

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS

RESUME

PREAMBULE 1

INTRODUCTION 2

PREMIERE PARTIE : LA GLANDE MAMMAIRE 3

I. DU DEVELOPPEMENT NORMAL AUX DERIVES CANCEREUSES: PRESENTATION DES ACTEURS IMPLIQUES 3

I.1. RAPPELS CONCERNANT L'ORGANOGENESE 3

I.1.1. Développement murin 3

I.1.1.1. La morphogenèse de la glande débute chez l'embryon. 3

I.1.1.2. De la naissance à la puberté (stades J 0 à J 25) 4

I.1.1.3. La maturation sexuelle (des stades 25 à 35 jours) 4

I.1.1.4. S'il y a gestation 4

I.1.2. Développement humain 5

I.1.2.1. Etape prénatale 5

I.1.2.2. A la naissance 5

I.1.2.3. Etape pubertaire 6

I.1.2.4. De la gestation à la lactation 6

I.2. LES HORMONES DANS LE DEVELOPPEMENT NORMAL ET CANCEREUX 6

I.2.1. Les androgènes 7

I.2.2. Les oestrogènes 8

I.2.3. La progestérone 9

I.2.4. Collaboration de la prolactine, de l'hormone de croissance, et des glucocorticoïdes	9
I.3. LES FACTEURS DE CROISSANCE DANS LE DEVELOPPEMENT NORMAL ET CANCEREUX	10
I.3.1. Les FGFs	10
I.3.1.1. <u>Le développement normal</u>	11
I.3.1.2. <u>Le développement tumoral</u>	12
I.3.2. Le TGFβ	13
I.3.2.1. <u>Le développement normal</u>	13
I.3.2.2. <u>Le développement tumoral</u>	13
I.3.3. L'HGF/SF	14
I.3.3.1. <u>Le développement normal</u>	14
I.3.3.2. <u>Le développement tumoral</u>	15
I.4. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE (MEC)	16
I.4.1. Les constituants de la matrice extracellulaire	16
I.4.1.1. <u>La matrice extra-cellulaire au sens large</u>	16
I.4.1.2. <u>La membrane basale</u>	16
I.4.2. Environnement matriciel et comportement cellulaire.	17
I.4.2.1. <u>Le développement normal</u>	17
I.4.2.1.1. <i>Synthèse et dépôt des composants de la MEC</i>	17
I.4.2.1.2. <i>Matrice et événements morphogénétiques et fonctionnels</i>	18
I.4.2.2. <u>Les cellules épithéliales mammaires cancéreuses et MEC</u>	19
I.4.2.2.1. <i>Interaction MEC /cellules épithéliales mammaires cancéreuses</i>	19
I.4.2.2.2. <i>En cas de cancer du sein, la MEC se modifie</i>	19
II. LES MECANISMES DE MIGRATION CELLULAIRE	21
II.1. DEGRADATION DE LA MEC ET PROTEASES CELLULAIRES	22
II.1.1. Protéases et développement de la glande mammaire	22
II.1.2. Protéases et cancers du sein	23

II.1.2.1. <u>Surexpression et accroissement de l'activité de la cathepsine D</u>	23
II.1.2.2. <u>Les métalloprotéases</u>	23
II.1.2.3. <u>Les activateurs du plasminogène</u>	24
II.1.2.4. <u>Inhibiteurs de protéases</u>	25
II.1.3. Cas particulier de l'uPA	25
II.1.3.1. <u>L'uPA et la vascularisation tumorale</u>	25
II.1.3.2. <u>Le système uPA en amont d'une cascade protéolytique</u>	26
II.1.3.3. <u>L'uPA activateur de facteurs de croissance</u>	27
II.2. INTERACTIONS CELLULES / MEC VIA LES INTEGRINES	28
II.2.1. Les intégrines: interactions cellules/matrice	28
II.2.1.1. <u>Morphogenèse normale</u>	28
II.2.1.2. <u>Au cours de la cancérogenèse</u>	29
II.2.2. Migration et interactions intégrines/cytosquelette	31
II.2.2.1. <u>Le cytosquelette est fortement impliqué dans la mobilité cellulaire</u>	31
II.2.2.2. <u>Interactions intégrines/molécules du cytosquelette</u>	32
II.2.3. Intégrines et système de transduction	33
II.3. E-CADHERINE ET I-CAM ET COHESION CELLULAIRES	34
II.3.1. L'E-Cadhérine	34
II.3.1.1. <u>E-cadhérine et cohésion des feuilletts épithéliaux</u>	34
II.3.1.1.1 <i>E-cadhérine et développement de la glande mammaire</i>	34
II.3.1.1.2. <i>E-cadhérine et cancer du sein</i>	35
II.3.1.2. <u>E-Cadhérine, cytosquelette et transduction du signal</u>	35
II.3.2. L'I-CAM-1	36
BILAN DE LA PREMIERE PARTIE ET PERSPECTIVES	36
<u>DEUXIEME PARTIE</u>	37
C-ETS-1 FACTEUR DE TRANSCRIPTION	37
I. LE PROTO-ONCOGENE C-ETS-1	37

I.1. LE RETROVIRUS E 26	37
I.1.1. L'oncogène <i>ets</i> : forme virale <i>v-ets</i> dans le virus E 26	37
I.1.2. <i>v-myb</i> et <i>v-ets/c-myb</i> et <i>c-ets-1</i>, proto-oncogènes	38
I.1.3. E 26 et cellules hématopoïétiques	39
I.1.4. <i>v-myb</i> et <i>v-ets</i> liés aux propriétés leucémogènes de E26	39
I.2 LES HOMOLOGUES CELLULAIRES DE V-ETS	40
I.2.1. Le proto-oncogène <i>c-ets-1</i> aviaire	40
I.2.2. Les proto-oncogènes humains et murins	41
I.3. C-ETS-1 FACTEUR DE TRANSCRIPTION	41
I.3.1. Chez le poulet	42
I.3.1.1. <u>Domaine de liaison à l'ADN</u>	42
I.3.1.2. <u>Domaines de régulation de la transcription</u>	42
I.3.1.3. <u>Domaines de répression intramoléculaire de la fixation à l'ADN</u>	43
I.3.1.4. <u>Domaine de régulation de la dégradation</u>	44
I.3.2. Chez l'homme	44
I.4. MODULATION DE L'EXPRESSION DU GENE <i>C-ETS-1</i>	44
I.4.1. Chez le poulet	44
I.4.2. Chez l'homme	45
I.4.3. Activation de la transcription et facteurs de croissance	46
I.5. MODULATION DE L'ACTIVITE DE LA PROTEINE C-ETS-1	47
I.5.1. Modulation de la fixation	47
I.5.1.1. <u>Modulation par les régions régulatrices</u>	47
I.5.1.2. <u>Modulation par phosphorylation</u>	47
I.5.1.3. <u>Modulation par compétition</u>	47
I.5.2. Modulation de l'activité transactivatrice	48
I.5.2.1. <u>Modulation par les régions régulatrices</u>	48
I.5.2.2. <u>Modulation par phosphorylation</u>	48
I.5.2.3. <u>Modulation par coopération avec d'autres facteurs</u>	48
I.6. LES SITES DE FIXATION A L'ADN	49

II. LA FAMILLE ETS	50
II.1 LA CARTE DE MEMBRE	50
II.1.1. Critère d'appartenance	50
II.1.2. Arbre phylogénétique	51
II.2. SPECIFICITES D'ACTION	51
II.2.1. Séquence nucléotidique et sélectivité d'action	51
II.2.2. Rôle des cofacteurs	52
II.2.2.1. <u>Gènes Ets et spécificité cellulaire</u>	52
II.2.2.2. <u>Les protéines Ets et le site AP-1</u>	53
II.2.2.3. <u>La protéine Erg active ou inhibe spécifiquement ses gènes cibles</u>	54
II.3. ETS ET LA TUMORIGENESE	55
II.3.1. <i>v-Ets</i> : le pionnier	55
II.3.1.1. <u><i>v-ets</i> induit une leucémie chez le poulet</u>	55
II.3.1.2. <u>Comment pourrait-on expliquer le rôle transformant de <i>v-ets</i> ?</u>	55
II.3.2. Translocations impliquant des gènes <i>ets</i>	56
II.3.2.1. <u>Les tumeurs d'Ewing</u>	56
II.3.2.2. <u>Autres cas humains</u>	57
II.3.3. Les leucémies de Friend	57
II.3.4. Ets-1 comme suppresseur de tumeur	58
II.4. ETS ET CELLULES HEMATOPOÏETIQUES	59
II.4.1. Les cellules érythroïdes	59
II.4.2. Protéines Ets et maturation des lymphocytes T	59
II.4.3. Protéines Ets et maturation des lymphocytes B	61
II.4.4. PU-1 et la lignée myéloïde	62
II.5. LE SYSTEME NERVEUX	62
II.6. LES SITUATIONS DE MIGRATION	63
II.6.1. Les patrons d'expression des gènes de la famille Ets	63
II.6.1.1. <u>La vasculogenèse et l'angiogenèse</u>	63

II.6.1.2. <u>Les cellules mésenchymateuses</u>	64
II.6.1.3. <u>Les cellules elles-mêmes en migration</u>	64
II.6.2. Gènes cibles des protéines Ets et migration	66
II.6.2.1. <u>Gènes codant des protéases</u>	66
II.6.2.2. <u>Gènes impliqués dans l'ancrage cellulaire</u>	66
II.6.2.2.1. <i>Gènes d'adhérence à la matrice</i>	66
II.6.2.2.2. <i>Gènes d'adhérence intercellulaire</i>	67
II.6.2.2.3. <i>Gènes du cytosquelette</i>	67
OBJECTIFS DE RECHERCHE	69

RESULTATS

PREMIERE PARTIE 70

L'expression de c-ets-1 et de l'uPA est associée à la tubulogenèse des cellules épithéliales mammaires ou à la dispersion des cellules cancéreuses

A. COURDENT-DELANNOY et al. 1996. International Journal of Developmental Biology, 40, 1097-1108.

CONTEXTE 70

RESUME 71

ARTICLE

ECLAIRAGES RECENTS 72

DEUXIEME PARTIE 74

L'expression constitutive d'un dominant négatif de Ets-1 dans les cellules épithéliales mammaires réduit la tubulogenèse et la dispersion en empêchant l'expression et l'activité de l'uPA

A. COURDENT-DELANNOY et al. Soumis à Journal of Cell Science

CONTEXTE 74

RESUME	75
ARTICLE	
ECLAIRAGES RECENTS	76
<u>TROISIEME PARTIE</u>	78
Ancrage cellulaire, migration et facteurs de transcription Ets	
INTRODUCTION	78
MATERIELS ET METHODES	81
Types cellulaires et conditions de culture	81
Western blot	82
Immunocytochimie (ICC)	83
Tests de morphogénèse	84
RESULTATS	85
I LE MUTANT DOMINANT NEGATIF DE ETS-1 A-T-IL UN EFFET SUR LA PRESENCE DES INTEGRINES $\alpha 2$ ET $\beta 1$?	85
I.1. Détection de la présence de l'intégrine $\alpha 2$	85
I.2. Détection de la présence d'intégrine	85
II EFFET DU TRAITEMENT PAR UN ANTICORPS ANTI- INTEGRINE $\alpha 2\beta 1$ SUR LA MORPHOGENESE DES NMUMG ET DES MMT DE TYPE SAUVAGE	86
III LE MUTANT DOMINANT NEGATIF DE ETS-1 A-T-IL UN EFFET SUR LA PRESENCE DES MOLECULES D'ADHERENCE INTER- CELLULAIRES?	86
IV LE MUTANT DOMINANT NEGATIF DE ETS A-T-IL UN EFFET SUR LA PRESENCE DE VIMENTINE?	87
DISCUSSION	88

**I LA PRESENCE DES INTEGRINES $\alpha 2$ ET $\beta 1$ EST INFLUENCEE
PAR L'EXPRESSION DU MUTANT DOMINANT NEGATIF DE ETS-1** 88

**II LA REPARTITION DES MOLECULES ASSURANT LA
COHESION EPITHELIALE EST MODULEE PAR LE DOMINANT
NEGATIF DE ETS-1** 90

**III LA REPARTITION DE LA VIMENTINE EST MODULEE PAR LE
DOMINANT NEGATIF DE ETS-1** 91

DISCUSSION GENERALE

I UPA/UPA-R ET PAI-1: COMPETITEURS OU COLLABORATEURS ?

94

**II LA FIXATION UPA/UPA-R PEUT GENERER UN SIGNAL DE
TRANSDUCTION MOTOGENE** 95

**II.1. L'activité protéolytique de l'uPA n'est pas nécessaire à la
signalisation de la migration** 95

**II.2. Les intégrines constituent un relai dans la transduction du signal
motogène** 96

**II.3. Le cytosquelette est impliqué dans la transduction du signal
motogène** 97

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 100

A mes parents

Parce qu'ils m'ont accompagnée depuis un quart de siècle sans faiblir ni faillir, parce que leur présence discrète mais effective est un atout précieux, parce que je leur dois la vie et les bonheurs dont elle m'a comblée, je leur dois bien cette dédicace.

Depuis le cours préparatoire jusqu'au DEA, maman me fait réciter mes leçons. Elle me bourre de jus d'orange et de kiwis en période d'examen, s'assure que j'ai bien mis mon cache-nez « c'est qu'il fait froid ce matin ! » et que j'ai mangé correctement le midi « sinon tu ne pourras pas bien travailler » (menace suprême). Que serais-je devenue sans ces recommandations de premier ordre ?

C'est sans doute à papa que je dois mes premières manip's d'enfants: les feux de Bengale dans le jardin qui enfument les voisins, les petits robots en cartons qui clignotent des yeux grâce à une connexion subtile entre deux ampoules et une pile (j'ai les plans si ça intéresse quelqu'un). Mais surtout, c'est la découverte de son microscope et de sa trousse à dissection d'écolier qui a fait naître chez moi l'intérêt pour la biologie.

Ces derniers temps votre dévouement pour le petit Louis, la confection de bons petits plats et votre soutien m'ont été d'un immense secours.

Pour toutes ces attentions et ces bons moments passés ensemble un simple remerciement est dérisoire. J'espère seulement que nos complicités dureront encore longtemps.

Cher X.D.

Voici maintenant quatre ans que nous travaillons ensemble et que je grignote vos barres aux céréales (ce sont celles aux pommes et abricots que je préfère). Quatre ans de réflexion, de manip's, d'écriture mais aussi de discussion à bâtons rompus sur des sujets pas forcément scientifiques (ça fait du bien). Par ma faute vous avez passé des week-end à corriger mes travaux d'écriture, mangé vos sandwiches en plein après midi parce que la science n'attend pas, occupé vos insomnies à vous préoccuper de mon sort. J'implore votre pardon pour tous ces désagréments et vous remercie cordialement pour votre disponibilité à toute épreuve.

SN3.3.

Je remercie également toute l'équipe de « l'Unité Dynamique des Cellules Embryonnaires et cancéreuses » à commencer par M. Boilly qui m'a accueillie dans son laboratoire. Je rends hommage aux « anciens » étudiants, en particulier William qui m'a beaucoup aidée, qui effectuent la formation « à la paillassse » des nouveaux étudiants.

Je n'oublie pas tous les autres manip'eurs qui m'ont donné, à un moment ou à un autre, un coup de pouce appréciable (Val. ; A.S.V. ; SD ; R.A. ; E.A. ; S.L. ; X.L.B ; H.H. ; A.R. ; M.S./ ; Isabelle. ; Super Mag.).

Merci également à Sylviane pour sa patience à toute épreuve, pour son record national de descente rapide des escaliers jusqu'à la photocopieuse, son calme devant les bons de commande et sa bonne humeur quotidienne.

Le groupe H.I.S de l'Institut Pasteur de Lille (devenu unité CNRS EP560 de l'Institut de Biologie de Lille) a été pour moi une deuxième famille d'accueil. Je suis extrêmement reconnaissante à l'égard tous ceux qui m'ont aidée au cours des expériences ou des réflexions que nous avons partagées. Merci notamment à Virginie Mattot, Véronique Fafeur et Bernard Vandebunder.

ABBREVIATIONS

ETS :	domaine de fixation à l'ADN des protéines Ets.
EBS :	sites de fixation pour les protéines Ets dans les promoteurs de gènes cibles.
kDa :	kilo Daltons
kpb :	kilo paires de bases
MEC :	Matrice Extracellulaire
uPA :	urokinase-type Plasminogen Activator
PAI :	Plasminogen Activator Inhibitor
MMP :	Matrix Metalloproteinase
TIMP :	Tissue Inhibitor Metalloproteinase
LTR :	Long Terminal Repeat
MEP :	Cellules souches, Myb Ets Progenitor
FGF :	Fibroblast Growth Factor
HGF :	Hepatocyte Growth Factor
TGF :	Transforming Growth Factor
EGF :	Epidermal Growth Factor
PDGF :	Platelet Derived Growth Factor
TNF α :	Tumor Necrosis Factor alpha
GMCSF :	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
IL-1 :	Interleukine 1

PUBLICATIONS:

1) A. Delannoy-Courdent, W. Fauquette, X.F. Dong-Le Bourhis, B. Boilly, B. Vandebunder and X. Desbiens. 1996. Expression of *c-ETS-1* and *uPA* genes is associated with mammary epithelial cell tubulogenesis or neoplastic scattering. *Int. J. Dev.Biol.* **40**, 1097-1108.

2) W. Fauquette, X.F. Dong-Le Bourhis, A. Delannoy-Courdent, B. Boilly and X. Desbiens. Characterisation of morphogenetic and invasive abilities of human mammary epithelial cells: correlation with variations of urokinase-type plasminogen activator activity and type-1 plasminogen activator inhibitor level. *Biol. Cell* Sous presse.

3) Delannoy-Courdent A., Mattot V., Fafeur V., Fauquette W., Pollet I., Calmels T., Vercamer C., Boilly B., Vandebunder B. and Desbiens X. Constitutive expression of a dominant negative mutant of the c-Ets1 transcription factor in mammary epithelial cells, decreases uPA proteolytic activity and cell motility, and impairs normal tubulogenesis and cancerous scattering. *J. Cell Sci.* Soumis.

COMMUNICATIONS:

1) A. Delannoy, W. Fauquette, F. Bouali. B. Boilly and X. Desbiens. 1995. C-ets-1, a proto-oncogene involved in both epithelial and mesenchymal cells during morphogenesis and metastatic process of mammary gland.

Congress of the European Developmental Biology Organisation, Toulouse, Juillet 1995

2) A. Delannoy-Courdent, W. Fauquette, X. Desbiens and V. Mattot, T. Calmels, C. Vercamer, A. Bègue, V. Fafeur, B. Vandebunder. 1996. The induction of epithelial tubular morphogenesis by fibroblast-derived soluble factors is inhibited by the expression of a dominant negative mutant of Ets-1

International Congress of the French Society of Developmental Biology (SFBD)
" Maternal and zygotic genes during embryonic development " Caen, 29-31 May 1996.

Résumé

Les déplacements cellulaires sont déterminants lors des mouvements de morphogenèse embryonnaire et critiques lors du processus de métastase en cas de cancer.

Les études que nous avons menées concernent les mécanismes d'activation du proto-oncogène *c-ets-1*, un facteur de transcription, et son rôle dans la migration des cellules épithéliales mammaires normales ou cancéreuses. Des cellules humaines normales cultivées seules en culture tridimensionnelle forment des lames épithéliales mais soumises à l'action de fibroblastes, elles forment des tubes ramifiés. Des cellules humaines cancéreuses invasives essaient dans toutes les conditions et cet essaimage est plus important sous stimulation fibroblastique. Une lignée cancéreuse non invasive forme des amas cellulaires compacts qui ne réagissent pas au(x) facteur(s) fibroblastique(s).

Nous avons démontré que *c-ets-1* s'exprime dans les cellules normales mais uniquement dans les cultures stimulées et au niveau des cellules qui migrent aux extrémités des tubules. Les cellules cancéreuses qui migrent de façon constitutive expriment *c-ets-1* dans toutes les conditions tandis que les cellules cancéreuses statiques n'expriment en aucun cas *c-ets-1*. Il est admis que les mouvements cellulaires sont possibles grâce à l'action de protéases qui permettent les remaniements de la matrice favorables à la migration. Un gène cible de *c-ets-1* est le gène de l'uPA qui une fois transcrit puis traduit permet la conversion plasminogène-plasmine. Dans tous les cas étudiés, l'expression de *c-ets-1*, quand elle existe, est corrélée à une forte expression d'uPA et nous avons montré qu'en induisant *c-ets-1*, on induit l'expression de l'uPA. Si *c-ets-1* est déjà exprimé, l'expression de l'uPA lui est associée.

Pour montrer que *c-ets-1* est bien impliqué dans la migration et la métastase, nous avons utilisé un mutant dominant négatif dans des cellules mammaires épithéliales murines soit normales, soit cancéreuses invasives qui ont le même comportement que leurs homologues humaines: *c-ets-1* est exprimé à l'extrémité des tubules normaux ou dans les cellules cancéreuses en essaimage. Lorsque les cellules expriment le dominant négatif, la tubulogenèse normale et l'essaimage sont complètement inhibés. De plus, aucune expression d'uPA n'a pu être détectée. Parallèlement l'activité enzymatique est fortement diminuée. Des tests de migration et d'invasion montrent enfin que le déplacement des cellules normales et cancéreuses est inhibé. Il est donc probable qu'en empêchant la dégradation de la matrice extracellulaire environnante, nous avons perturbé le déplacement cellulaire normal organisé et le processus d'invasion cancéreuse.

Des sites de liaisons pour les protéines ETS ont par ailleurs été découverts dans le promoteur de molécules d'interaction cellules-cellules et de molécules d'interaction cellules-substrats. Nous avons montré des modulations de production ou de localisation de ces substances sous l'effet du dominant négatif ce qui suggère que *c-ets-1* contrôle plusieurs mécanismes requis lors de toute migration cellulaire.

Mots clés : Glande mammaire, *c-ets-1*, oncogène, uPA, adhérence, tubulogenèse, invasion.

Centre de Biologie Cellulaire, Unité Dynamique des cellules embryonnaires et cancéreuses. Bâtiment SN3. Université des Sciences et Technologies de Lille I. 59655, Villeneuve d'Ascq Cédex.

PREAMBULE

La glande mammaire est un système dynamique dont la formation initiée chez l'embryon, ne se termine qu'à la première lactation, et qui subit des modifications cycliques physiques et fonctionnelles. Cet organe, cible de remaniements successifs, est à ce titre sujet à diverses régulations concernant la prolifération et la migration cellulaire. Si, lors du développement normal de la glande, ces régulations sont effectives et efficaces, il n'en n'est pas de même au cours des dysfonctionnements pathologiques. Le cancer du sein qui constitue une aggravation de ces anomalies, est dans la plupart des pays occidentaux industrialisés le cancer le plus fréquent chez la femme. Il représente en France la première cause de mortalité chez les femmes de 40 à 55 ans.

La découverte récente de gènes de prédisposition au cancer du sein, qui ne concernent qu'un pourcentage restreint de cas, ne suffit pas à éclairer les multiples aspects que prend la cancérogenèse de cet organe. Des amplifications de gènes de cancer ou « proto-oncogènes » ont été décrites dans plusieurs cas de cancer du sein. Par exemple, la surexpression de *Erb-B-2*, codant un récepteur à un facteur de croissance, l'héréguline, est corrélée à l'agressivité tumorale. Deux autres oncogènes, *Myc* et *CCND 1*, impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire peuvent aussi être amplifiés. Le passage de la croissance régulée à la croissance anarchique des cellules constitue bien entendu, une voie de recherche importante dans la compréhension des processus de cancérisation. Le contrôle des mécanismes invasifs est lui aussi essentiel dans la transition entre les déplacements organisés de cellules qui aboutissent à la formation de canaux galactophores, et les migrations dérégulées qui mènent à la métastase. Nous nous sommes proposés d'explorer ce dernier point en particulier à travers l'implication d'un proto-oncogène, *c-ets-1*, connu pour être, entre autre, associé à des phénomènes de déplacements cellulaires.

INTRODUCTION

Les modifications morphologiques et fonctionnelles subies par la glande mammaire et induites par des facteurs externes ou intrinsèques à l'organe, donnent lieu à une succession de remodelages tissulaires et de déplacements cellulaires. Ces événements nécessitent l'activation d'une batterie de gènes gérant des mécanismes distincts tels que la dégradation de l'environnement matriciel, l'adhérence des cellules aux composants de la matrice et la cohésion des cellules entre elles. L'itinéraire établissant le lien entre le signal qui parvient à la surface cellulaire et aboutit à l'activation des gènes intéressés est loin d'être éclairci. Cependant, le passage par l'activation de facteurs de transcription semble inévitable. Parmi ces facteurs, le proto-oncogène *c-ets-1* a attiré notre attention.

Avant d'exposer les résultats de nos recherches, nous introduirons dans une première partie des données concernant le développement normal et cancéreux de la glande mammaire, et dans une seconde partie nous présenterons le proto-oncogène *c-ets-1*.

PREMIERE PARTIE : LA GLANDE MAMMAIRE

I. DU DEVELOPPEMENT NORMAL AUX DERIVES CANCEREUSES: PRESENTATION DES ACTEURS IMPLIQUES

I.1. RAPPELS CONCERNANT L'ORGANOGENESE

Le développement de la glande mammaire commence au cours de l'embryogenèse et se poursuit après la naissance, pendant la puberté. L'ébauche formée se remodelera ensuite périodiquement lors de gestations successives.

I.1.1. Développement murin

Les différentes étapes de la formation de la glande mammaire de souris ont été décrites par Imagawa et al.(1994) et Sakakura (1991) et sont reportées sur la figure 1.

I.1.1.1. La morphogenèse de la glande débute chez l'embryon.

- Dès le 10^e jour de développement (stade E10) apparaît une bande d'ectoderme surélevée qui s'étend de la racine du membre antérieur à la base du membre postérieur en position dorso-latérale, de chaque côté du tronc.
- Au stade E11, à l'intérieur de cette bande mammaire, un étroit ruban ectodermique va alors faire saillie et constituer la crête mammaire.
- Les cellules de cette crête vont migrer du côté ventral et se regrouper en 5 amas ectodermiques distincts (E 12) pour former de véritables ébauches mammaires individuelles ou points mammaires situés au niveau du thorax (3 paires) et des régions inguinales (2 paires), (Fig. 1 A).
- Le stade lenticulaire (E 13) est caractérisé par l'enfoncement de l'ébauche mammaire dans le derme (Fig. 1 B).
- Au stade E 14, l'ébauche lenticulaire a augmenté de taille pour former le bourgeon mammaire primaire ou primitif (Fig. 1 C). Le mésenchyme sous-jacent se modifie, une partie des cellules se regroupe en couches parallèles tout autour du bourgeon épithélial pour constituer le

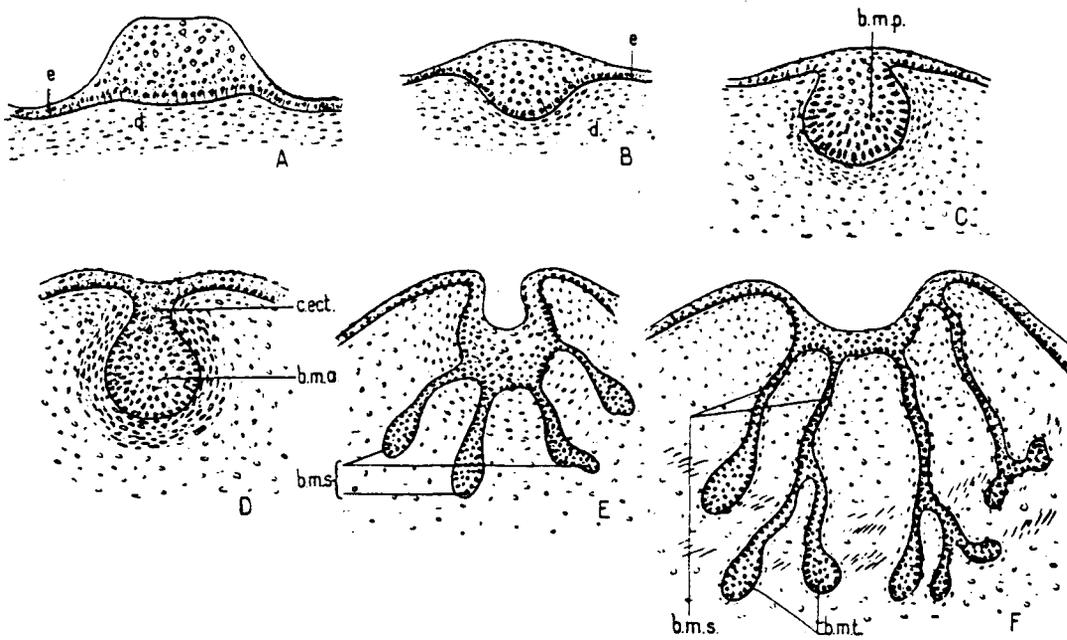


Fig. 1 : Développement embryonnaire de la glande mammaire.

A : Point mammaire formé dans la crête mammaire. B : Ebauche lenticulaire. C : Ebauche au stade du bourgeon mammaire primitif (b.m.p). D : Stade en massue, formation du bourgeon mammaire allongé (b.m.a) et du col ectodermique (c.ect.). E : Bourgeonnement de l'ébauche primaire pour constituer des bourgeons secondaires (b.m.s.). F : Allongement des bourgeons secondaires et formation des bourgeons tertiaires (b.m.t.). e : ectoderme. d : derme. D'après Grassé, *Traité de zoologie*.

mésenchyme dense, une partie plus éloignée du bourgeon va former le précurseur du tissu adipeux.

- Le bourgeon mammaire involue alors chez l'embryon mâle, mais s'enfonce progressivement dans le mésenchyme de l'embryon femelle de façon à former, au stade E 16, un bourgeon mammaire allongé constitué d'une extrémité distale enflée reliée à l'épiderme par un étroit pédoncule (Fig. 1 D).

- L'extrémité distale du bourgeon mammaire émet, par prolifération de l'assise basale, plusieurs bourgeons secondaires puis tertiaires qui s'allongent en cordons cellulaires pénétrant le mésenchyme et représentant l'ébauche des canaux galactophores (Fig. 1 E, F).

I.1.1.2. De la naissance à la puberté (stades J 0 à J 25), la glande mammaire ne subit pas de bouleversements morphologiques importants (Knight and Peaker, 1982).

- A la naissance (stade J 0), la glande mammaire est constituée d'une arborisation épithéliale rudimentaire (15 à 20 canaux) d'environ 2 mm de longueur enfouie dans un tissu de soutien lâche dont elle est séparée par une membrane basale.

- Jusqu'à la puberté la glande subit une croissance isométrique : son volume augmente simultanément avec la croissance du corps de l'animal.

I.1.1.3. Lors de la maturation sexuelle (des stades 25 à 35 jours), les extrémités terminales des canaux mammaires reprennent leur croissance (Fig. 2).

- Le degré de branchement des canaux s'accroît. Aux extrémités de ces canaux des bourgeons terminaux se forment et envahissent le tissu adipeux mammaire adjacent.

- Chaque canal est alors constitué d'une couche interne de cellules épithéliales luminales entourée d'une couche de cellules myoépithéliales séparée du mésenchyme par la membrane basale.

I.1.1.4. S'il y a gestation, les canaux vont produire de nouveaux bourgeons mammaires.

- Ces bourgeons subissent une différenciation en structures lobulo-alvéolaires. Le tissu adipeux est alors complètement masqué.

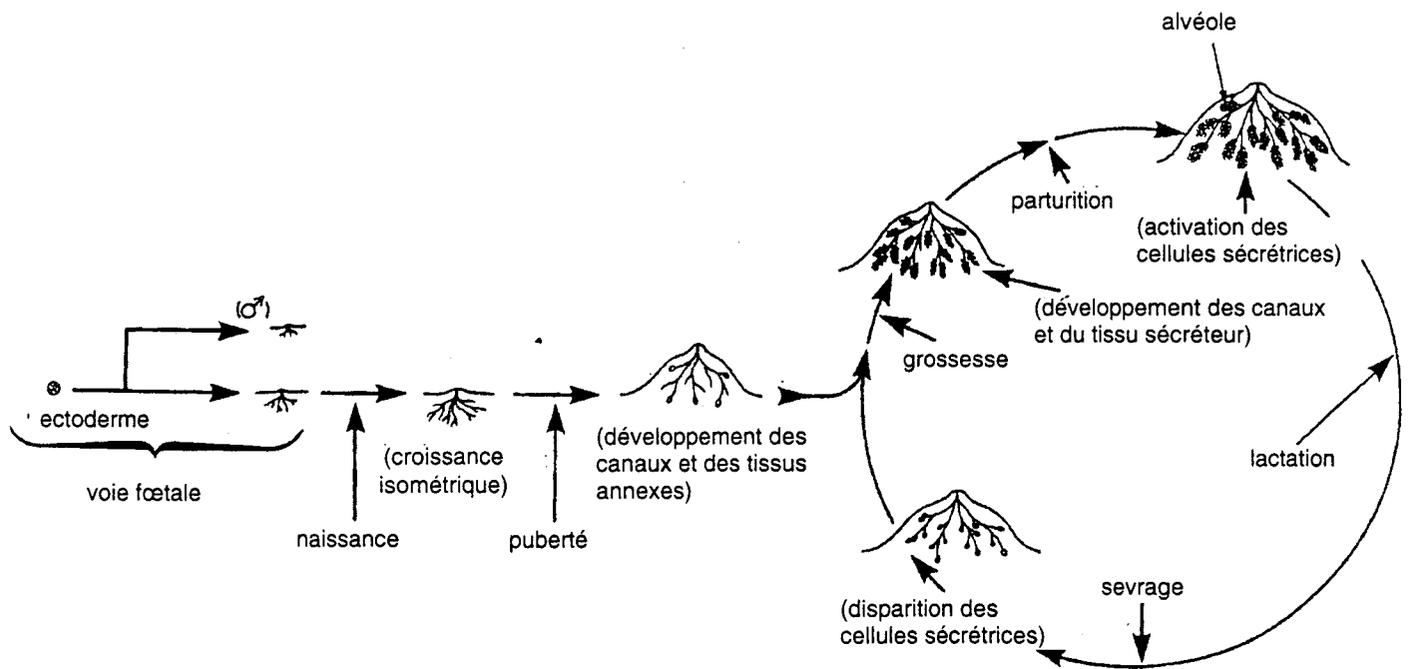


Fig. 2 : Phases de croissance post-natales de la glande mammaire.

D'après Espie et Gorins, 1995.

- Lors de la lactation, l'épithélium situé à l'intérieur de ces structures produit les protéines du lait. Ce dernier est expulsé par les canaux galactophores dont les cellules se contractent sous l'effet de l'ocytocine.
- Pendant la phase d'involution, les cellules sécrétrices de lait se détachent et la glande mammaire retrouve l'état qu'elle avait avant la gestation. Il y a donc diminution du nombre de lobules et augmentation de la masse du tissu adipeux.

I.1.2. Développement humain

Les étapes du développement mammaire chez la femme sont les mêmes que celles décrites chez la souris, mais suivent un calendrier différent.

I.1.2.1. Etape prénatale

- La crête mammaire apparaît dès la 4^e semaine de développement embryonnaire (embryon de 8 mm), elle s'étend de la future aisselle à la future aine. Des épaissements symétriques vont se former dans cette crête pour constituer une paire de bourgeons mammaires. La crête disparaît à la 6^e semaine, seuls subsistent les deux bourgeons.
- Au 5^e mois de développement, le bourgeon mammaire émet 15 à 20 prolongements cylindriques plein dans le mésoderme sous-jacent. Ces cordons se ramifient et se dilatent à leur extrémité. Vers les 7^e et 8^e mois, ces prolongements se creusent d'une lumière pour former les futurs canaux galactophores. Ces canaux s'ouvrent sur une au fond d'une petite dépression située à l'emplacement du futur mamelon.

I.1.2.2. A la naissance, la glande est réduite à un court système de tubules

- La glande mammaire présente en surface, en léger relief, le futur mamelon au sommet duquel s'ouvrent les 15 à 20 orifices des canaux galactophores. L'aréole n'est qu'un faible épaissement de la peau. A ce stade, il n'y a aucune différence entre garçon et fille.
- Peu après la naissance, le mamelon fait une petite saillie et l'aréole se pigmente légèrement. Chez le garçon, la mamelle restera à ce stade toute la vie.

- Jusqu'à la puberté, chez la fille, on n'observe qu'une légère augmentation de la ramification des canaux galactophores et une tendance à la lobulation par développement du tissu conjonctif.

I.1.2.3. Etape pubertaire

- Les modifications morphologiques sont très importantes, mais surtout dues à une augmentation du volume de tissu adipeux, car le développement des canaux galactophores et des acini reste modéré. On observe alors une augmentation du volume du sein, une saillie du mamelon, une pigmentation rosée et un élargissement de l'aréole. Les lobules rassemblant plusieurs acini ne se forment qu'après la première ovulation.

I.1.2.4. De la gestation à la lactation

- Dès le début de la grossesse, les seins augmentent de volume, l'aréole se pigmente comme le mamelon et prend un aspect grenu. L'extension des canaux galactophores se produit pendant les six premiers mois de grossesse et la différenciation des acini glandulaires ne se fait qu'au cours des trois derniers mois.

- Après l'accouchement, pendant 2 à 3 jours, le colostrum, fluide et jaunâtre est sécrété. Au 3^e jour, cette sécrétion devient du lait. La glande mammaire n'achève donc son développement qu'avec la première lactation, quand les acini sont parfaitement différenciés.

- Lorsque la lactation est terminée, la glande diminue très nettement de volume.

Les multiples modifications morphologiques et fonctionnelles auxquelles est soumise la glande mammaire correspondent à des remodelages tissulaires qui mettent en jeu des interactions entre l'épithélium et le mésenchyme. Le dialogue entre ces deux compartiments se réalise à la fois grâce aux signaux véhiculés par les hormones et les facteurs de croissance et grâce à la matrice extracellulaire (MEC) qui constitue un support informatif pour les cellules.

I.2. LES HORMONES DANS LE DEVELOPPEMENT NORMAL ET CANCEREUX

La succession des différentes phases de la morphogenèse de la glande mammaire implique l'alternance de périodes de prolifération et de différenciation cellulaire. Le

comportement des cellules est conditionné par diverses hormones dont l'action dirige les bouleversements survenant lors d'événements comme la puberté, la gestation ou la lactation. Des anomalies du contrôle hormonal sont corrélées avec l'apparition de cancers du sein qui peuvent prendre de multiples formes. Les études réalisées sur des patientes atteintes de cancer du sein aboutissent parfois à des constats forts divergents en ce qui concerne les corrélations entre taux d'hormones et malignité, cela en raison de la diversité des cas. De plus, les résultats varient en fonction de facteurs propres à chaque personne tels que l'âge, le degré d'obésité, le mode d'alimentation, les pathologies spécifiques au métabolisme des hormones, l'exposition à d'autres critères de risque comme l'alcoolisme. Cependant, au regard d'études épidémiologiques et d'expériences réalisées chez l'animal, on peut tracer quelques axes de réflexion.

I.2.1. Les androgènes

Nous l'avons vu précédemment, au 14^e jour de développement embryonnaire, le bourgeon mammaire involue chez le mâle alors qu'il poursuit son développement chez la femelle. Les expériences de Raynaud et al (1947) montrent que la destruction des gonades du fœtus mâle entraîne un développement mammaire analogue à celui observé chez le fœtus femelle. Parallèlement, l'injection de testostérone chez un embryon femelle inhibe le développement mammaire. L'inhibition par les androgènes est due à une condensation du mésenchyme qui se resserre autour du pédoncule du bourgeon mammaire jusqu'à ce que ce dernier se détache de l'épiderme et involue. Les cellules mésenchymateuses entourant le bourgeon possèdent en effet des récepteurs aux androgènes dont la présence est induite par l'épithélium mammaire quel que soit le sexe de l'embryon (Heuberger et al., 1982). Ces récepteurs ne seront stimulés par la testostérone que chez le mâle, ce qui aura pour conséquence d'isoler du bourgeon mammaire.

Chez les femmes atteintes de cancer du sein, une diminution des taux de production et d'excrétion de DHA (Dehydroépiandrostérone) est décrite (Rozenbaum, 1995). Un métabolite de la DHA pourrait se comporter comme un inhibiteur compétitif des oestrogènes sur les tissus cibles et le rôle protecteur de cet androgène disparaîtrait alors en cas de cancer.

I.2.2. Les oestrogènes

Des injections d'oestrogènes chez des souris ovariectomisées déclenchent une croissance des bourgeons terminaux. La présence de sites de fixation a pu être mise en évidence dans le compartiment épithélial de ces bourgeons ainsi que dans le mésenchyme mammaire (Haslam et Nummy, 1992). Les oestrogènes stimulent la synthèse d'ADN d'abord dans les cellules du mésenchyme puis dans les cellules épithéliales. Ceci suggère que l'action des oestrogènes sur la croissance des cellules épithéliales est due à une stimulation par des facteurs provenant des cellules mésenchymateuses (Shyamala et Ferenczy, 1984). Cette hypothèse est renforcée par le fait que, *in vitro*, la croissance des cellules épithéliales pouvant pousser en absence d'oestrogènes n'est pas stimulée par ces hormones alors qu'elle augmente dans des co-cultures avec des fibroblastes mammaires en présence d'oestrogènes (Haslam, 1986).

Les oestrogènes peuvent aussi jouer un rôle indirect dans le développement de la glande mammaire en stimulant la sécrétion de prolactine par l'hypophyse ou en augmentant la production locale de facteurs de croissance morphogènes. De plus, les oestrogènes sont capables d'augmenter le taux de récepteurs à la progestérone sur les cellules épithéliales (Haslam et Shyamala, 1979, 1980, 1981).

Les premières études concernant les oestrogènes et l'apparition de cancer mammaires sont dues à Lacassagne, dès 1932 (revue dans Rozembaun, 1995). Il constate en effet, la formation d'adénocarcinomes mammaires chez des souris mâles après injection de « folliculine ». Il propose alors deux explications qui constitueront les fondements des futures recherches : soit en favorisant le maintien de la glande mammaire, la folliculine permet à un caractère héréditaire latent de se manifester, soit la stimulation de la glande par l'hormone est la cause déterminante de la cancérisation. Ainsi se pose le problème des relations oestrogènes-cancer du sein, ces hormones pouvant révéler une prédisposition au cancer du sein, ou se comporter comme facteur carcinogène en tant qu'activateur de la prolifération. Des taux d'oestrogènes plus élevés que la normale ont été observés chez des femmes atteintes de cancer du sein et attestent de ce double rôle (Bernstein et al., 1990).

D'autre part, l'étude de l'ARNm du récepteur à l'oestradiol dans les cancers du sein montre qu'il existe des délétions et des mutations ponctuelles de ce récepteur ou des formes variantes, dues à un épissage alternatif du gène (Rennie et al., 1993). Ces anomalies entraîneraient alors un dysfonctionnement.

I.2.3. La progestérone

La progestérone intervient à la fois dans le développement lobulo-alvéolaire et canalaire et la régulation de la synthèse de lait. Lors de la gestation, la progestérone inhibe la synthèse de caséine en stimulant la production d'un facteur inhibiteur, le PMF (Pregnancy-specific Mammary nuclear Factor) qui se lie sur deux sites situés dans la région promotrice du gène de la caséine (Lee et Oka, 1992). En fin de gestation, la glande mammaire a atteint son maximum de développement lobulo-alvéolaire, le taux de récepteurs à la progestérone diminue alors. Après la parturition, une chute du taux de progestérone induit une diminution du taux de PMF ce qui permet la lactation.

Il existe deux théories mettant en jeu la progestérone dans la genèse des cancers du sein. L'une propose que, pendant une période précédant l'apparition des cycles menstruels ovulatoires et la période pré-ménopausique, une imprégnation oestrogénique non ou mal contrebalancée par la progestérone favorise l'induction du cancer du sein (Rozenbaum, 1985). L'autre indique que la progestérone sécrétée dans la deuxième partie du cycle menstruel, ou les progestatifs de synthèse, favorise l'apparition ultérieure de cancers du sein (Key et Pike, 1988). Comme nous le disions plus haut, la complexité des cas ne permet pas d'infirmier ou de confirmer définitivement les pistes avancées.

I.2.4. Collaboration de la prolactine, de l'hormone de croissance, et des glucocorticoïdes

Les effets des oestrogènes sont nettement amoindris chez des animaux ayant subi une hypophysectomie et une surrénalectomie. Des injections d'extraits hypophysaires, de prolactine et d'hormone de croissance en association avec des glucocorticoïdes et des oestrogènes vont rétablir le développement normal de la glande. L'injection simultanée de progestérone,

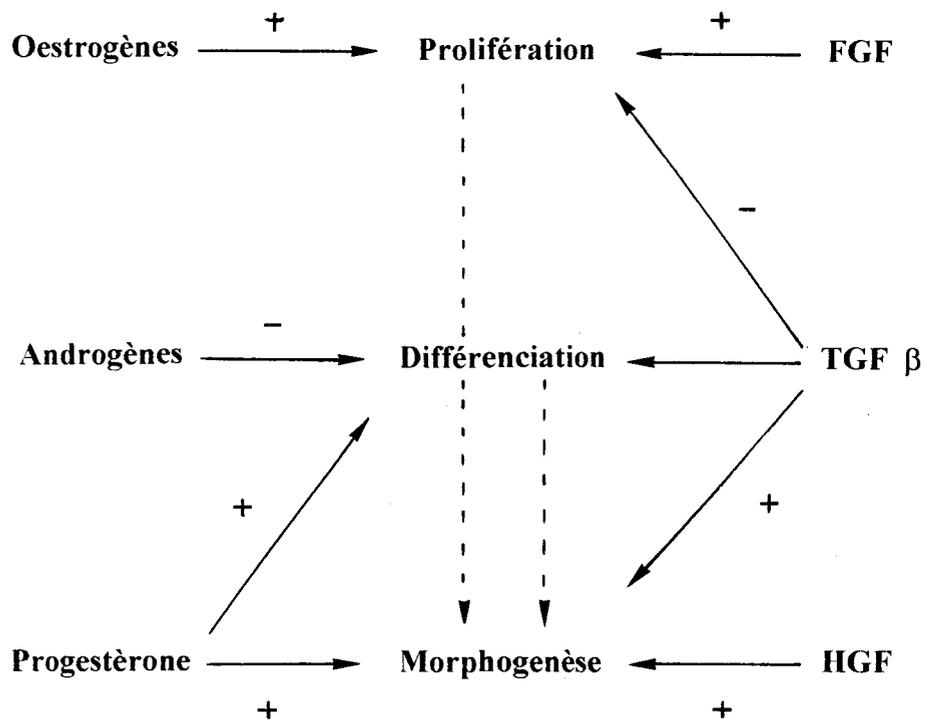


Fig. 3 : Facteurs solubles acteurs de la morphogènèse épithéliale.

+ : activation - : inhibition

oestrogènes et prolactine aboutit à la formation de lobules de petites tailles alors que l'adjonction d'hormone de croissance à ces trois hormones entraîne un développement des acini (ou alvéoles) complet (Talwalker et Meites, 1961). Lors de la grossesse chez la femme, le développement complet de la glande mammaire en acini peut être corrélé avec de hauts niveaux d'oestrogènes, de progestérone et de prolactine (Jacobs, 1977). Le rôle de cette dernière dans la lactation a pu être démontré par des expériences où des animaux hypophysectomisés ne restaurent un taux normal de synthèse de lait qu'après injection de prolactine (Cowie et al., 1969).

Les indications portant sur le lien entre ces hormones et les cancers du sein restent pauvres. Il a été observé des taux de prolactine plus élevés chez des membres de familles à multiples cas de cancer du sein (Rosenbaum et al., 1995).

I.3. LES FACTEURS DE CROISSANCE DANS LE DEVELOPPEMENT NORMAL ET CANCEREUX

La glande mammaire est soumise non seulement à l'action des hormones, mais aussi à celle des facteurs de croissance (Fig. 3) qui influencent la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que la morphogénèse, permettant la croissance canalaire et la synthèse de lait. Nous nous proposons d'explorer le rôle de facteurs prépondérants dans le développement et la cancérogenèse de la glande.

I.3.1. Les FGFs

La famille des « Fibroblast Growth Factors » (FGF) se compose actuellement de 14 membres dont les plus étudiés sont le FGF acide (FGF-1) et le FGF basique (FGF-2). Ils interagissent avec des récepteurs membranaires de haute affinité, à activité tyrosine kinase de quatre types (FGF-R1 à FGF-R4). Ces facteurs sont aussi capables de se lier à des sites de fixation de plus faible affinité de type Héparane Sulfate Protéoglycanes (HSPG) servant à la fois de lieu de stockage et de présentation du FGF (Delehedde et al., 1996).

I.3.1.1. Le développement normal

La description des lieux de synthèse des FGFs dans la glande est un indicateur du rôle de ces facteurs. Des études *in vitro* montrent que les FGF-1 et 2 sont produits respectivement par des fibroblastes mammaires et des cellules myoépithéliales mammaires (Barraclough et al., 1990). *In vivo*, Gomm et al. (1991) ont mis en évidence la présence de FGF-2 au niveau des cellules épithéliales de sein humain. Chez le rat, une étude immunologique fine, réalisée par Rudland et al. (1993), a permis de localiser précisément la présence de FGF-2 dans les différents types cellulaires, en fonction du stade de développement de la glande mammaire. Dans les canaux en quiescence et dans les alvéoles lors de la gestation et de la lactation, le FGF-2 est localisé principalement au niveau de la membrane basale et plus discrètement dans les cellules myoépithéliales. Au contraire, dans les canaux et les bourgeons terminaux en croissance, le FGF-2 a été détecté au niveau des cellules épithéliales et myoépithéliales, c'est-à-dire dans des cellules en prolifération. Une étude détaillée a permis de détecter l'expression de différents membres de la famille des FGFs dans les divers composants de la glande mammaire à différents stades (Coleman-Krnacik et Rosen, 1994). Alors que le FGF-3 (*int 2*) et le FGF-5 ne sont jamais exprimés, le FGF-1, le FGF-2, le FGF-4 (*hst/k-FGF*) et le FGF-7 (KGF) sont exprimés lors des stades de croissance canalaire et parfois lors de la gestation et de la lactation mais à des niveaux réduits (FGF-1) ou quasiment nuls (FGF-2). Dans le cas du KGF, c'est la taille du transcrite qui est modifiée lors de la lactation. Quant à la localisation des ARNm de ces différents facteurs, il semble que le FGF-1 soit exprimé dans les cellules luminales, le FGF-2 dans les cellules mésenchymateuses et myoépithéliales, le KGF exclusivement dans le mésenchyme et que l'expression du FGF-2 et du KGF dans le mésenchyme soit induite par l'épithélium mammaire. L'expression exclusive du KGF dans les cellules mammaires mésenchymateuses a été confirmée *in vitro* par Wilson et al. (1994) et son effet sur la croissance des canaux mammaires a pu être mis en évidence chez des rats et des souris (Ulich et al., 1994 ; Yi et al., 1994).

La présence des récepteurs à haute affinité des FGFs a pu être décelée dans la glande mammaire par hybridation *in situ*, PCR et analyse de Scatchard. L'expression du FGF-R2 (sous la forme de deux transcrits codant l'un pour le récepteur appelé Bek et l'autre pour le

récepteur du KGF) a été démontrée sur des bourgeons mammaires d'embryon de souris à E14,5 (Orr-Urtreger et al., 1993). De même l'expression du FGF-R1 a pu être détectée sur des coupes de sein humain au niveau des canaux épithéliaux (Jacquemenier et al., 1994) et peut être accompagnée d'une expression du FGF-R2 (Luqmani et al., 1992). Ainsi, il apparaît que les cellules épithéliales mammaires grâce à leur récepteurs, peuvent voir stimuler leur prolifération par le FGF, qu'il provienne de l'épithélium ou du mésenchyme.

1.3.1.2. Le développement tumoral

La présence de ces facteurs aux propriétés motogènes et mitogènes a été recherchée dans glande mammaire au cours de la cancérogenèse. L'amplification du proto-oncogène *int-2* (FGF-3) détectée dans un grand nombre de tumeurs mammaires, est plus importante dans les cas de rechute que dans les tumeurs primaires (Lidereau et al., 1988; Machotka et al., 1989). *int-2* apparaît donc comme un indicateur de mauvais pronostic au cours de la progression tumorale. Une co-amplification de *hst* (FGF-4) et *int-2* a été également observée dans les tumeurs de sein ainsi qu'une amplification du FGF-6 (Theillet et al., 1989; Dib et al., 1994). La présence des FGF-1 et 2 dans les tissus mammaires cancéreux faciliterait l'angiogenèse tumorale et par conséquent le développement de la tumeur (Anandappa et al., 1994). L'expression des ARNms et des protéines FGF-1 et 2 par des lignées tumorales mammaires hormono-dépendantes et indépendantes a pu être mise en évidence lors d'études *in vitro* (Flamm et al., 1989; Li et Shipley, 1991; Anandappa et al., 1994; El Yazidi et Boilly-Marer, 1995; Renaud et al., 1996). La croissance de cellules épithéliales mammaires tumorales peut d'ailleurs être stimulée par ces deux facteurs (Takahashi et al., 1989; Peyrat et al., 1991; Yamaguchi et al., 1992).

La présence de récepteurs à haute affinité des FGFs a également pu être détectée dans les tumeurs et les lignées cancéreuses mammaires. Il existe dans les tumeurs mammaires une amplification des gènes codant les récepteurs *Bek* (FGF-R1) et *Flg* (FGF-R2) (Adnane et al., 1991). Dans le cas de *Flg*, on peut rencontrer une co-amplification avec *int-2* et *hst* suggérant l'existence d'une boucle autocrine d'amplification. Des sites de fixations de haute et de basse affinité pour les FGFs ont pu être mis en évidence dans des biopsies cancéreuses mammaires (Luqmani et al., 1992 ; Wilson et al., 1994). L'expression du FGF-R1 a été localisée par hybridation *in situ* dans le compartiment épithélial (Jacquemenier et al., 1994), et des études *in*

vitro ont permis la caractérisation de récepteurs de type HSPG sur des lignées épithéliales mammaires cancéreuses (Peyrat et al., 1991; Luqmani et al., 1992; Wilson et al., 1994; Mc Leskey et al., 1994; Delehedde et al., 1996, 1997).

I.3.2. Le TGF β

I.3.2.1. Le développement normal

Le « Transforming Growth Factor β 1 » (TGF β 1) a un double rôle d'inhibiteur de prolifération et de facteur morphogène dans le modèle de la glande mammaire. Des implants contenant du TGF β 1 introduits dans des glandes mammaires de souris inhibent la croissance des canaux en développement mais pas la formation des alvéoles lors de la gestation (Silberstein et Daniel, 1987; Daniel et al., 1989). *In vivo*, le TGF β 1 est exprimé d'une part, par les cellules épithéliales des canaux en croissance, en quiescence ou lors de la gestation et d'autre part, par les cellules du mésenchyme (Robinson et al., 1991). La localisation du TGF β 1 a pu être déterminée par immunohistochimie au niveau de la membrane basale entourant les canaux mammaires mais pas au niveau des bourgeons terminaux. Ainsi, le TGF β 1 permettrait l'augmentation de synthèse des composants matriciels qui, en s'accumulant, canaliserait le positionnement des cellules. Parallèlement, le TGF β 1 déposé à la périphérie des canaux jouerait son rôle d'inhibiteur de prolifération stabilisant la croissance des cellules (Silberstein et al., 1990 ; 1992). En outre, le TGF β 1 peut réguler la différenciation des cellules épithéliales en inhibant la synthèse de caséine et d' α -lactalbumine lors de la gestation (Daniel et Robinson, 1992; Yamamoto et al., 1994; Sudlow et al., 1994). Associée à d'autres événements, la chute du taux de TGF β 1 lors de la lactation permet d'entraîner les cellules sur la voie d'une différenciation terminale caractérisée par la synthèse de caséine.

I.3.2.2. Le développement tumoral

Le rôle de ce facteur dans la cancérogenèse de la glande mammaire reste à préciser. *In vitro*, le TGF β 1 induit une inhibition de croissance de lignées épithéliales cancéreuses mammaires exprimant le TGF β 1 ainsi que ses récepteurs (Arteaga et al., 1988; Sun et al., 1994). D'autres études ont montré dans ce sens que la croissance de cellules hormono-sensibles s'accompagne d'une baisse d'expression du TGF β 1 et que l'inhibition de croissance cellulaire

est associée à la stimulation de l'expression du TGF β 1 après traitement des cellules par des anti-oestrogènes (Arrick et al., 1990; Knabbe et al., 1987, 1888). Par contre, les études réalisées *in vivo* ont souvent montré une corrélation positive entre la présence de TGF β 1 et la progression de la maladie (Walker et al., 1994). De même, le traitement d'une lignée normalement régressive par du TGF β 1 induit cette lignée à produire des tumeurs après transplantation (Li et al., 1993). On peut concevoir que lors de la cancérogenèse, l'effet inhibiteur de prolifération du TGF β 1 peut être masqué par les conséquences de sa capacité à stimuler la synthèse des éléments de la matrice extracellulaire. En effet, l'accumulation de la matrice agirait comme support à la migration des cellules et faciliterait ainsi la progression tumorale. Les auteurs qui se sont penchés sur l'effet du TGF β précisent que celui-ci dépend de la quantité effective de protéine produite, des différents types de TGF β présents (β 1, β 2, β 3), du stade de la tumeur, des traitements reçus par les patients et de la localisation tissulaire de l'expression et du produit du gène (Mc Callum et al., 1994; Benson et Baum, 1994).

I.3.3. L'HGF/SF

Un autre facteur de croissance pouvant influencer la croissance mammaire est « l'Hepatocyte Growth Factor » (HGF), appelé également « Scatter factor » (SF). Celui-ci est synthétisé sous forme d'un précurseur, le pro-HGF/SF, qui, après clivage en deux chaînes, forme l'HGF/SF mature présentant une structure tridimensionnelle en boucle. L'HGF/SF agit au niveau cellulaire par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire codé par le proto-oncogène *c-met* (Naldini et al., 1991; Weidner et al., 1993). Ce facteur, tout comme le FGF-2, possède des propriétés angiogènes (Grant et al., 1993). Il est également capable d'induire la dispersion de cellules épithéliales rénales cultivées sur fond de boîte et la tubulogenèse de ces cellules en culture tridimensionnelle (Montesano et al., 1991 a et b). Ce rôle dans la morphogenèse tubulaire est bien sûr au centre des recherches effectuées sur l'implication de ce facteur dans le développement de la glande mammaire.

I.3.3.1. Le développement normal

Wilson et al. (1994) ont mis en évidence par PCR l'expression des ARNm de l'HGF/SF et de son récepteur dans des tissus mammaires normaux sans pouvoir déterminer le

compartiment exact d'expression. Des expériences *in vitro* ont pu montrer que des fibroblastes mammaires normaux murins et humains produisent de l'HGF/SF alors que les lignées épithéliales mammaires expriment le récepteur c-Met (Sasaki et al, 1994; Niranjana et al., 1995). Ces dernières cellules sont capables de former des tubules sous l'action de l'HGF/SF lorsqu'elles sont cultivées en gel de collagène (Soriano et al., 1995; Brinkmann et al., 1995). Lors d'études *in vivo*, Tsarfati et al. (1992) ont pu détecter par immunohistologie la présence du récepteur c-Met dans du tissu mammaire normal humain au niveau des cellules épithéliales bordant la lumière des canaux. D'autre part, Yang et al. (1995) ont localisé l'expression de l'HGF/SF dans le mésenchyme mammaire. Ces mêmes auteurs ont montré sur des glandes mammaires en culture organotypique, que l'HGF/SF entraîne la formation de ramifications canalaire alors que cette morphogenèse peut être inhibée en bloquant l'expression endogène d'HGF/SF par des oligonucléotides antisens. Ces différents résultats indiquent que les cellules épithéliales mammaires grâce à leur récepteur c-Met répondent au signal HGF/SF émis par les cellules mésenchymateuses, en s'organisant en structures tubulaires ramifiées.

L'expression de l'HGF/SF et de son récepteur est régulée lors des différents stades de morphogenèse de la glande mammaire. Cette expression diminue de façon importante lors de la gestation, elle devient indétectable lors de la lactation et reprend lors de l'involution (Pepper et al., 1995). La prolactine peut réguler négativement le niveau d'expression de *c-met*, expliquant la faible présence du récepteur pendant la lactation.

I.3.3.2. Le développement tumoral

Des taux importants d'HGF/SF dans les tumeurs mammaires sont associées à un mauvais pronostic (Nagy et al., 1996; Yamashita et al., 1994). L'expression de l'HGF/SF est de façon générale localisée dans les cellules stromales des tumeurs mammaires, mais peut également apparaître dans les cellules épithéliales (Rahimi et al., 1994; Wilson et al., 1994; Wang et al., 1994; Nagy et al., 1996). L'expression de *c-met*, récepteur de l'HGF/SF, a été décrite à la fois dans le compartiment épithélial et le compartiment stromal des tumeurs mammaires ainsi que dans des lignées épithéliales mammaires en culture *in vitro* (Tsarfati et al., 1992; Byers et al., 1994; Wilson et al., 1994; Nagy et al., 1996). Il semble donc que l'HGF/SF, synthétisé par les cellules du stroma, agisse de manière paracrine sur les cellules

épithéliales sensibles à ce facteur et facilite ainsi leur mobilité et leur prolifération (Rahimi et al., 1994; Byers et al., 1994). Parallèlement, des cellules épithéliales mammaires cancéreuses peuvent à leur tour contrôler l'expression de l'HGF/SF par les cellules du stroma *via* la synthèse d'autres facteurs restant à identifier (Rosen et al., 1994 a, b; Seslar et al., 1993, 1995). Enfin, les travaux de Besser et al. (1997) montrent que l'activation constitutive de *c-met* active le gène de l'*uPA*, activateur du plasminogène de type urokinase, impliqué dans la dégradation de la matrice extracellulaire.

I.4. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE (MEC) DANS LE DEVELOPPEMENT ET LA CANCEROGENESE

I.4.1. Les constituants de la matrice extracellulaire

I.4.1.1. La matrice extra-cellulaire présente dans les tissus mésenchymateux au sens large, se compose de molécules aptes à interagir entre elles constituant ainsi un réseau. On trouve parmi ces molécules les collagènes fibrillaires dont le collagène de type I, forme la plus largement rencontrée dans les tissus conjonctifs de l'organisme, et les collagènes de types II, III, V, XI. Les collagènes non fibrillaires de type IV, VII, VIII, IX et X ajoutent de l'élasticité au réseau ainsi que l'élastine. La fibronectine, glycoprotéine, établit des liens entre le réseau de collagène et les cellules mésenchymateuses. On rencontre aussi des protéines telles que la vitronectine et la ténascine qui jouent un grand rôle dans l'adhérence cellulaire ainsi que les protéoglycanes composés d'un axe protéique et de chaînes de sucres, les glycosaminoglycanes. Ces dernières molécules capables de séquestrer des facteurs de croissance deviennent alors des « réservoirs » contrôlant la biodisponibilité de ces facteurs de croissance.

I.4.1.2. La membrane basale constitue une forme particulière de MEC; elle s'établit dès que s'organisent des cellules épithéliales et endothéliales. Elle contient de la laminine, caractéristique de la lame basale, du collagène de type IV et de l'entactine.

Le rôle de cette matrice dans le développement normal ou au cours de la progression tumorale a fait l'objet d'un grand nombre d'études (Judware et Culp, 1997; Adams et Watt,

1993, pour revue). Je résumerai ici les implications de cette matrice dans la morphogenèse et la cancérogenèse de la glande mammaire.

I.4.2. Nature ou culture: l'environnement matriciel conditionne le comportement cellulaire.

I.4.2.1. Le développement normal

I.4.2.1.1. Lors de la morphogenèse de la glande mammaire, la synthèse et le dépôt des composants de la MEC se réalisent selon des séquences spatiales et temporelles précises.

Ainsi, pendant le développement pubertaire, période de grande croissance de la glande, la synthèse de collagène de type I précède celle de collagène de type IV, ces deux synthèses précédant celle de laminine. Pendant la vie adulte, les expressions de ces trois gènes sont extrêmement réduites; par contre, pendant la gestation, la synthèse des trois protéines reprend dans la même séquence temporelle avec un pic à la mi-gestation. Keely et al. (1995a) ont montré que ce sont les cellules stromales adjacentes aux tubules épithéliaux qui synthétisent ces constituants matriciels. Le collagène de type I est plus abondant le long des canaux épithéliaux de façon à constituer une trame pour guider leur allongement (Silberstein et al., 1990, 1992). Par contre, le dépôt de collagène de type I est moins épais autour des bourgeons terminaux. Le patron inverse est observé pour la laminine, sa présence en grande quantité autour des bourgeons terminaux indique le rôle de cette protéine matricielle dans la différenciation finale morphologique et fonctionnelle des cellules épithéliales sécrétrices (Li et al., 1987).

Les composants matriciels participent à l'élaboration de la membrane basale qui va guider le développement de la glande mammaire. L'élongation du réseau canalaire épithélial est accompagnée par la formation d'une lame basale par les cellules myoépithéliales (Daniel et Silberstein, 1987) qui est d'autant moins épaisse qu'on se rapproche des bourgeons terminaux jusqu'à devenir vingt fois plus fines au niveau de ces bourgeons qu'au niveau des contours des canaux. Plusieurs travaux indiquent que l'intégrité de cette membrane basale est essentielle à la survie et au fonctionnement des cellules épithéliales mammaires ainsi qu'à la morphologie canalaire et alvéolaire de la glande (Sympson et al., 1994, Alexander et al., 1996). Apparaissent ici deux rôles fondamentaux de la MEC. D'une part, elle influence la morphologie et d'autre part

la physiologie. Ces deux aspects ont donc fait l'objet des expériences visant à éclaircir le rôle de la MEC dans le développement de la glande mammaire.

1.4.2.1.2. La matrice constitue un environnement tridimensionnel qui déclenche une série d'événements morphogénétiques et fonctionnels.

- Les cultures *in vitro* ont permis de rendre compte de l'importance de cet environnement. Les cellules épithéliales mammaires en culture classique, sur fond de boîte, perdent totalement leur aptitude à former des tubes et à synthétiser les protéines du lait. Cependant, en leur fournissant une matrice de collagène de type I, on a pu reconstituer des structures tubulaires et alvéolaires analogues à celles rencontrées dans la glande mammaire (Bennett et al., 1980; Ormerod et Rudland, 1982; Richards et al., 1983; Berthon et al., 1992). En utilisant une MEC plus complète et plus proche de la MEC naturelle, les cellules épithéliales mammaires sont capables, outre la reconstitution d'une morphologie caractéristique, de synthétiser des protéines du lait. Ces expériences ont été réalisées sur Matrigel, matrice reconstituant la membrane basale, composée de collagène de type IV, laminine, fibronectine et protéoglycanes ou sur matrice EHS, riche en laminine, issue du sarcome murin de Engelbreth-Holm-Swarm (Barcellos-Hoff et al., 1989), ou encore dans des gels de collagène flottants (Emerman et Pitelka, 1977; Lee et al., 1985; Li et al., 1987). Cette matrice artificielle permet aux cellules de synthétiser et d'organiser elles-mêmes les éléments d'une nouvelle matrice (Streuli et Bissel, 1990).

- La nature de la matrice peut induire l'expression de gènes essentiels à la différenciation et à la morphogenèse mammaire.

La ténascine C est un composant de la MEC qui, dans la glande mammaire de souris adulte en lactation, est très peu présente. Par contre, pendant l'involution, quand les tissus subissent un remodelage intense, elle est fortement exprimée alors que la membrane basale est dégradée et que la synthèse de β caséine diminue. Jones et al. (1995) ont montré que lorsqu'on fournit de la ténascine à des cellules épithéliales mammaires cultivées sur une matrice riche en laminine, l'expression et la synthèse de la β caséine sont inhibées. La conjonction de la dégradation de la membrane basale et de l'induction de la ténascine entraîne la perte d'expression de la β caséine, gène tissu spécifique, et le processus d'involution.

DEVELOPPEMENT NORMAL

PROGRESSION CANCEREUSE

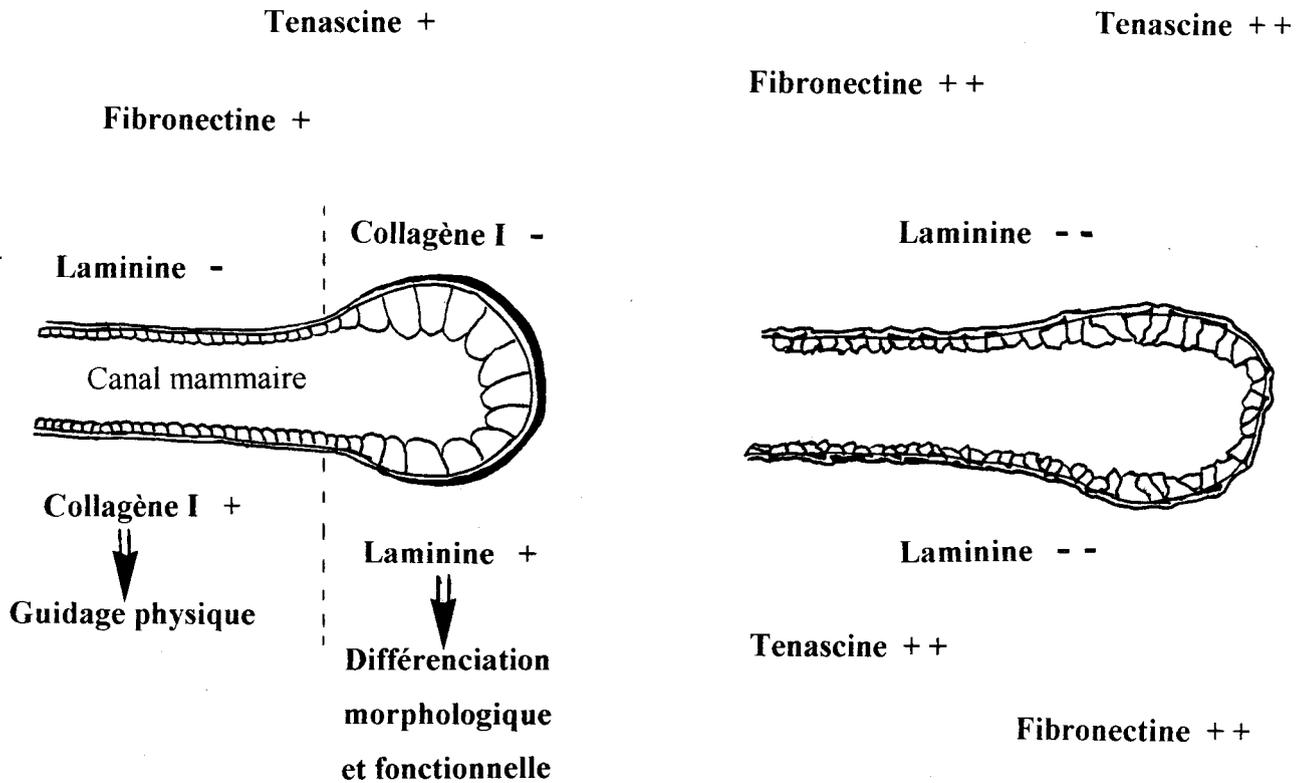


Fig. 4 : La répartition des molécules de la matrice influence le développement normal et cancéreux de la glande mammaire.

- : Présence faible

-- : Présence très faible

+ : Présence moyenne

++ : Présence importante

Schmidhauser et al. (1992) indiquent que la régulation de la synthèse de la β caséine par les composants de la MEC a lieu à un niveau transcriptionnel via l'activation d'éléments de réponse dépendant de la matrice. Streuli et al. (1995) montrent que la laminine de la membrane basale module l'expression de la β caséine grâce à un enhancer dépendant de la matrice.

Les constituants de la membrane basale sont également nécessaires à la régulation de synthèse du TGF β 1 par les cellules épithéliales mammaires (Streuli et al., 1993). Or le TGF β 1 lui-même augmente la synthèse des éléments de la MEC, en particulier du collagène de type I, qui canalise le déplacement des cellules épithéliales lors de la formation des canaux mammaires, comme nous l'avons déjà indiqué (Silberstein et al., 1990, 1992).

1.4.2.2. Les cellules épithéliales mammaires cancéreuses sont aussi soumises à l'action de la MEC.

1.4.2.2.1. L'interaction des constituants de la MEC avec les cellules épithéliales mammaires cancéreuses MCF-7 a été décrite comme l'élément qui va provoquer la progression tumorale (Noël et al., 1992). En effet, la transplantation sous-cutanée de cellules MCF-7 dans des souris nude en absence de Matrigel (cet extrait de membrane basale) n'induit pas la formation de tumeurs. Par contre, l'inoculation en présence de Matrigel entraîne une apparition rapide de tumeurs.

1.4.2.2.2. En cas de cancer du sein, la MEC se modifie. (Fig. 4)

Le dépôt de fibronectine dans le stroma adjacent aux cellules tumorales augmente : ceci correspond à une réaction stromale de défense contre la tumeur (Joffe et al., 1988; Lagace et al., 1984; Loridon-Rosa et al., 1988). La production dérégulée de molécule de MEC conduit à une desmoplasie, amplification du volume matriciel stromal, qui perturbe les interactions normales des deux compartiments cellulaires.

Chiquet et al. (1989) ont montré que les cellules MFC-7, en sécrétant du TGF β , induisent la synthèse par des fibroblastes normaux de ténascine C, protéine de la MEC, fortement exprimée dans le stroma des cancers du sein et peu dans les tissus mammaires normaux. En effet, la ténascine C inhibe l'adhérence à la fibronectine (Chiquet et al., 1986) et peut de ce fait induire le détachement des cellules MFC-7 de leur MEC favorisant le processus

de métastase. De plus, les cellules de cancer du sein produisent des facteurs de croissance capables de stimuler la synthèse de protéoglycanes par les fibroblastes (Merrilees et al., 1985).

On observe dans les carcinomes mammaires que la membrane basale, dont nous avons déjà évoqué l'importance, est très réduite en raison d'une diminution de la quantité de ses constituants, en particulier de la laminine, ce qui facilite l'infiltration des cellules cancéreuses (Albrechtsen et al., 1981; Siegal et al., 1981; Bergstraesser et Weitzman, 1994). La forte adhérence des cellules cancéreuses à la laminine est un prérequis à la traversée de la lame basale et à l'invasion des tissus environnants (Kleinman et al., 1989; Coucke et al., 1992).

La dégradation anormale de la MEC associée à une augmentation de synthèse des protéases peut aussi se produire. Elle est propice à une migration anarchique des cellules épithéliales au sein de leur stroma. Par exemple, les cellules MDA-MB-231 ne synthétisent plus de collagène alors qu'elles produisent la collagénase I apte à dégrader les collagènes fibrillaires (Noël et al., 1994).

FAISONS UN PREMIER POINT:

Le développement normal et cancéreux de la glande mammaire implique, nous l'avons vu à travers ce premier chapitre, la régulation de la prolifération mais aussi celle de la migration cellulaire. Si hormones et facteurs de croissance véhiculent des signaux modulant la croissance et la morphogenèse, les déplacements cellulaires nécessitent en outre un guidage réalisé par la matrice extracellulaire (MEC) environnante et une reconnaissance entre les cellules partenaires et cela que ce soit lors de l'invasion du mésenchyme par l'épithélium ou que ce soit au cours du remodelage du tissu épithélial lui-même.

II. ZOOM SUR LES MECANISMES DE MIGRATION CELLULAIRE

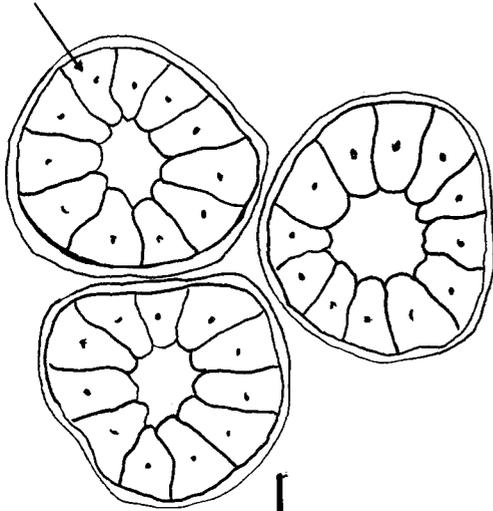
De nombreux travaux indiquent que la matrice peut selon les cas, constituer un lieu d'ancrage nécessaire à l'avancée cellulaire ou un obstacle physique à la progression des cellules. En outre, elle est capable de réguler l'expression spécifique de gènes. De sa présence ou de sa dégradation dépendra donc la régulation des déplacements cellulaires menant soit à un développement normal de la glande soit à des situations pathologiques incluant la métastase. En premier point de ce deuxième chapitre, nous détaillerons donc en quoi la **dégradation de la matrice** par les protéases peut conditionner le comportement migratoire des cellules. Nous verrons en deuxième point, comment les informations d'**adhérence à cette matrice** transmises par les intégrines jusqu'au cytosquelette peuvent influencer cette migration cellulaire. Nous aborderons en troisième point, l'implication de l'**adhérence entre les cellules** épithéliales lors des mouvements cellulaires.

En ce qui concerne la morphogénèse mammaire, la succession entre les phases de dégradation des composants de la MEC facilitant l'avancée épithéliale dans un massif mésenchymateux et les phases d'adhérence à la matrice permettant la réorganisation du tissu épithélial seront abordées à travers les étapes de croissance de la glande (voir rappels sur l'organogénèse).

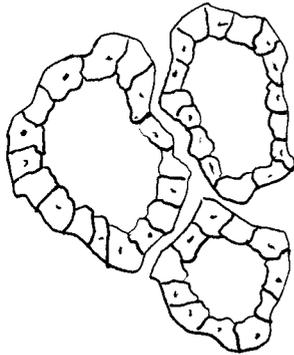
Lors du processus de métastase, adhérence et digestion se succèdent aussi selon des modalités qui méritent d'être précisées afin de faciliter la compréhension des prochaines lignes. Voici résumées les principales étapes suivies par les cellules tumorales au cours de la cancérogenèse et de la métastase:

INVOLUTION

Cellules épithéliales mammaires



Dégradation ménagée de la lame basale

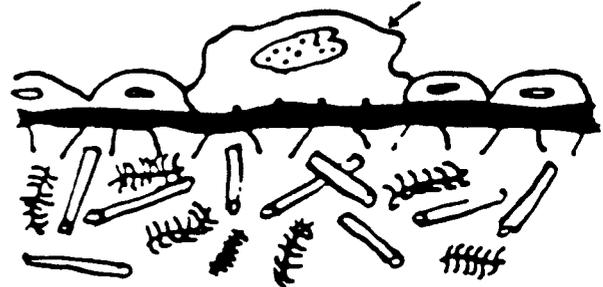


Involution du lobule

INVASION

Attachement

Cellule épithéliale tumorale



Dégradation de la lame basale



Invasion

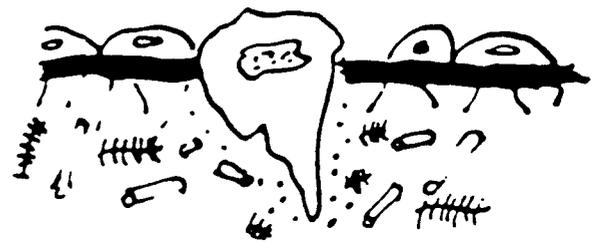


Fig. 5 : Les protéases sont impliquées dans l'involution mammaire et l'invasion cancéreuse.

- Baisse d'adhérence inter-cellulaire → Détachement des cellules tumorales
- Augmentation de l'adhérence à la lame basale du feuillet → Attachement aux composants de la lame basale
- Dégradation de la lame basale du feuillet → Protéolyse
- Baisse d'adhérence à la MEC et Dégradation des composants de la MEC des tissus environnants → Invasion
- Fixation à et dégradation de la lame basale endothéliale → Pénétration dans les vaisseaux
- Circulation dans les voies sanguines
- Fixation à et dégradation de la lame basale endothéliale de vaisseaux de l'organe cible → Sortie des vaisseaux
- Infiltration du tissu cible → Invasion
- Fixation sur l'organe cible → Implantation

D'après Kraft et al., 1992

II.1. DEGRADATION DE LA MEC PAR LES PROTEASES CELLULAIRES

II.1.1. Les protéases sont impliquées dans le développement de la glande mammaire (Fig. 5, A). (Pour Revue, Bissell et Hall, 1987)

Pendant l'involution, les activités protéolytiques augmentent, notamment celles de la Gélatinase A (72 kDa), de la stromélysine 1 et de l'activateur du plasminogène de type tissulaire, tPA (Talhok et al., 1991 et 1992). Ces auteurs indiquent que l'excès de synthèse de ces protéases, associé à l'absence de synthèse de leurs inhibiteurs déséquilibre la balance responsable du remodelage de la MEC vers la dégradation massive. Les sites d'expression

majeur de ces protéases se situent soit dans les cellules myoépithéliales (Dickson et Warburton, 1992) ou dans les cellules stromales entourant les structures lobulo-alvéolaires en train de se dégrader (Lund et al., 1996). Ainsi, cette phase de l'involution est due à la dégradation de la lame basale qui, par conséquent, ne peut plus maintenir l'intégrité des alvéoles sécrétrices. L'augmentation de l'expression de l'*uPA* et celle de la stromélysine 3 sont de la même façon associées à l'involution (Ossowski et al., 1979; Lefebvre et al., 1995). Par contre, une faible expression de l'*uPA* est associée à la fin de la gestation et à la lactation quand les alvéoles sécrétrices sont bien différenciées (Busso et al., 1989). Bien sûr, lors du développement normal de la glande mammaire, l'action des protéases est contrebalancée par celle de leurs inhibiteurs de façon à obtenir un modelage régulé de la MEC. Par exemple, Alexander et al. (1996) ont montré que l'inhibiteur tissulaire de métalloprotéase (TIMP-1) sauve les cellules épithéliales mammaires de l'apoptose consécutive à la dégradation de la matrice par la stromélysine 1.

II.1.2. La surexpression, l'augmentation de synthèse et d'activité des protéases sont largement décrites dans les cancers du sein (Fig. 5, B).

II.1.2.1. Une surexpression et un accroissement de l'activité de la cathepsine D, protéase lysosomiale, étroitement corrélée à la dégradation de la MEC lors de processus invasifs, sont observés dans les cancers du sein par rapport aux tissus normaux (Tryggvaison et al., 1987 ; Pollaren et al., 1989; Garcia et al., 1996). De nombreuses études ont pu établir un lien entre la surexpression de la cathepsine D et le degré de malignité de cancer du sein (Leto et al., 1992). Sa surexpression, toujours associé à un mauvais pronostic, est détectée soit dans les cellules épithéliales cancéreuses (Zhao et al., 1993; Escot et al., 1996) soit dans les cellules stromales (Joensuu et al., 1995) définies comme les cellules du mésenchyme entourant les tumeurs.

II.1.2.2. Les métalloprotéases comprenant collagénases, (dont les gélatinases), stromélysines sécrétées sous formes latentes et caractérisées par un site de liaison au zinc ont elles aussi une large responsabilité dans la dégradation matricielle associées au processus tumoral. Une augmentation de synthèse et d'activité des gélatinases A (72 kDa, MMP 2) et B (92 kDa, MMP 9) a pu être détectée dans les carcinomes invasifs (Brown et al., 1993; Rha et

al., 1997). Les fibroblastes sont d'ailleurs capables d'induire l'expression de la MMP 9 dans les cellules cancéreuses (Himmelstein et Muschel, 1996). Kyong et al. (1996) ont montré que l'activité de la MMP 2 est la plus élevée dans les stades les plus invasifs. Ces deux gélatinases MMP 9 et MMP 2 sont responsables de la dégradation du collagène de type IV, composant de la lame basale, et contribuent fortement au processus de métastase. Des protéases, telles que la collagénase 3 ou MMP 13 (Freije et al., 1994), la protéase de 80 kDa (Lin et al., 1997) ont pu être spécifiquement caractérisées dans les cancers mammaires. On peut noter que dans bien des cas, le mésenchyme est lui même auteur de la dégradation de la MEC. En effet, les cellules stromales qui jouxtent les cellules épithéliales des carcinomes invasifs expriment la collagénase I (Polette et al., 1993), la collagénase IV de 72 kDa (Ballin et al., 1991), la stromélysine 3 (Basset et al., 1990). Ito et al. (1995) ont montré que dans des expériences de cocultures *in vitro* les cellules MFC-7 sont capables de stimuler la synthèse de MMP 1 (collagénase I), MMP 2 (72 kDa gélatinase A) et MMP 3 (stromélysine 1) dans des fibroblastes.

II.1.2.3. Les activateurs du plasminogène tPA (tissue type Plasminogen Activator) et uPA (urokinase type Plasminogen Activator) ont fait l'objet d'études visant à évaluer leur degré d'implication dans le cancer du sein. Si le taux de tPA n'a pas pu être corrélé à la malignité, la surexpression de l'uPA et de son récepteur l'uPA-R est associée d'une part à la malignité, d'autre part à la capacité invasive des cellules de carcinomes mammaires (Jankun et al., 1993; Ronne et al., 1995; Holsthansen et al., 1996; Xing et Rabbani, 1996). L'uPA, sérine protéase, fixée à son récepteur, convertit le plasminogène en plasmine, laquelle peut dégrader les éléments de la MEC et activer d'autres protéases. Je reviendrai dans quelques lignes sur ce système protéasique afin de mieux en détailler les mécanismes et les implications. L'uPA a été mis en évidence dans les carcinomes mammaires lors de l'invasion du stroma par les cellules épithéliales (Clavel et al., 1986). Comme pour les autres protéases, la présence d'uPA est observée dans les fibroblastes du stroma adjacent aux cellules tumorales (Nielsen et al., 1996; Van Roosendaal et al., 1996a). Le récepteur de l'uPA quant à lui, est détecté dans les cellules épithéliales tumorales, d'autant plus qu'elles se situent à proximité des massifs tumoraux (Christensen et al., 1996). L'uPA-R a été mis en évidence à la surface des cellules épithéliales mammaires cancéreuses (MDA-MB-231) en culture sur une membrane basale artificielle

constituée de Matrigel, en particulier sur le front d'invasion des cellules et sur les pseudopodes pénétrant la membrane (Bastholm et al., 1994).

II.1.2.4. Mais qu'en est-il des inhibiteurs de ces protéases?

Il apparaît que l'équilibre entre MMPs et TIMPs est rompu (Wolf et al., 1994) en faveur des MMPs, ce qui induit une dégradation dérégulée de la MEC. Le TIMP 1, à large spectre, fixe toutes les collagénases; le TIMP 2 inhibe préférentiellement les collagénases IV.

De façon étonnante, l'augmentation de synthèse de PAI-1 est concomitante de celle de l'uPA et de l'uPA-R dans les tumeurs malignes (Christensen et al., 1996; Ronne et al., 1995) indiquant un mécanisme unique de contrôle dans les étapes de la cancérogénèse (Jankun et al., 1993). En fait, le PAI, après avoir internalisé le complexe uPA/uPA-R dégrade l'uPA mais recycle en surface l'uPA-R en concentrant ces molécules (pour revue Vassali, 1994) ce qui potentialiserait l'action de l'uPA. Un autre mécanisme expliquant que le PAI-1 est associé à un mauvais pronostic, en particulier dans les cancers mammaires, fait intervenir une fonction du PAI-1 indépendante de son activité inhibitrice de protéase. En effet, le PAI-1 et l'uPA-R peuvent se lier à la vitronectine sur le même site de liaison, et entrent alors en compétition l'un avec l'autre. Ainsi le PAI-1 dissocie l'uPA-R de la vitronectine matricielle et détache la cellule de son substrat (Deng et al., 1996).

Dans ce système complexe de modulation d'activités protéolytiques il existe un acteur dont le rôle dans la cancérogénèse est essentiel et qui mérite un éclairage: l'uPA.

II.1.3. Cas particulier de l'uPA

II.1.3.1. L'uPA et la vascularisation tumorale

Le réseau de vaisseaux sanguins qui se met en place autour des tumeurs permet l'apport d'éléments nécessaires à la croissance tumorale ainsi que le transport des cellules cancéreuses lors de la métastase. De nombreux travaux indiquent que les expressions de l'uPA et de son récepteur sont associées à la formation ou au remodelage des vaisseaux sanguins. L'augmentation de l'activité uPA et du taux de récepteurs dans les cellules endothéliales en accentuant les dégradations protéolytiques facilite la migration et la réassociation de ces cellules. (Pepper et al., 1987; Bacharach et al., 1992; Pepper et al., 1993). Dans les cancers du sein,

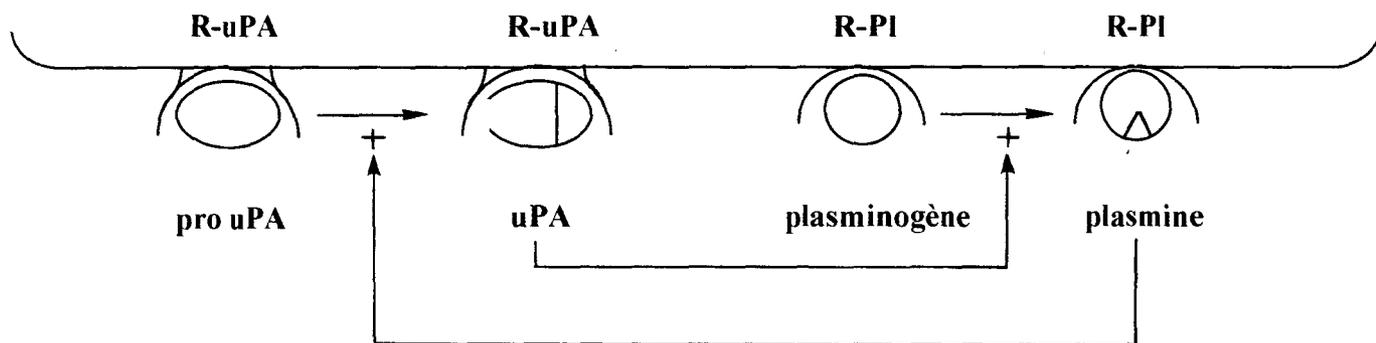


Fig. 6 : Activation de l'uPA

+ Activation

R-uPA: Récepteur du pro-uPA et de l'uPA

R-PI : Récepteur du plasminogène et de la plasmine

Hildenbrand et al. (1995) ont montré que l'augmentation de la quantité d'uPA est aussi associée à leur vascularisation.

II.1.3.2. Le système uPA se situe en amont d'une cascade protéolytique.

L'efficacité protéolytique du système uPA réside dans l'accumulation à la surface cellulaire, dans un espace restreint, des partenaires du système (Ellis et al., 1991). L'uPA est sécrété sous forme d'une pro-enzyme inactive (pro-uPA de 45 kDa chez la souris; Lijnen et al., 1996). La forme active de l'uPA est obtenue par un clivage en position 159 et la formation d'un pont disulfure entre les chaînes A et B. La chaîne A (15 kDa chez la souris) porte le fragment aminoterminal, elle est caractérisée par un domaine d'homologie avec l'EGF et un domaine « kringle » (Appella et al., 1987); cette chaîne assure la fixation au récepteur de l'uPA. La chaîne B (30 kDa chez la souris) est le siège de l'activité enzymatique. L'activation de l'uPA se réalise de manière beaucoup plus efficace quand celui-ci est fixé à son récepteur plutôt qu'à l'état libre. Une fois activé, l'uPA convertit le plasminogène fixé à son récepteur membranaire, en plasmine. Cette conversion est beaucoup plus efficace lorsqu'elle est réalisée par l'uPA lié à son récepteur (Becquemont et al., 1994). Le plasminogène libre peut aussi être converti mais de façon beaucoup moins efficace (Plow et al., 1995). La plasmine libérée peut à son tour activer le clivage du pro-uPA en uPA, ce qui amplifie la réaction (Stephens et al., 1989). La proximité des zymogènes/enzymes et de leur récepteur permet cette boucle d'amplification (Dano et al., 1994; Fig. 6). Les récepteurs, en fixant les enzymes, les protègent de l'inactivation par leurs inhibiteurs: l'uPA par PAI-1 et 2, la plasmine par l' α 2 antiplasmine, une serpine (Vassali, 1994). Le PAI-1 interagit avec la double chaîne de l'uPA, cette liaison entraînant l'internalisation et la dégradation du complexe uPA/uPA-R. Le PAI-2 interagit aussi avec la double chaîne de l'uPA mais avec une affinité moindre.

Voici donc que l'activation du système uPA aboutit à la formation de plasmine. La plasmine peut directement dégrader des substrats tels que la fibronectine, la fibrine, la laminine et la vitronectine (Plow et al., 1996). Elle est aussi capable de cliver les pro-MMPs de façon à libérer des MMPs fonctionnelles (Fig. 7). L'éventail de protéases activées permet donc la dégradation de la plupart des substrats matriciels (Fig. 8). Bien sûr, cette cascade est régulée, nous l'avons vu, par des inhibiteurs du système uPA et les TIMPs. L'uPA occupe donc une

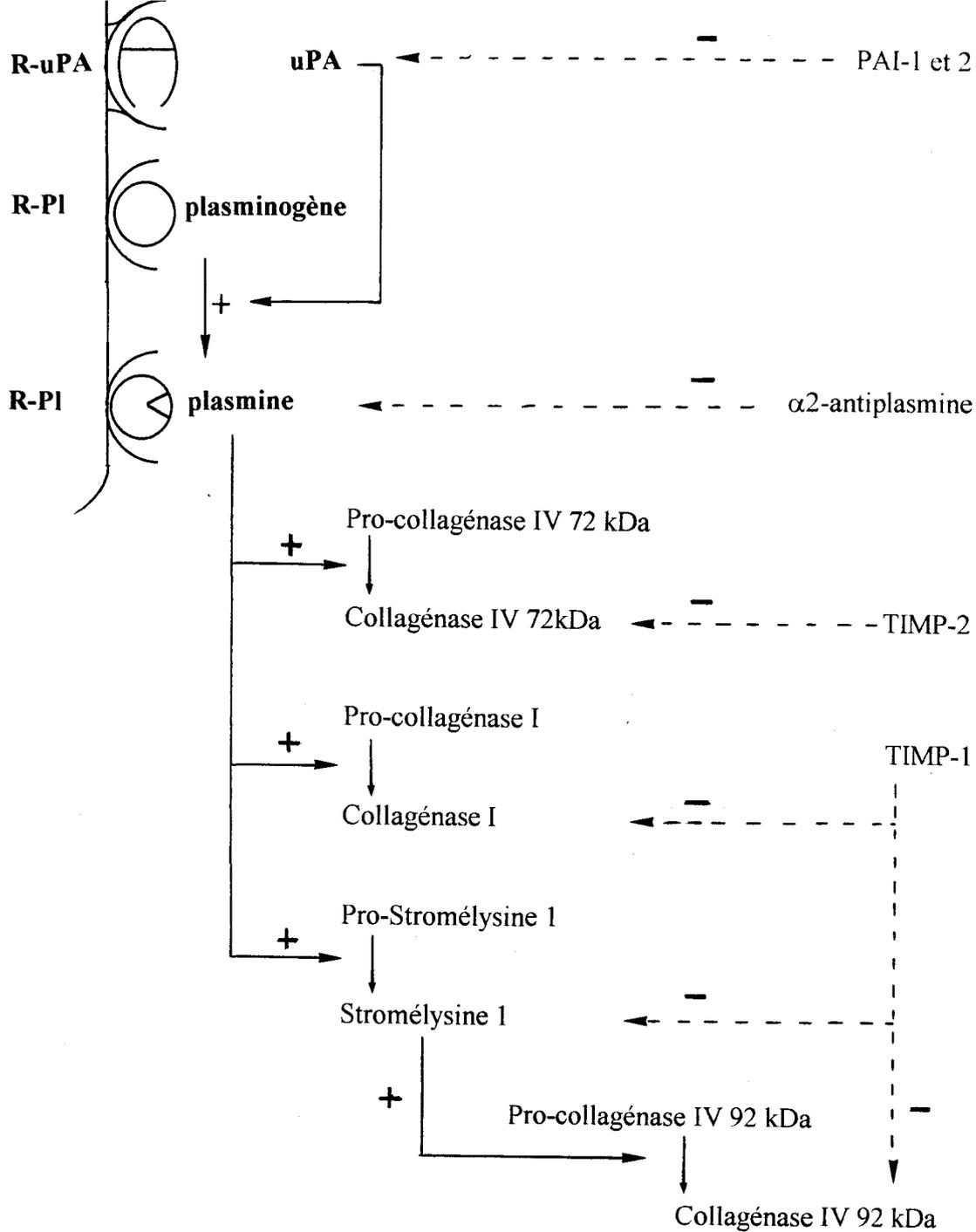


Fig.7 : Cascade protéolytique

+ : Activation
- : Inhibition

R-uPA : Récepteur de l'uPA
 R-Pl : Récepteur du plasminogène et de la plasmine

	Collagénase I Interstitielle	Stromélysine 1	Collagénase IV, 72 kDa Gélatinase A	Collagénase IV, 92 kDa Gélatinase B	Plasmine
	MMP-1	MMP-3	MMP-2	MMP-9	
Collagène I	+	-	-	-	-
Collagène II	+	-	-	-	-
Collagène III	+	+	-	-	+
Collagène IV	-	+	+	+	+
Collagène VII	-	+	+	+	-
Laminine	-	+	-	-	+
Fibronectine	-	+	-	-	+
Protéoglycanes	-	+	-	-	+

Fig 8 : Dégradation des composants de la MEC par les protéases.

+ : Capacité de dégradation du substrat matriciel par la protéase

- : Incapacité de dégradation du substrat matriciel par la protéase

D'après Alexander et Werb, 1989.

place pivot dans la morphogenèse normale et la progression tumorale, entraînant le remodelage de la MEC facilitant ainsi la réorganisation ou l'infiltration des cellules dans les tissus adjacents.

II.1.3.3. L'uPA activateur de facteurs de croissance

Au cours des déplacements cellulaires, soit pendant la morphogenèse, soit pendant la cancérogenèse, nous l'avons vu, plusieurs facteurs de croissance interviennent. Il faut garder en mémoire le fait que les protéases, certes, tracent des chemins d'infiltration à travers la MEC mais peuvent aussi libérer des facteurs de croissance séquestrés dans les protéoglycanes de cette MEC, tels que les facteurs « heparin binding » comme l'HGF/SF et le FGF. Saksela and Rifkin (1990) ont montré que la libération du FGF dépend de l'activité uPA. De plus, il est intéressant de signaler que l'HGF et le TGF β , facteurs morphogènes pour la glande mammaire, sécrétés sous forme inactive, doivent être clivés pour être activés. Ce clivage est réalisé par l'uPA (Mars et al., 1993; Naldini et al., 1992, 1995). Ainsi, l'uPA peut à la fois libérer les facteurs retenus dans la matrice, les activer et tracer des voies de migration à travers la MEC.

On comprend dès lors pourquoi on attribue à l'uPA un rôle majeur dans les déplacements cellulaires au cours du développement et de la cancérogenèse de la glande mammaire et pourquoi nous avons jeté notre dévolu sur cette molécule au cours de nos recherches.

CONTINUONS NOTRE REFLEXION:

La migration est un phénomène qui implique, au moins, deux processus majeurs. D'une part, la dégradation ménagée de l'environnement cellulaire permet aux cellules de se frayer un chemin. L'équilibre entre les protéases qui dégradent les composants de la MEC et leurs inhibiteurs qui limitent cette dégradation, joue un rôle crucial dans la progression des cellules à travers les tissus adjacents. D'autre part, sans attache point de salut! On ne peut concevoir qu'une cellule sans ancrage au support puisse se déplacer efficacement. La liaison à la matrice, au moins de façon temporaire, ou l'interaction avec d'autres cellules semblent être des éléments essentiels à la migration.

II.2. LES INTERACTIONS DES CELLULES AVEC LA MEC VIA LES INTEGRINES

Les intégrines sont des glycoprotéines membranaires dotées d'un domaine cytoplasmique. Elles s'associent de façon non covalente pour former des hétérodimères contenant une sous-unité α et une β .

II.2.1. Les intégrines permettent des interactions entre cellules épithéliales et composants de la matrice.

II.2.1. Morphogenèse normale

Keely et al. (1995b) ont montré que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (récepteur aux collagènes de type I et IV et à la laminine) est exprimée massivement à la mi-gestation alors que se développent et se façonnent les alvéoles sécrétrices et que des interactions cellules-MEC sont nécessaires pour l'organisation des structures épithéliales. L'expression de l' $\alpha 2\beta 1$ est la plus forte pendant la période où la synthèse et le dépôt de ses trois ligands atteignent un pic. Par contre, lors de la lactation, quand les cellules épithéliales sont en place, l'expression de l' $\alpha 2\beta 1$ décroît. Soulier et al. (1996) ont confirmé la diminution de l'expression de l'intégrine $\beta 1$ pendant la lactation et révélé une augmentation de cette intégrine pendant l'involution qui permettrait les interactions nécessaires au remodelage épithélial. De plus, l'augmentation de l'intégrine $\beta 1$, dont on a pu montrer la capacité à activer des tyrosine kinases, serait liée à l'activation de la collagénase IV de 72 kDa (Seltzer et al., 1994).

L'importance de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ apparaît d'autant plus dans les expériences où l'on bloque son action soit par anticorps anti- $\alpha 2$ ou anti- $\beta 1$ (Berdichevsky et al., 1992; Klinowska et al., 1996), soit par ARNm antisens $\alpha 2$ (Keely et al., 1995b). Ces blocages entraînent une inhibition de la tubulogenèse et de la formation des bourgeons terminaux due à la réduction d'adhérence de ces cellules à leur MEC. L'intégrine $\beta 1$ transmet certes des informations aboutissant à la morphogenèse mais aussi menant à la synthèse des constituants du lait par les cellules épithéliales mammaires. Elle peut en effet, activer un « enhancer laminine dépendant » présent dans le gène de la β caséine (Streuli et al., 1995).

D'autres expériences de blocages de morphogenèse ont été réalisées par exemple en inhibant l'interaction de la laminine à ses récepteurs, $\alpha3\beta1$ et $\alpha6\beta4$, par des anticorps spécifiques. Dans ces cas, la formation d'hémidesmosomes entre cellules et MEC est inhibée, ce qui empêche la reconnaissance de la MEC par les cellules (Stahl et al., 1997).

Mais, ne soyons pas manichéens, l'inactivation des intégrines est loin d'avoir des conséquences unidirectionnelles. Keely et al. (1995b) ont précisé que la mobilité des cellules épithéliales mammaires où l'expression de l'intégrine $\alpha2$ est inhibée par un ARN antisens, est la plus élevée quand ces cellules montrent un niveau intermédiaire d'adhérence au collagène, c'est à dire, quand les cellules présentent une densité moyenne d'intégrine $\alpha2\beta1$ à leur surface. En d'autres termes, pour se déplacer, les cellules doivent trouver l'équilibre entre ancrage et dérive, le niveau d'expression d'intégrines les y aide. Le blocage par un anticorps spécifique de l'intégrine $\alpha3$, qui dans le complexe $\alpha3\beta1$ permet l'adhérence au collagène, stimule la morphogenèse ductale au même titre que le l'HGF. Berdichevsky et al. (1994) analysent ces résultats en indiquant que la diminution d'adhérence au collagène facilite la mobilité cellulaire et de ce fait promeut la morphogenèse.

II.2.1.2. Au cours de la cancérogenèse, les interactions entre cellules épithéliales et matrice sont perturbées.

En cultures tridimensionnelles en Matrigel, les cellules épithéliales mammaires tumorales sont incapables de morphogenèse ductale, elles ne forment que des colonies désorganisées (Petersen et al., 1992). Il apparaît alors que les informations morphogénétiques émises par la MEC sont mal transmises par les molécules d'interaction cellules-MEC.

La forte adhérence des cellules épithéliales mammaires tumorales à leur lame basale est un prérequis à l'invasion (Hunt et al., 1989). D'ailleurs, pour cette étape précoce, le nombre de récepteurs intégrine $\beta1$, intervenant dans l'adhésion à la laminine augmente (Albelda et al., 1990; Restucci et al., 1995). Puis, il s'agit pour les cellules tumorales de traverser cette membrane basale et de s'en éloigner pour gagner le stroma environnant. Or on observe que les cellules de carcinomes mammaires invasifs déposent de faibles quantités de laminine (Bergstrasser et Weitzman, 1994) et qu'elles expriment un faible taux d'intégrines $\alpha6$ et $\beta1$ séparées et associées, directement responsable de l'adhérence à la laminine (Arihiro et al., 1993;

Bergstrasser et Weitzman, 1994). Les auteurs de ces travaux suggèrent que la conjonction entre la réduction de l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ et de la laminine facilite la faible adhérence à la lame basale et permet aux cellules de s'en éloigner. Dans cet ordre d'idée, l'intégrine $\alpha 6$ est considérée comme un suppresseur de tumeur potentiel pour les cellules épithéliales mammaires (Sager et al., 1993).

D'autres études ont montré que la malignité et la capacité invasive des cellules de carcinomes mammaires étaient corrélées à la perte d'expression des sous-unités intégrines $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$ séparées et associées (Pignatelli et al., 1992a; Hanby et al., 1993). La baisse du niveau d'intégrine $\alpha 2 \beta 1$, récepteur du collagène et de la laminine, et d'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, récepteur de fibronectine, réduit l'adhérence au substrat et facilite l'infiltration des cellules dans les tissus environnants (Zutter et al., 1990a, 1993; Restucci et al., 1995; Lanzafame et al., 1996). Inversement, la surexpression de l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ abroge le phénotype invasif des cellules de carcinomes mammaires en augmentant leur adhérence (Zutter et al., 1995).

Mais, évidemment, rien ne sera jamais simple en matière de tumorigenèse et de métastase. Si les cellules cancéreuses ont besoin d'un certain degré de liberté pour migrer à travers les tissus, elles ont besoin aussi d'un minimum d'adhérence. Ce problème déjà soulevé lors de l'étude des interactions dans le développement normal de la glande est à nouveau au fait de la discussion lorsqu'il s'agit de limiter la métastase.

L'injection d'anticorps anti-intégrine $\alpha 5$ ou $\beta 1$ en même temps que de cellules épithéliales cancéreuses mammaires invasives MDA-MB-231 dans des souris nude athymique réduit significativement le nombre de colonies métastatiques formées (Newton et al., 1995). Des tests *in vitro* ont montré que ces anticorps inhibent l'adhérence des cellules tumorales ainsi que leur capacité invasive. Ainsi, dans ce cas précis, en empêchant l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ d'interagir avec la fibronectine, on réduit l'adhérence et on empêche aussi la migration cellulaire.

Une redistribution des molécules de l'intégrine $\beta 1$ a en outre été signalée dans les cellules cancéreuses de façon générale (Patriarca et al., 1993; Vitalle et al., 1994). Elles se présentent de façon diffuse sur toute la surface alors que, pour les cellules normales, elles s'amassent en agrégats de manière à établir des contacts focaux. Pignatelli et al. (1992b) ont

suggéré que ce phénomène reflète le désordre du cytosquelette intracellulaire auquel sont associées les molécules d'intégrine.

II.2.2. Les phénomènes de migration impliquent des interactions intégrines-cytosquelette.

Les intégrines permettent l'adhérence des cellules à leur substrat, ce qui va favoriser la traction des cellules nécessaire à leur mouvement. Grâce à leur domaine cytoplasmique, les intégrines peuvent interagir avec les éléments du cytosquelette modifiant leur réorganisation et ainsi entraîner une modification de la forme des cellules, de leur étalement et de leur migration (pour revue Hendrix et al., 1996).

II.2.2.1. Le cytosquelette est fortement impliqué dans la mobilité cellulaire.

Des changements dans l'organisation du cytosquelette ont particulièrement été décrits dans les cellules cancéreuses invasives, et une réduction dans l'expression des protéines associées à l'actine telles que l' α actinine, la gélosine, la vinculine a été notée (Ben-Ze'ev, 1997). Il s'est avéré que la restauration de l'expression de vinculine et d' α actinine dans les cellules tumorales aboutit à l'abrogation des aptitudes tumorigène et métastatique (Rodriguez et al., 1992a; Glück et al., 1993). La surexpression de la vinculine inhibe la mobilité alors que l'inhibition de cette protéine augmente la mobilité (Rodriguez et al., 1992b; 1993).

La vimentine est un membre de la classe III des filaments intermédiaires du cytosquelette, des interactions entre la fibronectine et la vimentine ont pu être observées (Green et al., 1986). La vimentine est normalement exprimée dans des cellules d'origine mésenchymateuse, particulièrement lors de leurs déplacements (Klinowska et al., 1994). Sa présence apparaît au cours de la transition Epithélium-Mésenchyme, alors que les cellules acquièrent une morphologie migratoire, lors de cultures d'hépatocytes embryonnaires (Pagan et al., 1995), ou pendant la cicatrisation de cellules épithéliales respiratoires (Buisson et al., 1996). La vimentine n'est pas, ou très peu, exprimée dans les cellules épithéliales statiques, par contre, son expression apparaît dans les cellules épithéliales dans des situations de migration cellulaire accentuée. Dans des expériences de cicatrisation *in vitro* la vimentine est détectée, après blessure d'un tapis de kératinocytes, au front de migration des cellules (Biddle et

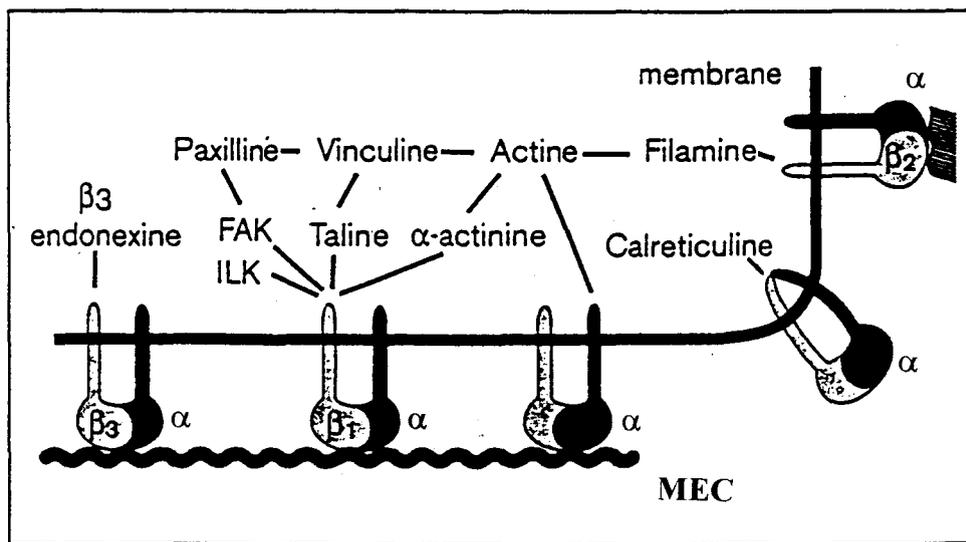


Fig. 9 : Les intégrines peuvent interagir avec le cytosquelette.

Le domaine cytoplasmique des intégrines peut transmettre le signal d'interaction de la cellule avec sa matrice jusqu'au cytosquelette en se liant avec les molécules de ce cytosquelette et ainsi modifier leur organisation.

FAK : focal adhesion kinase
 ILK : integrine linked kinase

D'après Yamada et Geiger, 1997.

Spandau, 1996). Finalement, l'expression de la vimentine est associée à la perte de contact entre cellules, par contre, elle est détectée aux limites des contacts cellules-matrice (Pagan et al., 1996; Biddle et Spandau, 1996), ce qui suggère le rôle de cette molécule dans le processus de traction sur le substrat.

En ce qui concerne la glande mammaire, alors que l'expression de la vimentine est très faible dans les cellules épithéliales mammaires normales, elle est fortement accrue dans les cellules épithéliales mammaires tumorales invasives murines ou humaines en culture ou dans les tumeurs (Sommers et al., 1989; Thompson et al., 1992 a; Chen et al., 1996; Domagala et al., 1990). De plus, il existe dans le promoteur de la vimentine un site NF κ B qui agit comme régulateur positif de l'expression de ce gène dans les cellules épithéliales mammaires (Chen et al., 1996). D'autre part, Stover et al. (1994) ont observé qu'un élément de régulation négatif de ce gène, détecté dans les cellules épithéliales mammaires non invasives MCF-7, est absent dans les cellules métastatiques MDA-MB-231. La vimentine est donc impliquée dans la migration des cellules épithéliales mammaires, son expression a été corrélée avec la capacité invasive et la synthèse de MMP2 et MMP9 (Bae et al., 1993). Ce gène a d'ailleurs été utilisé comme facteur pronostique dans les cancers métastatiques du sein, la vimentine est associée à des tumeurs de grade élevé (Raymond et Leong., 1989).

II.2.2.2. De multiples interactions entre domaines cytoplasmiques d'intégrines et molécules du cytosquelette ont été décrites (Fig. 9).

Huttenlocher et al. (1996) ont observé que, certaines mutations des domaines cytoplasmiques de l'intégrine α II b β 3, en accroissant le degré d'organisation du cytosquelette entraînent une baisse de la migration. Les intégrines β 2 et β 3 interagissent avec l' α actinine (Ottey et al., 1993), l'intégrine β 2 avec la filamine (Sharma et al., 1995), l'intégrine α 2 avec l'actine (Leung et al., 1994). Plusieurs études ont montré que le domaine cytoplasmique de l'intégrine β 1 peut se lier à la taline et à l' α actinine, molécules pouvant elles-mêmes se lier à l'actine soit directement, soit par l'intermédiaire de la tensine et de la vinculine (revue dans Yamada et Geiger, 1997). Après recrutement de taline et vinculine, les monomères d'actine polymérisent en filaments d'actine qui s'étendent dans la cellule pour structurer le cytosquelette et participer aux mouvements cellulaires (Hynes, 1992).

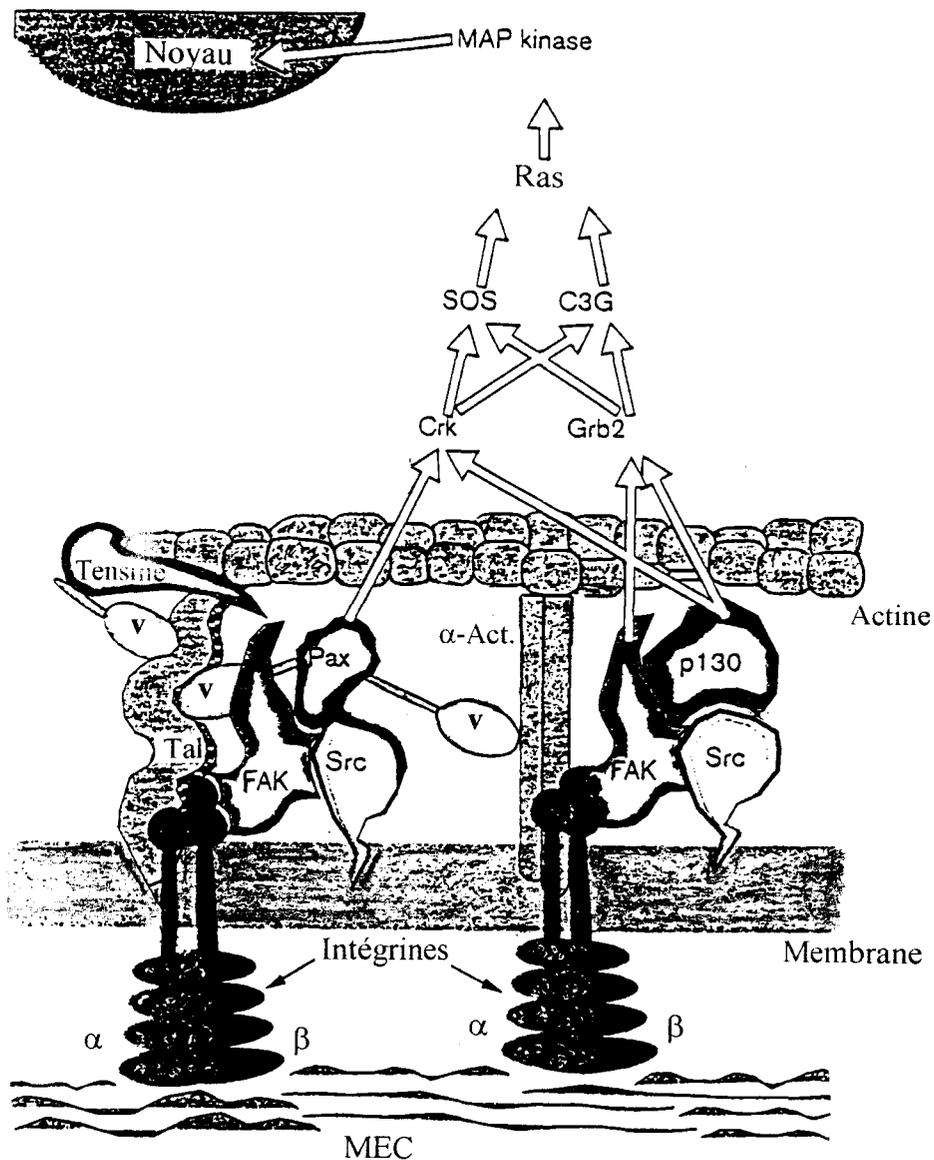


Fig. 10 : Les intégrines peuvent induire une cascade de signalisation.

Les intégrines peuvent interagir directement ou indirectement avec les molécules du cytosquelette (Taline : Tal ; α -Actinine : α -Act ; Vinculine : V ; Actine) et des tyrosines kinases telles que les FAK (focal adhesion kinase) et des kinases de la famille de Src. Après interaction des intégrines avec la MEC, la phosphorylation des FAK se réalise et induit celle de la paxilline (Pax), la p130 et la tensine. La FAK peut alors se lier à l'adaptateur Grb2, la paxilline à l'adaptateur Crk et la p130 à l'un ou l'autre des adaptateurs. Grb2 et Crk se lient aux protéines SOS et C3G qui activent la voie ras induisant la signalisation par les MAP kinases.

D'après Ben-Ze'ev, 1997.

II.2.3. Les intégrines sont associées à un système de transduction.

L'accumulation, d'une part des intégrines en agrégats à la surface cellulaire et d'autre part des molécules de connexion au cytosquelette et de kinases associées facilite les interactions entre les différents réactants et initie la cascade de transduction du signal qui participe à la migration (Damsky et Werb, 1992; Juliano et al., 1993; Clarke et al., 1995).

Les « Integrin Linked Kinase » (ILK) et les « Focal Adhesion Kinase » (FAK) peuvent se lier directement au domaine cytoplasmique des intégrines $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ (Shoukat et Hannigan, 1996). Il existe une double implication à la fois dans la structuration du cytosquelette et l'activation de la cascade de signalisation (Fig. 10). L'occupation des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ induit la phosphorylation de la p125 FAK et de la paxilline et tensine (Richardson et Parsons, 1995). Par ce biais, la FAK peut réguler la réorganisation de l'actine du cytosquelette. L'intégrine $\alpha 6\beta 4$, nécessaire à l'assemblage des héli-desmosomes, interagit avec la laminine. Cette interaction entraîne la phosphorylation de tyrosines du domaine cytoplasmique de la sous unité $\beta 4$. Certaines tyrosines phosphorylées permettent l'interaction de l'intégrine avec la protéine Shc phosphorylée et l'adaptateur Grb2 ce qui permet la liaison au système Ras (Maniero et al., 1995). D'autres séquences phosphorylées de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ permettent l'interaction aux filaments intermédiaires du cytosquelette (Weaver et Roskelley, 1997).

Les FAK associées à la fois au domaine cytoplasmique des intégrines et aux molécules du cytosquelette sont alors activées et déclenchent la cascade de signalisation dépendante du composant matriciel (Fig. 11). Cette cascade fait intervenir un accroissement du pH dû à une perte de H^+ à la suite d'une activation de la pompe Na^+H^+ et une augmentation du Ca^{++} intracellulaire (Yamada et Geiger, 1997). L'activation de c-src a pu être détectée en présence de FAK phosphorylées. La PKC peut aussi être activée et entraîner la translocation de $NF\kappa B$. Il a pu être montré que $NF\kappa B$ active la transcription de *c-fos*, *c-jun*, *IL-1*, *MAD-6* et *CSF-1*, gènes dont la transcription est activée par l'attachement cellulaire (Judware et Culp, 1997).

Le signal de transduction émanant de la matrice est donc capable d'induire des réponses nucléaires via les intégrines, à travers les molécules du cytosquelette (Skalli et al. 1991). Dans le cas de la glande mammaire, l'expression de β caséine et de la protéine du petit lait (Whey Acidic

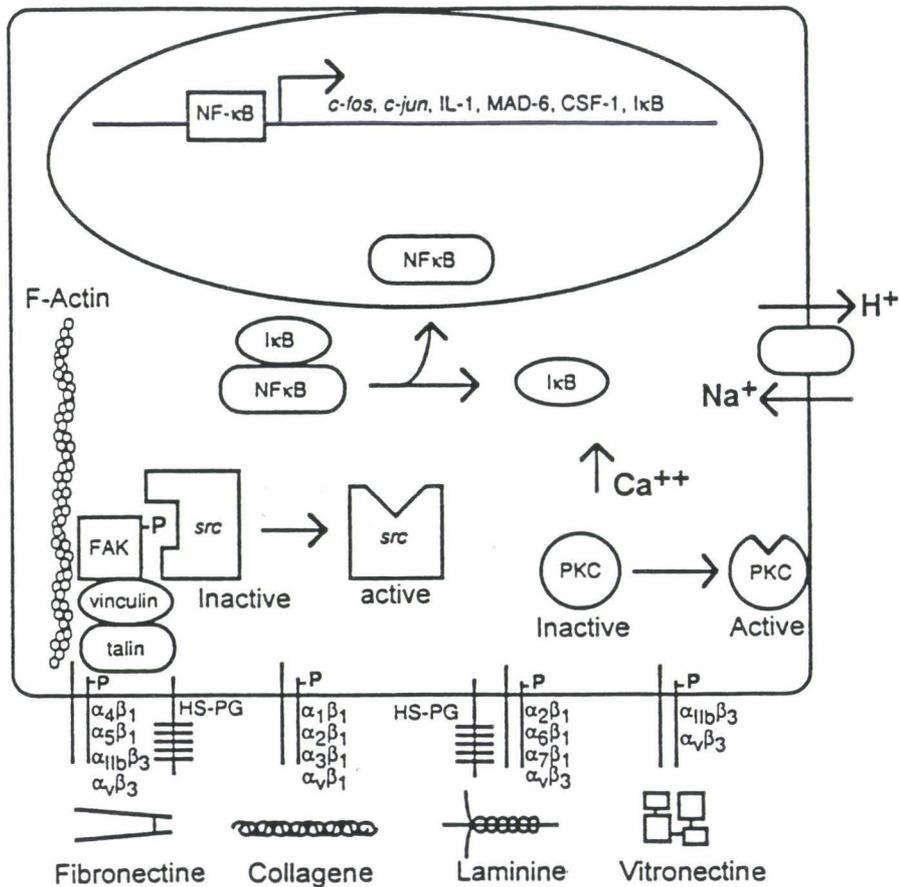


Fig. 11 : Cascade de signalisation consécutive à l'interaction des cellules et de leur matrice.

La phosphorylation des FAK peut induire une activation de Src. Le pH intra-cellulaire augmente consécutivement à l'activation de la pompe Na^+ / H^+ et le taux de Ca^{++} s'accroît. L'activation de la PKC entraîne la translocation nucléaire de NFκB qui stimule la transcriptions de gènes cibles.

D'après Judware et Culp, 1997.

Protein: WAP) par les cellules épithéliales est effectivement dépendante d'un contexte matriciel précis et de la présence de laminine (Streuli et al., 1991). Le signal constitué par l'interaction entre la laminine et l'intégrine $\beta 1$ est transmis jusqu'à un « enhancer » dépendant de la matrice du gène de la β caséine qui va induire l'expression de ce gène (Streuli et al., 1995).

II.3. E-CADHERINE ET I-CAM DANS LA COHESION DES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES

II.3.1. L'E-Cadhérine

Les cadhérines, ces molécules d'adhérence intercellulaire dépendantes du Ca^{++} , sont des glycoprotéines transmembranaires qui se lient les unes aux autres par interactions homophyliques. Elles ont un rôle fondamental dans la morphogenèse au cours du développement embryonnaire, en participant à la cohésion des cellules au sein de leur tissu.

II.3.1.1. L'E-cadhérine assure la cohésion des feuillets épithéliaux.

II.3.1.1.1 La présence de l'E-cadhérine est essentielle au cours du développement de la glande mammaire.

L'expression de l'E-cadhérine a été observée au niveau des contacts entre cellules épithéliales dans les tissus mammaires alvéolaires de souris (Streuli et al., 1991) et humain (Oka et al., 1993). Daniel et al. (1995) ont détecté la présence de l'E-cadhérine au contact entre les cellules luminales des canaux mammaires ainsi que dans les couches formant le corps des bourgeons terminaux. Ces auteurs ont alors implanté à côté de ces bourgeons des billes libérant un anticorps bloquant anti-E-cadhérine, ce qui a provoqué la dissociation des cellules luminales de l'épithélium des bourgeons et des canaux, et le détachement de ces cellules dans la lumière. La prolifération des cellules du bourgeon terminal décroît simultanément, mais non de façon irréversible, puisque lorsqu'on élimine l'anticorps, les cellules se réagrègent et prolifèrent à nouveau normalement (Silberstein et al., 1982).

Ceci indique d'une part, que l'E-cadhérine est nécessaire à l'intégrité de l'épithélium mammaire, d'autre part, que ces cellules épithéliales normales ont besoin d'être associées les unes aux autres pour proliférer. Ce critère, caractéristique des cellules normales s'oppose

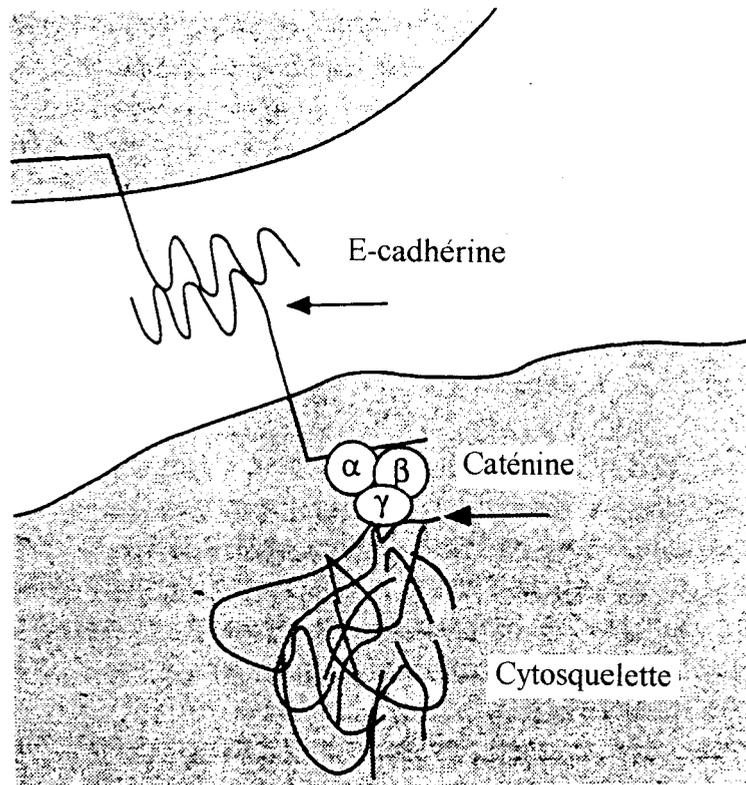


Fig. 12 : L'E-cadhérine peut interagir avec le cytosquelette.

Le domaine cytoplasmique des molécules de E-cadhérine se lie avec les sous-unités α , β , γ caténines. Les caténines interagissent elles mêmes avec le cytosquelette et sont susceptibles d'en modifier l'organisation.

D'après Jiang et al., 1994.

radicalement au comportement des cellules cancéreuses pour lesquelles l'augmentation de croissance et de malignité est corrélée à la baisse d'expression de l'E-cadhérine (Takeichi, 1993; Daniel et al., 1995).

II.3.1.1.2. L'expression de l'E-cadhérine est modifiée en cas de cancer du sein.

Si l'absence d'E-cadhérine n'est pas un critère suffisant pour déterminer la malignité des cellules, de nombreuses pistes montrent une association entre la baisse d'expression de cette molécule et les potentiel tumoral et invasif des cellules (pour revue, Mareel et al., 1994).

De très faible taux d'expression de l'E-cadhérine sont détectés dans les grades élevés de tumeurs et sont associés à un mauvais pronostic de survie (Gamallo et al., 1996; Guriec et al., 1996). De plus, Berx et al. (1996) ont pu mettre en évidence des mutations du gène de l'E-cadhérine dans les carcinomes lobulaires invasifs. En outre, la perte d'expression des cadhérines est associée au potentiel invasif des cellules épithéliales mammaires (Frixen et al., 1991; Vleminkx et al., 1991; Sommers et al. 1991). Par ailleurs, la perte d'expression de l'E-cadhérine est associée à l'augmentation d'expression de c-erb-B2, elle-même corrélée à l'accroissement du pouvoir invasif des cellules épithéliales mammaires cancéreuses. (Charpin et al., 1997; D'souza et Taylor-Papadimitriou, 1994). Le rétablissement de l'expression de l'E-cadhérine dans les cellules épithéliales mammaires cancéreuses invasives humaines ou murines, grâce à la transfection d'un ADNc codant l'E-cadhérine supprime le caractère invasif et métastatique de ces cellules (Vleminkx et al., 1991; Frixen et al., 1991; Mbalaviele et al., 1996).

La cohésion cellulaire réalisée par l'E-cadhérine apparaît donc comme une entrave à la migration excessive et dérégulée des cellules épithéliales mammaires.

II.3.1.2. L'interaction de l'E-Cadhérine avec le cytosquelette et la transduction du signal.

Le domaine cytoplasmique de l'E-cadhérine se lie aux sous unités α , β et γ de la caténine et à la plakoglobine qui établissent des liens avec le cytosquelette d'actine (Fig. 12). Les défauts de l'E-cadhérine ou des molécules d'association, dans les cellules tumorales, peuvent entraîner une réorganisation et ainsi modifier, via la restructuration de l'actine, les capacités migratoires des cellules. La sous unité β de la caténine et la plakoglobine sont aussi responsables de la transduction du signal d'adhérence vers le noyau (Fig. 13). Après leur association avec la partie

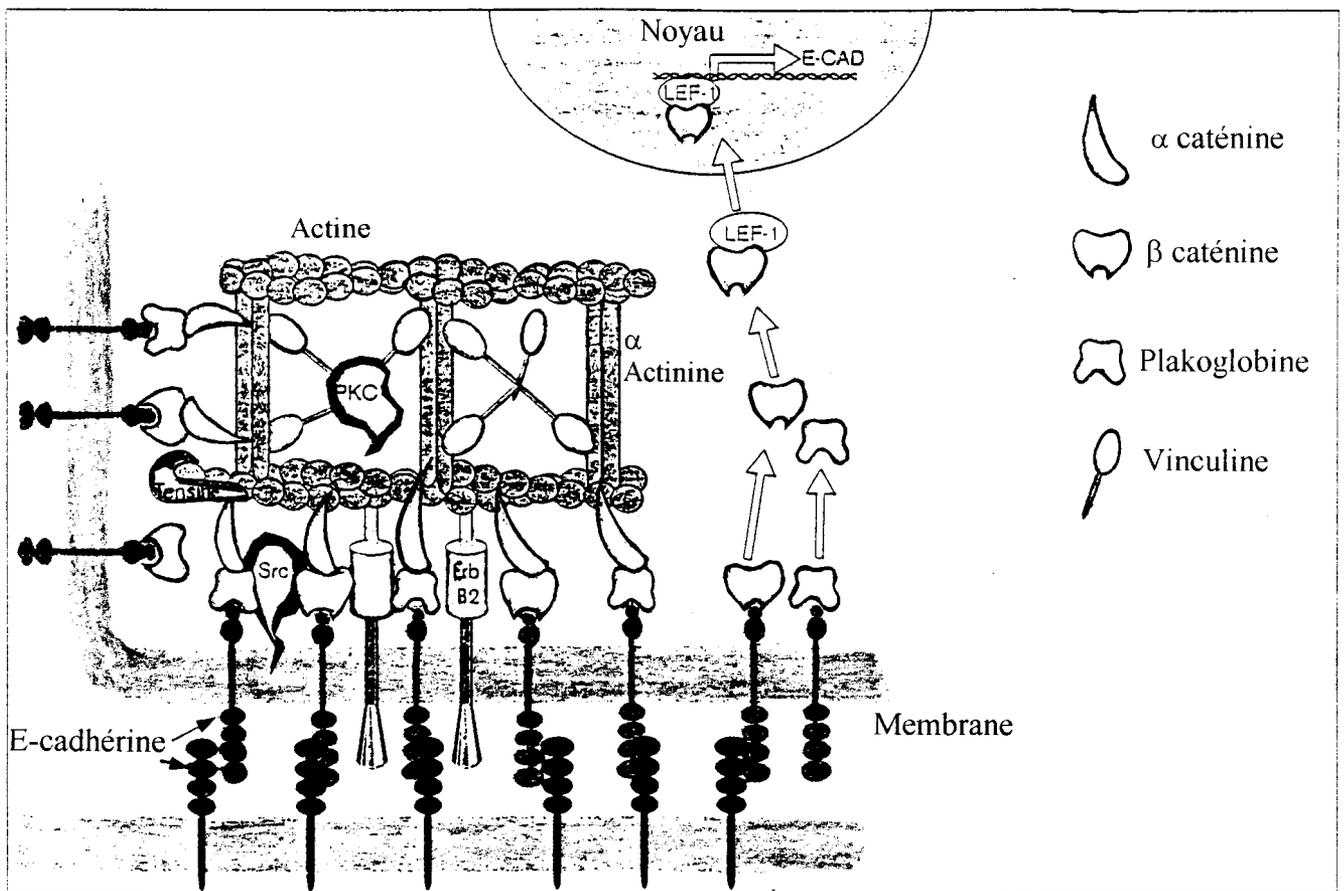


Fig. 13 : L'E-cadhérine peut induire une cascade de signalisation.

Les caténines sont capables de transmettre le signal d'interaction inter-cellulaire issu de l'E-cadhérine jusqu'au cytosquelette. Après interaction avec le domaine cytoplasmique de l'E-cadhérine, la β caténine et la plakoglobine peuvent s'associer au facteur de transcription LEF-1. Le complexe LEF-1/ β caténine ou plakoglobine peut alors être transloqué dans le noyau et y stimuler la transcription de gènes dont celui de l'E-cadhérine. L'association du récepteur oncogénique Erb B2 avec la β caténine ou la plakoglobine peut aussi stimuler cette voie de signalisation.

D'après Ben-Ze'ev, 1997.

intra-cellulaire de l'E-cadhérine, la sous unité β ou la plakoglobine peuvent se complexer à des facteurs de transcription et être transloquées dans le noyau pour y activer la transcription de gènes impliqués dans la mobilité cellulaire.

II.3.2. L'I-CAM-1.

L'I-CAM-1, glycoprotéine qui appartient à la superfamille des immunoglobulines est également responsable d'interactions cellules-cellules. Cette molécule a été initialement décrite lors du processus inflammatoire où elle permet le déplacement des leucocytes jusqu'au site de l'inflammation (Leff et al., 1991; Bujia et al., 1996). En effet, dans ces situations l'I-CAM-1 est surexprimée dans les cellules endothéliales, les cellules de l'épithélium bronchique et la lignée monocyte-macrophage. Dans les cancers mammaires, des réactions analogues de défense de l'organisme induisent la surexpression de l'I-CAM-1 dans l'endothélium tumoral ou péri-tumoral (Jallal et al., 1995 ; Nilsson et al., 1996). Par contre, l'augmentation d'expression de l'I-CAM-1 dans les cellules épithéliales de carcinomes mammaires accompagne la régression des lésions tumorales (Ozello et al., 1992). Dans ce cas, l'I-CAM-1 joue son rôle dans le maintien de la cohésion entre les cellules d'un même tissu.

BILAN DE LA PREMIERE PARTIE ET PERSPECTIVES:

La présence informative de la MEC module l'organisation spatiale des cellules et leur fonctionnement grâce à des récepteurs chargés de l'interaction entre cellules et matrice. Les cellules à leur tour remodelent leur matrice en sécrétant des protéases chargées de la dégradation des composants matriciels. Dans l'intégrité de la MEC, qu'elle forme la lame basale ou le support du stroma mésenchymateux, ou dans les interactions des cellules entre-elles, résident deux aspects de la modulation de la migration. Mais, qu'en est-il des contrôles moléculaires de ces mécanismes semblant entrer en jeu à la fois dans le développement normal et la progression cancéreuse?

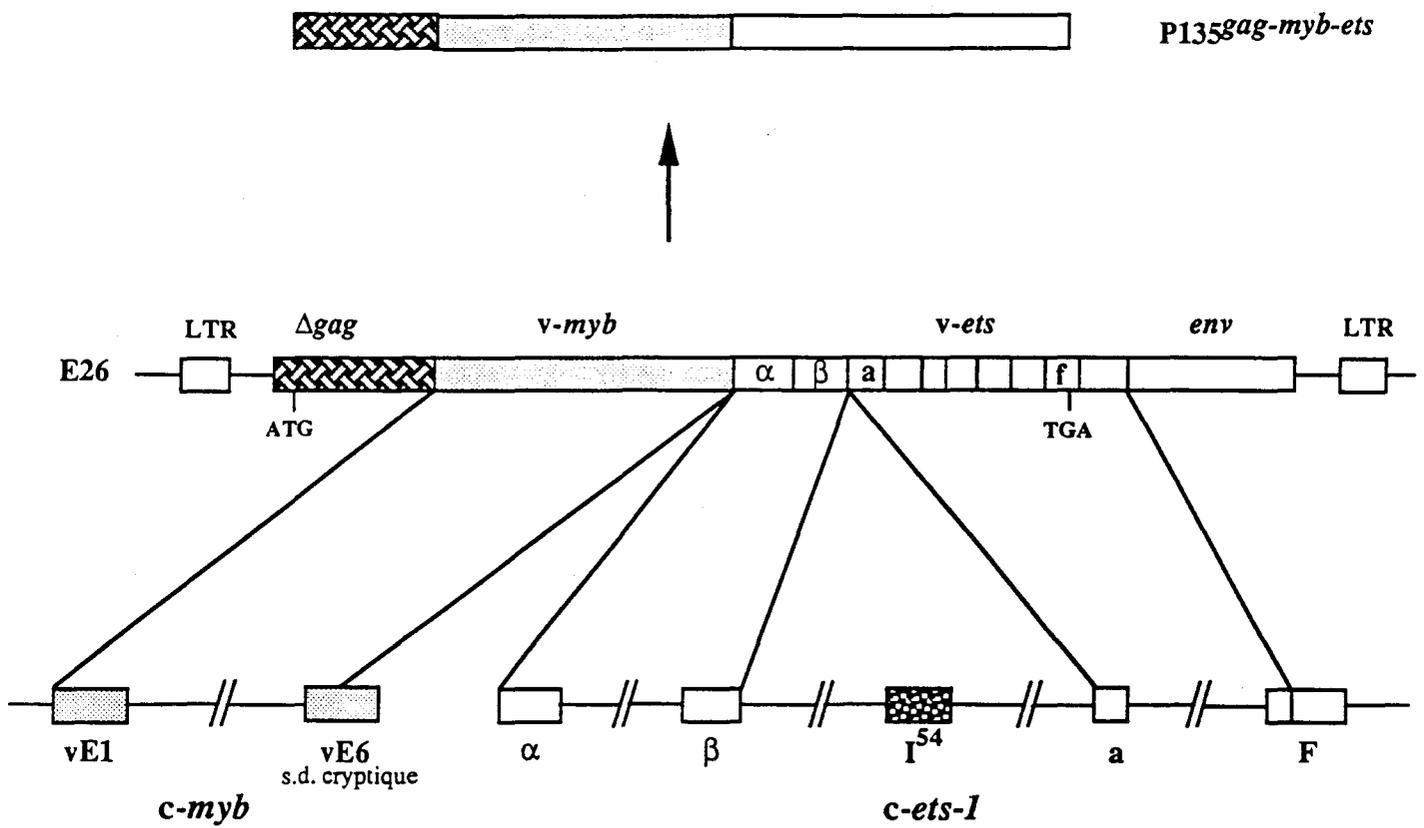


Fig. 14 : Structure et genèse du rétrovirus E 26.

DEUXIEME PARTIE :

C-ETS-1, PREMIER ROLE DANS LA SAGA D'UNE GRANDE FAMILLE DE FACTEURS DE TRANSCRIPTION.

La glande mammaire apparaît comme un modèle riche en phénomènes invasifs, régulés lors du développement normal, non jugulés pendant la cancérogenèse. Si le rôle d'oncogènes comme *myc* et *erb* (Pour Revue, Groner et al., 1992) a pu être mis en évidence dans les dérégulations cancéreuses, il n'existe que peu de travaux établissant un lien causal entre l'expression d'un facteur de transcription et le potentiel invasif des cellules épithéliales mammaires.

Nous nous sommes proposés d'étudier l'implication du proto-oncogène *c-ets-1*, prototype d'une famille de facteurs de transcription dans les processus invasifs normaux et cancéreux de la glande mammaire.

I. LE PROTO-ONCOGENE C-ETS-1

I.1. AU COMMENCEMENT IL Y EUT LE RETROVIRUS E 26

I.1.1. L'oncogène *ets* a d'abord été découvert sous sa forme virale *v-ets*, présente dans le virus aviaire leucémogène déficient (DLV) E 26.

Dès 1979, Roussel et al. ont mis en évidence dans le génome de ce rétrovirus l'existence d'une séquence d'origine cellulaire en plus de celle de *v-myb*. Cette séquence a été dénommée *ets* pour E-Twenty-six Specific (Leprince et al., 1983) ou E-Transformation-Specific (Nunn et al., 1983). Le virus E 26, dont le génome est constitué d'ARN, est déficient pour sa réplication en raison de l'absence de certaines séquences virales. Sa propagation nécessite l'apport par un virus auxiliaire des protéines de capsid, de la rétrotranscriptase responsable de la réplication et des protéines de l'enveloppe, codées respectivement par les gènes *gag*, *pol* et *env*.

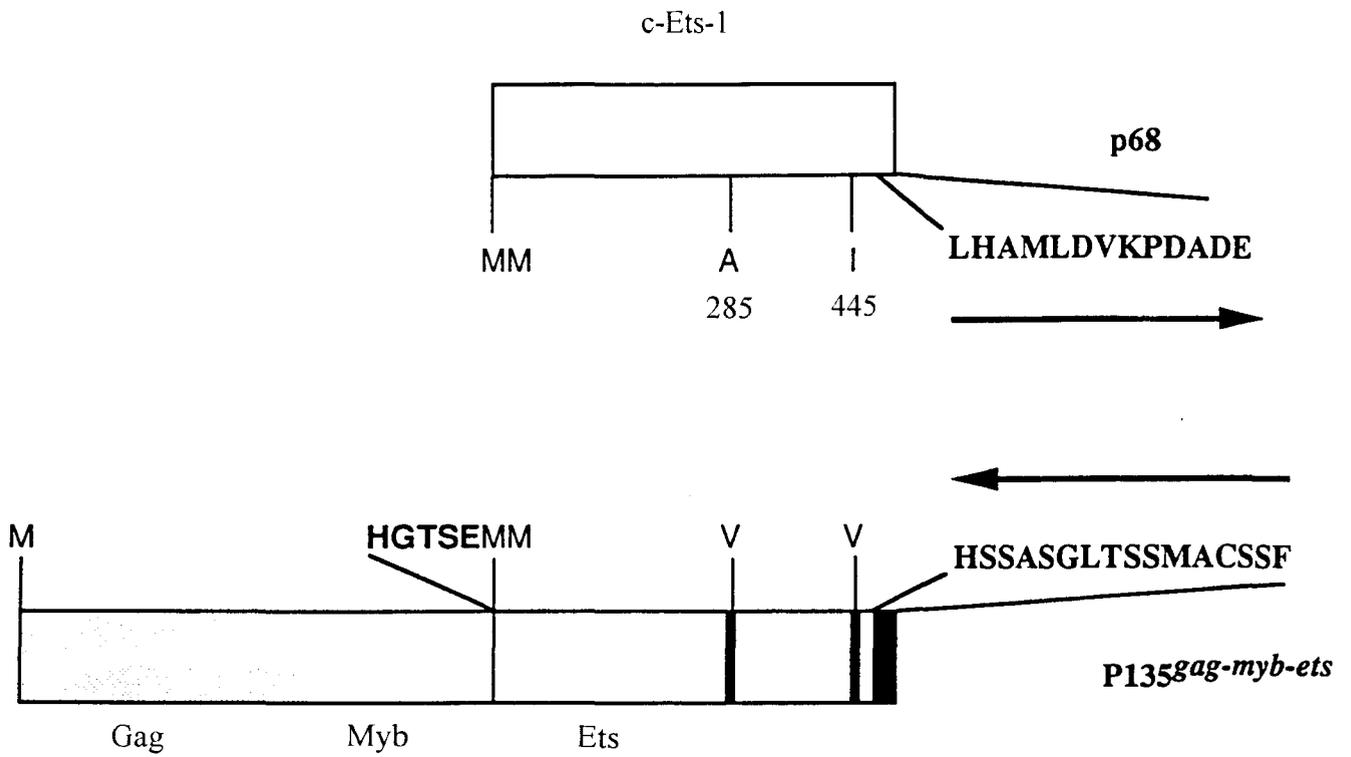


Fig. 15 : Représentation schématique des divergences existant entre la protéine virale et la protéine Ets-1 aviaire (Leprince et al., 1993).

L'ADN proviral du virus E 26 contient une partie des gènes *gag* et *env*, deux séquences d'origine cellulaire, les oncogènes *v-myb* et *v-ets* qui confèrent ses propriétés transformantes au virus et deux LTR (Long Terminal Repeat) séquences promotrices de la transcription virale, encadrant les gènes précédents.

Le virus code une protéine de fusion de 135 kDa, la P 135^{gag-myb-ets}, à localisation nucléaire, détectée dans les cellules transformées par le virus (Nunn et al., 1983; Boyle et al., 1984).

I.1.2. Les séquences *v-myb* et *v-ets* proviennent de la transduction des deux gènes cellulaires normaux *c-myb* et *c-ets-1*, appelés proto-oncogènes, codant des facteurs de transcription (Fig. 14)

Dans le génome de E 26, la séquence de *v-myb* est homologue à celle des six premiers exons codants de *c-myb*, le 1^{er} exon étant amputé en 5', tout en conservant le cadre de lecture. Le début du premier exon de *c-ets-1*, exon α , se joint au milieu de l'exon 6 de *c-myb*. La fusion dans la bonne phase des séquences des deux oncogènes résulte probablement d'un épissage illégitime ayant accolé un site cryptique donneur de l'exon 6 de *c-myb* et un site accepteur normal de l'exon α de *c-ets-1* (Leprince et al., 1988).

La séquence de *v-ets* est homologue à celle des exons α , β et a à F de *c-ets-1*, avec cependant deux mutations ponctuelles et une modification à l'extrémité C-terminale (Fig. 15). De plus, à l'extrémité N-terminale, les onze nucléotides 5' non codant de *c-ets-1* sont traduits dans *v-ets*. A l'extrémité C-terminale, les treize derniers acides aminés codés par *c-ets-1* sont remplacés dans le produit de *v-ets* par seize autres acides aminés. Ces derniers sont codés par le brin complémentaire de celui codant les treize derniers acides aminés de *c-ets-1* (Leprince et al., 1993).

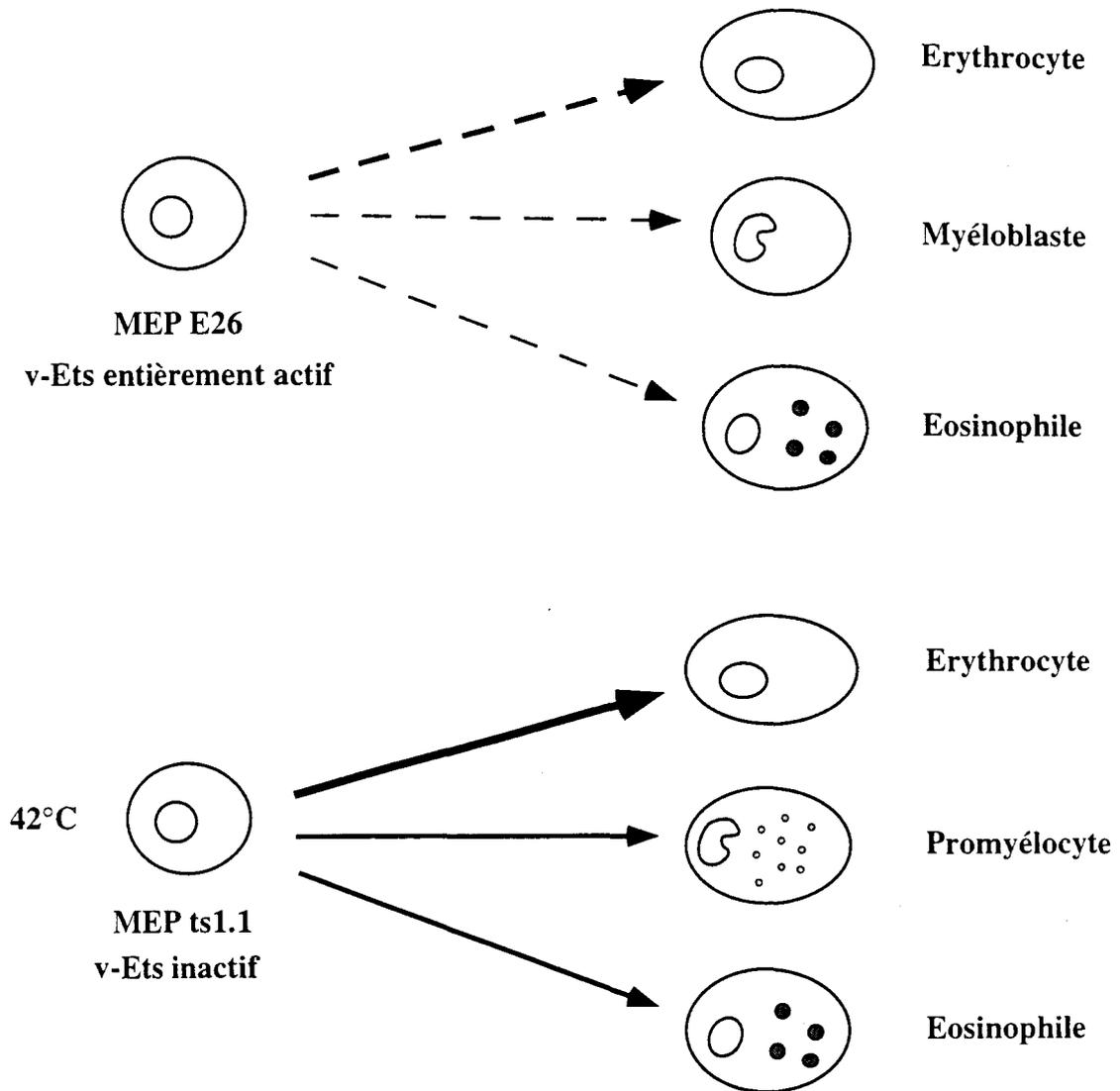


Fig. 16 : E 26 transforme des cellules multipotentes et requiert l'activité du domaine Ets de liaison à l'ADN.

Seule une faible fraction des cellules souches MEP, progéniteurs hématopoïétiques multipotents, transformées par E 26 peut se différencier. Le mutant E 26 ts1.1 porte une mutation thermosensible dans le domaine Ets. A température restrictive pour ce mutant, v-Ets devient inactif et les cellules peuvent se différencier spontanément. D'après Kraut et al. (1994).

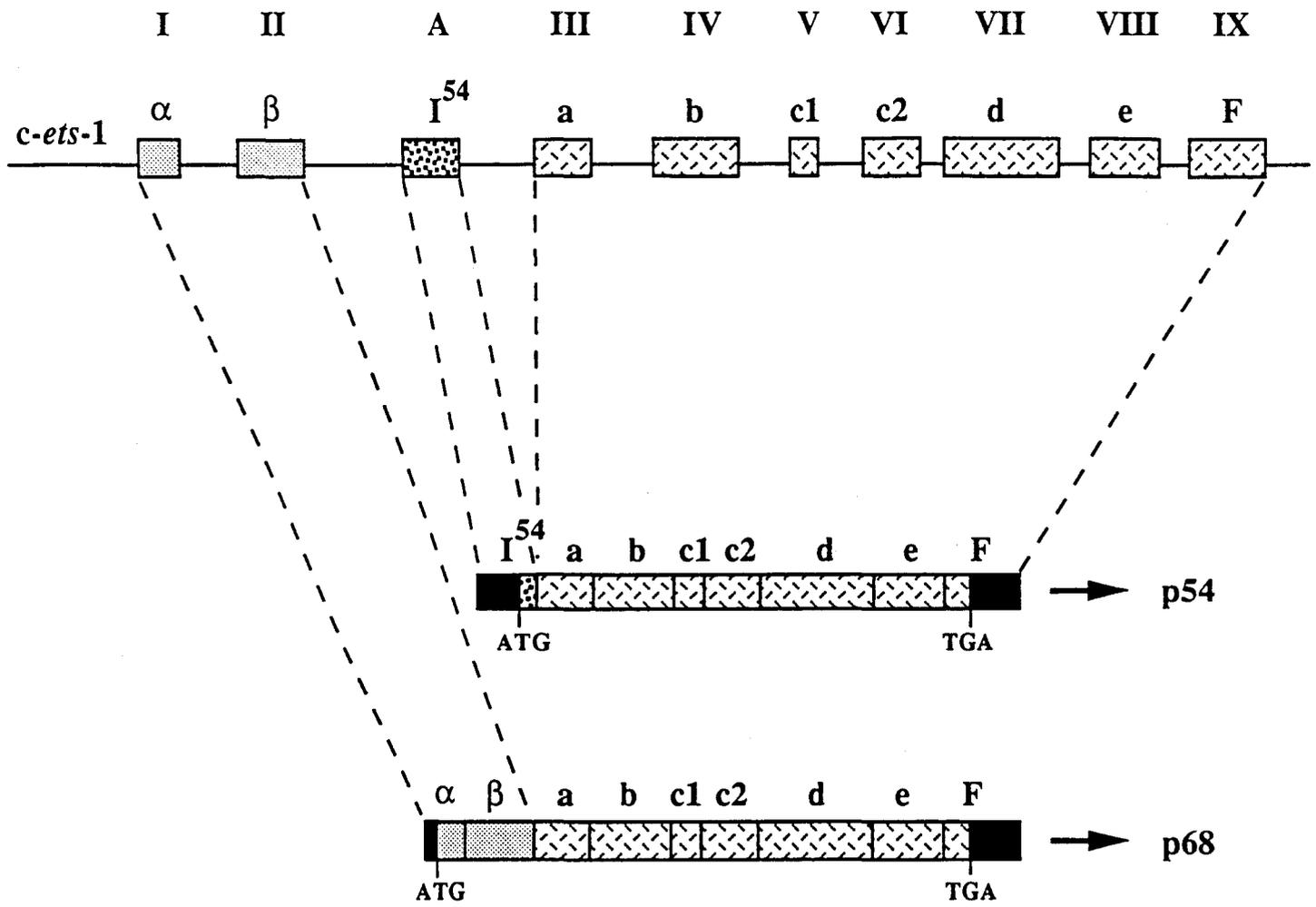
I.1.3. Le rétrovirus E 26 affecte les processus de différenciation et de prolifération des cellules hématopoïétiques

Ce rétrovirus a été isolé en Bulgarie en 1962 dans un poulet de basse court (Ivanov et al., 1962). Il induit chez le poulet une leucémie mixte érythroïde et myéloïde (Radke et al., 1982). L'infection de myéloblastes et érythroblastes de culture de moelle osseuse aboutit à la formation de trois types de colonies transformées: érythroïdes, myéloïdes et colonies mixtes composées de cellules exprimant des marqueurs soit érythroïdes soit myéloïdes. Le rétrovirus aurait donc pour cible des cellules progénitrices des lignées érythroïdes et myéloïdes et des cellules progénitrices bipotentes, les MEPs, communes aux deux lignées (Graf et al., 1992). D'autres expériences indiquent que toutes les voies de différenciation hématopoïétique seraient des cibles pour la transformation par le rétrovirus E 26 à l'exception des voies lymphoïdes (Domenget et al., 1992).

I.1.4. *v-myb* et *v-ets* contribuent tous deux aux propriétés leucémogènes de E26

Golay et al. (1988) ont montré que la fonction du domaine de fixation à l'ADN de Ets (domaine ETS) est nécessaire au blocage de la différenciation des MEPs. Ces auteurs ont obtenus un mutant thermosensible de E 26, ts 1.1, qui porte une mutation dans le domaine ETS. Alors que les MEP transformées par E 26 se différencient très peu, les MEPs infectées par E 26 ts1.1 peuvent se différencier quand on les cultive à température restrictive (Fig. 16). *v-ets* se comporte donc comme un inhibiteur de différenciation. Si la délétion du domaine de fixation à l'ADN de *v-Ets* inhibe la capacité de transformation des cellules érythroïdes (Nunn et Hunter, 1989 ; Domenget et al., 1992), elle n'empêche pas la transformation des cellules myéloïdes. Parallèlement, une mutation ponctuelle dans le domaine de fixation à l'ADN de *v-Myb* n'a pas d'effet sur la transformation érythroïdes (Beug et al., 1984) mais entraîne la perte de la capacité à transformer des cellules myéloïdes (Frykberg et al., 1988).

Ainsi, la partie Myb de la protéine de fusion est responsable de la transformation des cellules myéloïdes et la partie Ets permet la transformation des cellules érythroïdes.



α à F selon Leprince *et al.*, 1988
 I à IX selon Watson *et al.*, 1988
 ■ régions non codantes

Fig. 17 : Transcrits du locus *c-ets-1* aviaire et leur produit .

Néanmoins, des analyses fines à partir de l'étude de virus recombinants exprimant soit Myb ou Ets seules, soit Myb et Ets séparées dans un même virus, soit Myb et Ets fusionnées, indiquent qu'une coopération existe entre v-Myb et v-Ets au sein de la P 135^{gag-myb-ets} (Metz et Graf, 1991 a et b). Les virus qui expriment les protéines v-Myb et v-Ets séparément ne causent pas de leucémies. Ainsi, l'expression de v-Myb et v-Ets sous la forme d'une protéine de fusion apparaît indispensable à l'activité leucémogène du virus.

I.2 PUIS LES HOMOLOGUES CELLULAIRES DE V-ETS FURENT DECOUVERTS

I.2.1. Le proto-oncogène *c-ets-1* aviaire (Fig. 17).

Les sondes synthétisées à partir de la séquence virale *v-ets* ont permis le clonage de son homologue cellulaire chez le poulet : le proto-oncogène *c-ets-1*. Son locus est réparti sur 80 kpb d'ADN génomique. Les régions homologues à *v-ets* sont séparées en deux domaines situés de part et d'autre d'une séquence de 40 kpb, non apparentée au gène viral, contenant l'exon I⁵⁴ (ou A). Le premier domaine est homologue aux 223 nucléotides de la partie 5' de *v-ets*. Il est composé de deux séquences exoniques nommées α et β (ou respectivement I et II). Le deuxième domaine comprend 7 régions a, b, c1, c2, d, e, F (ou respectivement II, IV, V, VI, VII, VIII, IX) homologues aux 1250 pb restantes de la séquence virale.

Le locus cellulaire *c-ets-1* est transcrit en deux ARNm majeurs de 7,5 kpb résultant d'un processus d'initiation de la transcription et d'épissages alternatifs (Leprince et al., 1988 ; Crépieux et al., 1993).

Un ARNm, particulièrement exprimé dans les cellules lymphoïdes, contient en 5' l'exon I⁵⁴, épissé aux exons a à F (Chen et al., 1988). Il est initié au niveau d'un promoteur en amont de l'exon I⁵⁴. Cet ARN code la protéine majeure de poids moléculaire 54 kDa (p54) (Ghysdael et al., 1986 a ; Gégonne et al., 1987 b). Les 27 premiers acides aminés de la p54 codés par l'exon I⁵⁴ n'ont pas d'équivalents dans la p135^{gag-myb-ets} (Duterque-Coquillaud et al., 1988; Watson et al., 1988 a).

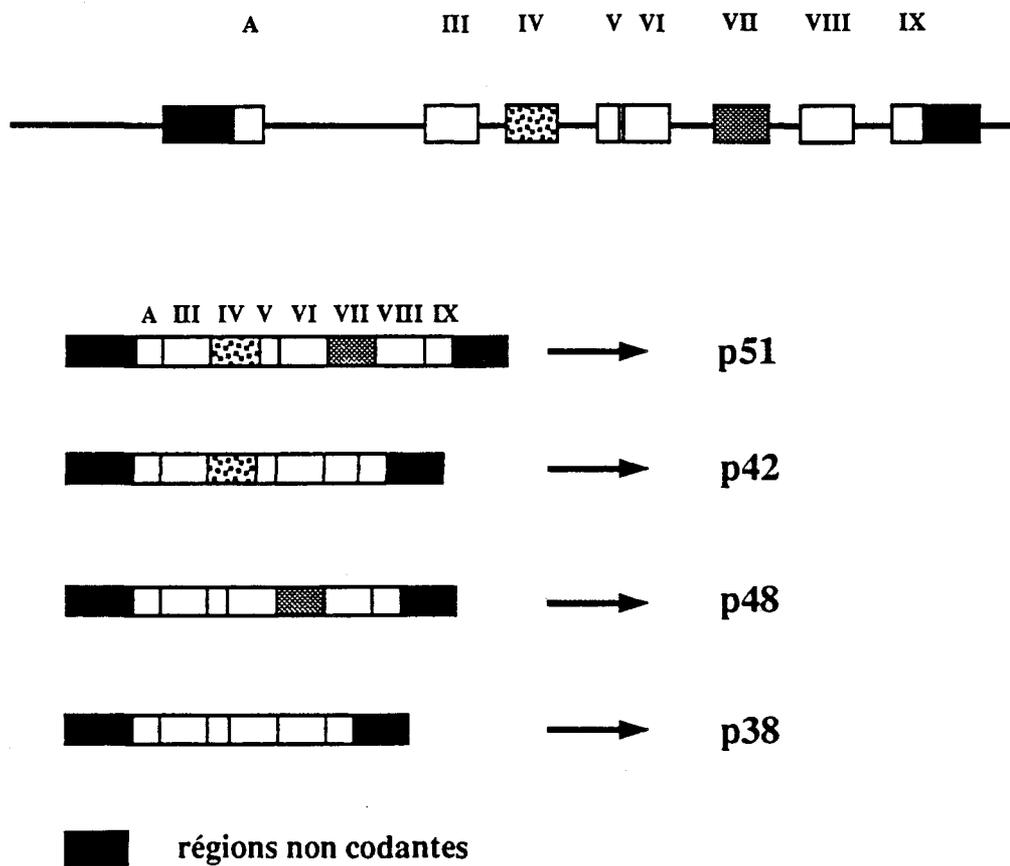


Fig. 18 : Transcrits du locus *c-ets-1* humain et leur produit .

Un deuxième ARNm majeur, détecté dans la rate, contient en 5' les exons α et β suivis des exons a à F (Leprince et al., 1988). Cet ARNm, codant une protéine d'un poids moléculaire de 68 kDa (p68), est initié au niveau d'un promoteur situé en amont d'un exon nommé Y (Crépieux et al., 1993). Il est le progéniteur cellulaire de *v-ets*.

Le locus *c-ets-1* est aussi transcrit en deux ARNm mineurs de 1,5 et 2 kpb (Leprince et al., 1983; Chen et al., 1985).

I.2.2. Les proto-oncogènes humains et murins (Fig. 18)

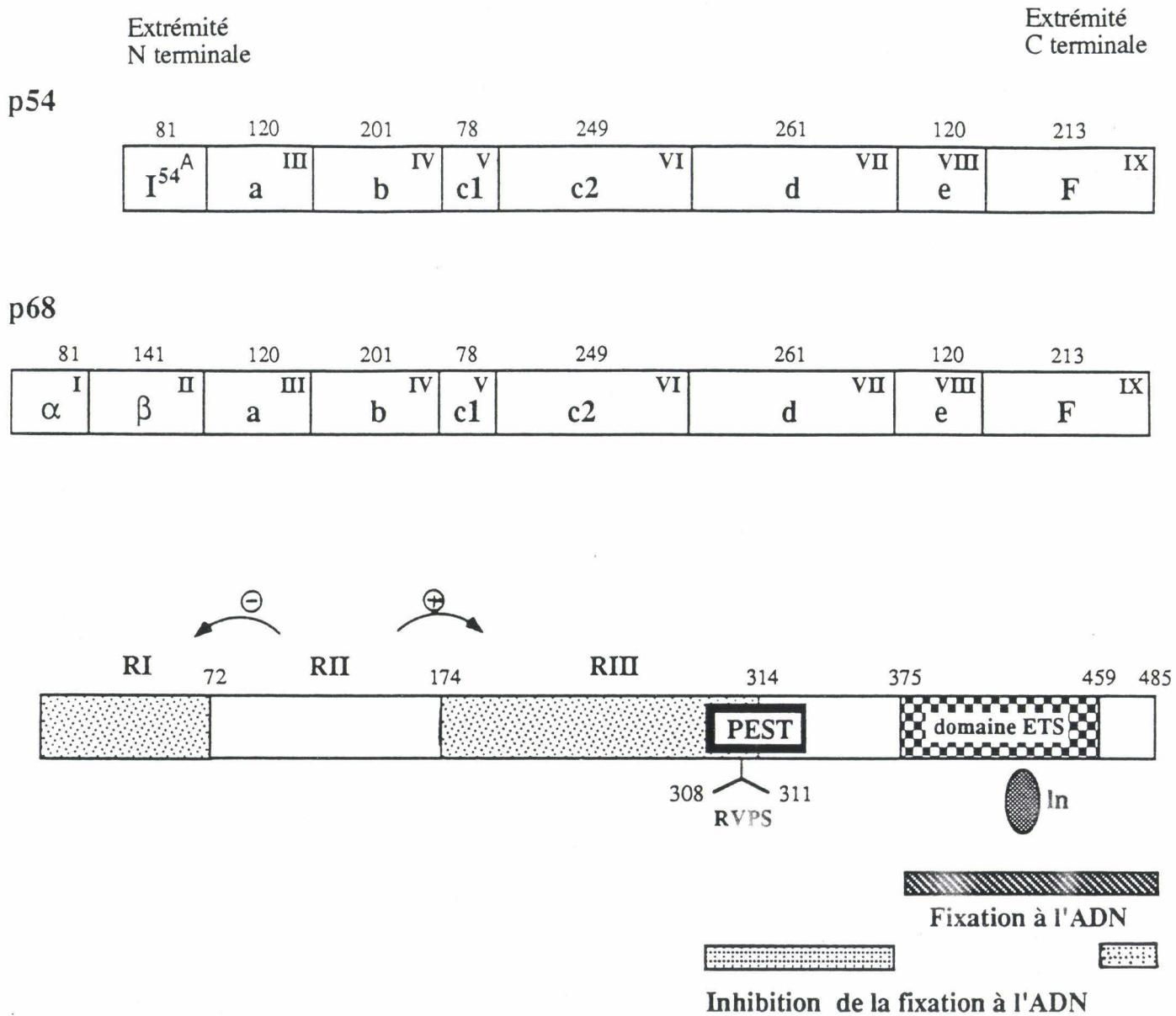
Chez l'homme, le locus *c-ets-1* est localisé sur le bras long du chromosome 11 (De Taisne et al., 1984). Il comprend 8 exons (A, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX) distribués sur 60 kpb, et précédés d'une région promotrice de 2 kpb. Les exons sont identiques en taille à ceux trouvés chez le poulet avec une identité de 95% au niveau de la séquence traduite en acides aminés (Jorcyk et al., 1991). *c-ets-1* est transcrit en un ARNm majeur de 6,8 kpb contenant l'ensemble des exons et codant une protéine de 51 kDa, la p51, homologue de la p54 aviaire (Watson et al., 1985). Par épissage alternatif d'autres ARNms sont produits, celui codant la p42 résulte de l'élimination de l'exon d (VII). L'ARNm codant la p48 a subi l'élimination de l'exon IV et celui codant la p38 est le résultat de l'épissage des exons IV et VII. Deux protéines mineures de 49 et 52 kDa sont aussi produites. Elles résultent respectivement de la phosphorylation des protéines p48 et p51.

Le clonage de l'ADNc murin (Chen, 1990) a révélé que l'organisation génomique chez la souris est très semblable à ce qui existe chez l'homme. Chez la souris, le locus *c-ets-1*, porté par le chromosome 9 (Watson et al., 1988 b), est transcrit en un ARN majeur de 5,3 kpb et en ARNms mineurs de 2,2, 2,5 et 4 kpb. Ce gène est fortement exprimé dans le thymus et code la protéine p63, homologue de la p54 aviaire et de la 51 humaine, et la protéine p52, équivalente à la p42 humaine et résultant d'un épissage alternatif (Pognonec et al., 1990).

Un homologue de la p68 aviaire n'a jamais été mis en évidence chez les mammifères.

I.3. C-ETS-1 : UN FACTEUR DE TRANSCRIPTION.

Les protéines Ets-1 comportent des domaines fonctionnels qui font d'elles des facteurs de transcription.



RI , RIII , domaines de transactivation,
 RII , domaine de régulation,

PEST , région riche en Pro, Glu, Ser et Thr,

RVPS, séquence consensus de phosphorylation par la calcium/calmoduline kinase II,

In, séquence de localisation nucléaire.

Fig. 19 : Structure et domaines fonctionnels des protéines c-Ets-1 aviaires.

I.3.1. Chez le poulet (Fig. 19).

I.3.1.1. Domaine de liaison à l'ADN

Le domaine responsable de cette activité est situé à l'extrémité carboxy-terminale des protéines. Il est codé par les exons VIII et IX (Boulukos et al., 1989; Pognonec et al., 1989; Reddy and Rao, 1990; Gégonne et al., 1992; Lim et al., 1992; Nye et al., 1992; Wang et al., 1992; Wasylyk et al., 1992). Ce domaine, très conservé au cours de l'évolution et qui a permis de définir les différentes protéines capables de se lier à l'ADN appartenant à la famille ETS, est appelé le domaine ETS (Karim et al., 1990; MacLeod et al., 1992).

Le domaine ETS, qui comprend 85 acides aminés hautement conservés, constitue un motif structural de reconnaissance ADN-protéine. Ce domaine se fixe à l'ADN sur des sites de liaison Ets-spécifiques (Ets Binding Site : EBS) comprenant une séquence GGAA/T. Le domaine ETS est organisé en trois hélices α (H1 à H3) et quatre feuillets β anti-parallèles (S1 à S4) (Skalicki et al., 1996). Les analyses structurales et fonctionnelles de ce domaine ont permis de définir sa structure tridimensionnelle ainsi que les différents mécanismes intra-moléculaires qui permettraient la modulation de la fixation à l'ADN (Mavrothalassitis et al., 1994; Petersen et al., 1995; Werner et al., 1995; Donaldson et al., 1996).

Le domaine Ets contient également le domaine de localisation nucléaire. La séquence peptidique responsable de l'adressage nucléaire (GKRKNKPK) est similaire au domaine minimum de translocation nucléaire de l'antigène T du virus SV 40 (Richardson et al., 1986). Les acides aminés situés en amont de ce signal de localisation nucléaire sont aussi importants dans cette activité et l'intégrité des 78 acides aminés carboxy-terminaux est requise pour la localisation nucléaire de la protéine p54.

I.3.1.2. Domaines de régulation de la transcription

Des expériences utilisant la fusion de mutants de délétion de la protéine p68 et un domaine de fixation à l'ADN hétérologue ont permis d'identifier deux domaines de transactivation R I et R III et un domaine de régulation R II, localisés dans la partie N-terminale de cette protéine (Schneikert et al., 1992).

Les domaines R I et R III sont capables d'activer la transcription de façon indépendante. Le domaine R I correspond aux 70 acides aminés N-terminaux codés par les exons α et β . Le domaine

R III est localisé entre les acides aminés 174 et 314 correspondants aux exons V, VI et une partie de l'exon VII. L'exon VII n'est pas nécessaire à l'activité transactivatrice (Gégonne et al., 1992). Les séquences de ces deux domaines sont différentes et présentent peu d'homologie dans leur composition en acides aminés: le domaine R I est riche en résidus cystéine et proline; le domaine R III est riche en résidus sérine et proline connus pour être importants dans la fonction transactivatrice d'autres facteurs de transcription.

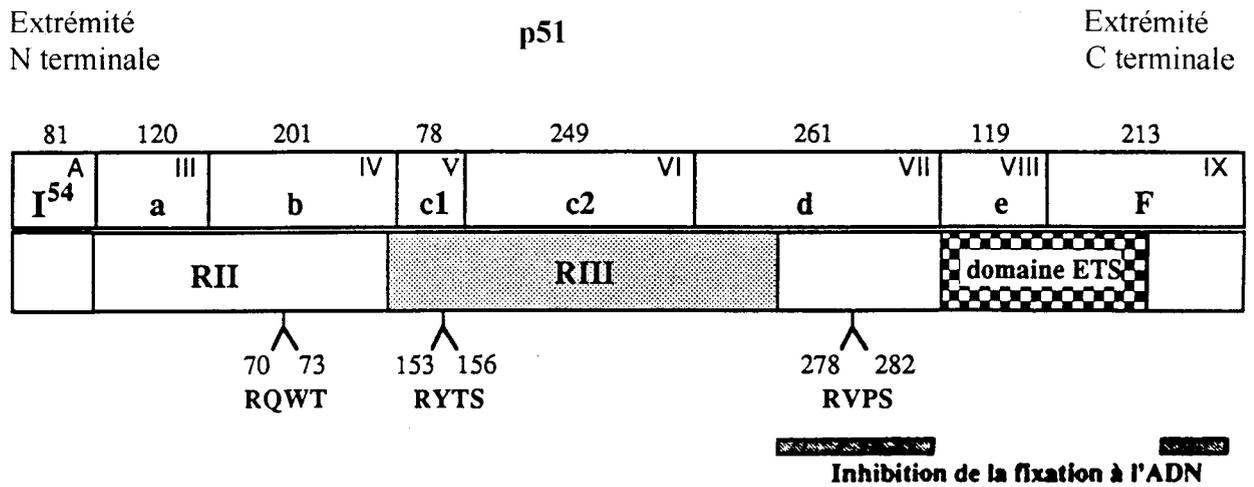
RI possède une succession de cystéines pouvant former un doigt de zinc impliqué dans des interactions protéines-protéines, qui ressemble au domaine transactivateur de la protéine Tat du virus HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus-1), (Kuppuswamy et al., 1989). Les 71 acides aminés qui spécifient la partie N-terminale de la p68 apparaissent globalement très hydrophobes (Leprince et al., 1990) et pourraient former une structure en boucle ω . Cette boucle peut être exposée à la surface de la protéine et ainsi interagir avec d'autres protéines par des interactions hydrophobes, conférant à cette protéine une activité spécifique.

La région R II située entre les deux régions transactivatrices R I et R III module la transactivation. Elle ne peut activer la transcription seule, mais combinée avec les domaines d'activation, R II a un effet de régulation négative sur l'activité de R I et un effet positif sur l'activité de R III. R II contient cinq hélices α (H1 à H5) et est impliqué dans des interactions protéine-protéine avec d'autres facteurs modulant ainsi l'activité de ce domaine.

La p54 ne possède que les domaines R II et R III. Le domaine codé par l'exon I⁵⁴ n'est pas capable d'activer la transcription lorsqu'il est fusionné à un domaine de fixation hétérologue (Schneikert et al., 1992; Gégonne et al., 1992).

I. 3.1.3. Domaines de répression intramoléculaire de la fixation à l'ADN

Nye et al. (1992), Lim et al. (1992) et Hagman et Grosschedl (1992) ont montré que deux régions de c-Ets-1 encadrant le domaine ETS, l'une localisée du côté N-terminal située dans l'exon VII, et l'autre localisée à l'extrémité carboxy-terminale, répriment la capacité de liaison à l'ADN de la protéine. L'interaction moléculaire entre ces deux domaines de c-Ets-1, permise par un repliement de la protéine, maintiendrait cette protéine dans une conformation fermée incapable de se lier à l'ADN (Wasylyk et al., 1992; Jonsen et al. 1996). Des études récentes ont décrit l'interaction des deux domaines inhibiteurs avec la première hélice du domaine ETS de façon à former « un



RIII, domaine de transactivation,
 RII, domaine de régulation,
 RQWT, RYTS et RVPS, séquences consensus de phosphorylation,
 par la calcium/calmoduline kinase II,

Fig. 20: Structure et domaines fonctionnels de la protéine c-Ets-1 humaine (p51).

module inhibiteur » qui empêche la fixation à l'ADN (Donaldson et al., 1996; Skalicky et al., 1996). De plus, la phosphorylation de sites présents dans la région inhibitrice N-terminale adjacente au domaine ETS pourrait stabiliser cette conformation inhibitrice.

I.3.1.4. Domaine de régulation de la dégradation

La séquence PEST, riche en résidus proline, glutamine, sérine et thréonine est responsable de la dégradation de la protéine (Rechsteiner et Rogers, 1996). La libération d'un fragment contenant un domaine de liaison à l'ADN exempt des domaines de régulation et capable de reconnaître en permanence des sites de fixation sur les gènes cibles pourrait ainsi interférer avec l'activité de la protéine totale (pour revue, MacLeod et al., 1992). Cette séquence PEST se situe entre la région R III et le domaine ETS.

I.3.2. Chez l'homme (Fig. 20).

Des domaines équivalents ont été identifiés chez l'homme. La protéine p 51 humaine, équivalente à la p 54 aviaire, ne comporte pas de domaine R I.

I.4. MODULATION DE L'EXPRESSION DU GENE *C-ETS-1*

I.4.1. Chez le poulet

Deux régions promotrices ont été caractérisées (Crépieux et al., 1993). La première se trouve en amont de l'exon I⁵⁴. Cette région promotrice est très homologue à celle décrite chez l'homme. Le deuxième promoteur qui fonctionne dans des fibroblastes embryonnaires est localisé en 5' d'un exon Y non codant situé en amont des exons α et β . Il initie la synthèse des messagers codant la p68 pour laquelle le domaine codé par l'exon I⁵⁴ est éliminé.

Tout comme pour les promoteurs caractérisés chez l'homme, les deux promoteurs aviaires ne présentent pas d'élément TATA ou CAAT, et la transcription des ARNm codant les protéines p54 et p68 s'initie en de multiples sites.

Le promoteur initiant la synthèse de la p 68 n'est pas spécialement riche en base G et C. Il ne comporte pas de boîtes TATA ou CAAT classiquement reconnues par l'ARN polymérase II pour la plupart des gènes eucaryotes. La transcription est initiée dans une zone contenant une

dizaine de bases C ou T. Des sites potentiels de fixation de différents facteurs de transcription spécifiques des cellules lymphoïdes ont été identifiés, tels que Elf-1, PU-1, Ets-1, TCF-1, GATA-3 en plus des sites AP-2. L'ARNm codant la p54 s'initie dans une région riche en G et C. L'organisation de ce promoteur est similaire à celle décrite pour le promoteur humain, comprenant plusieurs sites AP-2 et Sp-1 ainsi qu'une longue répétition de G/A située en aval des sites d'initiation de la transcription.

I.4.2. Chez l'homme

La transcription du gène humain *c-ets-1* s'initie en de multiples sites. Il existe 14 sites d'initiation couvrant une région de 137 pb, le site situé le plus en 3' étant localisé 305 pb en amont du codon ATG d'initiation de la traduction (Jorcyk et al., 1991). Le promoteur du gène *c-ets-1* humain ne contient pas les éléments TATA et CAAT. Par contre, il comporte un grand pourcentage en base G et C.

Une région de 706 pb incluant les sites multiples d'initiation de la transcription contient l'activité promotrice maximale pour le gène humain. Cette région présente des sites de fixation pour les facteurs de transcription Sp-1, AP-1, AP-2, EBS, SRE, NF κ B, OCT-1, OCT-2. Des expériences de transfections transitoires indiquent que les facteurs AP-1, AP-2, OCT-1, OCT-2, PEA-3 régulent positivement le promoteur dans les lignées de cellules hématopoïétiques (Bhat et al., 1996). La présence dans le promoteur de *c-ets-1* d'un site Ets-1 qui s'est avéré fonctionnel seul, suggère que la transcription de ce gène peut être régulée de façon positive par son propre produit (Seth et Papas, 1990). La présence conjointe des sites Ets-1, PEA-3, AP-2, OCT-1 et 2 permet d'augmenter l'expression du promoteur de *c-ets-1* de façon additive. Deux régions régulatrices négatives, NRE-1 et 2 ont aussi été localisées à l'intérieur du promoteur (Chen et al., 1993). Elles permettent de contrebalancer l'effet des régions de régulation positive. De plus, ces auteurs ont montré que NRE-1 et 2 sont capables de se lier à des facteurs de transcription n'étant présents que dans les cellules où le promoteur de *c-ets-1* humain est actif. La présence de facteurs se liant à NRE-2 empêche OCT-1 et OCT-2 d'exercer leur activité de régulation positive. Il est probable que, *in vivo*, les régions de régulation négative contribuent au contrôle strict de l'expression de *c-ets-1*.

Le promoteur de *c-ets-1* humain est aussi caractérisé par de longues séquences polypuriques-polypyrimidiques (G/A). Ces séquences semblent importantes pour l'activité promotrices car elles peuvent former une structure en triple hélice, sensible à la nucléase S1, sur laquelle peuvent se fixer des protéines nucléaires régulant ainsi l'inductibilité du promoteur (Mavrothalassitis et al., 1990 ; Jorcyk et al., 1991). Ces structures homopolymériques pourraient servir d'éléments fonctionnels du promoteur.

La régulation du promoteur de *c-ets-1* est donc complexe et hautement dépendante des types cellulaires. Elle implique des interactions entre les différents facteurs de transcription fixés sur le promoteur, et leur association avec d'autres facteurs de transcription présents dans un type cellulaire donné.

I.4.3. Activation de la transcription par les facteurs de croissance

De nombreux travaux ont montré que des facteurs de croissance sont capables d'induire l'expression de *c-ets-1*. L'IL-1 et le TNF α sont des stimulateurs puissants induisant une augmentation rapide (dans l'intervalle d'une heure) et durable (au moins 19 heures) de l'expression des transcrits et des protéines Ets-1 dans des cultures primaires de fibroblastes humains. Le FGF 2, l'EGF et le PDGF sont des stimulateurs plus modérés et tardifs mais potentialisent l'induction précoce de *c-ets-1* par le TNF α dans ces mêmes cellules (Gilles et al., 1996). L'augmentation rapide des ARNm de *c-ets-1* par ce facteur résulte d'une activation transcriptionnelle plutôt que d'une stabilisation des transcrits et ne nécessite pas de nouvelles synthèses protéiques. *c-ets-1* apparaît donc comme un gène de réponse précoce au TNF α dont la voie de transduction emprunterait celle de la sphingomyéline, indépendante des sérine/thréonine kinases. On peut noter que les deux activateurs puissants TNF α et IL-1 sont également impliqués dans l'induction de synthèse de l'uPA, de la collagénase I et de la stromélysine 1.

I.5. MODULATION DE L'ACTIVITE DE LA PROTEINE C-ETS-1

I.5.1. Modulation de la fixation

La fixation des protéines Ets-1 sur leurs gènes cibles, ou l'inhibition de cette fixation, permettra ou non à cette protéine de remplir ultérieurement ses fonctions transactivatrices.

I.5.1.1. Modulation par les régions régulatrices

Les séries d'expériences précédemment exposées lors de l'étude des différents domaines de Ets-1 ont pu mettre en évidence l'existence dans les protéines Ets-1 humaine, aviaire et murine de régions régulant l'activité de liaison à l'ADN. Ces domaines de régulation ont été décrits dans le paragraphe I.3.3., et sont présents dans les protéines Ets-1 en fonction de l'épissage alternatif qu'ont subi les ARNm. L'épissage peut donc être considéré comme un premier événement conditionnant la fixation ultérieure de la protéine produite.

I.5.1.2. Modulation par phosphorylation

Les protéines Ets-1 sont rapidement phosphorylées en réponse aux ionophores ou aux autres conditions qui augmentent la concentration de calcium intracellulaire (Koizumi et al., 1990). Cette hyperphosphorylation touche essentiellement quatre résidus sérine situés dans l'exon VII, et inhibe la capacité de la protéine à se fixer sur l'ADN (Fleischman et al., 1995). Fort logiquement, les isoformes de Ets-1 codées par les transcrits alternatifs sans exon VII sont insensibles à une phosphorylation dépendante du calcium (Pognonec et al., 1990; Fisher et al., 1994; Rabault et al., 1994). Ainsi, l'épissage alternatif de l'exon VII peut correspondre à une forme de régulation de l'activité des protéines Ets-1.

I.5.1.3. Modulation par compétition

La compétition pour le site de liaison à l'ADN pourrait être un autre moyen de modifier la fixation des protéines Ets à leurs séquences cibles. Une telle compétition a été observée avec la protéine de caille Pax-QNR (homologue de Pax 6 chez la souris), l'un des membres de la famille des facteurs de transcription Pax (Paired box)(Plaza et al., 1994). Ces protéines possèdent un motif de fixation à l'ADN, le domaine « Paired » (pour revue Wehr et Gruss, 1996). Pax-QNR peut inhiber *in vitro* la capacité de transactivation de la protéine p68, probablement en se fixant sur

un EBS par son motif « Paired » dont le site de reconnaissance est TTCC, soit l'équivalent de GGAA sur le brin complémentaire.

I.5.2. Modulation de l'activité transactivatrice

Ces modulations permettront aux protéines Ets-1 de réguler l'expression de leurs gènes cibles dans des situations ou des types cellulaires spécifiques.

I.5.2.1. Modulation par les régions régulatrices

Ces régions appartenant à la protéine Ets-1 ont été décrites dans le paragraphe I.3.1.2. En fonction de l'épissage alternatif, les protéines produites présentent ou non l'ensemble de ces domaines régulateurs et de ce fait ont des activités transactivatrices propres.

I.5.2.2. Modulation par phosphorylation

Les protéines Ets peuvent être phosphorylées dans leur région amino-terminale sur la thréonine 38. Ce résidu est phosphorylé *in vitro* par un membre de la famille des MAP Kinases, et *in vivo* dans les fibroblastes en réponse au sérum (Rabault et al., 1994). Dans ce contexte, la phosphorylation du résidu Thr 38 semble réguler négativement l'activité transactivatrice de Ets-1 (Rabault et al., 1996). A l'inverse, la phosphorylation de cette même Thr 38, en réponse à l'activation de Ras, augmente l'activité transactivatrice des protéines Ets-1 dans des expériences de transfections transitoires (Yang et al., 1996). L'influence directe de la phosphorylation des protéines Ets-1 sur leur activité transactivatrice n'est pas encore parfaitement éclaircie. Il est probable que la région N-terminale portant la Thr 38 soit le siège d'interactions spécifiques entre Ets-1 et d'autres protéines. Ainsi, sa phosphorylation pourrait entraîner le recrutement préférentiel de cofacteurs capables de réguler l'activité transcriptionnelle des protéines Ets.

I.5.2.3. Modulation par coopération avec d'autres facteurs

Les protéines Ets-1 et plus généralement les membres de la famille Ets sont capables de coopérer efficacement avec d'autres facteurs de transcription en interagissant directement avec eux. Les protéines Ets sont tout à fait capables de se fixer sous forme de monomères (Fisher et al., 1992 ; Nye et al., 1992). Néanmoins, ces protéines peuvent aussi interagir avec des protéines issues de familles différentes, impliquées dans des mécanismes physiologiques variés, ce qui accroît considérablement leur pouvoir transactivateur. Nous décrivons plus en détail les

Protéine	Séquence de fixation à l'ADN	Promoteur/Enhancer
Ets-1 (poulet)	GCA GGAA GCATT	Stromélysine
Ets-1 (poulet)	TCGA GGAA GTGAC	Virus du polyome
Ets-1 (homme)	GAAA GGAA GGGCG	Promoteur <i>Ets-1</i>
Ets-1 (homme)	GGA GGAA ATGG	LTR du HTLV-1 (ERE-A)
Ets-1 (homme)	CCG GGAA GCCA	LTR du HTLV-1 (ERE-B)
Ets-1 (homme)	CGC GGAA ATGT	LTR du HTLV-1 (ERR-2)
Ets-1 (homme)	CAGA GGAT GTGG	TCR- α
Ets-1 (homme)	GCA GGAA GT	Promoteur <i>Ick</i> type I
Ets-1 (homme)	CGA GGAA GG	Promoteur <i>GATA-1</i>
Ets-1 (souris)	GAGC GGAA GCGC	LTR du MSV

Fig. 21 : Exemples de séquences de fixation des protéines Ets-1 dans le promoteur de gènes cibles.

coopérations de différents co-facteurs avec Ets-1 et les protéines de la famille Ets dans un paragraphe suivant, consacré à la spécificité d'actions des protéines Ets.

I.6 LES SITES DE FIXATION A L'ADN

Des séquences de fixation des protéines Ets, appelées EBS pour « Ets Binding Site » ont été identifiées dans des séquences de régulation de la transcription de différents gènes viraux et cellulaires, ce qui a conduit à l'identification de gènes cibles pouvant être régulés par des protéines Ets.

La comparaison de différentes séquences de fixation des protéines Ets a permis de définir le noyau GGAA/T, riche en purine, qui est retrouvé dans tous les sites de fixation des protéines Ets (Karim et al., 1990) et dont l'intégrité est nécessaire à la fixation. Par exemple, une mutation au niveau d'un G (GGAA= > AGAA) abolit complètement la fixation spécifique à l'ADN de la p68 (Wasylyk et al., 1990). D'autre part, la différence d'affinité de fixation entre les protéines Ets-1 et Ets-2 sur différents promoteurs est fonction des nucléotides proximaux entourant la séquence GGAA/T (Ascione et al., 1992).

Des séquences consensus cibles pour les protéines Ets-1 aviaire (Woods et al., 1992), murine (Nye et al., 1992) et humaine (Fisher et al., 1991) ont été définies *in vitro*.

Ets-1 poulet	ACC GGAA ATT C T G
Ets-1 souris	ACC GGAA GT G T C
Ets-1 homme	GGC GGAA GT ACA C

Les séquences flanquantes du noyau GGAA/T sont aussi nécessaires à la sélectivité de reconnaissance et de transactivation. Quelques séquences de fixation des protéines Ets-1 sur différents promoteurs sont présentées dans le tableau ci-contre (Fig. 21).

A

		H1	S1	S2	H2	H3	S3	S4
PEA3	H ERB1	gsLqLWQFLVaLLdDpa..nshfIaWtgrg.meFKLi..EgEeVARrWGiqK.nRPaMNYDKLSRsLRYYYeKgIMqKva.GeRyVvYKfv						
	H ERM	gsLqLWQFLVtLLdDpa..nahfIaWtgrg.meFKLi..EgEeVARrWGiqK.nRPaMNYDKLSRsLRYYYeKgIMqKva.GeRyVvYKfv						
	H E1A-F	gaLqLWQFLVaLLdDpt..nahfIaWtgrg.meFKLi..EgEeVARlWGiqK.nRPaMNYDKLSRsLRYYYeKgIMqKva.GeRyVvYKfv						
ETS	H ETS-1	gpIqLWQFLLeLlItDks..cqsfiSwtdgdg.weFKLs..DpDeVARrWGkrK.nKPkmNYEKLSRgLRYYydKnI IhKta.GkRyVvYRFv						
	H ETS-2	gpIqLWQFLLeLlItDks..cqsfiSwtdgdg.weFKLs..DpDeVARrWGkrK.nKPkmNYEKLSRgLRYYydKnI IhKta.GkRyVvYRFv						
	S ETS-2	gpIqLWQFLLeLlItDkt..cqhIiSwtdgdg.weFKLs..DpDeVARrWGkrK.nKPkmNYEKLSRgLRYYydKnI IhKta.GkRyVvYRFv						
	D PNT	gpIqLWQFLLeLlItDkt..cqsfiSwtdgdg.weFKLs..DpDeVARrWGkrK.nKPkmNYEKLSRgLRYYydKnI IhKta.GkRyVvYRFv						
M ER71	gpIqLWQFLLeLlItDga..rascIrWtGns.reFqLc..DpkeVARlWGerK.rKPgMNYEKLSRgLRYYyrRdlVlKsg.GrKyTYRFg							
ERG	H FLI-1	ggIqLWQFLLeLlItDsa..nascItWegtN.geFKMt..DpDeVARrWGGrK.sKPmMNYDKLSRaLRYYydKnIMtKvh.GkRyAYKfd						
	H ERG	ggIqLWQFLLeLlItDss..nascItWegtN.geFKMt..DpDeVARrWGGrK.sKPmMNYDKLSRaLRYYydKnIMtKvh.GkRyAYKfd						
	S ERG	ggIqLWQFLLeLlItDss..nancItWegtN.geFKMt..DpDeVARrWGGrK.sKPmMNYDKLSRaLRYYydKnIMtKvh.GkRyAYKfd						
	D ETS-6	ggIqLWQFLLeLlItDsa..nanaIsWeggs.geFRLi..DpDeVARrWGGrK.sKPmMNYDKLSRaLRYYydKnIMtKvh.GkRyAYKfd						
ERF	H ERF	rqIqLWhfILeLlItDke..yqgvIaw.qgdygeFvIk..DpDeVARlWGrK.cKPgMNYDKLSRaLRYYYnKrI LhKtk.GkRFtYKfn						
	H PE-1	rqIqLWhfILeLlItDke..frhvIaw.qgdygeFvIk..DpDeVARlWGrK.cKPgMNYDKLSRaLRYYYnKrI LhKtk.GkRFtYKfn						
ELG	H EATF	ggIqLWQFLLeLlItDkd..ardcIsWvgde.geFKLn..qgELVaQkWGGrK.nKPtMNYEKLSRaLRYYydGdm IcKvq.GkRFvYKfv						
	D ELG	ggVtLWQFLLeLlItDce..htdvIeWvgte.geFKLt..DpDrVARlWGeKk.nKPmMNYEKLSRaLRYYydGdm IsKvs.GkRFAYKfd						
ELK	H SAP-1	saItLWQFLLeLlItDkg..nkhmIcWtsnd.gqFKLl..gaEeVARlWGlRk.nKPmMNYDKLSRaLRYYvYknI IkKvn.GqKFvYKfv						
	H NET	saItLWQFLLeLlItDkg..hehlIcWtsnd.gqFKLl..kaEeVAKlWGlRk.nKtnMNYDKLSRaLRYYydKnI IkKvl.GqKFvYKfv						
	H ELK-1	psVtLWQFLLeLlItDkg..nghiIsWtsrdgdegeFKLv..DaEeVARlWGlRk.nKtnMNYDKLSRaLRYYydKnI IrKvs.GqKFvYKfv						
	Ce LIN-1	siItLWQFLLeLlItDkg..ngdiIeWtrgtdegeFRLi..DaEeVARkWGGrK.sKPmMNYDKLSRaLRYYvYknI IkKvl.GqKFvYKfv						
ELF	H ELF-1	ntIyLWefLLaLlItDkat.cpyIkWtqrekgiFKLv..DskaVsRlWGkhK.nKpdmNYETMgRaLRYYyqRgI LaKve.GqRlVYqfK						
	H NERF	nttyLWefLLaLlItDknt.cpryIkWtqrekgiFKLv..DskaVsKlWGkhK.nKpdmNYETMgRaLRYYyqRgI LaKve.GqRlVYqfK						
	D E74	sttyLWefLLaLlItDdrey.cprfIkWtnrekgvFKLv..DskaVsRlWGmhK.nKpdmNYETMgRaLRYYyqRgI LaKvd.GqRlVYqfV						
YAN	H TEL	dcrLWdVYyqLlItDsr..yenfIrWedkeskiFRiv..DpngLARlWGrhK.nRtnMtYEkMSRaLRhYyknI IrKep.GqRlVFRFm						
	D YAN	ngriLWdVFLqLlItDsrngkysdlIawkcrdtgFvFKIv..DpAgLAKlWGlqK.nhlsMNYDKMSRaLRYYyrvnI LrKvq.GeRlCYqfL						
	D ETS-4	shIlLWQFLLeLlItDspqvn.gtaIrWidrskgiFKIe..DsvrVARlWGrK.nRPaMNYDKLSRsIRqYyKkgIMkKtErasqRlVYqfC						
SP1	H SPI-B	kkLrLYQFLLeLlItDrgdm..recVwVvepgagvFqFsskhkELARrWGGrKgnRkrMtYqKLaRaLRnyaktgeIrKvk..rKltYqfD						
	H PU.1	kkIrLYQFLLeLlItDrgdm..kdsIwVvdkdktFqFsskhkEaLArWGGrKgnRkrMtYqKMaRaLRnyaktgeVvKvk..kKltYqfS						
Consensus		--I-LWQFLLeLlItD-----I-W-----FKL---D-D-VAR-WG-K--KP-MNYDKLSR-LRYYY-K-I-K--G-RV-YKF-						

B

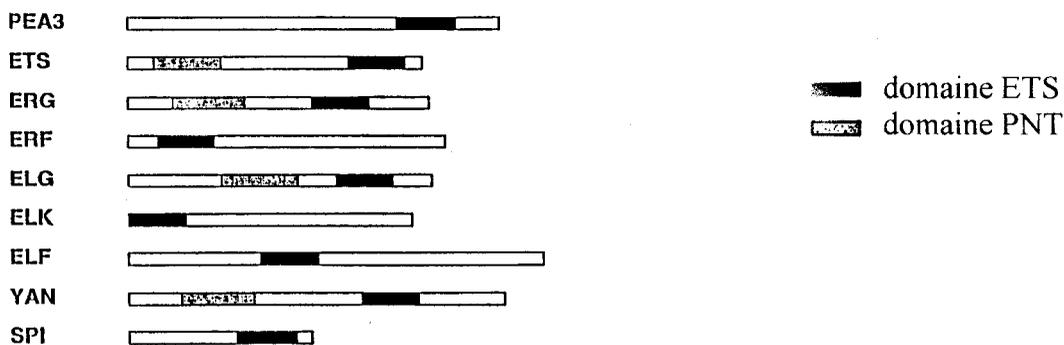


Fig. 22 : Les membres de la famille Ets.

A : Le domaine ETS est très conservé parmi tous les membres de la famille. Il comporte 3 hélices α (H1 à 3) et 4 feuillets β (S1 à 4).

B : Le domaine PNT n'est conservé que pour certains membres de la famille.

D'après Graves et al., communication personnelle.

RECAPITULONS:

A partir de l'étude de *c-ets-1*, nous avons pu cerner les caractéristiques principales de la famille de facteurs de transcription à laquelle il appartient. Nous avons pu aborder les subtilités de modulation de son activité transactivatrice et poser les bases de la spécificité d'action des facteurs sur leur cible en fonction de l'épissage alternatif de l'ARNm, de la phosphorylation des protéines, de la coopération avec d'autres facteurs, de la séquence cible de fixation. A travers les exemples utilisés nous avons pu constater que Ets-1 est, en particulier, impliqué dans le contrôle de la différenciation de la lignée hématopoïétique et du remodelage de la MEC.

Nous allons à présent utiliser ces indications pour poursuivre notre réflexion en considérant les rôles biologiques des membres de cette famille.

II. LA FAMILLE ETS : Des membres unis autour d'axes communs

II.1 LA CARTE DE MEMBRE

II.1.1. Critère d'appartenance

Une région particulièrement bien conservée des invertébrés à l'homme, le domaine ETS, de 84 à 90 acides aminés détermine l'appartenance à la famille Ets (Fig. 22 A). Ces domaines montrent une forte homologie dans les hélices α et les feuillets β . Par contre, les régions charnières sont beaucoup moins conservées (Donaldson et al., 1996). Le domaine ETS peut se situer en position carboxy-terminale, médiane ou amino-terminale selon les protéines (Fig. 22 B).

Les facteurs de transcription Ets appartiennent à la classe des protéines se liant à l'ADN appelée « winged helix turn helix » (wHTH), la structure tertiaire du domaine ETS conférant une forme d'aile à ces protéines de type hélice-tour-hélice (Brenan et al., 1993).

Un autre domaine, le « domaine Pointed » ou Pnt, initialement décrit dans le gène *pointed* de la drosophile (Klamt et al., 1993), est conservé seulement dans certains membres de la famille appartenant aux groupes ETS, GABP/ELG, ERG et YAN/TEL (Fig. 22 B). Ce domaine, homologue au domaine de régulation de c-Ets-1 initialement appelé RII qui contient cinq hélices α ,

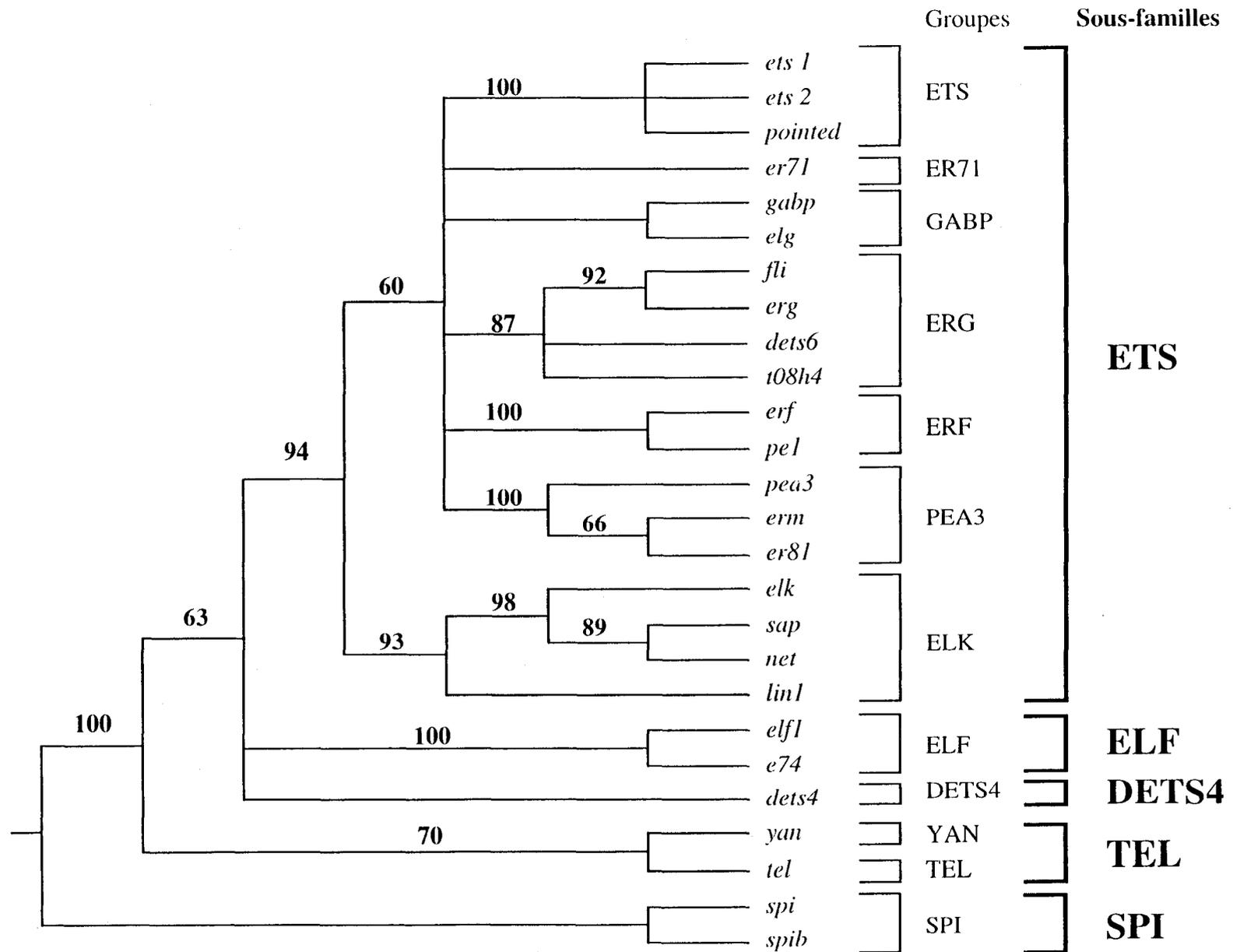


Fig. 23 : Arbre phyllogénétique.

Les gènes de la famille Ets sont classés par leur degré de similitude. Les chiffres indiquent le taux de confiance sur la parenté phyllogénétique des gènes d'une branche D'après Laudet et al., communication personnelle.

intervient dans des interactions protéines-protéines et dans des phénomènes d'associations homotypiques (Jousset et al., 1997) pouvant réguler l'activité des protéines Ets.

II.1.2. Arbre phylogénétique (Fig. 23)

L'analyse des taux de divergence entre les différents domaines ETS indique que la famille Ets constitue un groupe très ancien de gènes qui peuvent être classés en sous groupes (Laudet et al., 1993). Lors de l'examen des différents rôles biologiques des protéines Ets nous ferons appel à plusieurs des gènes présentés sur l'arbre phylogénétique.

II.2. COMMENT ENVISAGER DES SPECIFICITES D'ACTION ?

Il a été décrit que, dans certains cas, des protéines Ets peuvent se substituer à d'autres pour rétablir une situation fonctionnelle normale. En effet, des expériences réalisées chez la drosophile indiquent que les défauts induits par l'altération du gène *pointed (pnt)* peuvent être partiellement corrigés par l'expression d'un transgène codant les protéines Ets-1 et Ets-2 de poulet (Albagli et al., 1996). Pnt, Ets-1 et Ets-2 ont donc des capacités fonctionnelles communes.

Cependant, *in vivo*, la plupart des protéines Ets ont des gènes cibles spécifiques et sont activées sélectivement dans un type cellulaire donné.

II.2.1. Rôle de la séquence nucléotidique dans la sélectivité d'action

Les protéines Ets se fixent sur le site EBS contenant le noyau GGAA/T. La variation des nucléotides proximaux entraîne une différence d'affinité pour la fixation des différentes protéines Ets. Cette proposition a été démontrée pour les protéines Ets-1 et Ets-2 par Ascione et al. (1992). La présence de séquences flanquantes différentes dans les sites EBS de promoteurs distincts explique la sélectivité d'action de Ets-1 et Ets-2. L'identité du quatrième nucléotide du noyau GGAA/T définit une première spécificité de reconnaissance. Elf-1, E74 et Fli-1 ont une préférence invariable pour la séquence GGAA. Ets-1, SAP-1, ER81 et PU.1 peuvent se fixer indifféremment sur des séquences GGAA ou GGAT. Mais, les différences intrinsèques de spécificité de liaison à l'ADN ne suffisent sans doute pas à rendre compte des différences fonctionnelles. Les protéines

Ets ont à la fois une sélectivité due à la reconnaissance d'une séquence et une sélectivité due au recrutement d'autres cofacteurs protéiques.

II.2.2. Rôle des cofacteurs

Les associations entre protéines Ets avec des protéines de la famille Ets ou d'autres familles permettent d'augmenter les possibilités de régulation des gènes cibles par la mise en oeuvre de nombreuses combinaisons de complexes protéiques. Ainsi, la reconnaissance nucléotidique peut être modulée par l'une ou l'autre de ces combinaisons.

II.2.2.1 Gènes Ets et spécificité cellulaire

Une autre coopération a été mise en évidence entre la protéine p54 et le facteur GATA-1 exprimé dans la lignée érythrocytaire, les mégacaryocytes et les cellules de moelle osseuse, de façon spécifique. Le promoteur du gène de la glycoprotéine II B contient un EBS et un site de liaison pour le facteur GATA-1 situé à proximité. La protéine Ets-1 et le facteur GATA-1 coopèrent de façon additive pour transactiver le promoteur de GP II B et assurer l'expression spécifique de la glycoprotéine dans les mégacaryocytes (Lemarchandel et al., 1993).

La régulation transcriptionnelle de « l'enhancer » du gène codant la chaîne α du récepteur des cellules T nécessite des interactions entre la protéine Ets-1 et PEBP 2 α se fixant à l'ADN sur des sites adjacents. Le complexe Ets / PEBP 2 α / ADN est alors stabilisé par l'interaction avec d'autres facteurs spécifiques de ces cellules, fixés plus loin sur l'ADN, et induisant la formation d'un coude dans l'hélice d'ADN qui favorise les contacts entre protéines (Giese et al., 1995; Mayall., 1997). De la même façon, l'interaction de Ets-1 avec ce même facteur PEBP 2 α augmenterait l'affinité des interactions Ets-1/ ADN sur « l'enhancer » du gène codant la chaîne β du récepteur des cellules T, favorisant ainsi l'activité transactivatrice de Ets-1 (Wotton et al., 1994). La formation des complexes multiprotéiques auquel participe Ets-1 est donc nécessaire à la transcription de gènes cibles spécifiques des cellules T.

La protéine PU-1 qui est le membre le plus divergeant de la famille, s'associe avec le facteur de transcription NF-EM5 spécifiquement exprimé dans les lymphocytes B, sur « l'enhancer » 3' du gène de la chaîne κ des immunoglobulines (Pongubala et al., 1992). La

fixation de NF-EM5 à l'ADN dépend de son association préalable avec PU-1. La spécificité d'action peut ici être attribuée à l'association d'une protéine de la famille Ets et d'un facteur spécifique au lymphocyte B.

Les protéines Ets-1 peuvent aussi coopérer avec des membres de la famille Ets, comme cela a été décrit pour l'enhancer μ des chaînes lourdes des immunoglobulines (Ig H) (Nelsen et al., 1993). Ets-1 et PU-1 se fixent respectivement sur les séquences μ A et μ B de l'enhancer, et entrent en interaction l'une avec l'autre. La présence de ces deux facteurs est requise pour augmenter l'activité lignée spécifique de l'enhancer μ . Les interactions entre facteurs de la famille Ets peuvent donc participer à la régulation transcriptionnelle de gènes spécifiques d'une lignée.

II.2.2.2. Les protéines Ets et le site AP-1

Le domaine ETS des protéines est capable de se lier au domaine basique des protéines Jun (Bassuk et Leiden, 1995). L'interaction de Ets-1 avec Jun est suivie du recrutement d'une protéine Fos pour former un complexe ternaire sur les sites de type EBS/AP-1, ce qui entraîne l'augmentation de la transactivation du promoteur sur lequel ce complexe est fixé. La protéine p68 peut coopérer avec le complexe AP-1 (Jun-Fos) sur l'élément de réponse à l'oncogène situé dans « l'enhancer » des gènes précoces du virus du polyome qui contient un site EBS et un site AP-1 juxtaposés (Wasylyk et al., 1990). Ces auteurs suggèrent que les sites de liaison de Ets-1 et de AP-1 sont requis pour qu'il y ait un effet coopératif, car il n'y a pas de complémentation si l'un des deux sites est absent de « l'enhancer ».

Des sites EBS et AP-1 ont été décrits dans les promoteurs de gènes codant des protéases telles que la collagénase I ou MMP-1 (Gutman et Wasylyk, 1990), la stromélysine 1 ou MMP-3 (Wasylyk et al., 1991), et l'activateur du plasminogène de type urokinase, uPA (Nerlov et al., 1992) (Fig. 24). La collaboration entre les protéines Ets et le complexe AP-1 dépend de l'espacement sur le promoteur des sites fixant les protéines. Sur le promoteur du gène de la collagénase, ces sites sont distants d'une dizaine de bases et l'effet de Ets-1 et AP-1 pour la stimulation transcriptionnelle est additif. Si, par mutagenèse, on rend les sites adjacents, la coopérativité Ets-1 / AP-1 est augmentée (Gutman et Wasylyk, 1990).

Les sites EBS et AP-1 peuvent coopérer soit pour une stimulation ou soit pour une inhibition du gène cible. La transactivation du promoteur de la MMP-1 est augmentée par Ets-1 en



Stromélysine 1

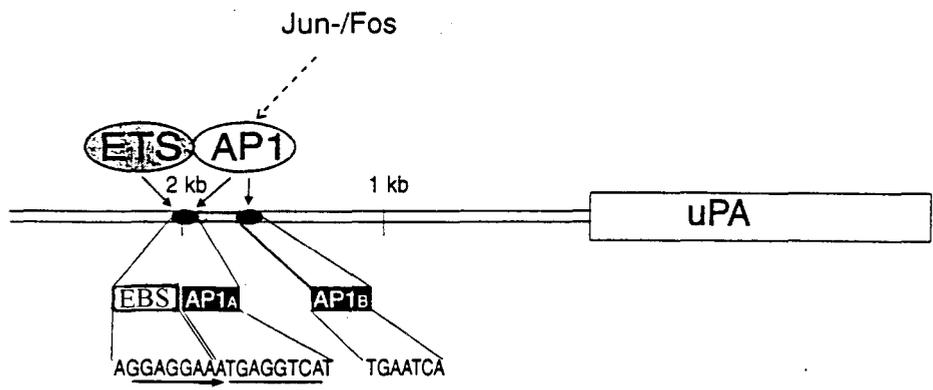


Fig. 24 : Les promoteurs de la collagénase I, de la stromélysine 1 et de l'uPA contiennent des sites EBS et AP-1.

tests *in vitro*, mais l'induction de ce promoteur par c-Jun ou Jun B (Wesstermack et al., 1997) est abolie par PU-1. Il s'avère que Ets-1 potentialise l'activation de la MMP-1 en coopération avec c-Jun et Jun B. L'expression de la protéine PU-1 diminue de façon significative la liaison de c-Jun et Jun D à l'élément AP-1 du promoteur de la MMP-1 et abolit ainsi l'activation de ce promoteur. Ceci indique que des facteurs de transcription différents de la famille Ets peuvent moduler dans des sens opposés l'expression d'un gène cible grâce à l'intervention du site AP-1.

II.2.2.3. La protéine Erg met en jeu différentes stratégies de régulation pour activer ou inhiber spécifiquement ces gènes cibles

Lors de transfections transitoires, Erg peut induire la transactivation de la collagénase 1 mais pas de la stromélysine 1 (Buttice et al., 1996). Il a été montré qu'une mutation dans le site AP-1 du promoteur de la collagénase abolit l'activation par Erg et que la protéine Erg peut effectivement se lier au complexe AP-1. Ainsi, la coopération entre Erg et AP-1 régule la transcription du promoteur de la collagénase 1. Par contre, si Erg peut se lier au promoteur de la stromélysine 1 en test retard sur gel, elle ne peut pas activer ce promoteur. Deux interprétations sont alors envisageables. D'abord, la fixation de Erg sur le promoteur peut masquer des sites nécessaires à d'autres activateurs. Ensuite, l'agencement des sites EBS sur le promoteur de la stromélysine 1, différent de celui du promoteur de la collagénase 1, implique un assemblage de deux monomères de Erg dans une configuration ayant un effet inhibiteur sur l'activation du promoteur (Fig. 24).

De plus, il se trouve que Erg inhibe complètement la transactivation de la stromélysine 1 par Ets-2. Erg formerait alors des hétérodimères avec Ets-2 sur les sites EBS du promoteur de la stromélysine 1, ce complexe dimérique n'ayant pas d'activité transactivatrice. Les interactions Erg-Ets-2 ont effectivement été décrites (Basuyaux et al., 1997).

Il apparaît donc que Erg peut réguler différemment deux gènes de protéases en fonction du recrutement du complexe Jun/ Fos, de la particularité des sites sur chaque promoteur et de l'interaction avec un autre facteur de la famille Ets.

II.3. ETS ET LA TUMORIGENESE

II.3.1. *v-Ets* : le pionnier

II.3.1.1. Historiquement, c'est d'abord l'oncogène *v-ets* qui a été découvert dans le génome du virus E-26 induisant une leucémie chez le poulet (Ivanov et al., 1962).

Je ne reviendrai pas sur le détail des expériences déjà décrites qui ont permis d'établir la part respective de *v-myb* et *v-ets* dans le processus leucémogène (se reporter au paragraphe 1 du chapitre I). Je rappellerai seulement ici que le rétrovirus provoque des leucémies mixtes myéloïdes et érythroïdes (Radke et al., 1982). Il infecte des cellules souches multipotentes, les MEP (Myb Ets Progenitor), progénitrices des lignées myéloïdes et érythroïdes. *v-ets* est responsable de la transformation des cellules érythroïdes et le domaine ETS est requis pour le rôle d'inhibiteur de différenciation de *v-ets* (Kraut et al., 1994).

II.3.1.2. Comment pourrait-on expliquer le rôle transformant de *v-ets* ?

Outre le fait d'être fusionner à *v-Myb*, *v-Ets* diffère de *Ets-1* par deux points (Fig. 15):

- il présente deux mutations ponctuelles dont une dans le domaine ETS en position 445
- les derniers acides aminés de la protéine adjacents au domaine ETS, sont complètement différents de ceux de *Ets-1*. En fait, la séquence codant ce domaine dans *c-ets-1* a été inversée dans *v-ets* (Leprince et al., 1993).

Ces différences agissent de concert pour modifier la spécificité de liaison de la protéine à l'ADN. *In vitro*, la queue C-terminale de *Ets-1* inhibe fortement sa fixation à l'ADN (Donaldson et al., 1996). Si on la remplace par la région équivalente de *v-ets*, l'inhibition est levée. La mutation du résidu 445 quant à elle diminue la sélectivité de liaison à l'ADN (Soudant et al., 1994). Il y a donc simultanément augmentation de l'affinité et diminution de la spécificité. Ainsi, *v-Ets* peut reconnaître des sites plus nombreux que *Ets-1*, et s'y lier plus efficacement (Hahn et Wasyluk, 1994). On peut donc imaginer deux raisons pour expliquer la transformation par *v-Ets*, d'une part la compétition avec d'autres membres de la famille ETS pour la régulation de gènes de différenciation; d'autre part, un effet sur des gènes qui ne sont pas normalement régulés par des protéines Ets.

La transformation par E-26 pourrait faire intervenir un autre mécanisme qui s'apparente à celui intervenant pour certains récepteurs nucléaires. En effet, il existe un antagonisme fonctionnel entre le récepteur de l'hormone thyroïdienne T3 (T3 R) ou celui de l'acide rétinoïque (RAR), et les protéines de la famille AP-1 (Kamei et al., 1996). L'expression des premiers diminue le pouvoir transactivateur des seconds et réciproquement, sans qu'il y ait d'interactions physiques entre les protéines antagonistes (Rasclé et al., 1996). Cet effet résulterait d'une compétition entre les facteurs pour un coactivateur transcriptionnel commun présent en quantité limitante (Kamei et al., 1996). Pour ce qui concerne *v-ets*, il apparaît que la protéine p135 inhibe le pouvoir transactivateur de T3 R, mais augmente celui de AP-1 sans interagir physiquement avec ces protéines provoquant ainsi des perturbations leucémogènes (Rasclé et al., 1996).

Si *v-ets* est, par sa nature virale, impliqué dans la transformation, les gènes cellulaires de la famille Ets peuvent aussi avoir des capacités tumorigènes. Par exemple, la surexpression de *c-ets-1* dans des fibroblastes NIH-3T3 induit la transformation de ces cellules *in vitro* et augmente leur tumorigénicité dans les souris nude (Seth et Papas, 1990). Voyons à présent comment les protéines Ets cellulaires peuvent induire un processus tumoral.

II.3.2. Translocations impliquant des gènes *ets*

II.3.2.1. Les tumeurs d'Ewing

La présence de transcrits *c-ets-1* a été décrites dans des cellules de neuroblastomes, de neuroépithéliomes et de sarcomes d'Ewing, trois tumeurs qui ont une origine embryonnaire commune, puisqu'elles sont issues de cellules de crêtes neurales, où les ARNm *c-ets-1* sont abondants (Sacchi et al., 1991). Le point commun des tumeurs d'Ewing est la présence dans les cellules tumorales de translocations affectant le chromosome 22. Ces translocations s'accompagnent du réarrangement d'un gène situé sur ce chromosome, baptisé EWS pour Ewing Sarcoma (Delattre et al., 1992). Suite aux remaniements chromosomiques, la partie N-terminale d'EWS se trouve fusionnée à différents gènes situés sur d'autres loci. Ces gènes, *fli-1*, *erg*, *er 81* et *pea 3*, sont tous membres de la famille ETS (Sorensen et al., 1994 ; Jeon et al., 1995 ; Urano et al., 1996).

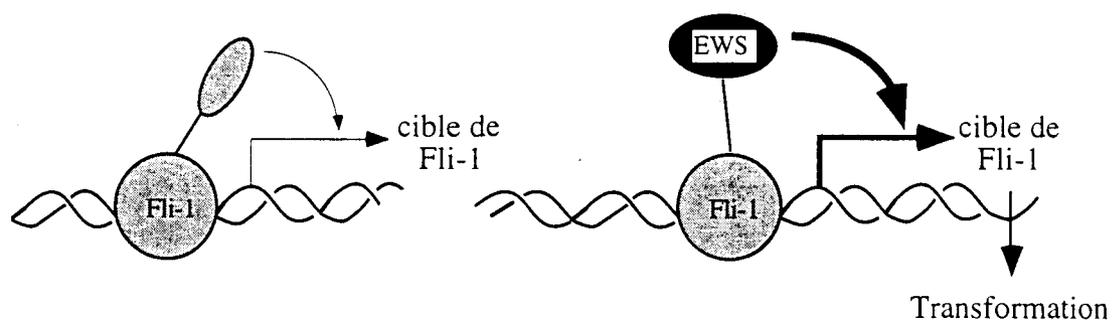


Fig. 25 : EWS/ Fli stimulerait plus efficacement l'expression des gènes cibles de Fli.

On peut considérer EWS-Fli-1 comme un « super-transactivateur » des gènes cibles de Fli (Fig. 25). Les propriétés de cette protéine EWS-Fli-1 qui la rende intrinsèquement oncogénique, sont dues à ses caractéristiques de liaison à l'ADN et à sa capacité à réguler la transcription. Effectivement, la protéine EWS-Fli-1 peut se fixer aux cibles de Fli-1, et activer la transcription de gènes dont le promoteur comporte des sites Ets avec une « force » supérieure à celle de la protéine Fli-1 sauvage (Bailly et al., 1994). *In vitro*, EWS-Fli-1 peut reconnaître les mêmes séquences que Fli-1 mais, par le biais d'interactions avec des partenaires, les protéines Ets peuvent être recrutées à des sites « non-optimaux ». Ainsi, il se peut qu'*in vivo*, EWS-Fli-1 interagissent avec des partenaires différents de ceux de Fli-1, et se fixe alors sur d'autres promoteurs. De fait, Braun et al.(1995) ont mis en évidence des gènes régulés par EWS-Fli-1 qui ne répondent pas à Fli-1 sauvage.

II.3.2.2. Autres cas humains

Le locus *c-ets-1* a été impliqué dans des translocations chromosomiques entre les chromosomes 11 et les 1, 4 et 9. Ces translocations ont été mises en évidence chez des malades atteints de leucémies myéloïdes (Diaz et al., 1986 ; Sacchi et al., 1986). Un réarrangement de locus a été décrit dans un cas de leucémie myélomonocytaire et un cas de lymphome (Rovigatti et al., 1986). Le rôle de *c-ets-1* dans l'apparition ou la maintenance de ces leucémies reste cependant imprécis.

II.3.3. Les leucémies de Friend

Les leucémies de Friend interviennent après l'infection de souriceaux ou de souris adultes par un complexe viral appelé FLV, composé de FMuLV (Friend Murine Leukemia Virus), et de SFFV (Spleen Focus Forming Virus). Les mécanismes par lesquels les virus induisent ces leucémies ont été décrits par Ben-David et Bernstein (1991).

La transformation est corrélée à l'intégration du provirus SFFV à un site spécifique du génome. Ce locus a été nommé *spi-1* (pour SFFV Provirus Integration-1). L'insertion s'accompagne de la surexpression d'un gène situé à proximité du site d'intégration, appelé par extension *spi-1*. Il s'agit d'un membre de la famille ETS (Moreau et al., 1988), identique à PU.1 découvert indépendamment par Klemsz et al (1990). Des expériences visant à comprendre l'origine

du pouvoir oncogénique de *spi-1* indiquent que l'induction de la différenciation s'accompagne d'une forte réduction de la quantité de Spi-1 (Galson et al., 1993). Par contre, si on diminue la quantité de Spi-1 dans les cellules en utilisant des nucléotides antisens, on réduit leur potentiel réplicatif sans induire leur différenciation (Delgado et al., 1994). Spi-1 agirait donc en maintenant les précurseurs érythroblastiques dans un état de prolifération qui leur interdit la différenciation.

Il est vraisemblable qu'au cours de l'hématopoïèse cette activité mitogène de Spi-1 est fermement contrôlée soit par modification de la protéine, soit par extinction de son expression. Lors de l'intégration par SFFV, *spi-1* est largement surexprimé et doit échapper à ces mécanismes de régulation.

Le virus FMuLV peut provoquer des leucémies de façon indépendante de SFFV. Il cause différents néoplasmes hématopoïétiques, dont des érythroleucémies aux caractéristiques très proches de celles causées par les complexes FLV. A nouveau, la transformation des cellules est associée à l'intégration du virus à un site spécifique du génome appelé *fli* (Friend Leukemia Intégration-1), qui est distinct de *spi-1* (Ben-David et al., 1990). Les LTR viraux induisent la surexpression d'un gène proche du site d'insertion, appelé par extension *fli-1*. Il s'agit d'un membre de la famille ETS (Ben-David et al., 1991). Si des souris transgéniques surexprimant *fli-1* présentent des anomalies lymphocytaires conduisant à des maladies auto-immunes, mais pas à des leucémies (Zhang et al., 1995), le rôle exact de ce gène n'est pas déterminé.

II.3.4. Ets-1 comme suppresseur de tumeur.

L'expression ectopique de Ets-1 (p51) dans des cellules de cancer du colon qui n'expriment pas de façon endogène cette protéine, reverse le phénotype transformé de ces cellules dont les aptitudes à former des colonies en agar mou et des tumeurs chez la souris nude sont réduites (Suzuki et al., 1995). La protéine Ets-1 où l'exon VII a été épissé (P42) est également capable de diminuer la tumorigénicité de ces cellules en induisant leur apoptose (Huang et al., 1997). Ainsi, la protéine Ets-1 pourrait avoir un rôle de suppresseur de tumeur.

A travers l'implication des gènes de la famille Ets dans la tumorigénèse nous avons pu appréhender les conséquences des anomalies de fonctionnement des protéines Ets dans des cellules nerveuses et hématopoïétiques. Nous verrons que, lors du développement normal, les gènes *ets*

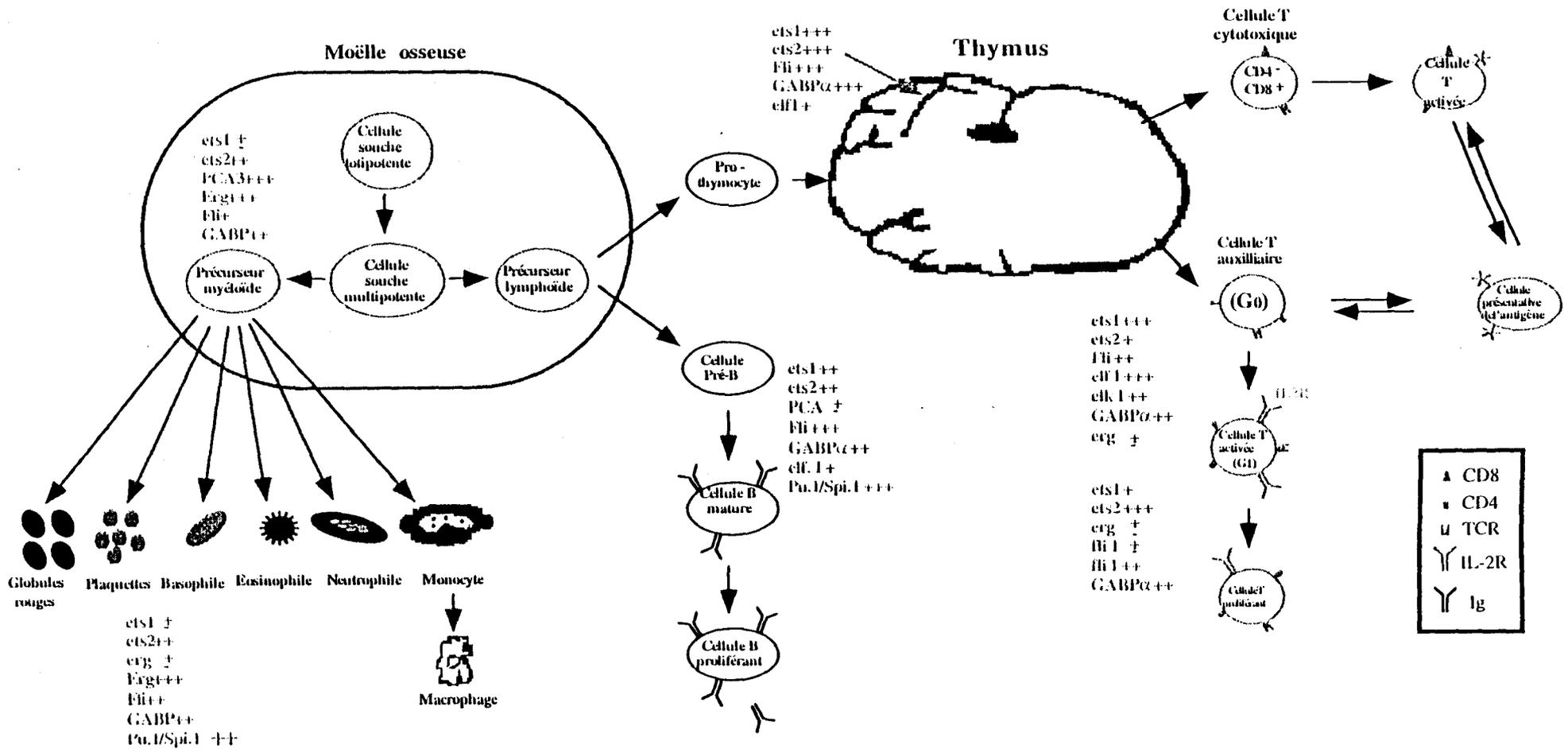


Fig. 26 : Expression des gènes de la famille Ets au cours de la différenciation des cellules hématopoïétiques.

+ : Faible expression ; ++ : expression moyenne ; +++ : Expression importante ;
+/- : Expression indétectable par Northern blot mais détectable par HIS.

D'après Grévin, 1996.

sont également fortement impliqués dans le processus de différenciation de ces cellules. Cependant, ce rôle n'est pas limitatif, et nous aborderons, en décrivant les lieux d'expression des gènes *ets* et de leur gènes cibles, l'implication de cette famille dans les processus de migration.

II.4. LES PROTEINES ETS ET LA DIFFERENCIATION DES CELLULES HEMATOPOÏETIQUES

L'expression de *c-ets-1* a été étudiée dans plusieurs lignées hématopoïétiques, représentant divers stades de différenciation des lignées myéloïdes, érythroïdes et lymphoïdes. Les transcrits *c-ets-1* ont été détectés dans les lignées et les organes lymphoïdes comme la rate, le thymus et la bourse de Fabricius (Pognonec et al., 1988 ; Vandebunder et al., 1989) chez le poulet, et des résultats analogues ont été rapportés chez la souris et chez l'homme (Bhat et al., 1989).

Romanospica et al. (1994) ont pu mettre en évidence l'expression conjointe de plusieurs membres de la famille Ets dans les cellules hématopoïétiques (Fig. 26). Parallèlement des sites EBS ont pu être décrits dans les régions de régulation d'un grand nombre de gènes spécifiques des cellules hématopoïétiques (Pour revues, Seth et al., 1992; Bhat et al., 1996).

II.4.1. Les cellules érythroïdes

L'analyse de l'expression de *c-ets-1* au cours de l'embryogenèse du poulet a montré que les précurseurs érythroïdes exprimaient *c-ets-1*, alors qu'aucun transcrit n'est détectable dans les érythrocytes matures (Quéva et al., 1993). Le promoteur du gène codant le facteur de transcription GATA-1, spécifique des cellules érythroïdes, contient trois sites EBS dont deux forment un palindrome. La protéine Ets-1 ne se lie qu'aux sites EBS palindromiques de ce promoteur (Seth et al., 1993).

II.4.2. Les protéines Ets sont impliquées dans la maturation des lymphocytes T

L'activité de plusieurs protéines ETS contribuent à la différenciation des cellules T.

Chez la souris, *c-ets-1* est fortement exprimé dans le thymus à partir du 15^e jour de gestation, à la fois dans les zones corticales et médullaires. Lors de leur différenciation, les thymocytes expriment *c-ets-1* à un niveau élevé (Pognonec et al. 1989; Bhat et al., 1989). Salmon et al. (1993) ont montré que les protéines Ets-1 et Ets-2 peuvent transactiver le promoteur du gène du co-récepteur CD4 *in vitro*, qui est activé dans certaines sous populations de lymphocytes T.

Au cours de la maturation des thymocytes, les gènes codant les chaînes α/β et γ/δ du récepteur des cellules T (TCR) se réarrangent. L'activation de la transcription du gène codant la chaîne α du TCR (TCR- α) nécessite la fixation des protéines Ets à un élément (T α 2) de l'enhancer 3' de ce gène ainsi que l'intervention d'autres facteurs (Ho et al., 1990 a). La protéine Ets qui se fixe sur le motif T α 2 pourrait interagir avec les autres facteurs se liant aux éléments T α 1, T α 3 et T α 4 de cet enhancer de façon à moduler l'activité transcriptionnelle du gène. Comme nous l'avons précédemment évoqué, il existe une coopération entre les protéines PBP2 α et Ets-1 dans les enhancers des gènes codant les chaînes α et β du TCR (Ho et al., 1990 b; Wotton et al., 1994; Mayal et al., 1997). Prosser et al. (1992) ont montré que Ets-1 active la transcription de la chaîne α mais inhibe celle de la chaîne β . L'expression de la protéine Ets-2 est également concomitante au réarrangement de la chaîne α .

Le gène codant l'enzyme terminale désoxynucléotidyl transférase (TdT) est exprimé au début du développement des lymphocytes T, puis son taux chute en cours de maturation (Ernst et al., 1993). Les protéines Ets-1 et Fli-1 peuvent *in vitro* se fixer sur le promoteur de ce gène (Hermans et al., 1989), sans que les mécanismes de régulation *in vivo* soient bien compris.

Les cellules T à l'état quiescent, en phase G0 du cycle cellulaire, expriment la protéine Ets-1 de façon intense, et Ets-2 très faiblement. Par contre, la stimulation mitogénique de la cellule inverse les rapports Ets-1/ Ets-2 (Bhat et al., 1990). Ainsi, Ets-2 semble être lié à la prolifération cellulaire alors que Ets-1 permet de maintenir le lymphocyte T à l'état quiescent et doit être réprimé lors de l'activation lymphocytaire.

De plus, des souris chimères où le gène *ets-1* a été inactivé par recombinaison homologue (Bories et al., 1995; Muthusamy et al., 1995) présentent un déficit en lymphocytes T. Ces cellules lorsqu'elles sont mises en culture, sont particulièrement sensibles à l'apoptose. Cette observation

est compatible avec l'hypothèse que Ets-1 contribue à maintenir ces cellules en phase G0 et que la perte de ce contrôle les conduise par défaut vers l'apoptose.

Le gène de l'interleukine 2 (IL-2), n'est pas transcrit dans les lymphocytes T quiescents, mais peut être induit. Il possède dans son promoteur un site permettant la fixation de la protéine Elf-1 (Thompson et al., 1992). Elf-1 est liée à la protéine RB non phosphorylée dans les lymphocytes quiescents, le complexe RB/ Elf-1 se séparant lors de la phosphorylation de RB, au moment de l'entrée des cellules dans le cycle (Wang et al., 1993). La protéine Elf-1 a besoin pour induire l'expression de l'IL-2 de la coopération avec Jun B et Fra-1. De même, la coopération de Elf-1 et AP-1 est nécessaire à l'activation du promoteur « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor » (GM-CSF) dans les cellules T (Wang et al., 1994).

II.4.3. Les protéines Ets et la maturation des lymphocytes B

Au cours du développement, les transcrits *c-ets-1* ont été détectés dans les organes lymphoïdes où se différencient les cellules B, en particulier dans la bourse de Fabricius des embryons de poulet (Quéva et al., 1993). D'autres travaux ont montré que *c-ets-1* est exprimé dans des lignées de cellules pré-B ou B-immatures.

Les souris chimères où le gène *ets-1* a été inactivé par recombinaison homologue (Bories et al., 1995), possèdent des lymphocytes B dépourvus de Ets-1, présents en quantité normale mais se différenciant de façon aberrante en cellules sécrétrices d'immunoglobulines M (Ig M). Ets-1 contribue donc au contrôle de la différenciation normale des lymphocytes B.

Dans les lymphocytes B, la protéine PU.1, complexée au facteur NF-EM5, participe à la régulation de « l'enhancer » 3' du gène de la chaîne légère κ des immunoglobulines (Grant et al., 1992; Pongubala, 1992, 1993). PU.1 coopère aussi avec Ets-1 pour activer « l'enhancer » μ des chaînes lourdes des immunoglobulines, Ig H (Bhat et al., 1990; Nelsen et al., 1993; Rao et al., 1997). Fli et Erg-3 sont aussi capables de se fixer sur des sites spécifiques de cet « enhancer » (Rivera et al. 1993). « L'enhancer » μ est un élément de régulation spécifique des lymphocytes, soupçonné de réguler l'activation du locus IgH au stade pré-B pendant le développement (Ferrier et al., 1990). D'autre part, PU.1 active la transcription du gène de la chaîne J des immunoglobulines (Ig J) en réponse à une stimulation par l'IL2 (Shin et Koshland, 1993). Ces différents résultats

indiquent que les protéines Ets participent à la différenciation et au fonctionnement des lymphocytes B.

II.4.4. PU-1 et la lignée myéloïde

PU.1, qui est exprimé dans toutes les cellules sanguines à l'exception des cellules T, régule un grand nombre de gènes spécifiques de lignées myéloïdes (pour revue, Moreau-Gachelin, 1994), dont le gène du « scavenger receptor » (SR) impliqué dans la différenciation des monocytes en macrophages (Moulton et al., 1994). Il est à noter que la régulation de la transcription de ce gène met en jeu les motifs AP-1 et Ets (Wu et al., 1994), ce qui indique une fois de plus que l'activité des protéines Ets passe par des coopérations avec d'autres facteurs.

Enfin, Mc Kercher et al. (1996) qui ont inactivé PU.1 par recombinaison homologue ont apporté la preuve de l'implication de ce gène dans le développement des lignées hématopoïétiques. Les souris homozygotes pour la mutation meurent peu avant la naissance, elles sont dépourvues de lymphocytes, de macrophages et de granulocytes.

L'ensemble de ces données indique que les protéines Ets jouent un rôle important dans la différenciation et la maturation des cellules hématopoïétiques.

II.5. LE SYSTEME NERVEUX

Une abondance de transcrits *c-ets-1* est détectée pendant la formation du tube neural au cours de l'embryogenèse et pendant le développement péri-natal, dans les méninges, les tissus nerveux du cortex cérébral et de la corde de l'embryon, ainsi que dans le cerveau des nouveaux nés. (Kola et al., 1993; Maroulakou et al., 1994). Ceci suggère le rôle important de *c-ets-1* dans le système nerveux qui, chez la souris, continue à se développer après la naissance.

Chez le poulet, les transcrits *c-ets-1* sont présents dans les cellules de crêtes neurales céphalique et troncales en migration (Vandendunder et al., 1889 ; Quéva et al., 1993).

L'expression de *c-ets-1* a été décrite dans une catégorie de cellules gliales, les astrocytes humains *in vivo* (Amouyel et al., 1988; Fleischman et al., 1995). Ces auteurs ont montré que l'induction stable de *c-ets-1* dans une lignée pluripotente de tératocarcinome embryonnaire (P 19)

est spécifiquement corrélée avec leur différenciation en astrocytes. Ainsi, Ets-1 participerait à l'acquisition de caractères spécifiques des cellules gliales.

Ets-1 a donc un grand rôle dans le développement du système nerveux.

II.6 LES SITUATIONS DE MIGRATION

II.6.1. Les patrons d'expression des gènes de la famille Ets

II.6.1.1. La vasculogenèse et l'angiogenèse

Chez le poulet, l'expression de *c-ets-1* est détectée dès la gastrulation lors de la mise en place des feuillettes. A ce stade, les transcrits sont plus abondants dans les cellules du mésoderme ventral qui vont se condenser pour former des îlots sanguins extra-embryonnaires, constitués d'hémangioblastes, précurseurs communs aux érythrocytes et aux cellules endothéliales. Au fur et à mesure de la maturation de ces îlots, l'expression de *c-ets-1* se restreint aux cellules endothéliales (Pardanaud et Dieterlen-Lièvre, 1993; Quéva et al., 1993).

Dans les cellules endothéliales, l'expression de *c-ets-1* se maintient tant que dure les processus de vasculogenèse (formation de vaisseaux sanguins *de novo*) ou d'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux par bourgeonnement à partir d'un vaisseau déjà existant) (Vandebunder et al., 1989). Cette expression diminue lorsque les vaisseaux sont formés. Grévin et al. (1993) ont montré que, lors de la placentation chez la souris, *c-ets-1* est exprimé dans les vaisseaux sanguins maternels qui participent à la néovascularisation utérine. Plus récemment, une corrélation spatio-temporelle entre l'expression de *c-ets-1* et la formation du réseau sanguin dans l'hypothalamus de rat a pu être établie (Laurent-Huck et al., 1996). Jorcyk et al. (1991) ont décrit l'implication d'éléments contenus dans l'intron I du gène pour l'expression vasculaire spécifique de *c-ets-1*.

L'expression transitoire de *c-ets-1* lors de la constitution des vaisseaux sanguins a été confirmée dans l'embryogenèse humaine, ainsi que dans des situations pathologiques, telles que la cicatrisation des plaies et la vascularisation des tumeurs (Wernert et al., 1992).

c-ets-1 apparaît alors impliqué dans ces processus de vasculogenèse et d'angiogenèse.

II.6.1.2. Les cellules mésenchymateuses

Pendant une longue période, l'expression de *c-ets-1* dans les épithélia au cours de l'embryogenèse n'a pas pu être détectée. Par contre, les transcrits *c-ets-1* ont été détectés dans une grande variété de tissus d'origine mésodermique (Vandenbunder et al., 1989). Lors de la formation de la plume chez le poulet *c-ets-1* est exprimé dans les cellules mésodermiques du derme lors de leur condensation et de leur migration (Desbiens et al., 1991). L'expression de *c-ets-1* a également été décrite dans les cellules mésenchymateuses adjacentes à des structures épithéliales invasives au cours d'interactions épithélio-mésenchymateuses notamment lors de la morphogenèse du rein, de l'intestin et des poumons (Quéva et al., 1993; Kola et al., 1993; Maroukalou et al., 1994). Pendant la phase d'implantation de l'embryon de souris, les cellules mésenchymateuses de l'utérus colonisé par les cellules trophoblastiques invasives expriment *c-ets-1* (Grévin et al., 1993). D'autres membres de la famille Ets présentent aussi ce patron d'expression. Lors de la formation du rein chez le Xénope, Meyer et al. (1995) ont découvert l'expression de *fli-1* non pas dans les cellules qui migrent mais dans celles qui bordent leurs voies de migration. Les gènes de la famille PEA-3 (*pea3*, *erm*, *er81*) sont aussi exprimés dans le mésenchyme des organes où ont lieu des remodelages tissulaires dépendant d'interactions épithélio-mésenchymateuses, tels que le rein, le poumon et la glande salivaire (Chotteau-Lelièvre et al., 1997).

L'analyse de l'expression de *c-ets-1* dans les carcinomes invasifs humains a révélé la présence de transcrits dans les fibroblastes du stroma tumoral. Cette expression est d'autant plus forte que les fibroblastes sont proches des cellules néoplasiques (Wernert et al., 1994). Cette situation est analogue à celles observées au cours des interactions épithélio-mésenchymateuses lors du développement. Ces données soulignent l'importance des gènes de la famille Ets dans le remodelage du tissu mésenchymateux.

II.6.1.3. Les cellules elles-mêmes en migration

Des études récentes ont permis de détecter l'expression de gènes de la famille Ets dans des cellules elles-mêmes en mouvement. Fafeur et al. (1997) ont montré, lors de l'embryogenèse de poulet, que *c-ets-1* s'exprime dans les cellules somitiques en cours de dissociation, les cellules du sclérotome qui essaient et les cellules des crêtes neurales pendant leur migration. Meyer et al. (1995, 1997) et Rémy et al. (1996) indiquent que, dans l'embryon de Xénope *fli-1* et *c-ets-2* sont

préférentiellement exprimés dans des régions soumises à des réorganisations tissulaires, et plus précisément dans des cellules en migration. De plus, l'expression des gènes de la famille *PEA-3* est associée à la capacité métastatique des cellules épithéliales mammaires tumorales chez la souris (Trimble et al., 1993) et à la capacité invasive des cellules épithéliales mammaires cancéreuses humaines (Baert et al., 1997). L'expression de E1AF, homologue humain de *pea-3*, est corrélée au potentiel invasif des cellules de carcinome squameux après injection chez la souris nude (Shindo et al., 1996).

Au regard de ces informations, un thème fédérateur semble se profiler. De fait, *c-ets-1* s'exprime lors de la formation précoce des vaisseaux sanguins de l'embryon, mais disparaît dans les vaisseaux âgés. *c-ets-1* serait donc associé à la dynamique de formation de ces vaisseaux pendant que les cellules endothéliales se réorganisent les unes par rapport aux autres. Dans cette optique, il est intéressant de noter que l'expression des gènes *ets* dans le mésenchyme est concomitante aux réarrangements cellulaires au sein de ce tissu, lors des interactions épithélio-mésenchymateuses. Si l'hypothèse de l'implication des protéines Ets dans le déplacement cellulaire germait déjà, cette idée fut confortée par les nombreux exemples qui associent l'expression des gènes *ets* aux cellules en cours de migration (pour revue, Vandembunder et al., 1995).

Mais, n'en restons pas à ces corrélations et cherchons plus avant comment les mécanismes de mouvement cellulaire peuvent être liés aux gènes de la famille Ets. La migration des cellules nécessite la conjonction de plusieurs mécanismes. Les cellules doivent d'une part, ouvrir une brèche dans la matrice afin de s'y infiltrer. Elles ont d'autre part, besoin de se lier, au moins temporairement, à leur substrat afin de se tracter. Le niveau d'interaction des cellules entre-elles module également leur progression à travers leur environnement.

De façon fort intéressante, parmi les nombreux gènes cibles des protéines Ets, des gènes de protéases et de molécules intervenant dans l'ancrage cellulaire ont été décrits. Les données qui vont suivre n'ont pas pour but d'être exhaustives, elles vont seulement guider la réflexion qui a conduit nos travaux de recherches.

II.6.2. Gènes cibles des protéines Ets et migration

II.6.2.1. Gènes codant des protéases impliquées dans la dégradation des composants de la MEC

Les patrons d'expression de protéases se superposant à celui de *c-ets-1* dans des situations de migration cellulaire constituent les premiers indices des liens unissant ces deux familles de gènes. L'expression de *c-ets-1* est corrélée à l'expression de l'uPA dans les cellules endothéliales et les cellules mésenchymateuses du tissu utérin envahi par les cellules trophoblastiques, lors de la placentation chez la souris (Grévin et al., 1993). De même, Wernert et al. (1992, 1994) ont décrit une superposition de l'expression de *c-ets-1* avec celles de l'uPA, la collagénase I et/ou la stromélysine 1. Des sites EBS ont été identifiés dans les promoteurs de gènes de protéases et des tests de transactivation ont montré que des protéines Ets peuvent activer l'expression de ces gènes. Il s'agit de la collagénase I (Gutman et Wasyluk, 1990), la stromélysine 1 (Wasyluk et al., 1991; Buticce et Kurkinen, 1993), ainsi que l'uPA (Rorth et al., 1990; Nerlov et al., 1992; Stacey et al., 1995). La transactivation passe par l'intermédiaire d'une séquence ORE (Oncogene Responsive-unit) formée par la juxtaposition des sites de liaison pour les protéines Ets et AP-1 (Jun-Fos) (Fig. 24).

Shindo et al. (1996) ont montré par transactivation *in vitro*, que PEA-3 est capable de surexprimer les collagénases de type I et IV (MMP1 et MMP9). De même, des expériences d'expression transitoire ont montré que la transcription des MMPs 1, 3 et 9 est stimulée par E1AF, homologue humain de PEA-3 (Higashino et al., 1995). De plus, E1AF, une fois transfecté dans des cellules de cancer du sein non invasives MCF-7, stimule d'une part l'expression de la MMP 9 et d'autre part, la capacité invasive des cellules en test *in vitro* et *in vivo* après implantation des cellules chez la souris nude (Kaya et al., 1996). Par contre, la transfection d'oligonucléotides antisens de E1AF réduit l'invasion de cellules de carcinomes squameux en inhibant la synthèse des MMPs 1, 3 et 9 (Hida et al., 1997).

II.6.2.2. Gènes impliqués dans l'ancrage cellulaire

II.6.2.2.1. Gènes d'adhérence à la matrice

Les intégrines sont ces molécules transmembranaires qui permettent aux cellules d'interagir avec leur substrat. Un grand nombre de gènes codant des intégrines possède dans leur promoteur

des sites EBS. C'est le cas par exemple de l'intégrine $\alpha 4$ (Rosen et al., 1994) et de l'intégrine $\beta 2$ (Bottinger et al., 1994). Block et Poncz (1995) ont montré que la glycoprotéine GP II b, qui participe à la formation du complexe intégrine GP II b/III a, récepteur de plusieurs ligands matriciels, possède un promoteur contenant un site Ets. La mutation de ce site décroît sévèrement l'expression de ce gène. D'autre part, Yebra et al. (1996) ont pu mettre en évidence le rôle de l'intégrine $\alpha V\beta 5$, récepteur de la fibronectine lors de la migration cellulaire. De façon intéressante, deux sites Ets ont été décrits dans la région 5' flanquante du gène de l'intégrine αV (Donahue et al., 1994).

L'intégrine $\alpha 2\beta 1$, un récepteur du collagène et de la laminine, intervient aussi dans la migration cellulaire. La chute d'expression de l'intégrine $\alpha 2$ dans les cellules épithéliales mammaires accroît leur mobilité (Kelly et al., 1995b), alors qu'une réduction de l'expression de cette intégrine est observée dans les cellules de cancer du sein (Jonjic et al., 1993). Or, le promoteur du gène de l'intégrine $\alpha 2$ possède un site PU.1 (Zutter et al., 1994).

Ces différents gènes sont donc des cibles putatives des gènes de la famille Ets.

II.6.2.2.2. Gènes d'adhérence intercellulaire

Les remodelages tissulaires impliquent le déplacement des cellules les unes par rapport aux autres. La perception par une cellule de la position de sa voisine est alors essentielle et se réalise grâce à des molécules établissant des contacts intercellulaires. De Launoit et al. (soumis) ont montré que la transcription de l'I-CAM-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule-1) est activée par Erm (appartenant au groupe PEA-3). Un site Ets a également été décrit dans le promoteur de la VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule; Cybulsky et al., 1993).

II.6.2.2.3. Gènes du cytosquelette

La migration met également en jeu des molécules du cytosquelette impliquées dans les déformations cellulaires et la transduction du signal imposées par les déplacements. La vimentine, molécule du cytosquelette, est exprimée dans les kératinocytes en migration lors de la cicatrisation, dans les hépatocytes au cours de leur transition épithélio-mésenchymateuse, et dans les cellules mésenchymateuses en migration dans l'embryon de souris (Buisson et al., 1996 ; Pagan et al., 1996 ; Klinowska et al., 1994). Chen et al. (1996) ont montré que PEA-3 peut transactiver le gène de la vimentine dans les cellules épithéliales mammaires cancéreuses et suggèrent que ce gène

participe ainsi au potentiel métastatique de ces cellules. Gilles et al. (1997) ont mis en évidence que la capacité invasive des cellules de cancer du sein en transition épithélio-mésenchymateuse est corrélée avec l'augmentation de l'expression de *c-ets-1* et de la vimentine.

RESULTATS

OBJECTIFS DE RECHERCHE

Le contrôle des migrations cellulaires dans la glande mammaire nous a paru être un mécanisme essentiel pouvant diriger le développement de cet organe soit vers la morphogenèse normale soit vers la cancérogenèse. Nous venons de voir comment, à travers l'activation de certains de ses gènes cibles dont les gènes de protéases et ceux de molécules d'ancrage cellulaire, les facteurs de transcription pouvaient être impliqués dans les processus de migration. Nous avons précédemment indiqué les raisons qui nous ont conduit à jeter notre dévolu plus particulièrement sur l'*uPA*, une sérine protéase. Notre premier objectif a donc été de définir les liens qui s'établissent entre le couple *c-ets-1/uPA* et la remarquable morphogenèse de branchement caractérisant certaines phases du développement mammaire. Alors que des données générales laissaient présager une implication de ce tandem dans le compartiment mésenchymateux, nous avons pu montrer une expression de *c-ets-1* et de l'*uPA* non négligeable dans les tubules épithéliaux eux-mêmes et dans les cellules épithéliales mammaires cancéreuses invasives. C'est cet aspect novateur que nous avons développé en deux temps. D'abord, une **corrélation nette entre les expressions de *c-ets-1* et de l'*uPA*** a été décrite, *in vivo* et *in vitro*, dans les cellules épithéliales en situation de migration. Ensuite, une étude expérimentale nous a permis d'établir des **relations causales entre les expressions de *c-ets-1* et de l'*uPA* et les capacités invasives des cellules épithéliales mammaires**. Ces deux axes de recherche ont donné lieu à deux articles qui constituent les deux premières parties des « Résultats ». Si nous avons pu montrer que les effets inhibiteurs de migration, d'invasion, de tubulogenèse et d'essaimage obtenus par un mutant dominant négatif de *c-et-1* passent par une inhibition de l'*uPA*, d'autres gènes cibles de la famille Ets peuvent aussi être affectés. Nous avons donc voulu savoir si **l'inactivation de ces facteurs de transcription avait des effets sur certaines molécules d'ancrage cellulaire** impliquées dans la mobilité des cellules. Cette étude est rapportée dans la troisième partie des « Résultats ».

PREMIERE PARTIE :

L'expression de *c-ets-1* et de l'*uPA* est associée à la tubulogenèse des cellules épithéliales mammaires ou à la dispersion des cellules cancéreuses

A. COURDENT-DELANNOY et al. 1996. International Journal of Developmental Biology, 40, 1097-1108.

CONTEXTE

La glande mammaire est un modèle biologique qui met en jeu des interactions entre épithélium et mésenchyme nécessitant la mobilité des cellules de chaque compartiment. Le contrôle génique des déplacements cellulaires est essentiel dans la formation et le fonctionnement de cet organe ainsi que dans les dérives cancéreuses qu'il peut subir. Or, le proto-oncogène *c-ets-1* impliqué, entre autre, dans les processus de migration cellulaire apparaît comme un bon candidat pour contribuer à la régulation de ces mécanismes. Son expression dans la glande mammaire n'avait pas été décrite jusqu'à l'initiation de nos travaux. Le but de notre étude, menée *in vivo* et *in vitro*, était donc de déterminer le statut de *c-ets-1* dans la glande mammaire et de le corréler éventuellement à celui d'un de ses gènes cible, l'*uPA*, impliqué dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC).

RESUME

Bien que les interactions instructives qui stimulent la morphogénèse épithéliale aient été largement étudiées, il existe peu de données quant aux facteurs de transcription impliqués dans ces processus. Pendant la morphogénèse de la glande mammaire, nous décrivons l'expression de *c-ets-1*, facteur de transcription, et de l'*uPA*, un de ses gènes cibles, dans les cellules mésenchymateuses lors d'étapes précoces d'invasion épithéliale, et dans les cellules épithéliales elles-mêmes à des stades plus tardifs. Nos études transposées *in vitro* montrent que les ARNm de *c-ets-1* et de l'*uPA* peuvent être induits dans les cellules épithéliales mammaires normales en réponse à du milieu conditionné par des fibroblastes MRC-5. Par contre, les cellules épithéliales mammaires cancéreuses invasives expriment constitutivement *c-ets-1* et l'*uPA*, alors que les cellules cancéreuses non invasives n'expriment pas ces deux gènes. Lors de cultures tridimensionnelles en gel de collagène, une expression préférentielle de *c-ets-1* et de l'*uPA* est détectée dans les cellules épithéliales qui migrent à travers leur matrice, soit à l'extrémité des canaux formés par les cellules normales, soit dans les cellules cancéreuses qui se dispersent. Le milieu conditionné par des cellules épithéliales mammaires cancéreuses induit dans les fibroblastes MRC-5 une forte expression des deux gènes. En revanche, le milieu conditionné par des cellules normales induit une expression plus faible. Ces résultats suggèrent que les interactions épithélium-mésenchyme stimulent l'expression de *c-ets-1* et l'*uPA* dans les deux compartiments cellulaires au cours de la morphogénèse de la glande mammaire. Ces expressions sont à chaque fois corrélées à la capacité invasive des cellules épithéliales.

Expression of *c-ETS-1* and *uPA* genes is associated with mammary epithelial cell tubulogenesis or neoplastic scattering

ALBINE DELANNOY-COURDENT¹, WILLIAM FAUQUETTE¹, XUE FEN DONG-LE BOURHIS¹, BÉNONI BOILLY¹, BERNARD VANDENBUNDER² and XAVIER DESBIENS^{1*}

¹Centre de Biologie Cellulaire, Unité Dynamique des Cellules Embryonnaires et Cancéreuses, Bâtiment SN 3, Université des Sciences et Technologies de Lille I, Villeneuve d'Ascq and ²CNRS URA 1160, Institut Pasteur, Lille, France

ABSTRACT Although the inductive interactions which trigger epithelial morphogenesis have been extensively described, little is known about the transcription factors involved in these processes. During mammary gland morphogenesis, we report the expression of the transcription factor *c-ets-1* and one of its target genes *uPA* in mesenchymal cells during early stages of epithelial invasion, and later in epithelial cells themselves. *In vitro* studies show that both *c-ets-1* and *uPA* mRNAs can be induced in cultured normal mammary epithelial cells in response to medium conditioned by MRC-5 fibroblasts. In contrast, invasive tumorigenic cell lines from the mammary epithelium express constitutively *c-ets-1* and *uPA* while non-invasive tumorigenic cells do not. In three dimensional co-cultures in collagen gels, a preferential expression of these genes is detected in epithelial cells migrating through the gel either at the tips of normal ducts or in cancerous cells which are scattering. These genes are also expressed in the neighboring fibroblasts. In MRC-5 fibroblasts, conditioned media from tumorigenic epithelial cells induce more efficiently *c-ets-1* and *uPA* mRNA accumulation than do conditioned medium from normal cells. These results suggest that epithelial-mesenchymal interactions trigger *c-ets-1* and *uPA* expression in both compartments during mammary gland morphogenesis. The expression of the genes correlates with invasiveness of epithelial cells irrespective of their being normal or cancerous.

KEY WORDS: *mammary gland, tubulogenesis, metastasis, c-ets-1, uPA, interactions*

Introduction

Organs are complex structures composed of numerous types of tissues. The precise arrangement of tissues in these organs results from proximate interactions which direct changes in gene expression, cell shape and migration. Several transcription factors have been shown to be involved in the control of gene expression during these interactions.

Expression of the proto-oncogene *c-ets-1* has been detected when organogenesis takes place (reviewed in Vandenbunder *et al.*, 1995). This proto-oncogene is the cellular progenitor of the viral oncogene *v-ets* originally identified in the avian leukemia retrovirus E 26 (Leprince *et al.*, 1983; Nunn *et al.*, 1983). It encodes a transcription factor (Bosselut *et al.*, 1990; Gunther *et al.*, 1990; Ho *et al.*, 1990; Wasyluk *et al.*, 1990) which recognizes specific nucleotide sequences with a GGAA/T core sequence. *c-ets-1* transcripts have been detected as early as during gastrulation in the mesodermal layer of the embryo. Throughout the embryonic

development, *c-ets-1* was shown to be expressed in situations involving cell movement. For example, *c-ets-1* transcripts have been detected in endothelial cells during the formation of new blood vessels (Vandenbunder *et al.*, 1989; Pardanaud and Dieterlen-Lièvre, 1993). *c-ets-1* transcripts are also abundant in mesenchymal cells adjacent to epithelial structures when inductive interactions occur (Quéva *et al.*, 1993) before the formation of cutaneous structures in dermis, limb bud, or during branching morphogenesis in kidney. In contrast, *c-ets-1* transcripts are absent in epithelia of the embryo whether they are derived from endoderm, mesoderm or ectoderm. The expression pattern of *c-ets-1* during pathological or normal development shares the same features, with *c-ets-1*

Abbreviations used in this paper. UPA, urokinase type plasminogen activator; tPA, tissue type plasminogen activator; PAI, plasminogen activator inhibitor; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase; MMP9, 92 kDa collagenase IV; ECM, extracellular matrix; TNF α , transforming growth factor α ; bFGF, basic fibroblast growth factor (type 2); HGF/SF, hepatocyte growth factor/scatter factor.

*Address for reprints: Centre de Biologie Cellulaire, Unité Dynamique des Cellules Embryonnaires et Cancéreuses, Bâtiment SN 3, Université des Sciences et Technologies de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France. FAX: 232434038. e-mail: desbiens@pop.univ-lille1.fr

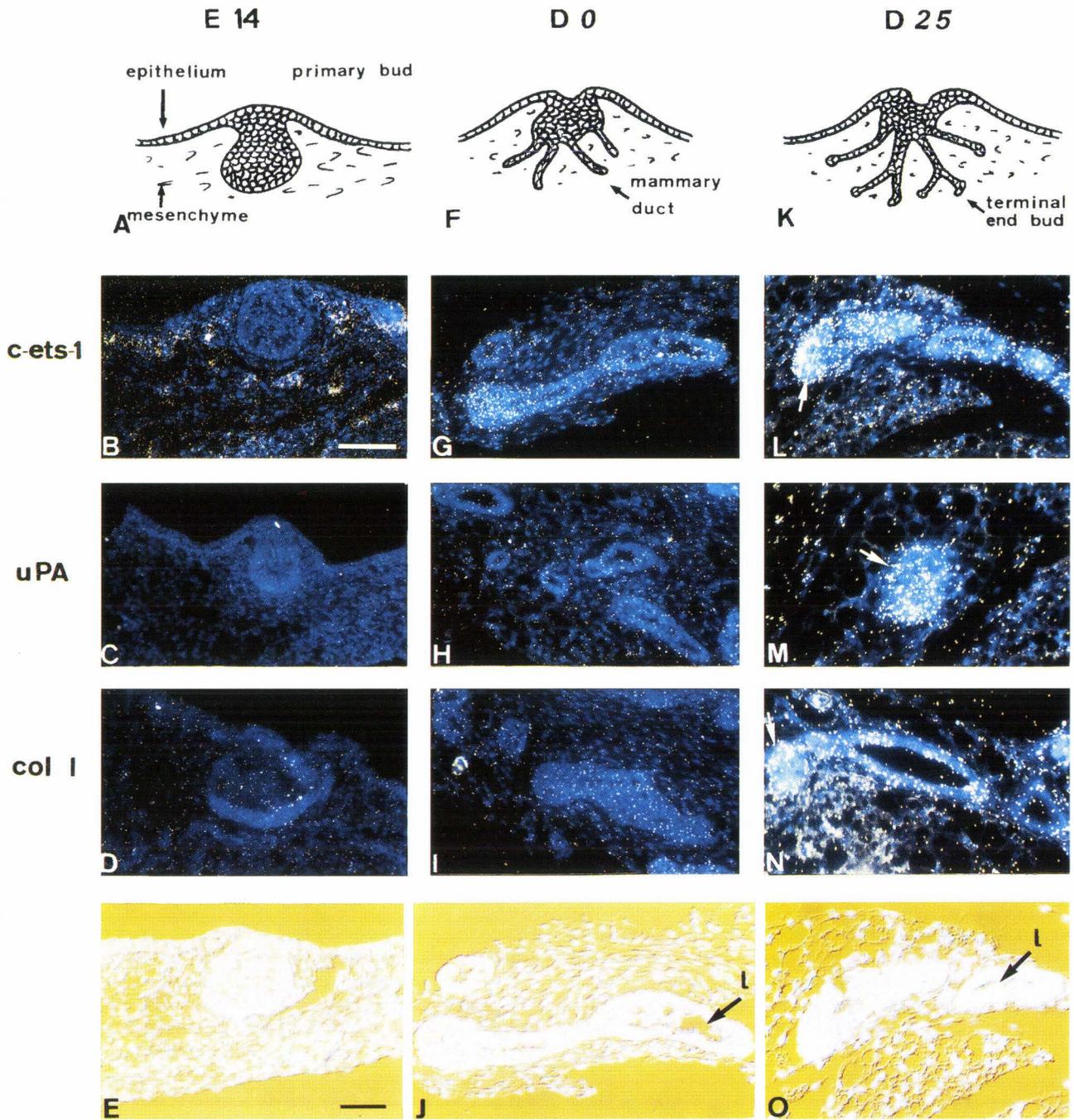


Fig. 1. *c-ets-1*, *uPA* and collagenase I (*col I*) expression during mouse mammary gland development. At 14 days of embryonic development, i.e. E 14, (A-E) the mammary gland is constituted of an epithelial primary bud which invaginates into the subjacent mesenchyme. At birth, D0 (F-J), the first epithelial mammary ducts are formed. At the onset of puberty, D25 (K-O) the mammary gland shows growing and branching ducts with the first terminal end buds at their extremities. *In situ* hybridization performed on mouse mammary gland sections at E14 indicates that the primary buds are not labeled by either of the three probes (B,C,D). The *c-ets-1* signal initially clearly detected in the mesenchyme (B) decreases in this tissue and appears in the mammary epithelial ducts at birth (G). *c-ets-1* expression is particularly intense in the terminal end buds at D25 (L, arrow). Both *uPA* and collagenase I expressions are detected at puberty (M,N) and serial sections performed on adjacent mammary ducts show a major expression in the terminal part of the ducts (arrows). E,J,O are enlarged Nomarski views of B,G,L respectively (l, lumen of the ducts). Bar, 35 μ m.

transcripts in the endothelium during tumor angiogenesis and in stromal fibroblasts surrounding invasive tumor formation (Wernert et al., 1992). Using *in vitro* transactivation assays, several genes encoding proteinase precursors were shown to be Ets target

genes. This is true for genes encoding pro-stromelysin 1 (Wasylyk et al., 1991), the precursor of stromelysin 1 which degrades extracellular matrix (ECM) components (proteoglycans, laminin and fibronectin), pro-collagenase I (Gutman and Wasylyk, 1990),

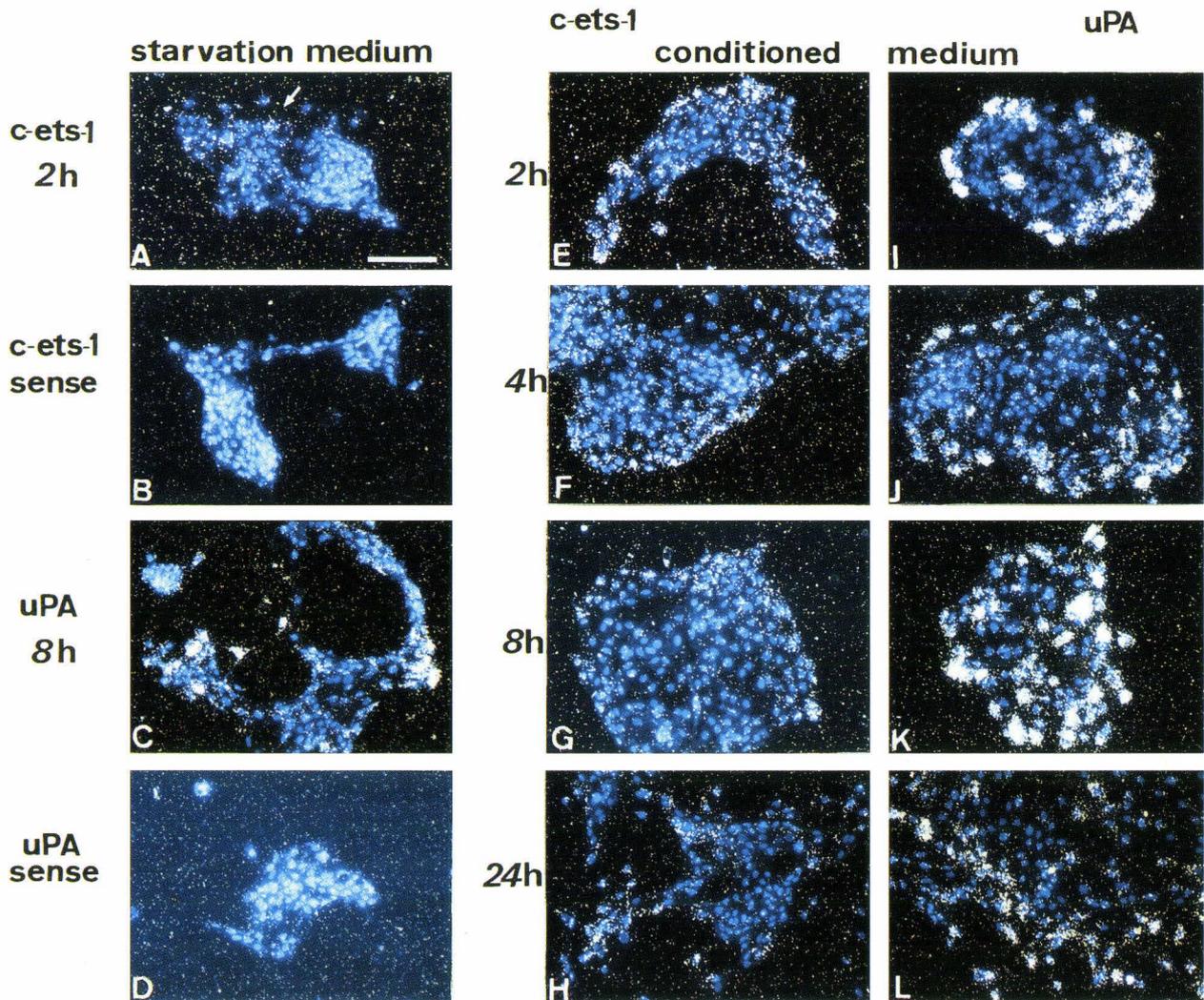


Fig 2. *c-ets-1* and uPA expression in hNMEC in two dimensional cultures. Cells were starved for 24 h after 3 days of growth. They were subsequently cultured either in starvation medium or in MRC-5 conditioned medium and mRNAs expression was analyzed at different times of incubation in these two culture media. In situ hybridization (A-L) was performed either with *c-ets-1* and uPA antisense or with sense probes (B,D). In starvation condition, the *c-ets-1* signal is faint and detected only in a few cells (A, arrow). In the same way, whatever the observation time, uPA is focally expressed in some cells (C). In MRC-5 conditioned medium, cells expressing *c-ets-1* and uPA mRNAs form a ring at the periphery of the epithelial cell clusters (E-L). This pattern is particularly evident from 2 to 8 h for the two genes (E-K). At 24 h (H,L) the cells have migrated to the periphery and the signals are widespread with a decreased intensity. Bar, 35 μ m. For the indicated times of culture, the cells were lysed, RNA recovered and analyzed by Northern blot (M). *c-ets-1* mRNA level is quite undetectable in starved cells. In these conditions, uPA mRNA expression

exhibits a minimum level by 0 to 24 h. In MRC-5 conditioned medium the level of *c-ets-1* expression increases as soon as 2 h and reaches its maximum at 4 to 8 h while uPA mRNA levels also increase as early as 2 h after the beginning of stimulation and peak at 8 h. A GAPDH probe was used as control for equal loading.

the precursor of collagenase I responsible for cleavage of the collagen triple helix, and pro-urokinase type plasminogen activator, pro-uPA, (Rorth *et al.*, 1990) the precursor of uPA which converts plasminogen into plasmin after fixation to its receptor and activation (Stephens *et al.*, 1989). Plasmin is able not only to

degrade ECM components but also to activate pro-collagenase and pro-stromelysin (He *et al.*, 1989).

It is well established that proteinases are involved in cellular movement processes of morphogenesis. During organogenesis, proteinases would allow the correct development of embryonic

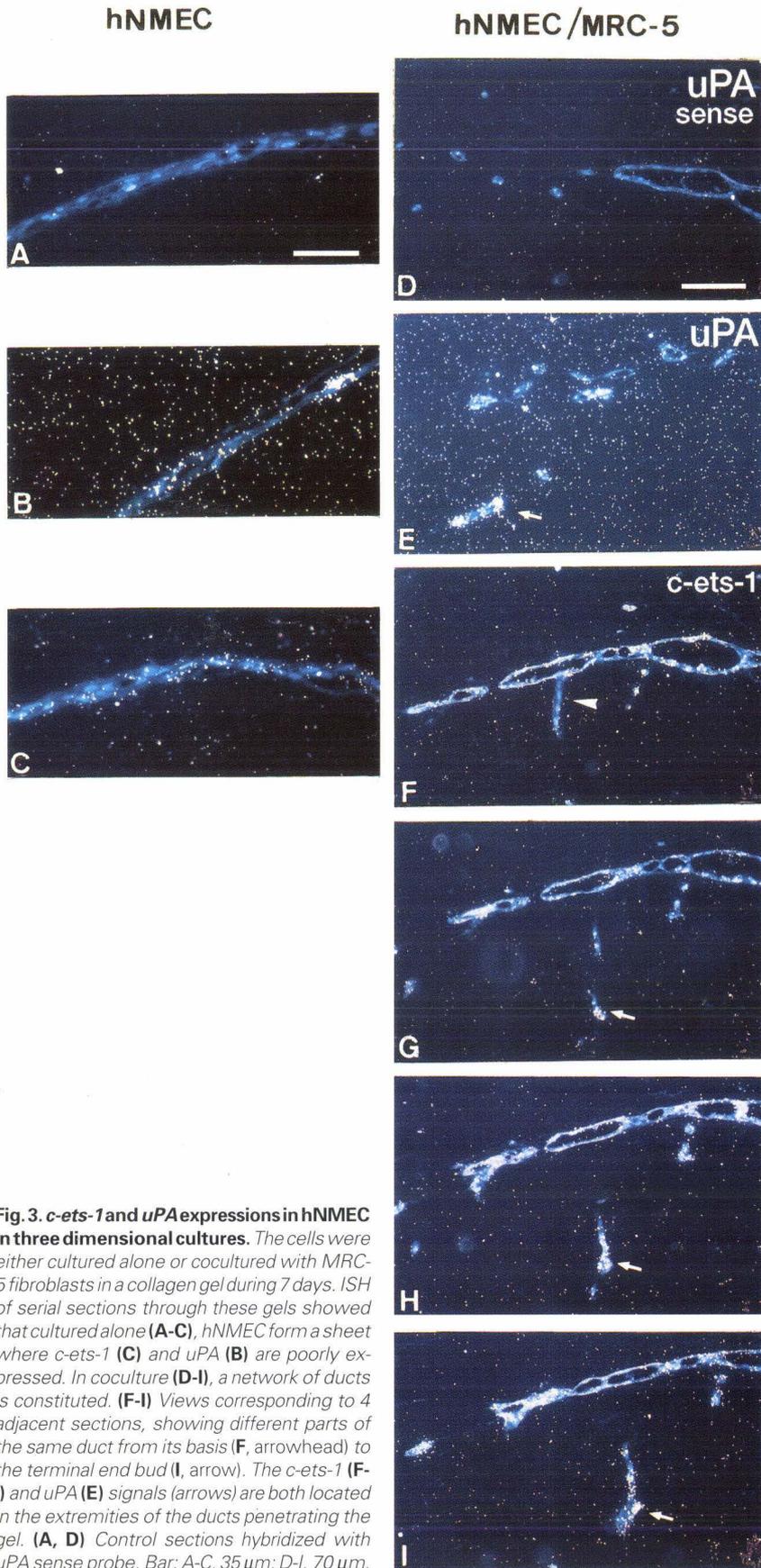


Fig. 3. *c-ets-1* and *uPA* expressions in hNMEC in three dimensional cultures. The cells were either cultured alone or cocultured with MRC-5 fibroblasts in a collagen gel during 7 days. ISH of serial sections through these gels showed that cultured alone (A-C), hNMEC form a sheet where *c-ets-1* (C) and *uPA* (B) are poorly expressed. In coculture (D-I), a network of ducts is constituted. (F-I) Views corresponding to 4 adjacent sections, showing different parts of the same duct from its basis (F, arrowhead) to the terminal end bud (I, arrow). The *c-ets-1* (F-I) and *uPA* (E) signals (arrows) are both located in the extremities of the ducts penetrating the gel. (A, D) Control sections hybridized with *uPA* sense probe. Bar: A-C, 35 μ m; D-I, 70 μ m.

tissues by monitoring the amount of ECM components. For example, stromelysin 1, by degrading basement membrane, allows branching of epithelial ducts during mammary gland morphogenesis (Simpson *et al.*, 1994). The urokinase-type plasminogen activator, *uPA* is expressed in the maternal vessel walls during uterine neo-vascularization (Grévin *et al.*, 1993). On the other hand, cancer cells in invasive carcinomas induce neighboring stromal cells to express proteinases such as *uPA* (Pyke *et al.*, 1991), collagenase I (Polette *et al.*, 1993) as well as the 72 kDa collagenase IV (Ballin *et al.*, 1991) and stromelysin 3 (Basset *et al.*, 1990). Moreover, in both normal and cancerous rodent mammary glands, Ossowski *et al.* (1979) showed the association of plasminogen activator production with tissue remodeling. It has been suggested that the degradation of ECM components by one or combinations of these proteinases facilitates either epithelial or endothelial invasion through the surrounding stroma.

In endothelial cells and in mesenchymal tissues of the uterus colonized by aggressive trophoblastic cells during implantation of the embryo (Grévin *et al.*, 1993) as well as in stromal fibroblasts adjacent to invasive neoplastic cells (Wernert *et al.*, 1992, 1994), the expression of *c-ets-1* correlated with the accumulation of *uPA* and/or collagenase and stromelysin transcripts. In contrast, in embryonic tissues during morphogenesis, in endothelial cells during angiogenesis or in mesenchymal cells expressing *c-ets-1*, neither *uPA* nor collagenase I transcripts were detected. The fact that *uPA* transcripts were not detected in the early stages of development agree with the proposal of Carmeliet *et al.* (1994) that *uPA* is not required for normal embryonic development.

In the present studies, we focused our attention on the mammary gland whose organogenesis takes place in the embryo and resumes during puberty. Previous results from Heuberger *et al.* (1982) using tissue recombinations have elegantly demonstrated the primordial role of epithelial-mesenchymal interactions in this development. In order to characterize the migration processes induced by these interactions, we set up *in vitro* reconstitution models in which normal or cancerous mammary epithelial cells interact or not with fibroblasts. Our results show for the first time, that epithelial mammary cells are able to express both *c-ets-1* and *uPA*. They also demonstrate that the expression of these genes is associated either with organized tubulogenesis by normal epithelial cells or with unregulated invasive processes by cancerous cells. These expressions would lead to a modification of epithelial organization and allow mesenchymal ECM to be degraded.

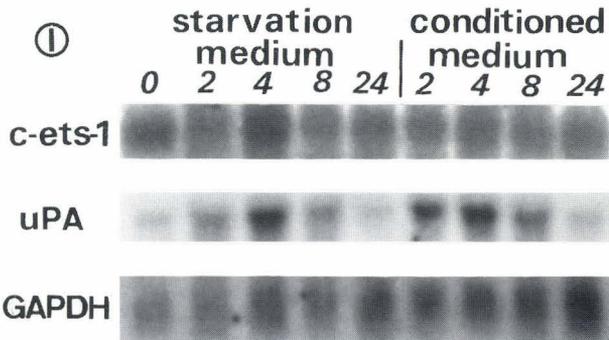
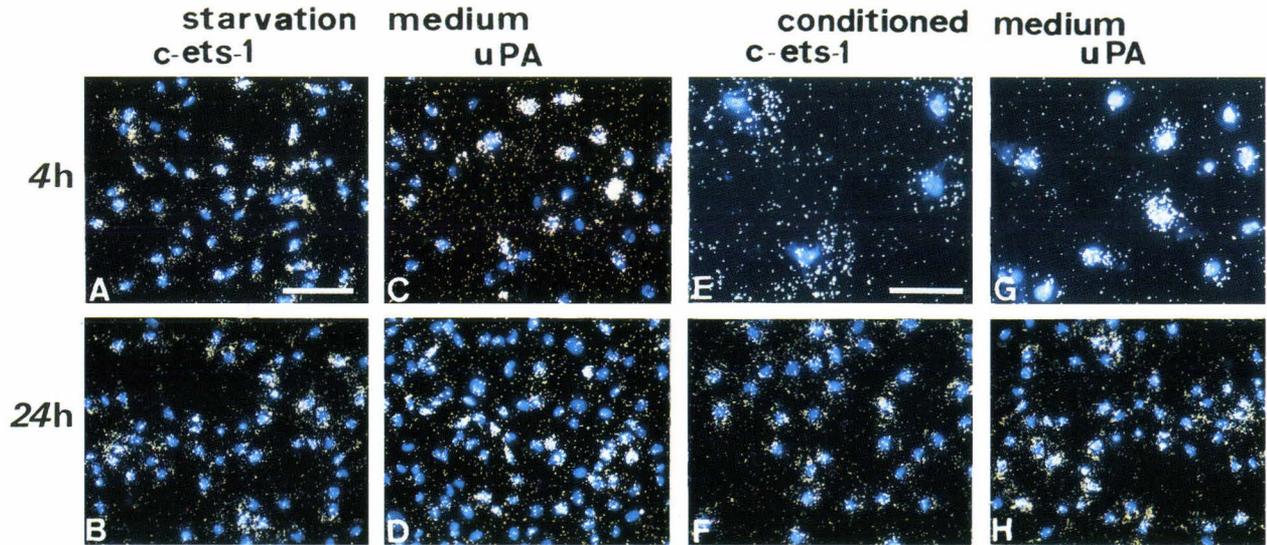


Fig 4. *c-ets-1* and *uPA* expressions in MDA-MB-231 in two dimensional cultures. Cells which expressed *c-ets-1* or *uPA* are distributed in the whole seeded region either in starvation or in MRC-5 conditioned medium and at any times of analysis. However, *c-ets-1* expressing cells (A,B,E,F) appear more numerous than *uPA* expressing cells (C,D,G,H). Views E and G allow us to observe the distinct aspect of the two signals. While the *c-ets-1* signal is located in the whole cell, *uPA* signal appears more focally localized just near the nucleus. Moreover, the *uPA* signal decreases in 24 h. cultured cells (compare C and D). Bars: A to D,F,H, 35 μ m; E and G, 17.5 μ m. Northern blots (II) point out that the time courses of expression, for each of the two genes, are the same either in starvation or in MRC-5 conditioned medium.

Results

***c-ets-1* and proteinases are expressed in vivo during morphogenesis of mouse mammary gland**

Sections of mouse mammary glands at different stages of development were hybridized with murine *c-ets-1*, *uPA* and collagenase I probes. At E14, the primary epithelial buds were not labeled by the *c-ets-1* probe whereas a signal was detected in the surrounding mesenchyme (Fig. 1B). Collagenase I and *uPA* transcripts were not detected, either in epithelial or in mesenchymal cells (Fig. 1C,D). At D0, the *c-ets-1* signal decreased in the mesenchyme and clearly appeared in epithelial mammary ducts (Fig. 1G). Again, proteinase RNAs were not detected (Fig. 1H,I). At D25, the onset of puberty, (and D35, data not shown), epithelial cells in the tips of growing ducts expressed *c-ets-1* as well as *uPA* and collagenase I transcripts (Fig. 1L,M,N). The ISH signals were higher in these extremities than in epithelial cells forming the more proximal collecting tubules. For each probe, focal signals were detected in the loose mesenchyme.

Thus, during mammary gland morphogenesis, *c-ets-1* was strongly expressed in the mesenchymal component at the onset of primary epithelial bud formation. Later, *c-ets-1* expression was detected in the epithelial component where it correlated with proteinase expression, at the tips of the ducts. The features of these expression patterns prompted us to investigate whether diffusible signals released by either com-

partment could mediate the induction of *c-ets-1* and *uPA* expressions.

***c-ets-1* and *uPA* expressions are inducible in normal mammary epithelial cells (hNMEC)**

In a first set of experiments, we tested the effects of conditioned medium by MRC-5 fibroblasts on hNMEC in two dimensional cultures. Northern blot analysis (Fig. 2M) revealed the presence of low levels of *c-ets-1* and *uPA* mRNAs in starvation conditions for each time. As early as 2 hours after stimulation by MRC-5 conditioned medium, *c-ets-1* mRNAs levels increased and reached a maximum from 4 to 8 h. In the same conditions, *uPA* mRNA levels increased from 2 to 8 h. In two dimensional cultures, hNMEC grew as clusters that dissociated upon incubation with MRC-5 conditioned medium. Interestingly, ISH analysis revealed that *c-ets-1* and *uPA* signals were localized at the periphery of the clusters formed by hNMEC. Cultured in starvation conditions, very few peripheral cells were weakly labeled by the *c-ets-1* riboprobe for each time of the experiment (Fig. 2A). In the same way, *uPA* was focally expressed in a few peripheral cells (Fig. 2C). In MRC-5 conditioned medium, from 2 to 8 h after stimulation, both the number of peripheral cells expressing *c-ets-1* and *uPA* transcripts, and the signal intensity, increased (Fig. 2E to G, I to K). After 24 h of treatment, *c-ets-1* and *uPA* transcripts were detected in peripheral spread cells which had migrated. At this time, signals appeared lower than those observed after 2 or 8 h (Fig. 2H,L).

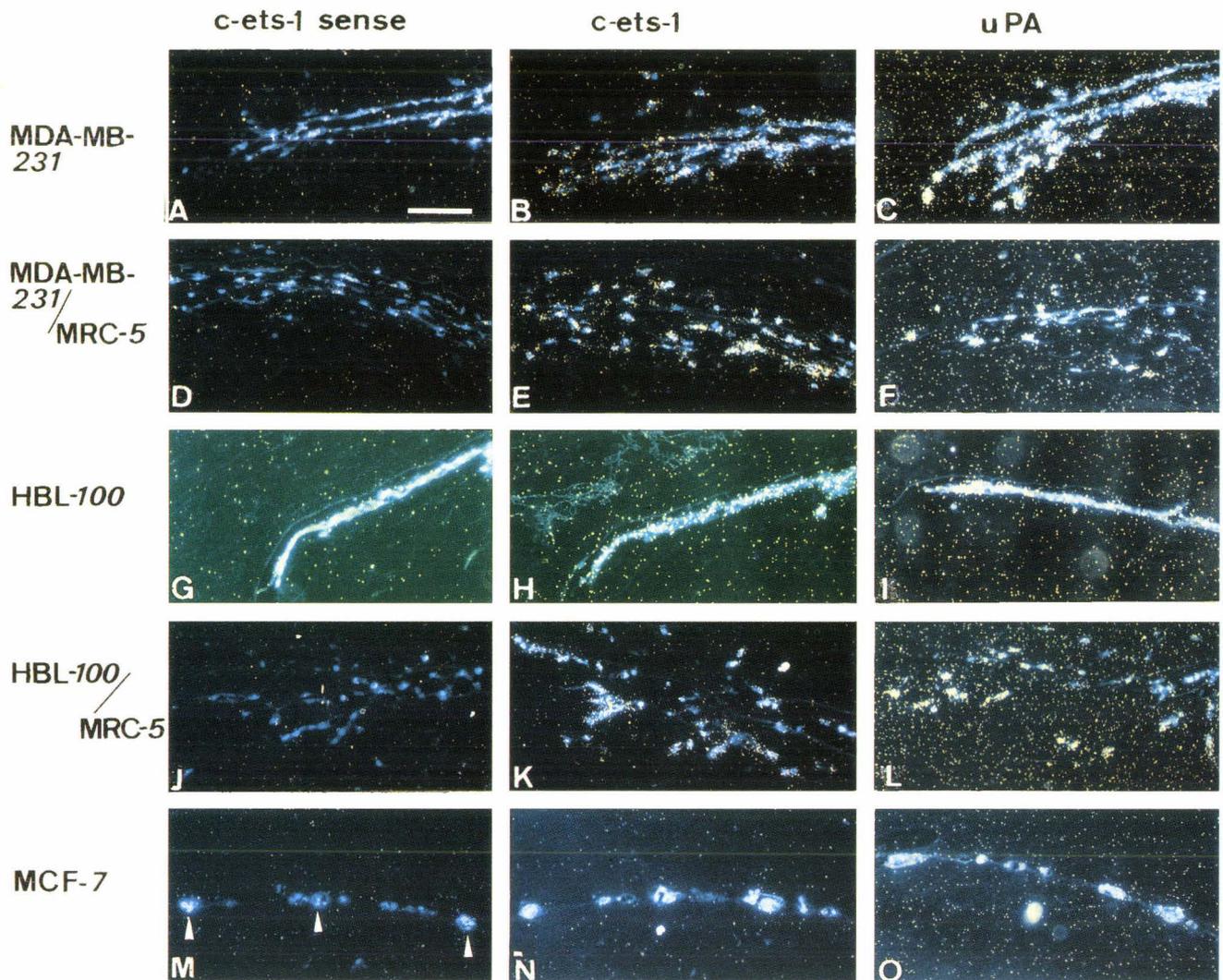


Fig. 5. *c-ets-1* and *uPA* expressions in MDA-MB-231, HBL-100 and MCF-7 in three dimensional collagen gels. Culture conditions were the same as these used for hNMEC in three dimensional cultures. Cultured alone, MDA-MB-231 cells constitute parallel layers in the center of the seeded zone and scatter in the periphery of this zone (A-C). When cocultured, they scattered all along the seeded region (D-F). In both cases, the most invasive cells infiltrating the gel clearly express *c-ets-1* (B,E) and *uPA* (C,F). In a fibroblast free gel, HBL-100 form a compact layer (G-I) where the genes are weakly expressed (H,I). In coculture, the cells scattering and invading the gel all along the seeded zone (J-L) distinctly expressed *c-ets-1* (K) and *uPA* (L). Cultured alone or in coculture, MCF-7 grew as adjacent cysts (arrowheads in M). *c-ets-1* and *uPA* signals are never detected (M to O). Views A,D,G,J,M are control sections hybridized by *c-ets-1* sense probe. Bar, 70 μ m.

The fact that *c-ets-1* and *uPA* were expressed at the periphery of the epithelial cell clusters suggested a role in morphogenetic processes. We next set up three dimensional cultures that more closely mimic physiological situations.

A 10 μ l drop containing 25000 hNMEC was laid between two collagen gels in absence of fibroblasts. Seven days later the cells formed a pluristratified compact sheet without lumen formation. The antisense *c-ets-1* or *uPA* probes detected a weak signal in these cells (Fig. 3B,C) when compared to the sense probes (Fig. 3A). When cocultured with MRC-5, hNMEC began to produce branching tubules after 3-4 days of culture. After 7 days, these tubules formed a three dimensional network which infiltrated the gel and extended from the initial center where cells were initially laid down to the periphery. Sections of these gels clearly revealed the presence of lumen within the tubules. It is worthy of note that

migrating cells located at the tips of invasive ducts showed particularly intense *c-ets-1* and *uPA* signals before lumen establishment (Fig. 3E to I).

These experiments demonstrated that *c-ets-1* and *uPA* gene expression was associated with migration and morphogenetic processes in normal mammary epithelial cells and could be induced by cytokines released by neighboring fibroblasts.

Invasive cancerous epithelial cells express high levels of c-ets-1 and uPA-transcripts in the absence of stimulation

In MDA-MB-231 cancerous cells, incubated either in starvation medium or in MRC-5 conditioned medium, *c-ets-1* transcripts detected by Northern blot analysis (Fig. 4I) were abundant for each time, and mRNA levels were similar in both culture conditions. In the same way, the time courses of *uPA* expression were similar in

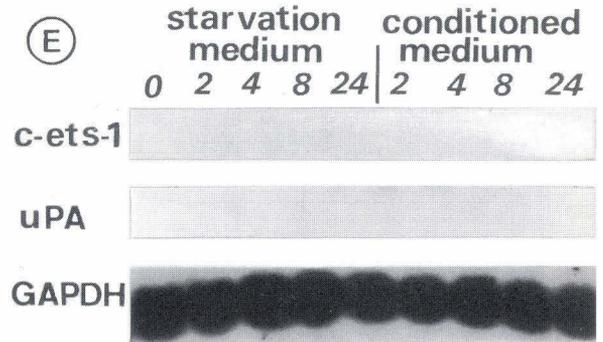
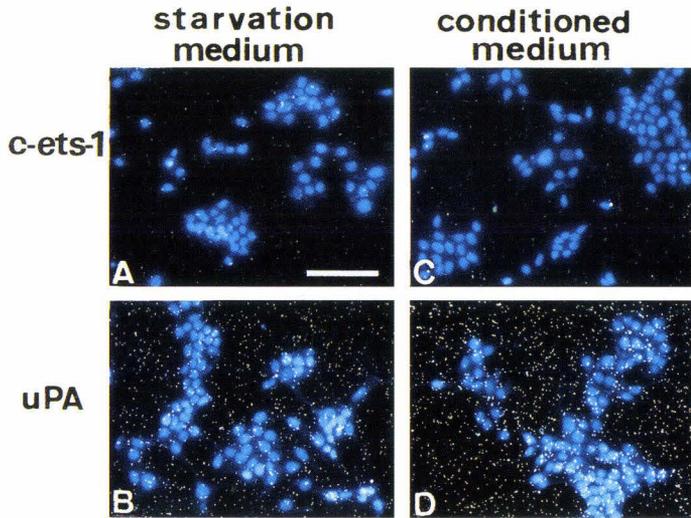


Fig. 6. *c-ets-1* and *uPA* expressions in MCF-7 in two dimensional cultures. Under similar conditions of cell cultures and gene expression analysis, ISH (A-D) fails to detect *c-ets-1* and *uPA* expression irrespective of the conditions used. Bar, 35 μ m. In the same way, *c-ets-1* and *uPA* transcripts are not detected by Northern blot analysis (E).

the two conditions. MDA-MB-231 cells did not aggregate and rather grew as spindle-like cells. In starvation medium as well as in MRC-5 conditioned medium, ISH showed that the *c-ets-1* and *uPA* expressing cells were distributed throughout the culture at any time of treatment. However, while most of the MDA-MB-231 cells expressed *c-ets-1* (Fig. 4A,B,E,F) only a few dispersed cells expressed *uPA* (Fig. 4C,D,G,H). Similar results were obtained with HBL-100 cells.

We subsequently investigated the behavior of these cells in our three dimensional assay. After 3 days of culture in a fibroblast-free gel, MDA-MB-231 began to invade the gel around the initial cell deposit, in the three dimensions, producing a lot of tight cytoplasmic extensions. At the end of the experiment, an anarchic network of spindle-shaped cells was obtained. Sections revealed that cells were organized in parallel layers in the center of the seeded zone but scattered at its periphery (Fig. 5A). Cells obviously invading the surrounding gel expressed *c-ets-1* and *uPA* more conspicuously than did the cells in the central area (Fig. 5B,C). When MDA-MB-231 were co-cultured with fibroblasts, the limits of the initial cell deposit were rapidly overstepped. After 7 days, the area covered by MDA-MB-231 cells in co-culture was twice as large as the area covered in fibroblast-free cultures. Cells were scattered all along the seeded zone but they were unable to form tubules. *c-ets-1* and *uPA* signals were preferentially detected in invasive cells infiltrating the gel (Fig. 5E,F). When HBL-100 were cultured alone, these cells migrated only close to the limits of the initial deposit. They formed a compact layer with poor scattering and showed a weak *c-ets-1* signal (Fig. 5H). *uPA* labeling was more evident at the extremity of the layer (Fig. 5I). After one week of co-culture, HBL-100 extensively colonized the gel with anarchic scattering similar to that of MDA-MB-231. Invading HBL-100 conspicuously expressed *c-ets-1* and *uPA* (Fig. 5K,L).

Expression of *c-ets-1* and *uPA* is not detected in non-invasive cancerous epithelial cells

In two dimensional cultures, MCF-7 grew as little clones and never showed *c-ets-1* or *uPA* expression. ISH or Northern blot failed to detect the transcripts whatever the culture conditions used (Fig. 6A to E). These cells cultured with or without fibroblasts in

three dimensional cultures grew as individual cysts and never formed tubular structures. In both conditions, MCF-7 never expressed *c-ets-1* and *uPA* (Fig. 5N,O).

Normal mammary epithelial cells are less efficient than cancerous cells in inducing *c-ets-1* and *uPA* expression in fibroblasts

In order to evaluate whether diffusible signals released by epithelial cells could induce *c-ets-1* and *uPA* expression in neighboring fibroblasts, we cultured MRC-5 fibroblasts in control medium or in media conditioned by either hNMEC, MCF-7, MDA-MB-231 or HBL-100. After treatment by hNMEC conditioned medium, many fibroblasts were labeled by *c-ets-1* and *uPA* probes (Fig. 7C,D). The labeling intensities were slightly higher than that observed in control cultures (Fig. 7A,B). Most fibroblasts treated with MCF-7 (Fig. 7E,F), MDA-MB-231 (Fig. 7G,H) or HBL-100 conditioned media contained a higher amount of transcripts for the two genes than did the cells treated by control or hNMEC conditioned medium. Under the same conditions, normal breast fibroblasts showed the same expression than MRC-5 fibroblasts (data not shown).

Consistent with these results, in three dimensional cultures, MRC-5 located close to the most invasive epithelial cells strongly exhibited enhanced *c-ets-1* and *uPA* expressions (data not shown).

Discussion

c-ets-1 expression has been widely documented in mesenchymal tissues during invasive processes and under epithelial-mesenchymal interactions. Here, we describe for the first time *c-ets-1* expression pattern in invasive epithelial cells during normal *in vivo* mammary gland development. Using *in vitro* reconstitution models we show that *c-ets-1* expression is associated either with mesenchymal-induced tubulogenesis by normal mammary epithelial cells or with epithelial scattering by cancerous mammary cells. Furthermore, the expression pattern of *uPA*, a putative target gene for *c-ets-1*, parallels both *c-ets-1* expression pattern and the morphological feature of epithelial cell in movement.

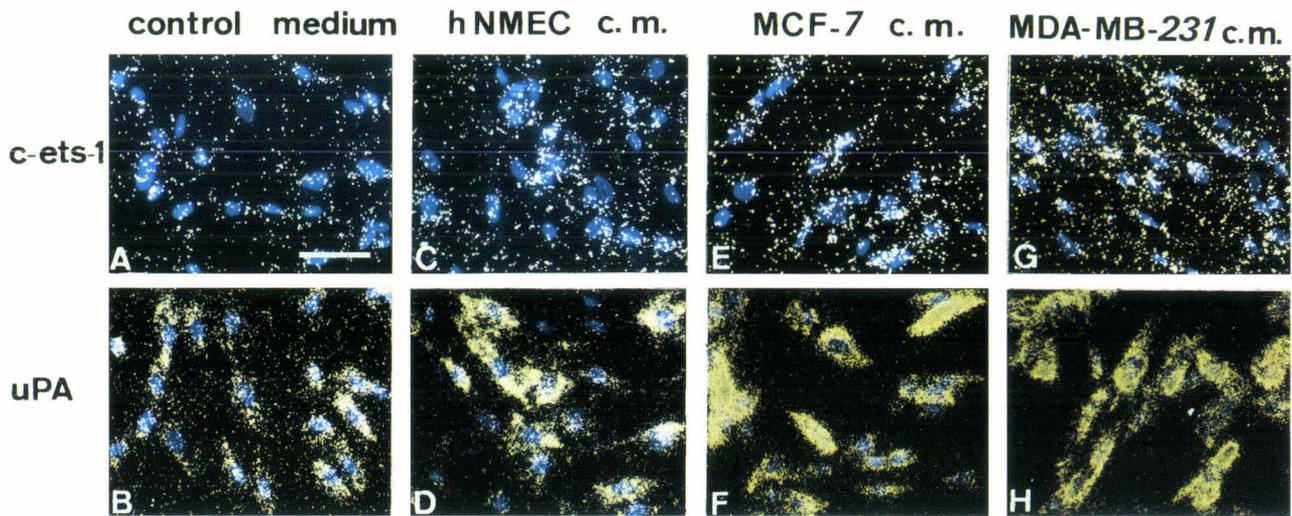


Fig. 7. *c-ets-1* and *uPA* expression in MRC-5 fibroblasts treated by epithelial mammary cells conditioned media. After growth and starvation, MRC-5 were cultured in media conditioned by hNMEC, MCF-7 or MDA-MB-231 (c.m.). ISH (A-H) shows that after 24 h of treatment by hNMEC c.m., MRC-5 cells expressed *c-ets-1* (C) and *uPA* (D) more intensely than in control medium (A,B). Note that, for the two genes, the density of silver grains drastically increases under cancerous epithelial cell c.m. The *uPA* signal intensity increases such as cell nuclei are quite invisible (E to H). Bar, 17.5 μ m.

Expression of *c-ets-1* and *uPA* in invaded mesenchymal tissue

During mammary gland morphogenesis, we show that *c-ets-1* is clearly expressed at E14 in the mammary mesenchyme close to the invaginating epithelial primary bud. Later, at birth and at puberty, the loose mesenchyme in the vicinity of epithelial ducts displays focal expression of *c-ets-1*. Similar features of the expression patterns have been observed in situations where epithelial layers invade various mesenchymal compartments such as the uterine wall during mouse implantation or the stromal part of invasive carcinomas (reviewed in Vandebunder *et al.*, 1995). At puberty, mesenchymal cells located near the mammary ducts also expressed *uPA* and collagenase. The late expression of these proteinases suggests either that they are not required for embryonic tissue remodeling, or that our probes are not suitable to detect a very low level of expression as previously reported for stromelysin 3 expression (Lefebvre *et al.*, 1995). Indeed, using the same mouse *uPA* probe, Grévin *et al.* (1993) never observed *uPA* expression in the embryo proper at least until day 10.5 of development while, as previously demonstrated by Sappino *et al.* (1989), trophoblastic cells strongly expressed this gene as early as day 6.5. In the same way, Mattot *et al.* (1995) using the same collagenase I probe, detected collagenase I mRNAs solely in chondrocytes in the E17 mouse fetus. Consistent with our data, the finding that *tPA* (tissue type plasminogen activator) and *uPA* double-deficient mice appear normal at birth suggests that neither *tPA* nor *uPA* is required for normal embryonic development (Carmeliet *et al.*, 1994). As previously shown in adult tissues (Grévin *et al.*, 1993; Wernert *et al.*, 1994), *c-ets-1*, *uPA* and collagenase expressions are detected in mesenchyme facing invasive epithelial tissue. Taken together, these *in vivo* observations suggest that epithelial cells send signals to mesenchymal cells which react by expressing these genes. According to *in vitro* transactivation assays (Gutman and Wasyluk, 1990; Rorth *et al.*, 1990; Wasyluk *et al.*, 1991; Stacey *et al.*, 1995), it is tempting to

think that, during active growing phases of mammary gland development, *c-ets-1* expression takes part in events that trigger *uPA* and collagenase I expression in the invaded mesenchyme. Thus, the mesenchyme, under the stimulation of epithelial cells, would be able to control ECM degradation and to become permissive to epithelial invasion.

Our *in vitro* cultures were designed to compare the stromal reaction triggered either by normal epithelial mammary cells or by cancerous epithelial cells. It clearly appears that normal mammary epithelial cells, which migrate as sprouting ducts, induce *c-ets-1* and *uPA* expression in fibroblasts with a lower efficiency than cancerous cells. These results provide support for the hypothesis that instructive inductions monitored by epithelial cells via secreted factors are specific of epithelial cell status; these factors, in turn, induce *c-ets-1* and the proteinase gene expression. In the same way, human breast fibroblasts cultured with epithelial MDA-MB-231 conditioned medium increase their production of collagenase IV (Noël *et al.*, 1994); stromelysin 3 is specifically expressed by fibroblasts in the vicinity of neoplastic cells of mammary carcinomas (Basset *et al.*, 1990). $\text{TNF}\alpha$ and bFGF, both potent stimulators of *uPA* expression which trigger *c-ets-1* expression in fibroblasts, appear as good candidates for epithelial signaling (Wernert *et al.*, 1994; Gilles *et al.*, 1996).

Expression of *c-ets-1* and *uPA* in invasive epithelial cells

In addition, our work shows that *c-ets-1* can be expressed in migrating epithelial cells themselves. Indeed, during mammary gland morphogenesis, at day 0 *c-ets-1* expression appears in the epithelial cells of primary ducts. This observation is the first evidence of *c-ets-1* expression in an epithelium during development. During morphogenetic processes, epithelial cells disrupt their specific organization to allow local repositioning (Gumbiner, 1992). Therefore, we suggest that *c-ets-1* plays a role in cell rearrangement inside an epithelial sheet at this stage. Later, at puberty, when the growth of the gland is reactivated, epithelial cells

display a conspicuous signal for *c-ets-1*, *uPA* and collagenase I. It is worthy of note that the three signals are particularly intense in the growing ends of the ducts where cells are probably most invasive. At this stage epithelial cells have to force their way through the surrounding mesenchyme. *uPA*, collagenase I and *c-ets-1* expressions superimpose in the epithelial cells at the invasive extremity of the ducts during mammary development. These proteinases, known to be expressed in many migrating cell types, are here involved in the normal invasive epithelium. In the same way, *c-ets-1*, *uPA* and collagenase were recently detected in lung carcinoma cells and were suspected to be involved in tumor invasion (Bolon *et al.*, 1995).

Northern blot analysis indicates that *c-ets-1* and *uPA* expression can be induced in hNMEC in response to MRC-5 conditioned medium. Moreover, for the first time, our *in vitro* experiments on two dimensional or three dimensional cultures reveal that *c-ets-1* and *uPA* transcripts are expressed in migrating hNMEC stimulated by soluble factors released by MRC-5 fibroblasts. On the contrary, HBL-100 and MDA-MB-231 cells expressed high levels of *c-ets-1* and *uPA* either constitutively or under MRC-5 stimulation. These data suggest that hNMEC are dependent upon migrating signals to significantly express these genes whereas HBL-100 and MDA-MB-231 cells, which exhibit a natural invasive power, do not need such signals to express *c-ets-1* and *uPA*. The correlation between these gene expressions and the migration process is furthermore reinforced by MCF-7 behavior. These cells grow tightly aggregated as clones or cysts, share abundant surface E cadherin (Révillion *et al.*, 1993) known to act as an invasion suppressor molecule (Vlemingckx *et al.*, 1991), and never express *c-ets-1* and its putative target proteinase gene. These cells, when transfected with a member of the Ets family, E1AF, strongly express the metalloproteinase MMP9 and furthermore scatter both *in vitro* and *in vivo* (Kaya *et al.*, 1996).

Under the influence of both MRC-5 conditioned medium and three dimensional matrix, hNMEC cells form tubular structures whereas MDA-MB-231 and HBL-100 scatter. Irrespective of their own status, the most invasive cells express both *c-ets-1* and *uPA*. Recently, involvement of Ets factors, including c-Ets-1, was confirmed in the transactivation of the *uPA* promoter *in vitro* (Stacey *et al.*, 1995). However, our ISH experiments on two dimensional cultures show that the *c-ets-1* signal is rather homogeneously distributed in cell populations while the *uPA* labeled cells appear more focally in the population concerned with *c-ets-1* expression. The distribution of *c-ets-1* and *uPA* signals during placentation share the same features (Grévin *et al.*, 1993). Thus, there may exist a threshold of *c-ets-1* expression from which *uPA* expression would be triggered. Alternatively, we can also propose that the activation of *uPA* expression needs additional Ets family proteins or, one or several cofactor(s). Ets transcription factors cooperate with factors as Jun/Fos (Wasylyk *et al.*, 1990). Experiments are currently in progress to go further in the demonstration of the inductive role of *c-ets-1* in our model.

Remodeling the ECM

uPA plays a central role in ECM proteolysis as the starter of a proteinase cascade: it leads to pro-collagenase activation in human mammary carcinoma cells (Paranjpe *et al.*, 1980). It can also activate stromelysin (Wolf *et al.*, 1994). As a consequence, *uPA* has been highly correlated with cell invasiveness and metastatic power for example in melanoma cells (Mignatti *et al.*, 1986) and in

lung colonies (Hearing *et al.*, 1988). It has been suggested that epithelial cells can degrade the matrix using *uPA* linked to its surface receptors (Pyke *et al.*, 1991). These receptors are overexpressed in breast cancer cells (Jankun *et al.*, 1993) and this overexpression has been correlated with the high invasiveness capacity of the cells. Among cancerous epithelial cells, the most invasive MDA-MB-231 clearly exhibit the *uPA* signals whereas the non-invasive MCF-7 do not show these signals. These results agree with the finding of Funahashi *et al.* (1994): proteinase activities are proportional to the metastatic potentials of the cells in culture. Of course, cellular invasion depends on the balance between the levels of structural proteins and their proteinases, between the activators and the inhibitors of these proteinases like PAI 1, PAI 2 and TIMPs. The breakdown of this balance leading to high levels of plasminogen activator or metalloproteinases may be responsible for the abnormal tumoral progression. In this view, we recently performed *uPA* activity estimations in our three dimensional cultures and the results showed an increased *uPA* activity in epithelial cells under MRC-5 stimulation while PAI-1 levels were not affected (Fauquette *et al.*, in preparation).

In conclusion, the description of *c-ets-1* expression in migrating epithelial cells is a new finding. Furthermore, we show that in adult tissues and in our *in vitro* systems the expression pattern of *c-ets-1* in invasive cells correlates with the expression pattern of *uPA*, keeping in mind the fact that the expression and the activity of *uPA* have been associated with the invasiveness capacity of epithelial cells. The comparison between our results concerning the normal mammary gland tubulogenesis *in vivo* and *in vitro* and the scattering of cancerous mammary epithelial cells suggests that the transient and inducible expression of *c-ets-1* and *uPA* during normal development can be constitutively activated under pathological conditions. We now aim at inhibiting *c-ets-1* expression with the expectation to block the mechanism which leads to invasion and metastasis.

Materials and Methods

In vivo model

Mammary glands of E14 mouse embryos as well as those of young mice at birth (D0) or at puberty (D25 and D35) were collected and prepared for hybridization: they were fixed at 4°C for 16 h in 4% paraformaldehyde in PBS containing 5 mM MgCl₂, washed in PBS, dehydrated, embedded in paraffin and serially cut (7 µm). Sections were transferred to 3 amino-propyl-triethoxysilane (TESPA, Aldrich) coated slides and incubated at 37°C for three days. Slides were stored at 4°C until use.

In vitro model

Cell types and their maintenance in culture

All cell lines were routinely maintained in plastic flasks (Falcon 75 cm²) fed with 15 ml of cell type specific medium containing serum (see below), and incubated in a humid atmosphere of 5% CO₂ in air, at 37°C. Medium was changed every three days.

Human Normal Mammary Epithelial Cells (hNMEC) were isolated from mammary reduction (generous gift from Dr Pellerin) and cultured as previously described by Berthon *et al.* (1992). hNMEC were maintained at low Ca⁺⁺ concentration (20 µM) in DMEM/Ham F12 (Eurobio) with 100 ng/ml cholera toxin (Sigma), 2 ng/ml EGF (Genzyme), 5x10⁻⁶ M cortisol (Sigma), 2 mM glutamine (Eurobio), 10 µg/ml insulin (Endopantrine, Organon), 40 U/40 µg/ml penicillin-streptomycin (Eurobio), 4 µg/ml gentamycin (Sigma), 0.25 ng/ml fungizone (Eurobio), 5% calcium free Fetal Calf Serum (FCS, Eurobio). In these conditions, cells produced by mitosis

stay in suspension, and can be recovered by centrifugation (15 min at 1200 rpm). For each experiment, cells were resuspended in the same medium supplemented with ordinary FCS allowing cell attachment after seeding.

The other epithelial cells were obtained from the American Type Culture Collection. HBL-100 cells were initially reported as non-tumorigenic in nude mice but, recently some clones including the clones we used in these studies, exhibited a transformed phenotype and an increased motility (data not shown). MDA-MB-231 cancerous cells are tumorigenic in nude mice and are hormone-independent for growth. In contrast, MCF 7 cancerous cells are hormone-dependent. These cells were cultured in Epithelial cell Medium (EM) consisting of MEM (Eurobio) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS, Eurobio), 2 mM glutamine (Eurobio), 100 U/100 µg/ml penicillin-streptomycin (Eurobio), 1% non essential amino acids (Eurobio) and 5 µg/ml insulin (Endopantrine, Organon).

MRC-5 fibroblasts are derived from normal lung tissue of a 14 week-old male fetus (Eurobio). Montesano *et al.* (1991a) showed that these cells produce HGF/SF capable of inducing tubulogenesis in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) three dimensional cell cultures. MRC-5 were maintained in Fibroblast Medium (FM) consisting of EM deprived of non-essential amino acids and insulin.

Two-dimensional cultures

Epithelial cells and fibroblasts were collected either according to standard conditions with 0.25% trypsin-EDTA or by centrifugation of cell suspensions for hNMEC. The cells were resuspended in appropriate medium, numbered and seeded at the following densities: MDA-MB-231 were plated at 10,000 cells/ml, HBL-100 at 15,000 cells/ml, MCF-7 and hNMEC at 30,000 cells/ml and fibroblasts at 60,000 cells/ml. These densities allowed us to obtain subconfluent cultures after three days of growth. In order to perform *in situ* hybridization, cells were seeded with 250 µl of medium in 8-well tissue culture chambers of Lab Tech slides (Nunc) previously coated with collagen to provide the cells with an artificial matrix. For Northern blot analysis, epithelial cells were plated with 20 ml of medium in 150 mm dishes. The cells were grown for three days before replacing complete medium by starvation medium (EM or FM without serum but supplemented with 2 µg/ml fibronectin and 30 µg/ml transferrin). After 24 h, cells were submitted to the following conditions. Epithelial cells were cultured either in starvation medium (reference culture) or in MRC-5 conditioned medium. This conditioned medium was recovered from a subconfluent MRC-5 culture after 2 days of growth in serum-free medium. The fibroblasts were either cultured in complete medium as control, or treated with 50% complete medium and 50% conditioned media recovered from subconfluent cultures of each epithelial cell line after 2 days of growth in serum free medium.

After each culture assay, cells were fixed for ISH in 4% paraformaldehyde in PBS containing 5 mM MgCl₂, washed in PBS and dehydrated. Slides were stored at 4°C until ISH. To perform Northern blot analysis, total RNAs of epithelial cells were extracted in guanidium isothiocyanate according to Chirgwin *et al.* (1979).

Three-dimensional cultures

Rat tail collagen gels were prepared according to Montesano *et al.* (1991b). Briefly, 8 volumes of a 2 mg/ml collagen solution were melted at 4°C to one volume of 10xMEM and one volume of 22.2 g/l sodium bicarbonate. We performed either cocultures with epithelial cells and MRC-5 fibroblasts in a way that reproduces the *in vivo* situation of epithelial-mesenchymal interactions, or control cultures of epithelial cells alone.

In the first case, 300 µl of collagen gel containing 500,000 MRC-5 cells/ml were dispensed in 16 mm wells of 24-well plates (Nunc). Then, a 10 µl-drop containing 25,000 epithelial cells was laid at the center of the collagen gel surface. In the other case, the 10 µl-drop was put down onto a fibroblast free collagen gel. The epithelial cells were allowed to attach to the substrate during about one hour in the incubator. Then, a cell free collagen gel (300 µl) was applied to cover the cell deposit. 500 µl of complete medium were added. The cultures were maintained during one week, and subsequently the gels were prepared for hybridization.

Preparation of the probes

The antisense and sense ³⁵S RNA probes for ISH and the ³²P probes for Northern blot analysis were transcribed from the following cDNA fragments: the 1.6 Kb Sac I/Kpn I fragment of the mouse *c-ets-1* cDNA (Chen *et al.*, 1990) cloned into the Bluescript KS (Stratagene); the 660 bp Pst I/Hind III fragment of the mouse *uPA* cDNA (Belin *et al.*, 1985) cloned into pSP64 and pSP65 (Promega); the 2.7 Kb Hind III/Not I fragment of the mouse collagenase I cDNA (Henriet *et al.*, 1992) cloned into the Bluescript KS; the 825 bp fragment of the human *c-ets-1* cDNA (Watson *et al.*, 1988) cloned into pSP64 and pSP65; the 600 bp Eco R1/Pst I fragment of the human *uPA* cDNA (Wernert *et al.*, 1994) cloned into the Bluescript KS.

In situ hybridization

ISH were performed as previously described (Quéva *et al.*, 1992). Briefly, after deparaffinization (for sections) and hydration, slides were treated with 1 µg/ml proteinase K (Boehringer, Mannheim) for 15 min at 37°C, post-fixed in 4% paraformaldehyde, washed in PBS, acetylated by 0.25% acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine, washed in 2xSSC and dehydrated by ethanol. Probe, in hybridization mixture, was applied to slides and hybridization was performed at 60°C for 18 h. The slides were subsequently washed several times and incubated with 20 µg/ml RNase A (type III A, Sigma) for 1h at 37°C. Final washes were performed for 15 min at 60°C in 2xSSC and for 15 min at 60°C in 0.1xSSC. Sections and cells were dehydrated in ethanol, dried and dipped in a nuclear track emulsion (Kodak NTB2). The slides were exposed for 2.5 weeks at 4°C. After development they were stained by the intercalating dye Hoechst 33258, mounted in glycerol (Dako) and observed under a double illumination using an Olympus BH2 photo-microscope with epifluorescence for Hoechst staining and a dark-field condenser for silver grain detection.

Northern blot analysis

RNAs (15 µg) were separated on 1.2% agarose/formaldehyde gels and transferred overnight onto nitrocellulose membranes (Hybond-C-extra, Amersham). Membranes were baked at 80°C for 2h and hybridized at 42°C with probes prepared by the Megaprime labeling system (Amersham).

Acknowledgments

We are extremely grateful to Dr. Pellerin for generously providing mammary explants. We also thank Drs. H. Hondermarck and S. Flament for critical reviews of the manuscript, Dr. R. Montesano for his valuable help in three dimensional reconstitutions, members of the "In situ" group of URA 1160 for their technical help and discussion, and Dr. D. Stéhelin for taking an interest in our research. This work was supported by the Region Nord-Pas de Calais, the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (EA 1033) and by the Association pour la Recherche sur le Cancer. A. Delannoy-Courdent is the recipient of a fellowship from the "Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche".

References

- BALLIN, M., MACKAY, A.R., HARTZLER, J.L., NASON, A., PELINA, M.D. and THORGEIRSSON, U.P. (1991). Ras levels and metalloproteinase activity in normal versus neoplastic rat mammary tissues. *Clin. Exp. Metastasis*. 9: 179-189.
- BASSET, P., BELLOCQ, J.P., WOLF, C., STOLL, I., HUTIN, P., LIMACHER, J.M., PODHAJECER, O.L., CHENARD, M.P., RIO, M.C. and CHAMBON, P. (1990). A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 34: 699-704.
- BELIN, D., VASSALI, J.D., COMBEPINE, C., GODEAU, F., NAGAMINE, Y., REICH, E., KOSHER, H.P. and DUVOISIN, R.M. (1985). Cloning, nucleotide sequencing and expressions of cDNAs encoding urokinase-type plasminogen activator. *Eur. J. Biochem.* 148: 225-232.
- BERTHON, P., PANCINO, G., DE CREMOUX, P., ROSETO, A., GESPACH, C. and CALVO, F. (1992) Characterization of normal breast epithelial cells in primary cultures: differentiation and growth factor receptors studies. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 28A: 716-724.

- BOLON, I., GOUYER, V., DEVOUASSOUX, M., VANDENBUNDER, B., WERNERT, N., MORO, D., BRAMBILLA, C. and BRAMBILLA, E. (1995). Expression of c-ets-1, collagenase 1, and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas. *Am. J. Pathol.* **147**: 1298-1310.
- BOSSELUT, R., DUVAL, J.F., GÉGONNE, A., BAILLY, M., HÉMAR, A., BRADY, J., and GHYSDAEL, J. (1990). The product of c-ets-1 proto-oncogene and the related c-ets-1 protein act as transcriptional activators of the long terminal repeat of human T cell leukemia virus HTLV-1. *EMBO J.* **9**: 3315-3322.
- CARMELET, P., SCHOONJANS, L., KIECKENS, L., REAM, B., DEGEN, J., BRONSON, R., DE VOS, R., VAN DEN OORD, J.J., COLLEN, D. and MULLIGAN, R.C. (1994). Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* **368**: 419-424.
- CHEN, J.H. (1990). Cloning and sequencing of mouse c-ets-1 cDNA in baculovirus expression system. *Oncogene Res.* **5**: 277-285.
- CHIRGWIN, J.M., PRZYBYLA, A.E., MACDONALD, R.J. and RUTTER, W. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**: 5294-5299.
- FUNAHASHI, T., SHIMAMURA, M., KOCHA, T., FUKUDA, T. and AOYAGI, T. (1994). Proportionality of protease activities in malignant cells to their metastatic potentials. *Biol. Pharmacol. Bull.* **17**: 1118-1120.
- GILLES, F., RAES, M.B., STÉHELIN, D., VANDENBUNDER, B. and FAFEUR, V. (1996). The c-ets-1 proto-oncogene is a new early-response gene differentially regulated by cytokines and growth factors in human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **222**: 370-378.
- GRÉVIN, D., CHEN, J.H., RAES, M.B., STÉHELIN, D., VANDENBUNDER, B. and DESBIENS, X. (1993). Involvement of the proto-oncogene c-ets-1 and the urokinase plasminogen activator during mouse implantation and placentation. *Int. J. Dev. Biol.* **37**: 519-529.
- GUMBINER, B.M. (1992). Epithelial morphogenesis. *Cell* **69**: 385-387.
- GUNTHER, C.V., NYE, J.A., BRYNER, R.S. and GRAVES, B.J. (1990). Sequence-specific DNA binding of the proto-oncoprotein Est-1 define a transcriptional activator sequence within the long terminal repeat of the Moloney murine sarcoma virus. *Genes Dev.* **4**: 667-679.
- GUTMAN, A. and WASYLK, C. (1990). The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J.* **9**: 2241-2246.
- HE, C., WILHEM, S.M., PENTLAND, A.P., MARMER, B.L., GRANT, G.A., EISEN, A.Z. and GOLDBERG, G.I. (1989). Tissue cooperation in proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2632-2636.
- HEARING, J.V., LAW, L.W., CORTI, A., APPELLA, E. and BLASI, F. (1988). Modulation of metastatic potential by cell surface urokinase of murine melanoma cells. *Cancer Res.* **48**: 1270-1278.
- HENRIET, P., ROUSSEAU, G.G. and EECKOUT, Y. (1992). Cloning and sequencing of mouse collagenase cDNA. Divergence of mouse and rat collagenase from the other mammalian collagenases. *FEBS Lett.* **310**: 175-178.
- HEUBERGER, B., FIZTKA, I., WASNER, G. and KRATOCHWIL, K. (1982). Induction of androgen receptor formation by epithelium-mesenchyme interaction in embryonic mouse mammary gland. *Dev. Biol.* **79**: 2957-2961.
- HO, I.C., BHAT, N.K., GOTTSCHALK, L.R., LINDSTEN T., THOMPSON, C.B., PAPAS, T.S. and LEIDEN, J.M. (1990). Sequence specific binding of human c-ets-1 to T cell receptor α gene enhancer. *Science* **250**: 814-818.
- JANKUN, J., MERRICK, H.W. and GOLDBLATT, P.J. (1993). Expression and localization of elements of the plasminogen activator system in benign breast disease and breast cancers. *J. Cell. Biochem.* **53**: 135-144.
- KAYA, M., YOSHIDA, K., HIGASHINO, F., MITAKA, T., ISHII, S. and FUJINAGA, K. (1996). A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells. *Oncogene* **12**: 221-227.
- LEFEBVRE, O., RÉGNIER, C., CHENARD, M.P., WENDLING, C., CHAMBON, P., BASSET, P. and RIO, M.C. (1995). Developmental expression of mouse stromelysin-3 mRNA. *Development* **121**: 947-955.
- LEPRINCE, D., GÉGONNE, A., COLL, J., DE TAISNE, C., SCHNEEBERGER, A., LAGROU, C. and STÉHELIN, D. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukemia virus E-26. *Nature* **306**: 395-397.
- MATTOT, V., RAES, M.B., HENRIET, P., EECKHOUT Y., STÉHELIN, D., VANDENBUNDER, B. and DESBIENS, X. (1995). Expression of interstitial collagenase is restricted to skeletal tissue during mouse embryogenesis. *J. Cell Sci.* **108**: 529-535.
- MIGNATTI, P., ROBBINS, E. and RIFKIN, D.B. (1986). Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. *Cell* **47**: 487-498.
- MONTESANO, R., MATSUMOTO, K., NAKAMURA, T., and ORCI, L. (1991a). Identification of a fibroblast derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* **67**: 901-908.
- MONTESANO, R., SCHALLER, G., and ORCI, L. (1991b). Induction of epithelial tubular morphogenesis *in vitro* by fibroblast-derived soluble factors. *Cell* **66**: 697-711.
- MOSCATELLI, D., PRESTA, M. and RIFKIN, D.B. (1986). Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis and migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 2091-2095.
- NOËL, A.C., POLETTE, M., LEWALLE, J.M., MUNAUT, C., EMONARD, H.P., BIREMBAUT, P. and FOIDART, J.M. (1994). Coordinate enhancement of gelatinase A mRNA and activity levels in human fibroblasts in response to breast adenocarcinoma cells. *Int. J. Cancer* **57**: 331-336.
- NUNN, M.F., SEEBURG, P.H., MOSCOVI, C. and DUESBERG, P.H. (1983). Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* **306**: 391-395.
- OSSOWSKI, L., BIEGEL, D. and REICH, E. (1979). Mammary plasminogen activator: correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue. *Cell* **16**: 929-940.
- PARANJPE, M., ENGEL, L., YOUNG, N. and LIOTTA, L.A. (1980). Activation of human breast carcinoma collagenase through plasminogen activator. *Life Sci.* **26**: 1223-1231.
- PARDANAUD, L. and DIETERLEN-LIÈVRE, F. (1993). Expression of c-ets-1 in early chick embryo mesoderm: relationship to the hemangioblastic lineage. *Cell Adhesion Commun.* **1**: 151-160.
- POLETTE, M., CLAVEL, C., COCKETT, M., GIROD DE BENTZAMM, S., MURPHY, S. and BIREMBAUT, P. (1993). Detection and localisation of mRNA encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in human breast pathology. *Invas. Metast.* **13**: 31-37.
- PYKE, C., KRISTENSEN, P., RALFKIAER, E., GRONDAHL-HANSEN, J., ERIKSEN, J., BLASI, F. and DANO, K. (1991). Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas. *Am. J. Pathol.* **138**: 1059-1067.
- QUÉVA, C., NESS, S.A., GRÄSSER, F.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.
- QUÉVA, C., LEPRINCE, D., STÉHELIN, D. and VANDENBUNDER, B. (1993). p54c-ets-1 and p68c-ets-1 the two transcription factors encoded by the c-ets-1 locus are differentially expressed during the development of the chick embryo. *Oncogene* **8**: 2511-2520.
- RÉVILLION, F., VANDEWALLE, B., HORNEZ, L. and LEFÈBVRE, J. (1993). Influence of cAMP on E-cadherin expression and cell surface heparan sulfate proteoglycan synthesis in human breast cancer cells. *Anticancer Res.* **13**: 1625-1630.
- RORTH, P., NERLOV, C., BLASI, F. and JONHENSEN M. (1990). Transcription factor PEA3 participates in the induction of urokinase plasminogen activator transcription in murine keratinocytes stimulated with epidermal growth factor or phorbol-ester. *Nucleic Acids Res.* **18**: 5009-5017.
- SAPPINO, A-P., HUARTE, J., BELIN, D. and VASSALI, J-D. (1989). Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. *J. Cell Biol.* **109**: 2471-2479.
- STACEY, K.J., FOWLES, L.S., COLMAN, M.S., OSTROWSKI, M.C. and HUME, D.A. (1995). Regulation of urokinase-type plasminogen activator gene transcription by Macrophage Colony Stimulating Factor. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 6: 3430-3441.
- STEPHENS, R.W., PÖLLÄNEN, J., TAPIOVAARA, H., LEUNG, K.C., SIM, P.S., SALONEN, E.M., RONNE, E., BEHRENDT, N., DANO, K. and VAHERI, A. (1989). Activation of pro-urokinase and plasminogen on human sarcoma cells: a proteolytic system with surface bound reactants. *J. Cell Biol.* **108**: 1987-1995.
- SYMPSON, C.J., TALHOUK, R.S., ALEXANDER, C.M., CHIN, J.R., CLIFT, S.M., BISSEL, M.J. and WERB, Z. (1994). Target expression of stromelysin-1 in

- mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue specific gene expression. *J. Cell Biol.* 125: 681-693.
- VANDENBUNDER, B., PARDANAUD, L., JAFFREDO, T., MIRABEL, M.A. and STÉHELIN, D. (1989). Complementary patterns of expression of c-ets-1, c-myc and c-myc in the blood forming system of the chick embryo. *Development* 107: 265-274.
- VANDENBUNDER, B., QUÉVA, C., DESBIENS, X., WERNERT, N. and STÉHELIN, D. (1995). Expression of the transcription factor c-ets-1 correlates with the occurrence of invasive processes during normal and pathological development. *Invas. Metast.* 14: 198-209.
- VLEMINCKX, K., VAKAET, L. Jr., MAREEL, M., FIERS, W. and VAN ROY, F. (1991). Genetic manipulation of E-Cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66: 107-119.
- WASYLYK, C., GUTMAN, A., NICHOLSON, R. and WASYLYK, B. (1991). The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same element as several non-nuclear oncoproteins. *EMBO J.* 10: 1127-1134.
- WASYLYK, B., WASYLYK, C., FLORES, P., BEGUE, A., LEPRINCE, D. and D. STEHELIN, D. (1990). The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* 346: 191-193.
- WATSON, D.K., MACWILLIAMS, M.J., LAPIS, P., LAUTENBERGER, J.A., SCHWEINFEST, C.W. and PAPAS, T.S. (1988). Mammalian ets-1 and ets-2 genes encode highly conserved proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7862-7866.
- WERNERT, N., GILLES, F., FAFEUR, V., BOUALI, F., RAES, M.B., PYKE, C., DUPRESSOIR, T., SEITZ, G., VANDENBUNDER, B. and STÉHELIN, D. (1994). Stromal expression of c-ets-1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res.* 54: 5683-5688.
- WERNERT, N., RAES, M.B., LASSALLE, B., DEHOUCQ, M.P., GOSSELIN, B., VANDENBUNDER, B. and STÉHELIN, D. (1992). C-ets-1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans. *Am. J. Pathol.* 138: 111-117.
- WOLF, C., LEFEBVRE, O., ROUYER, N., CHENARD, M.P., BELLOCQ, J.P., RIO, M.C., CHAMBON, P. and BASSET, P. (1994). Protéases d'origine stromale et progression tumorale. *Med. Sci.* 10: 507-515.

Received: July 1996

Accepted for publication: September 1996

ECLAIRAGES RECENTS

Nous avons utilisé lors de nos reconstitutions *in vitro* du milieu conditionné par les fibroblastes, inducteur de tubulogénèse, de dispersion et d'essaimage. Ce milieu contient un ensemble de facteurs dont la combinaison aboutit à une stimulation de la migration et de l'invasion, phénomènes associés à l'augmentation d'expression de *c-ets-1* et de l'*uPA*. Plusieurs travaux ont permis de préciser la cascade qui relie les signaux émis par des facteurs motogènes et morphogènes à l'expression de *c-ets-1* et de l'*uPA*.

L'effet du FGF-2 sur l'induction de l'*uPA* a été analysé par Besser et al. (1995) dans des fibroblastes NIH-3T3. Les résultats obtenus montrent que le site PEA-3/ AP-1 présent dans le promoteur de l'*uPA* (PEA3 étant un site EBS particulier) est impliqué dans l'induction de ce gène, et que sa transcription passe par une voie de transduction dépendant de Ras impliquant Raf-1, Mek, Erk-2 et Jun D.

Des travaux récents indiquent que le récepteur à l'HGF/SF, c-Met, activé constitutivement, stimule la transcription de l'*uPA* via un signal de transduction impliquant le système SOS/ Ras et les ERK kinases (Besser et al., 1997). Ces auteurs ont pu mettre en évidence le rôle important de la liaison du récepteur à GRB2 dans l'induction de l'*uPA* de même que l'implication de la kinase PI 3. Ceci suggère que les interactions des différentes molécules de transduction du signal avec le récepteur sont essentielles pour l'induction optimale de l'*uPA*. Fafeur et al. (1997) ont pu mettre en évidence le rôle de Ets-1 comme molécule effectrice de la voie de transduction de Ras induite par l'HGF/SF dans les cellules MDCK. En effet, l'HGF/SF stimule l'expression de *c-ets-1* et de l'*uPA* dont le promoteur peut être régulé par ce facteur à travers la cascade Ras et la protéine Ets-1.

Dans cet article nous avons donc détecté pour la première fois l'expression de *c-ets-1* dans les cellules épithéliales mammaires en cours de migration et avons montré que la localisation de l'expression de l'*uPA* correspond à celle de *c-ets-1*. L'expression de ces deux gènes induite dans les cellules normales uniquement au cours de leur tubulogénèse est constitutivement activée dans les cellules cancéreuses lors de leur dispersion. Il apparaît alors que la régulation de l'*uPA* constitue un élément de contrôle de la migration.

Récemment, de multiples stratégies ont été employées pour réduire migration et invasion cellulaires en inhibant l'action de l'uPA. Le récepteur de l'uPA (uPA-R) constitue une cible de ces stratégies. Des cellules de glioblastomes humains transfectées par une portion de l'ARNm de l'*uPA-R* en orientation antisens présentent à leur surface un nombre de récepteurs réduit par rapport aux cellules contrôles (Go et al., 1997). Ces auteurs montrent que, en culture organotypique, l'invasion de portions de cerveau de rats par ces cellules est réduite. De plus, ces cellules injectées dans des cerveaux de souris nude ne forment pas de tumeur contrairement à leurs équivalentes sauvages.

Le « knockout » des gènes impliqués dans le système uPA est également une voie de recherche importante. Chez des souris uPA *-/-* les phénomènes d'invasion tumorale locale ainsi que la progression de mélanomes malins sont réduits (Shapiro et al., 1996). Chez des souris plasminogène *-/-* la migration des kératinocytes lors de la cicatrisation est réduite en raison d'une accumulation de fibrine qui n'a pas pu être dégradée (Romer et al., 1996 ; Bugge et al., 1996).

Nos travaux ultérieurs ont visé quant à eux la régulation transcriptionnelle de l'*uPA*.

DEUXIEME PARTIE :

L'expression constitutive d'un dominant négatif de Ets-1 dans les cellules épithéliales mammaires réduit la tubulogenèse et la dispersion en empêchant l'expression et l'activité de l'uPA

A. COURDENT-DELANNOY et al. Soumis à Journal of Cell Science

CONTEXTE

Nous avons pu mettre en évidence dans l'article précédent la co-expression de *c-ets-1* et de l'*uPA* dans des cellules induites à migrer lors de la tubulogenèse normale, ou lors de l'essaimage cancéreux. Mais, des corrélations spatio-temporelles ne suffisent pas à prouver que le facteur de transcription transactive effectivement le gène de l'*uPA* en liaison directe avec ce phénomène physique précis que constitue la migration cellulaire. De plus, l'activité supposée de l'*uPA*, protéase initiant une cascade protéolytique, n'a pas été détectée dans ce travail, et, par conséquent, n'a pas pu attester de l'implication de cette protéase dans le processus migratoire.

Il s'agissait alors de démontrer à la fois le lien effectif entre *c-ets-1* et l'*uPA*, et le rôle de ces gènes dans les deux types de processus invasifs, normaux et cancéreux. Nous avons à cette fin, tenté d'empêcher l'action du facteur de transcription grâce à un mutant dominant négatif de *c-ets-1* appelé Ets1-DB. Des études précédentes ont montré que des mutants dominant négatifs de PU.1, Ets-1 et Ets-2 peuvent entraîner la réversion du phénotype de fibroblastes transformés par Ras (Wasylyk et al., 1994). Nous avons évalué les effets du Ets1-DB sur l'expression et l'activité de l'*uPA* ainsi que sur la migration, l'invasion, la morphogenèse et l'essaimage. Parallèlement, nous avons comparé les effets de ce dominant négatif se situant en amont du gène cible aux effets provoqués par un inhibiteur protéasique agissant en aval de la cascade.

RESUME

Les cellules épithéliales mammaires normales ou cancéreuses pendant les phases d'invasion co-expriment le facteur de transcription *c-ets-1* et l'*uPA*, une sérine protéase. Nous avons utilisé un mutant dominant négatif de *c-ets-1* dans le but de démontrer une relation causale entre la capacité invasive et l'activation de facteurs de transcription Ets *via* l'activation de l'*uPA*. Dans cette optique, des cellules épithéliales mammaires murines issues de tissus normaux (NMuMG) ou cancéreux (MMT) ont été infectées par un construit viral comportant la séquence de liaison à l'ADN du gène *c-ets-1* (Ets1-DB). Le virus produit ainsi un dominant négatif capable de se lier aux promoteurs des gènes dotés de sites EBS (Ets Binding Site). Ce dominant négatif peut alors entrer en compétition avec les protéines Ets. Nous avons observé dans les NMuMG et les MMT exprimant la protéine Ets1-DB une inhibition de l'activation du promoteur de l'*uPA*, une chute du niveau de protéine et une décroissance de l'activité uPA. Nous nous sommes alors intéressés aux effets biologiques de ce dominant négatif et avons montré une réduction de la capacité de migration et de l'aptitude à l'invasion des cellules exprimant la protéine Ets1-DB. De plus, lors de tests de morphogénèse, nous avons pu observer que les NMuMG infectées ne sont plus capables de former des tubes et que la dispersion des MMT infectées est réduite. De façon à préciser l'implication de l'*uPA* dans ces effets, des tests de morphogénèse ont aussi été réalisés avec des cellules de type sauvage en présence d'aprotinine, inhibiteur de sérine protéase. Ces tests aboutissent également à l'inhibition de l'effet morphogénétique. Des hybridations *in situ* ont révélé que l'inhibition de la morphogénèse et de la dispersion est concomitante de la baisse d'expression de l'*uPA*. L'inactivation des facteurs de transcription Ets apparaît donc importante dans le contrôle de la tubulogénèse normale et la limitation des processus d'invasion et de métastase.

Constitutive expression of a dominant negative mutant of the c-Ets1 transcription factor in mammary epithelial cells, decreases uPA proteolytic activity and cell motility, and impairs normal tubulogenesis and cancerous scattering

Delannoy-Courdent, A.*, Mattot, V.§, Fafeur, V.§, Fauquette, W.*, Pollet, I.*, Calmels, T.§, Vercamer, C.§, Boilly, B.*, Vandebunder, B.§ and Desbiens, X.*¹

* Centre de Biologie Cellulaire, Unité Dynamique des Cellules Embryonnaires et Cancéreuses, Bâtiment SN 3, Université des Sciences et Technologies de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

§ EP560 CNRS- Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, 59021 Lille Cédex, France.

¹ Corresponding author:

Tel : 33 03 20 43 45 82

Fax : 33 03 20 43 40 38

e-mail : xavier.desbiens@univ-lille1.fr

Short title : Ets transcription factors and cell motility

Key words : mammary gland, ets1, transcription factor, uPA, motility, invasion, morphogenesis

ABSTRACT

Cell migration and invasion play a crucial role during normal and pathological development. Little is known of the transcription factors that control gene expression during these processes. In the present study, we investigated the effect of a dominant negative mutant of the Ets1 transcription factor (Ets1-DB) on the functional properties of two mammary epithelial cell lines, NMuMG and MMT cell lines, issued from normal and cancerous mouse mammary tissues, respectively. We found that stable expression of the Ets1-DB mutant inhibited the expression and activity of a potential target gene of Ets1, the urokinase type-plasminogen activator (uPA), a key serine proteinase in the proteolytic cascade leading to the degradation of the extra-cellular matrix. In two dimensional cultures, expression of the Ets1-DB mutant resulted in a decrease of cell migration and invasion in both cell lines. In three dimensional collagen gels, NMuMG cells underwent tubular morphogenesis, but not MMT cells, which rather developed as scattered structures. The Ets1-DB mutant impaired the capacity of NMuMG cells to form tubules and reduced the ability of MMT cells to invade the gels. Similar inhibition of cell migration, invasion and morphogenesis were observed in non-infected NMuMG and MMT cell lines treated with aprotinin, a serine proteinase inhibitor. These data demonstrate that a dominant negative mutant of c-Ets1 can reduce uPA activity and cell motility, leading to the impairment of normal tubular morphogenesis in NMuMG cells and of cancerous scattering in MMT cells.

INTRODUCTION

Epithelial cells have the potential to develop motile and invasive properties in a transient or more persistent manner. These cell properties play a crucial role during early development and organogenesis or during pathological development and metastasis. Cell migration and invasion involve modifications of the architecture of the cells, changes in cell adhesion and remodeling of the extracellular matrix, which in turn can affect cell behaviour. These events require the coordinate expression of several sets of genes (see Jiang et al., 1994). It is of major importance to identify the molecular actors mediating the transcriptional regulation of these genes.

The proto-oncogene c-ets1 is the cellular progenitor of the viral oncogene v-ets and the founder of the Ets transcription factor family. These proteins share a highly conserved 83 amino acids domain, the DNA binding domain, which recognizes specific nucleotide sequences with a GGAA/T core (see Wasyluk et al., 1993). Analysis of c-ets1 expression in developing embryos revealed a broad pattern of expression, which suggests that this gene may serve multiple functions. Of particular interest, expression of c-ets1 is mainly observed in situations involving extensive cell migration and tissue remodeling. Expression of c-ets1 is detected at the very early stage of gastrulation in migrating mesodermal cells (Quéva et al., 1993). At later stages, c-ets1 mRNAs are found in emigrating neural crest cells and in dissociating somites corresponding to epithelial-mesenchymal transitions (Fafeur et al., 1997) and in endothelial cells during angiogenesis, the formation of new blood vessels (Vandenbunder et al., 1989, Pardanaud and Dieterlin-Lièvre, 1993). During the mammary gland development, transcripts for c-ets1 are first detected in the mesenchymal component at the onset of primary epithelial bud formation. Later, c-ets1 transcripts are detected in the epithelial component at the invading extremities of epithelial ducts (Delannoy-Courdent et al., 1996). Similarly, c-ets1 expression correlates with invasive processes during tumorigenesis; c-ets1 transcripts are detected in stromal cells surrounding invasive tumor, as well as in endothelial cells of the new blood vessels neighbouring the tumour (Wernert et al., 1992; Wernert et al., 1994). These data demonstrate that expression of c-ets1 is detected in various situations involving cell migration during normal or pathological development.

Cell migration through the extra-cellular environment is facilitated by the proteolytic degradation of extra-cellular matrix components. Plasminogen activators (PAs) play a key role in this degradation process by their ability to induce a cascade of proteolytic events. Indeed, PAs are serine proteases that convert plasminogen into plasmin, which in turn activate several proteases capable to degrade extra-cellular matrix components (see Murphy et al., 1992). Both urokinase-type and tissue-type PAs (tPA and uPA, respectively) have been identified; whereas tPA is thought to be predominantly involved in vascular fibrinolysis, uPA is considered to participate in the extra-cellular proteolysis accompanying tissue remodeling and cellular invasion (see Schmitt et al., 1997). During mouse embryogenesis, uPA expression is detected in the maternal decidua during implantation and placentation (Grevin et al., 1993), but is not detected in the embryo proper until E15.5 at the onset of organogenesis (Grevin et al., 1993; Sappino et al., 1991). In the normal mammary gland, the uPA gene is transcriptionally regulated both during embryogenesis (Delannoy-Courdent et al., 1996) and during the succession of lactation and involution stages occurring in female adult life (Busso et al., 1989; Ossowski et al., 1979). It appears that overexpression of uPA or of uPA-receptor in mammary cancer cells correlates with increased invasiveness in vitro or metastatic ability in rats (Holst-Hansen et al., 1996; Xing and Rabbani, 1996).

Several evidences indicate that Ets transcription factors can regulate the transcription of proteinase genes, including the uPA gene. Functional Ets binding sites have been identified in the promoters or enhancers of various genes encoding extra-cellular proteinases, such as uPA (Rorth et al., 1990), stromelysin 1 (Wasylyk et al., 1991), collagenase I (Gutman and Wasylyk, 1990) and 92 KDa gelatinase B (Higashino et al., 1995). Ets1 can transactivate promoters of these proteinases in various cell types, including in fibroblasts and in epithelial cells (Fafeur et al., 1997; Stacey et al., 1995). In addition, co-expression of c-ets1 and proteinases, such as uPA, collagenase I and/or stromelysin 1, were detected during normal (Grevin et al., 1993) or pathological (Bolon et al., 1995; Wernert et al., 1994) development. We previously demonstrated that during mammary gland morphogenesis in vivo, a preferential expression of c-ets1 is detected in the epithelial component at the invading extremities of epithelial ducts, and correlates with an increased expression of uPA (Delannoy-Courdent et al.,

1996). In addition, we demonstrated co-expression of c-ets1 and uPA mRNAs in three dimensional cultures of human mammary epithelial cells, during tubulogenesis of normal cells and invasion of cancerous cells (Delannoy-Courdent et al., 1996).

To investigate the involvement of Ets1 in regulating the functional properties of mammary epithelial cells, in particular the ability of Ets1 transcription factor to regulate uPA expression and activity, we characterized mammary epithelial cells expressing a trans-dominant negative mutant of Ets1. To this purpose, NMuMG and MMT epithelial cell lines issued from normal and tumoral mouse mammary tissues, respectively, were infected by a retrovirus encoding the DNA binding domain of Ets1 (Ets1-DB). In these cell lines, we examined expression and activity of uPA and we compared their motile, invasive and morphogenetic properties. In parallel, we investigated in non infected epithelial cells, the effect of aprotinin, a serine protease inhibitor, in order to evaluate the contribution of the uPA proteolytic system to the functional properties of these cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell types and culture conditions

The MMT epithelial cell line, established from mouse mammary tumour (ATCC), was routinely cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) containing antibiotics, 4.5 g/l glucose, 1% non essential amino acids and 10% fetal calf serum (FCS, Eurobio). The NMuMG epithelial cell line, derived from normal mouse mammary glandular tissue (ATCC), was cultured in the previous medium supplemented with 2 µg/ml insulin (Endopancrin). Non-infected cells, i. e. wild-type cells, will be referred to as WT MMT cells and WT NMuMG cells.

Experimental assays were performed using type I collagen solutions prepared from rat tails as described by Montesano et al. (1991). For each test, cells were seeded at the appropriate density, either on plastic dishes coated for three hours with 0.5 mg/ml collagen solution for two dimensional cultures or in 1.5 mg/ml collagen gels for three dimensional cultures.

The fibroblast-conditioned medium was obtained by collecting the supernatant of sub-confluent NIH-3T3 fibroblasts grown for two days in DMEM-serum free. It was then stored at -80°C until use. Fibroblast-conditioned medium was used in two dimensional cultures to stimulate cell migration and invasion, and in three dimensional cultures to induce tubulogenesis or to enhance scattering of mammary epithelial cells, as previously demonstrated (Delannoy-Courdent et al., 1996; Montesano et al., 1991).

Inhibition of plasminogen activator activity in non infected cells was performed using aprotinin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma) a serine proteinase inhibitor. In similar experimental conditions, it has been shown to inhibit plasminogen activator activity and basal membrane degradation in the MDA-MB-231 cancerous epithelial mammary cell line (Stonelake et al., 1997).

Viral constructions and production

Virus were constructed and produced as described by Mattot et al. (1997). A schematic representation of the virus constructs is shown in figure 1. Briefly, the cDNA sequence encoding for the mouse Ets1 DNA-binding domain (Ets1-DB) and corresponding to amino acids 306-423 was obtained by PCR amplification of mouse Ets1 cDNA (Chen, 1990). The Ets1-DB sequence was cloned in front of an IRES and Neo sequence in order to translate both the Ets1-DB and neomycin-inducing resistance proteins from a single viral mRNA. A second plasmid carrying only the IRES and Neo sequences was constructed and used as control in the entire study. These Ets1-DB-IRES-Neo and IRES-Neo sequences were inserted into the genome of a MFG retroviral vector (Dranoff et al., 1993). For production of the virus, the packaging GP+E86 cell line was transfected by lipofection with these MFG retroviral vectors and the GP+E86-virus producing cell lines were then obtained following selection in the presence of 0.8 mg/ml Geneticin (Gibco). After an overnight incubation of sub-confluent cells with fresh medium, the supernatant containing viral particles were collected, filtered and used for infection. Viral titration was performed by counting the number of geneticin-resistant clones after infection and selection of NIH-3T3 cells. The titer was found to be higher than 10^6 cfu/ml in the supernatant of each virus-producing cell line.

Epithelial cell infection and characterisation

NMuMG and MMT cells (150,000 cells/ 100 mm dish) were incubated for 6 hours with 1 ml of virus-producing GP+E86 cell supernatant containing 4 µg/ml of polybrene (Aldrich). Selection started two days after, by the addition into the culture medium of 0.8 mg/ml Geneticin. After 10 days, cell colonies were pooled. The resulting infected cell lines were maintained in their respective specific media, supplemented with 0.8 mg/ml Geneticin. These infected cells are referred to as Neo MMT, DB MMT, Neo NMuMG and DB NMuMG cells.

The expression of the Ets1-DB protein was assessed by immunoprecipitation. For metabolic labelling, epithelial cells (150,000 cells/ 100 mm) were cultured for 24 hours in DMEM-10% FCS. The medium was replaced by Modified Eagle's Medium (MEM)-methionine- and cysteine- free and cells were further incubated for two hours. Then incubation was performed for three hours in MEM- methionine- and cysteine- free, containing 250 µCi / 3 ml of [35S]-methionine and -cysteine (Tran 35S-Label 1066 Ci/ mmol, ICN). At the end of the experiments, cells were lysed and processed for immunoprecipitation as described by Gilles et al. (1996). Briefly, cell extracts containing identical amounts of TCA-precipitable [35S]-labelled material were incubated in the presence of an anti-Ets1-DB rabbit polyclonal antibody (Gilles et al., 1996) and immuno-adsorbed onto protein-A-agarose beads. Proteins were then separated onto 15% SDS-polyacrylamide gels and the gels were fixed, treated with Amplify (Amersham) and exposed to Hyperfilm MP (Amersham).

Transient transfection with uPA reporter vector

Neo and DB NMuMG cells (22,000 cells/ well) and Neo and DB MMT cells (16,000 cells/ well) were seeded in 12-well dishes. The next day, the cells were transiently transfected with a uPA reporter vector (uPA-Luc, pGL99, containing a functional Ets-binding site (Stacey et al., 1995). This reporter contains a fragment of the mouse uPA promoter (-2446, -2356) linked to the proximal uPA promoter (-114, +398) and driving the luciferase reporter gene. For each well, 1µg uPA reporter vector was mixed with 10 µg lipofectamine (Gibco) in OPTI MEM (Gibco) (total volume 110 µl) and incubated for 30 minutes at room temperature. Meanwhile, the cells were washed and incubated in 445µl OPTI MEM. The DNA/ lipofectamine mixture

was added to the wells for 6 hours and cells were then incubated overnight following addition of 555 μ l of OPTI MEM-20% FCS. The following day, medium was replaced by 2 ml of fibroblast-conditioned medium for 24 hours. Cells were rinsed and lysed in reporter lysis buffer (Promega). The lysates were centrifuged (14,000 rpm for 10 minutes) and pellets were used to quantify DNA in each sample. Luciferase activities in the supernatant were measured in a Berthold Lumat LB 9501 luminometer and values obtained were normalized to the DNA content of the cell extract. Transfection efficiency was routinely of 5-10% for Neo and DB MMT cells and 10-15% for Neo and DB NMuMG cells as monitored independently by assay of β -galactosidase activity, following transfection of a pSG5-Lac Z plasmid.

Immunocytochemistry

WT, Neo and DB epithelial cells were seeded in 8-wells of collagen solutions-coated slides (Lab Tech, Nunc) at a density of 31,000 NMuMG cells/ well and 10,000 MMT cells/ well. The next day, cells were treated by fibroblast-conditioned medium for 24 hours. Cells were then fixed with methanol and stored at -20°C until use. Cells were rehydrated 5 minutes in phosphate buffer saline (PBS). Blockage and endogenous peroxydase saturation were performed by incubation with 0.3% H_2O_2 and 1.5% goat serum in PBS. Cells were rinsed 5 minutes in PBS and then incubated with an anti-uPA rabbit polyclonal antibody (Chemicon) diluted 1:100 (v/v) in PBS containing 0.5% Tween 20 (v/v) and 0.5% BSA (w/v). Slides were incubated overnight at 4°C , rinsed in PBS and incubated at room temperature for 30 minutes in goat anti-rabbit biotin-conjugated antibody (Sigma) diluted 1:20 (v/v) in PBS-0.5 % Tween 20-0.5% BSA. Cells were rinsed in PBS and incubated at room temperature for 30 minutes in extravidin peroxydase (Sigma) diluted 1:20 (v/v) in PBS-0.5% Tween-0.5% BSA. Cells were rinsed in PBS and color development was done with DAB (Sigma) according to the manufacturer's indications. Cells were counterstained with hematoxylin and slides were mounted in Xam (DBH Laboratory).

uPA activity assays

uPA activity was measured as described by Reinartz et al. (1993). Briefly, following conversion of plasminogen into plasmin by the uPA contained in cell extracts, the quantification of uPA activity was obtained by measuring the formation of a yellow precipitate resulting from the specific cleavage of a synthetic substrate, D-Val-Leu-Lys-paranitroaniline dihydrochloride (S-2251, Sigma) by the produced plasmin. Cells were seeded in 35 mm collagen-coated dishes, at a density of 90,000 cells/ for WT, Neo and DB NMuMG cells, and 60,000 cells/ for WT, Neo and DB MMT cells. The next day, the cells were treated by fibroblast-conditioned medium for 24 hours. Cells were rinsed and 750 μ l DMEM without phenol red was added, to avoid interferences with the colorimetric reaction of the test. The following day, cells were lysed on ice in 200 μ l of extraction buffer (100 mM Tris/HCl, pH 7.6; 2mM EDTA; 0.4% Triton X-100, v/v) and the cell extracts were centrifuged (14,000 rpm for 15 minutes). The pellets were used for DNA quantification and supernatants stored at -20° C until uPA activity measurement. In each well of a 96-well plate, 50 μ l of supernatant was added to 50 μ l of substrate (0.45 mM, Sigma) and 50 μ l of plasminogen (60 μ g/ml, Sigma), both diluted in 0.1 M phosphate monosodic; 10 mM EDTA; 0.01% NaN₃; 0.01% Triton X-100; pH 7.3. The plate was incubated at 37° C during 5 hours to allow reaction. Absorbance at 405 nm was measured in a microplate reader (MR 700, Dynatech).

Migration tests

WT, Neo and DB cells were seeded in collagen-coated dishes, at a density of 40,000 NMuMG cells/ 35 mm dish and 30,000 MMT cells/ 35 mm dish. After 24 hours of incubation at 37° C, 1.5 ml of fibroblast-conditioned medium and 0.75 ml of Leibovitz medium (L15; Sigma) were added. When appropriate, 200 μ g/ml of aprotinin, a serine proteinase inhibitor, was added to WT cell cultures. Each dish was placed in a humidified chamber maintained at 37° C on the stage of an inverted Olympus microscope IMT-2 fitted with a Sony-CCD-IRIS camera and a time lapse video recorder (HS-5300, Mitsubishi). A field containing 6 to 10 cells was chosen and cell migration was recorded overnight. From the time lapse video tape, the migration tract for each individual cell was determined by marking the center of the nucleus

every 30 minutes, beginning within 2 hours after addition of the conditioned medium. Migration speed was obtained by dividing the covered distance by the time of migration.

Invasion tests

These tests were performed using 12 mm Transwell chambers containing a 12 μ m pore polycarbonate membrane (Costar). The lower and upper sides of the membrane were coated for 3 hours with 0.5 mg/ml of collagen solution. Cell suspension (100,000 cells/ 0.4 ml) of each cell line (WT, Neo, DB NMuMG cells and MMT cells) was added to the upper chamber and 0.8 ml of NIH3T3-conditioned medium was added to the lower chamber. In addition, aprotinin (200 μ g/ml) was added or not to WT NMuMG and MMT cultures. The Transwell chambers were incubated for 18 hours at 37°C. Cells which did not cross the membrane were scrapped off the upper side of the membrane with a cotton swab. Cells which had migrated to the lower side were fixed in methanol at -20°C and stained with the intercalating dye, Hoechst 33258. We found by independent cell counting that after 24 hours of culture, in these experimental conditions, the proliferation rate was equivalent for each cell line. The membrane was excised from its support and mounted on glass slide with glycergel (Dako). Cells were counted using an Olympus BH2 microscope.

Three dimensional cultures in type I collagen gel

Collagen gels were prepared according to Montesano et al. (1991). Briefly, 8 volumes of a 2 mg/ml collagen solution were mixed at 4°C to one volume of 10 x MEM and one volume of 22.2 g/l sodium bicarbonate. For the low density cultures, 300 μ l of collagen gel were dispensed in 16 mm wells of a 24-well plate. After 30 minutes at 37°C, gelification was obtained and a second layer was dispensed containing 1200 cells/ 300 μ l collagen gel. After gelification, 0.5 ml of appropriate standard medium (containing 10% FCS) was added. These cultures were maintained for 5 days. The culture medium was then replaced by fibroblast-conditioned medium-5% FCS (standard medium/ fibroblast-conditioned medium, v/v) and cells were further cultured for 4 days. As indicated, some WT cultures were treated with aprotinin (200 μ g/ml) during these last 4 days.

For the high density cultures, 300 μ l of collagen gel were dispensed in 16 mm wells of a 24-well plate. Then, a 8 μ l drop containing 24,000 cells was laid onto the center of the collagen gel surface. Epithelial cells were allowed to attach to the substrate during approximately one hour at 37°C. Then, 300 μ l of the collagen gel was gently applied to cover the cells and the plate was incubated for 30 minutes at 37°C. As described, 300 μ l of either control medium-5% FCS (standard medium /serum free medium, v/v) or of conditioned medium-5 % FCS (standard medium /fibroblast-conditioned medium, v/v) was added. Cultures were further cultured for 5 days.

At the end of the experiments, both types of three dimensional cultures were stained with neutral red (0.5%, w/v), fixed at 4°C for 16 hours in PBS containing 4% paraformaldehyde, washed in PBS and dehydrated. Whole-mount pictures were taken using either a Nikon SMZ-U binocular for high density cultures or an Olympus BH 2 microscope for the low density cultures. Gels were embedded in paraffin and 7 μ m-thick sections were serially obtained. Serial sections were transferred to Superfrost/Plus slides (Kindler, Polylabo) and allowed to attach at 37°C for 5 days. The slides were stored at 4°C until their processing for histological analysis and/ or in situ hybridization, as described below.

Histological and In Situ Hybridization analysis of three dimensional cultures.

Slides were deparaffinized and rehydrated. For histological analysis, the slides were stained by nuclear red for 10 minutes and picro-indigo carmin for 10 seconds, rinsed using tap water, dehydrated and dipped in toluene. Slides were mounted with Xam (DBH Laboratory) and observed using an Olympus BH 2 photo-microscope equipped with a Nomarski lens .

In situ hybridization on slides were performed as described by Quéva et al. (1992). The antisense and sense 35S RNA probes were transcribed from the following cDNA fragments: the 1.6 Kb Sac I/KpnI fragment of mouse c-ets1 cDNA (Chen, 1990) cloned into the Bluescript KS (Stratagen); the 660 bp Pst I/Hind III fragment of mouse uPA cDNA (Belin et al., 1985) cloned into pSP64 and pSP65 (Promega). Since this c-ets1 antisense probe can hybridize the Ets1-DB sequence, this probe was not used to detect c-ets1 expression in DB cells. After development, cells were stained by Hoechst 33258, mounted in glycerol and observed under a

double illumination using an Olympus BH2 photo-microscope with epifluorescence for Hoechst staining and a dark-field condenser for silver grain detection.

RESULTS

Epithelial cell infection and expression of the Ets1-DB protein

Packaging GP+E86 cells were transfected with either the MFG DB or the MFG Neo retroviral constructs in order to produce recombinant ecotropic retroviruses. The supernatant containing viral particles of these cells were used to infect NMuMG and MMT epithelial cells (Fig. 1 A). After selection in geneticin during 10 days, the colonies were pooled and the expression of the Ets1-DB protein was determined by immunoprecipitation (Fig. 1 B). In DB NMuMG and DB MMT cells, the anti-Ets1 antibody recognized a protein migrating at 13 kDa, the expected size for the Ets1-DB protein.

The Ets1-DB mutant inhibit uPA expression and activity

Constitutive expression of the Ets1-DB protein by the infected epithelial cells, was expected to cause inhibition of transactivation of the uPA promoter, in which functional Ets-binding sites have been identified (Fafeur et al., 1997; Rorth et al., 1990; Stacey et al., 1995). We examined this possibility following transient transfection of a uPA-Luc reporter vector in the infected cell lines (Fig. 2, upper left panel). In the DB NMuMG cells, the activation of the uPA-Luc reporter was reduced to 80% compared to the Neo NMuMG cells. A 45% inhibition was found in the DB MMT cells compared to the Neo MMT cells.

We next examined whether expression of the uPA protein was modified in the DB cells (Fig. 2, lower panel). The WT and Neo NMuMG cells grew mainly as cell clusters, with few cells presenting a fusiform shape at the periphery of the cell clusters. The presence of uPA was detected by immunocytochemistry in these NMuMG cells, in particular at the periphery of the cell clusters. In contrast, the DB NMuMG cells formed less compact cell clusters, rather they appeared to spread on the substrate. These DB NMuMG cells displayed a faint uPA signal. MMT cell lines did not grow as cell clusters, rather they present a scattered homogeneous

distribution onto the substrate. The uPA protein was detected in WT and Neo MMT cells, while it was barely detectable in DB MMT cells.

In addition, uPA activity was measured in these NMuMG and MMT DB cell lines; the expression of Ets1-DB mutant induced a 2-fold decrease in uPA activity compared to their respective control cell lines (Fig. 2, upper right panel).

The Ets1-DB mutant reduce cell migration and invasion in two dimensional cultures

The migration ability of the infected cell lines was estimated following measurement of the migration speed of individual cells (Fig. 3 A). In parallel, experiments were conducted using non infected cell lines treated by 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of aprotinin, a serine proteinase inhibitor, which can inhibit the activity of uPA (Stonelake et al., 1997). The WT and Neo NMuMG cells migrated with equivalent speeds of 29 and 33 $\mu\text{m}/\text{h}$ respectively, whereas the DB NMuMG cells migrated at 12 $\mu\text{m}/\text{h}$, which represents a 60 % inhibition compared to the NMuMG control cells. Similarly, the WT NMuMG cells treated with aprotinin migrated at 14 $\mu\text{m}/\text{h}$ which corresponds to a 50 % inhibition. The WT and Neo MMT cells migrated with similar speeds of 36 and 33 $\mu\text{m}/\text{h}$, respectively. The DB MMT cells migrated at 15 $\mu\text{m}/\text{h}$ and the WT MMT cells treated by aprotinin migrated at 19 $\mu\text{m}/\text{h}$, corresponding to a 50 % and 40 % inhibition compared to the MMT control cell lines, respectively.

The invasion ability of the epithelial cell lines was estimated by measuring their ability to cross a collagen-coated membrane in Transwell chamber assays (Fig. 3 B). Invasion ability was found similar for the WT and Neo NMuMG cells. It was reduced both in the WT NMuMG cells treated by aprotinin and in the DB NMuMG cells, with approximately a 20% reduction compared to the control cells. The WT and Neo MMT cells which derive from a mammary tumor showed the same invasiveness rate, and were by two-fold more invasive than the WT and Neo NMuMG cells, which derive from normal mammary gland. The invasion ability was reduced by 80% both in the WT MMT cells treated with aprotinin and in the DB MMT cells, compared to the MMT control cells.

The Ets1-DB mutant impairs tubulogenesis and scattering in low density three dimensional cultures

The WT cells treated by aprotinin, and the DB, Neo and WT cells were cultured at low density in three dimensional collagen gels. The WT and Neo NMuMG cells underwent branching and tubular morphogenesis, with tubules showing terminal end buds at their extremities (Fig. 4 A, E, B, F, arrows) which resemble normal tubular morphogenesis occurring in the mammary gland *in vivo*. Serial sections in the WT and Neo NMuMG cultures (Fig. 4 I and J) confirmed the presence of extending tubules (Fig. 4 I, arrow head) presenting lumen (Fig. 4 J, arrows). The WT NMuMG cells treated by aprotinin and the DB NMuMG cells form more spiky and bushy masses than WT and Neo NMuMG cells (Fig. 4 C, G, D, H). Sections revealed heaps of cells from which cell alignments extended without luminal structures (Fig. 4 K, L), confirming the absence of tubular organisation.

The WT and Neo MMT cells generated bushy cell masses from which spindle-shaped cells scattered to the periphery (Fig. 5 A, E, B, F). This scattering effect was evidenced in serial sections by the presence of numerous isolated cells invading the gel, presenting a stellate configuration (Fig. 5 I, J). The WT MMT cells treated by aprotinin and the DB MMT cells form cell masses with cell alignments, forming cord-like structures (Fig. 5 C, G, D, H). Sections showed no lumen in these cord-like structures, but only cell alignments (Fig. 5 K, L).

These data demonstrate that the expression of Ets1-DB mutant or treatment with aprotinin induce similar morphotypical changes in three dimensional cultures, i. e. the inhibition of tubular morphogenesis for NMuMG cells and a reduced scattering for MMT cells.

The Ets1-DB mutant impairs tubulogenesis and scattering in high density three dimensional cultures

High density cultures in collagen gels were initiated by laying a drop containing 25,000 epithelial cells between two collagen gels. These culture conditions allows the rapid formation of a cell mass that can organize or not into an empty vesicle according to the normal or cancerous origin of the cells (Delannoy-Courdent et al., 1996). In the control medium, the WT and Neo NMuMG cultures showed identical aspects: the cell mass extended laterally between

the two gel layers, with short peaks delimitating the invasion front (Fig. 6 A, E). Sections of these gels revealed that the seeded zone reorganized into an empty vesicle delimited by two continuous cell layers (Fig. 6 C, G). In contrast, the addition of fibroblast-conditioned medium resulted in the formation of tubules budding from these layers (Fig. 6 B, F, arrows). They formed a three dimensional network infiltrating the gel and extending from the initial deposit to the periphery. Sections revealed the presence of a lumen (Fig. 6 D, arrow) or extending tubules (Fig. 6 H, arrow). The DB NMuMG cells, both in the presence or absence of fibroblast-conditioned medium, showed only short peaks at the invasion front and never develop into tubules infiltrating the gels (Fig. 6 I, J). Sections of these cultures revealed only empty vesicles (Fig. 6 K, L).

The WT and Neo MMT cells were able to migrate and invade the gel around the initial cell deposit, as a three-dimensional network, producing a network of spindle-shaped cells and showing an irregular and indented invasion front (Fig. 6 M, Q). These effects were observed both in control and fibroblast-conditioned medium (Fig. 6 M, N, Q, R). Sections revealed that in control medium, they did not organize as an empty vesicle delimited by two cell layers, as observed with NMuMG cell lines (Fig. 6, compare O, S and C, G). Rather, they form a single layer, with isolated cells scattering from the margin of this layer, corresponding to the initial seeded zone (Fig. 6 O, S). Fibroblast-conditioned medium increased the dispersion of these cells, which did not form tubules but got away from the periphery of the central area (Fig. 6 P, T). In both culture conditions, the invasion front of the DB MMT cells was more regular than the one of WT and Neo MMT cells (Fig. 6 U, V, arrow heads, and compare U, V and M, N, Q, R). Sections showed that the cells grew as a compact layer, which did not scatter (Fig. 6 W, X).

In agreement with the results obtained with the low density cultures, in high density cultures we found that the expression of the Ets1-DB mutant resulted in the impairment of the tubulogenic property of the NMuMG cells and of the scattering and invasive properties of the MMT cells.

The inhibition of tubulogenesis and scattering elicited by the Ets1-DB mutant correlates with inhibition of uPA expression

Using sections of the high density cultures, we performed *in situ* hybridization analysis, to investigate expression of c-ets1 and uPA mRNAs. In the WT and Neo NMuMG cells cultured in control medium, both c-ets1 and uPA signals were detected (Fig.7 A, D, G, J). The intensity of these signals were low compared to those detected in cells cultured in fibroblast-conditioned medium (Fig. 7 B, C; E, F, H, I, K). As described above (Fig. 6), the addition of fibroblast-conditioned medium resulted in the formation of tubules budding from the two cell layers. Co-expression of c-ets1 and uPA was detected in these tubules extending from the two cell layers (Fig. 7, B, C; E, F, H, I, K, arrows). In the DB NMuMG cells, in both control and fibroblast-conditioned medium, no uPA signal was detected (Fig. 7 L, M).

Co-expression of c-ets1 and uPA mRNAs was also observed in WT and Neo MMT cells (Fig. 8). Overall, the intensity of the signals were found to be higher in control MMT cells than in control NMuMG cells (compare Fig. 7 and 8). In control medium, isolated cells which infiltrated the surrounding gel expressed c-ets1 and uPA mRNAs (Fig. 8 A, C, E, G). The intensity of the c-ets1 and uPA signals, in cell scattering from the periphery of the seeded zone was higher in fibroblast-conditioned medium than in control medium (compare Fig. 8 B, D, F, H and A, C, E, G). As described above (Fig. 6), the DB MMT cells grew as a compact layer, both in the control and fibroblast-conditioned medium. The uPA signal was low in these cells (Fig. 8 I, J).

These data show a co-expression of c-ets1 and uPA mRNAs occurring during tubulogenesis of NMuMG cells and scattering of MMT cells. The expression of the Ets1-DB mutant in these cell lines resulted in the impairment of uPA mRNA expression, which correlated with a perturbation of their morphogenetic and/or invasive properties.

DISCUSSION

It has been postulated that the Ets1 transcription factor can play a role during cell motility and invasion. This hypothesis comes from the demonstration that expression of c-ets1 correlates with invasive processes in normal and pathological development (Vandenbunder et

al., 1995) and that Ets1 is involved in the transcriptional regulation of several genes implicated in tissue remodeling and cell migration, such as those encoding extra-cellular matrix degrading proteinases (Fafeur et al., 1997; Gutman and Wasylyk, 1990; Rorth et al., 1990; Stacey et al., 1995; Wasylyk et al., 1991). To address the question of its functional implication, we expressed a dominant negative mutant of Ets1 in cellular situations in which we could measure epithelial cell motility and invasion. The present study demonstrated that a mutant Ets1-DB protein, by its ability to inhibit the uPA proteolytic system, can impair the migrating and invasive properties of epithelial cells, leading to the impairment of the normal tubular morphogenesis and of the cancerous invasive properties of mammary epithelial cells.

Using epithelial cells cultured in collagen gels, we demonstrated a co-expression of uPA and ets1 mRNAs, which was associated with their morphogenetic and/or invasive properties. Following addition of fibroblast-conditioned medium, the NMuMG cells can undergo branching and tubular morphogenesis. These morphogenetic effects were found to be associated with co-expression of c-ets1 and uPA mRNAs. The MMT cells which scatter and invade the collagen gels both in basal and fibroblast-conditioned medium conditions, without forming tubular morphogenesis, were found to co-express c-ets1 and uPA mRNAs. These results are in agreement with our previous findings using normal and cancerous human mammary epithelial cells (Delannoy-Courdent et al., 1996).

By examining the functional consequence of the expression of the Ets1-DB mutant, we found that expression and activity of uPA was reduced both in the NMuMG and MMT cell lines. In two dimensional cultures, when we examined the whole cell population, inhibition of uPA expression or activity did not exceed 50%. Although this inhibition might reflect a partial ability of the Ets1-DB mutant to inhibit uPA expression, it is possible that the level of inhibition was underestimated in these conditions. Indeed, a drastic decrease of uPA transcripts was found in DB cells in three dimensional cultures. In these culture conditions, as mentioned above, the cells can develop invasive and morphogenetic properties associated with high levels of uPA expression.

Activation of the uPA proteolytic system has been associated with the migrating and invasive properties of several cell types. For example, addition of an anti-uPA antibody was

found to inhibit cell migration from arterial smooth muscle explants, whereas the addition of plasminogen increased this cell migration (Kenagy et al., 1996). Migration of endocardial-derived mesenchymal cells was also found to be inhibited following addition of uPA antisense oligonucleotides (McGuire and Alexander, 1993). Similarly, it was found that inhibition of uPA by synthetic inhibitors can reduce degradation of matrix components of the basement membrane by MDA-MB-231 breast cancer cells (Stonelake et al., 1997). In mouse models, injection of uPA synthetic inhibitors or of anti-uPA antibodies were found to cause inhibition of local invasion and metastasis (Alonso et al., 1996; Ossowski et al., 1991). The fact that the Ets1-DB mutant was able to decrease uPA expression and activity in mammary epithelial cells, led us to investigate their migrating and invasive properties.

The MMT and NMuMG cells expressing the Ets1-DB mutant, migrated with a lower speed than the WT and Neo cells. A similar reduction of migration speed was also obtained by treating non infected cells with aprotinin, a serine proteinase inhibitor. In addition, invasion through the collagen I - coated membrane was reduced both in the DB cells and in the aprotinin-treated WT cells. Taken together, these results demonstrated that the Ets1-DB protein can decrease cell migration and invasion, most likely by its ability to inhibit uPA expression and activity. These data are consistent with the work of Chen et al. (1997) showing that ets1 antisense oligonucleotides reduce the levels of uPA mRNAs and inhibit VEGF-induced invasiveness of endothelial cells through Matrigel-coated membranes.

In three dimensional cultures in collagen gels, expression of the Ets1-DB mutant impaired the ability of NMuMG to form tubular structures and of MMT cells to invade the gels as scattered structures. Inhibition of proteolytic activity by aprotinin in non infected cells gave similar results. These data together with the lack of expression of uPA in the same experimental culture conditions, suggest that a downregulation of the uPA proteolytic activity by the Ets1-DB protein leads to different morphogenetic properties according to the normal or tumoral origin of the cells.

The possibility that other cellular properties can be affected by expression of the Ets1-DB mutant cannot be excluded. In particular, we evidenced cellular effects which can be related to a modification of the cell adhesion properties. In two dimensional cultures, the DB NMuMG

cells appeared to spread more than the control NMuMG cells. In three dimensional cultures, histological analysis demonstrated that the DB MMT cells had an impaired ability to form scattered structures, rather in high density cultures they grow as a compact sheet, corresponding to the initial deposit of cells. This suggest that molecules involved in cell-cell and cell-matrix association are also modified in the infected NMuMG and MMT cells.

It is well known that adhesion molecules and cytoskeleton elements are involved in normal and pathological remodeling (Adams and Watt, 1993; Gille and Swerlick, 1996). Integrins are cell surface receptors that are involved in mediating interactions of the cells with the extra-cellular matrix. Decreased expression of $\alpha 2$ integrin, a collagen and laminin receptor, in mammary cells was found to be associated with increased cell motility (Keely et al., 1995). The presence of Ets binding sites in the $\alpha 2$ integrin gene promoter, suggest that Ets transcription factors can regulate expression of this gene (Donahue et al., 1994; Zutter et al., 1994). Vimentin is a cytoskeleton molecule, which belongs to the intermediate filaments and can interact with extra-cellular components via integrins (Biddle and Spandau, 1996). Invasive mammary carcinoma cells were found to express vimentin, but not non invasive cell lines (Gilles et al., 1997). In these cells, c-ets1 expression correlated with vimentin expression. These data suggest that the Ets transcription factors can regulate cellular adhesive properties. In addition, it is important to point out that the cell adhesion system can collaborate with the urokinase proteolytic system. For example, $\alpha V\beta 5$ integrin, a vitronectin receptor can mediate cell migration when the uPA/uPA-receptor activation system is induced (Yebra et al., 1996). It is therefore possible that the inhibition of the uPA proteolytic activity by the Ets1-DB mutant is related in a more complex manner with the cell adhesive properties. This hypothesis will require a more detailed study of the cellular genes modified by the Ets1-DB mutant.

It is important to address the question of the specificity of the action of the Ets1-DB mutant in competing with other Ets transcription factors. It is clear that in addition to Ets1, other members of the Ets family can play a role in cell migration and invasion. For example, in *Xenopus* embryos, transcripts of the fli and ets2 mRNAs are preferentially expressed in regions undergoing important reorganization, in particular in migrating cells (Meyer et al., 1995; Remy et al., 1996). During mouse development, three close members within the Ets family (PEA-3,

ERM and ER-81) are expressed in situations where epithelial-mesenchymal interactions occur (Chotteau-Lelievre et al., 1997). Similarly to our present results, NMuMG cells express PEA-3, ERM and ER-81 during tubular morphogenesis and MMT cells constitutively expressed these genes in three dimensional collagen gels (Chotteau-Lelièvre et al., unpublished observations). In addition, these factors can upregulate several proteinases genes (Higashino et al., 1995; Shindoh et al., 1996). The relative efficiency or specificity of these Ets transcription factors in comparison with Ets1 is difficult to establish at present. Nonetheless, these observations indicate that several members of the Ets family, distinct from c-Ets1, can be involved in migration and invasion through their proteinase target genes. Therefore it is likely that the Ets1-DB mutant does not compete only with Ets1 in migrating epithelial cells.

In conclusion, we demonstrated decreased expression and activity of the uPA serine proteinase, a potential target gene of Ets1, in mammary NMuMG and MMT epithelial cells expressing a dominant negative mutant of the Ets1 transcription factor. These effects correlated with reduced cell migration and invasion in two dimensional cultures and impairment of tubulogenesis of NMuMG and scattering of MMT cells in three dimensional cultures. Similar results were obtained when non infected epithelial cells were treated by aprotinin, a serine protease inhibitor. We propose that these biological effects are linked to the inhibition of uPA which probably leads to a lack of extra-cellular matrix degradation. This does not exclude the possibility that adhesion and cytoskeleton molecules can be affected in these morphogenetic changes. Thus, the Ets1-DB mutant demonstrate the involvement of Ets transcription factors in the control of mammary epithelial cells migration, invasion and morphogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Region Nord-Pas de Calais, the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche”, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Ligue Nationale contre le Cancer, the Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer, and the Association for International Cancer Research. A. D.-C. is the recipient of a fellowship from the “Ministère de l’Education Nationale, de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche”.

REFERENCES

- Adams, J. C., and Watt, F. M.** (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* **117**, 1183-1198.
- Alonso, D. F., Farias, E. F., Ladeda, V., Davel, L., Puricelli, L., Bal, de, Kier, Joffe, and E** (1996). Effects of synthetic urokinase inhibitors on local invasion and metastasis in a murine mammary tumor model. *Breast Cancer Res Treat* **40**, 209-223.
- Belin, D., Vassalli, J. D., Combepine, C., Godeau, F., Nagamine, Y., Reich, E., Kocher, H. P., and Duvoisin, R. M.** (1985). Cloning, nucleotide sequencing and expression of cDNAs encoding mouse urokinase-type plasminogen activator. *Eur J Biochem* **148**, 225-232.
- Biddle, D., and Spandau, D. F.** (1996). Expression of vimentin in cultured human keratinocytes is associated with cell - extracellular matrix junctions. *Arch Dermatol Res* **288**, 621-624.
- Bolon, I., Gouyer, V., Devouassoux, M., Vandebunder, B., Wernert, N., Moro, D., Brambilla, C., and Brambilla, E.** (1995). Expression of c-Ets1, collagenase 1 and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas. *Am. J. Pathol.* **147**, 1298-1310.
- Busso, N., Huarte, J., Vassalli, J. D., Sappino, A. P., and Belin, D.** (1989). Plasminogen activators in the mouse mammary gland. Decreased expression during lactation. *J Biol Chem* **264**, 7455-7457.
- Chen, J. H.** (1990). Cloning, sequencing, and expression of mouse c-Ets1 cDNA in baculovirus expression system. *Oncogene Res.* **5**, 277-285.
- Chen, Z. Q., Fisher, R. J., Riggs, C. W., Rhim, J. S., and Lautenberger, J. A.** (1997). Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-induced endothelial cell migration by ETS1 antisense oligonucleotides. *Cancer Res.* **5**, 2013-2019.
- Chotteau-Lelievre, A., Desbiens, X., Pelczar, H., Defosse, P. A., and de, L. Y.** (1997). Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development. *Oncogene* **15**, 937-952.

- Delannoy-Courdent, A., Fauquette, W., Dong, Le, B. X., Boilly, B., Vandebunder, B., and Desbiens, X. (1996).** Expression of c-Ets1 and uPA genes is associated with mammary epithelial cell tubulogenesis or neoplastic scattering. *Int J Dev Biol* **40**, 1097-1108.
- Donahue, J. P., Sugg, N., and Hawiger, J. (1994).** The integrin alpha v gene: identification and characterization of the promoter region. *Biochim Biophys Acta* **1219**, 228-232.
- Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., and Mulligan, R. C. (1993).** Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti tumor immunity. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **90**, 3539-3543.
- Fafeur, V., Tulasne, D., Queva, C., Vercamer, C., Dimster, V., Mattot, V., Stehelin, D., Desbiens, X., and Vandebunder, B. (1997).** The Ets1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter-factor stimulated MDCK epithelial cells. *Cell Growth and Differ.* **8**, 655-665.
- Gille, J., and Swerlick, R. A. (1996).** Integrins: role in cell adhesion and communication. *Ann N Y Acad Sci* **797**, 93-106.
- Gilles, C., Polette, M., Birembaut, P., Brunner, N., and Thompson, E. W. (1997).** Expression of c-Ets1 mRNA is associated with an invasive, EMT-derived phenotype in breast carcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis* **15**, 519-526.
- Gilles, F., Raes, M. B., Stehelin, D., Vandebunder, B., and Fafeur, V. (1996).** The c-Ets1 proto-oncogene is a new early-response gene differentially regulated by cytokines and growth factors in human fibroblasts. *Exp Cell Res* **222**, 370-378.
- Grevin, D., Chen, J. H., Raes, M. B., Stehelin, D., Vandebunder, B., and Desbiens, X. (1993).** Involvement of the proto-oncogene c-ets 1 and the urokinase plasminogen activator during mouse implantation and placentation;. *Int. J. Dev. Biol.* **37**, 519-529.

- Gutman, A., and Wasylyk, B.** (1990). The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *The Embo J* **9**, 2241-2246.
- Higashino, F., Yoshida, K., Noumi, T., Seiki, M., and Fujinaga, K.** (1995). Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters. *Oncogene* **10**, 1461-1463.
- Holst-Hansen, C., Johannessen, B., Hoyer, H. G., Romer, J., Ellis, V., and Brunner, N.** (1996). Urokinase-type plasminogen activation in three human breast cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Clin Exp Metastasis* **14**, 297-307.
- Jiang, W. G., Puntis, M. C., and Hallett, M. B.** (1994). Molecular and cellular basis of cancer invasion and metastasis: implications for treatment. *Br J Surg* **81**, 1576-1590.
- Keely, P. J., Fong, A. M., Zutter, M. M., and Santoro, S. A.** (1995). Alteration of collagen-dependent adhesion, motility, and morphogenesis by the expression of antisense alpha 2 integrin mRNA in mammary cells. *J Cell Sci*, 595-607.
- Kenagy, R. D., Vergel, S., Mattsson, E., Bendeck, M., Reidy, M. A., and Clowes, A. W.** (1996). The role of plasminogen, plasminogen activators, and matrix metalloproteinases in primate arterial smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**, 1373-1382.
- Mattot, V., Vercamer, C., Calmels, T., Huguet, C., Soncin, F., Fafeur, V., and Vandebunder, B.** (1997). Constitutive expression of the DNA-binding domain of Ets1 increases endothelial cell adhesion and spreading and impairs the formation of capillary-like structures on Matrigel. *submitted*.
- McGuire, P. G., and Alexander, S. M.** (1993). Inhibition of urokinase synthesis and cell surface binding alters the motile behavior of embryonic endocardial-derived mesenchymal cells in vitro. *Development* **118**, 931-939.
- Meyer, D., Stiegler, P., Hindelang, C., Mager, A. M., and Remy, P.** (1995). Whole-mount in situ hybridization reveals the expression of the Xl-Fli gene in several lineages of migrating cells in *Xenopus* embryos. *Int J Dev Biol* **39**, 909-919.

- Montesano, R., Schaller, G., and Orci, L.** (1991). Induction of epithelial tubular morphogenesis *in vitro* by fibroblast-derived soluble factors. *Cell* **66**, 697-711.
- Murphy, G., Atkinson, S., Ward, R., Gavrilovic, J., and Reynolds, J. J.** (1992). The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* **667**, 1-12.
- Ossowski, L., Biegel, D., and Reich, E.** (1979). Mammary plasminogen activator: correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue. *Cell* **16**, 929-940.
- Ossowski, L., Russo, P. H., and Wilson, E. L.** (1991). Inhibition of urokinase-type plasminogen activator by antibodies: the effect on dissemination of a human tumor in the nude mouse. *Cancer Res* **51**, 274-81.
- Pardanaud, L., and Dieterlen-Lièvre, F.** (1993). Expression of C-ETS1 in early chick embryo mesoderm : relationship to the hemangioblastic lineage. *Cell Adhesion and Communication*. **1**, 151-160.
- Quéva, C., Leprince, D., Stéhelin, D., and Vandebunder, B.** (1993). p54 c-Ets1 and p68 c-Ets1, the two transcription factors encoded by the c-Ets1 locus, are differentially expressed during the development of the chick embryo. *Oncogene* **8**, 2511-2520.
- Quéva, C., Ness, S. A., Graf, T., Vandebunder, 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.
- Reinartz, J., Batrla, R., Boukamp, P., Fusenig, N., and Kramer, M. D.** (1993). Binding and activation of plasminogen at the surface of human keratinocytes. *Exp Cell Res* **208**, 197-208.
- Remy, P., Senan, F., Meyer, D., Mager, A. M., and Hindelang, C.** (1996). Overexpression of the *Xenopus* XI-fli gene during early embryogenesis leads to anomalies in head and heart development and erythroid differentiation. *Int J Dev Biol* **40**, 577-589.

- Rorth, P., Nerlov, C., Blasi, F., and Johnsen, M.** (1990). Transcription factor PEA3 participates in the induction of urokinase plasminogen activator transcription in murine keratinocytes stimulated with epidermal growth factor or phorbol-ester. *Nucleic Acids Research* **18**, 5009-5017.
- Sappino, A. P., Huarte, J., Vassalli, J. D., and Belin, D.** (1991). Sites of synthesis of urokinase and tissue-type plasminogen activators in the murine kidney. *J.Clin.Invest.* **87**, 962-970.
- Schmitt, M., Harbeck, N., Thomssen, C., Wilhelm, O., Magdolen, V., Reuning, U., Ulm, K., Hofler, H., Janicke, F., and Graeff, H.** (1997). Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost* **78**, 285-96.
- Shindoh, M., Higashino, F., Kaya, M., Yasuda, M., Funaoka, K., Hanzawa, M., Hida, K., Kohgo, T., Amemiya, A., Yoshida, K., and Fujinaga, K.** (1996). Correlated expression of matrix metalloproteinases and ets family transcription factor E1A-F in invasive oral squamous-cell-carcinoma-derived cell lines. *Am. J. Pathol.* **148**, 693-700.
- Stacey, K. J., Fowles, L. F., Colman, M. S., Ostrowski, M. C., and Hume, D. A.** (1995). Regulation of urokinase-type plasminogen activator gene transcription by Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3430-3441.
- Stonelake, P. S., Jones, C. E., Neoptolemos, J. P., and Baker, P. R.** (1997). Proteinase inhibitors reduce basement membrane degradation by human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* **75**, 951-959.
- Vandenbunder, B., Pardanaud, L., Jaffredo, T., Mirabel, M. A., and Stehelin, D.** (1989). Complementary patterns of expression of c-ets1, c-myb and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo. *Development* **107**, 265-274.
- Vandenbunder, B., Queva, C., Desbiens, X., Wernert, N., and Stehelin, D.** (1995). Expression of the transcription factor c-Ets1 correlates with the occurrence of invasive processes during normal and pathological development. *Invasion and Metastasis* **14**, 198-209.
- Wasylyk, B., Hahn, S. L., and Giovane, A.** (1993). The Ets family of transcription factors. *Eur.J..Biochem.* **277**, 7-18.

Wasylyk, C., Gutman, A., Nicholson, R., and Wasylyk, B. (1991). c-ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *The Embo J* **10**, 1127-1134.

Wernert, N., Gilles, F., Fafeur, V., Bouali, F., Raes, M. B., Pyke, C., Dupressoir, T., Seitz, G., Vandebunder, B., and Stehelin, D. (1994). Stromal expression of c-ets1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res.* **54**, 5683-5688.

Wernert, N., Raes, M. B., Lassalle, P., Dehouck, M. P., Gosselin, B., Vandebunder, B., and Stéhelin, D. (1992). The c-ets 1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularisation and other forms of angiogenesis in man. *Am. J. Pathology* **140**, 119-127.

Xing, R. H., and Rabbani, S. A. (1996). Overexpression of urokinase receptor in breast cancer cells results in increased tumor invasion, growth and metastasis. *Int J Cancer* **67**, 423-429.

Yebra, M., Parry, G., Stromblad, S., Mackman, N., Rosenberg, S., Mueller, B. M., and Cheresh, D. A. (1996). Requirement of receptor-bound urokinase-type plasminogen activator for integrin alphavbeta5-directed cell migration. *J Biol Chem* **271**, 29393-29399.

Zutter, M. M., Santoro, S. A., Painter, A. S., Tsung, Y. L., and Gafford, A. (1994). The human alpha 2 integrin gene promoter. Identification of positive and negative regulatory elements important for cell-type and developmentally restricted gene expression. *J Biol Chem* **269**, 463-469.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Ets1-DB protein expression in infected epithelial cell lines

A. Schematic representation of the viral constructs. The 78 amino-acids Ets1-DB protein contains the DNA binding domain of Ets1 and the presumed nuclear transport signal, while the C-terminal inhibitory region of Ets1 was deleted. The cDNA encoding this mutant was cloned in front of the IRES-Neo sequences and inserted into the genome of a MFG virus (MFG-DB). The control virus was obtained from the same construction, lacking the Ets1-DB domain (MFG-Neo). +, SD and SA are the packaging, splice donor, and acceptor sites, respectively.

B. Expression of the mutant Ets1-DB protein. Expression of the protein was analysed in NMuMG and MMT cells by immunoprecipitation using wild type cells (WT), MFG-Neo (Neo) and MFG-DB (DB) infected cells. The arrow indicates the presence of the Ets1-DB protein (~13 kDa). Molecular markers are indicated on the right.

Figure 2. Effects of the Ets1-DB mutant on uPA expression and activity

Upper panel left. Transcriptional activation of the uPA-Luc reporter vector: the Neo and DB NMuMG and MMT cells were transiently transfected with the uPA-Luc reporter vector and subsequently stimulated with fibroblast-conditioned medium for 24 hours. The relative luciferase activity represents the percentage of the luciferase activity / μg DNA in the DB cells relative to the one of the Neo cells. Luciferase activity was 855 AU/ μg DNA for Neo NMuMG and 150 AU/ μg DNA for Neo MMT. The mean of three values is shown with the corresponding standard error bar.

Upper panel right. Measurement of uPA activity: Neo and DB cells were cultured on type I collagen-coated wells in fibroblasts conditioned medium for 24 hours and uPA activity was measured. The amount of DNA in the extracts, which is proportional to the number of cells, was quantified for each sample. The uPA activity is expressed as AU(405 nm)/ μg DNA. The mean of three values is shown with the corresponding standard error bar.

Lower panel. Expression of uPA protein: Cells were cultured on type I collagen-coated wells and stimulated by fibroblast-conditioned medium for 24 hours. The expression of uPA

was revealed by immunocytochemistry using an anti-uPA antibody in WT (A), Neo (B), DB (C) NMuMG cells and in WT (D), Neo (E), DB (F) MMT cells. Bar is 50 μm .

Figure 3. Effects of the ETS1-DB mutant and aprotinin on cell motility and invasion

A. The migration of the cells plated onto type I collagen-coated wells was recorded using a time lapse video, within a period of 18 hours following addition of fibroblast-conditioned medium, containing or not aprotinin. Grey bar: WT cells (WT), white bar: Neo cells (Neo), black bar: DB cells, lined bar: WT cells treated with aprotinin (Aprot). Results are the means \pm SD, of 12 individual migration speeds from two separate experiments.

B. The invasion ability of the cells were investigated by seeding the cells in the upper chamber of a Transwell chamber containing a type I collagen-coated membrane, with the lower chamber containing fibroblast-conditioned medium. Aprotinin was added or not into the culture medium of the upper chamber. After 18 hours of culture, the cells present on the under side of the membrane were fixed, colored with Hoechst 33258 and the number of cells across two membrane diameters were counted. Grey bar: WT cells (WT), white bar: Neo cells (Neo), black bar: DB cells, lined bar: WT cells treated with aprotinin (Aprot). Each value is the mean \pm SD of duplicate samples.

Figure 4. Three dimensional cultures of NMuMG cells at low density

NMuMG cells suspended in collagen gels were cultured for 5 days, then the medium was replaced by fibroblast-conditioned medium and the cells were cultured for an additional period of 4 days. At the end of the experiments, cells were colored with neutral red. Pictures of the whole-mounts were performed using two magnifications; for views A, B, C, D bar is 100 μm , for views E, F, G, H bar is 50 μm . Serial sections (I, J, K, L, bar : 25 μm) were colored with nuclear red and picro-indigo carmin and observed using a Nomarski system.

A, E, I : WT cells (WT); B, F, J : Neo cells (Neo); C, G, K: DB cells (DB); WT cells treated by aprotinin during the last 4 days: D, H, L (Ap).

Figure 5. Three dimensional cultures of MMT cells at low density

The MMT cells were grown in collagen gels as described in figure 4. For views of the whole-mounts A, B, C, D, bar is 100 μm and for views E, F, G, H bar is 50 μm . For views of serial sections I, J, K, L bar is 25 μm .

A, E, I : WT cells (WT); B, F, J : Neo cells (Neo); C, G, K: DB cells (DB); WT cells treated by aprotinin during the last 4 days: D, H, L (Ap).

Figure 6. Three dimensional cultures of NMuMG and MMT cells at high density

These cultures were initiated by laying a drop containing 25,000 epithelial cells between two collagen gels. After 5 days of culture, in the presence (conditioned medium) or absence (control medium) of fibroblast-conditioned media, cells were stained with neutral red. Experimental conditions for sections and pictures were as indicated in figure 4. For pictures of the whole-mount, bar is 195 μm . For each culture, transversal sections were performed according to the arrow drawn on picture A. Sections (C, D, G, H, K, I, O, P, S, T, W, X) were used for Nomarski views (bar is 25 μm).

A, B, C, D : WT NMuMG cells (WT); E, F, G, H : Neo NMuMG cells (Neo). I, J, K, L : DB NMuMG cells (DB); M, N, O, P : WT MMT cells (WT); Q, R, S, T : Neo MMT cells (Neo); U, V, W, X : DB MMT cells.

Figure 7. In situ hybridization of high density NMuMG three dimensional cultures

Probes were applied on the sections of the NMuMG high density collagen gels, grown in control medium or conditioned medium, shown in figure 6. Photos were taken under a double illumination with epifluorescence for Hoechst staining and a dark-field condenser for silver grain detection. Bar is 50 μm .

WT NMuMG cells (WT) were hybridized with c-ets1 (A-C) or uPA (D-F) antisense probes; Neo NMuMG cells (Neo) were hybridized with c-ets1 (G-I) or uPA (J, K) antisense probes. DB NMuMG cells (DB) were hybridized with uPA (L, M) antisense probe. B and C,

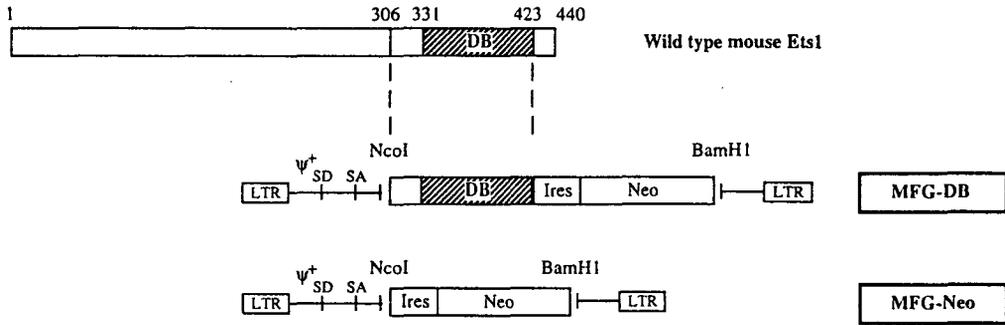
E and F, and H and I are adjacent serial sections, respectively. Control sense c-ets1 and uPA probes were applied on WT NMuMG cells grown in control medium and on WT NMuMG cells grown in conditioned medium, respectively.

Figure 8. In situ hybridization of high density MMT three dimensional cultures

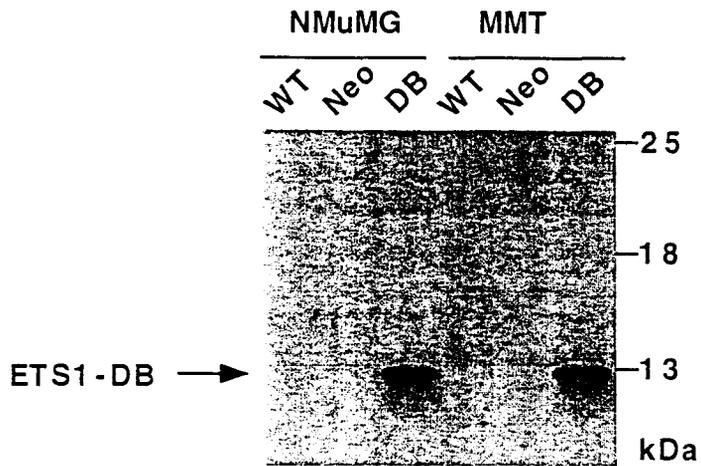
Probes were applied on the sections of the MMT high density collagen gels, grown in control medium or conditioned medium, shown in figure 6. Photos were taken as explained in figure 7. Bar is 50 μm .

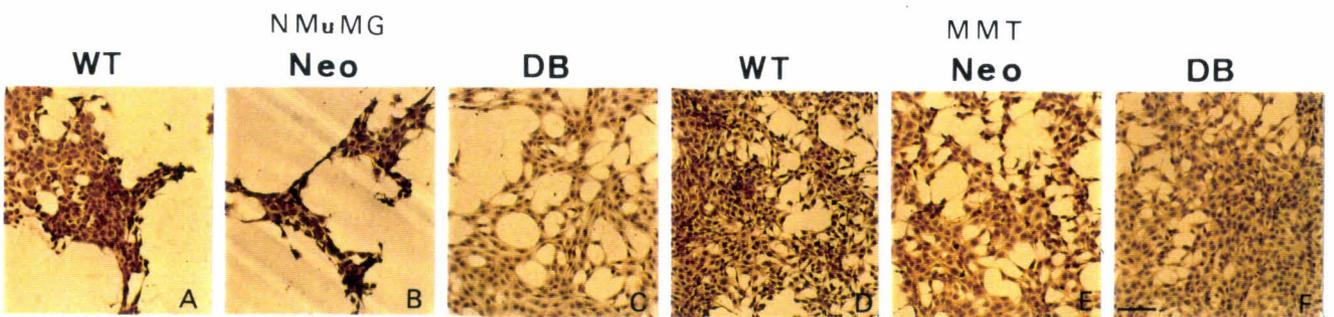
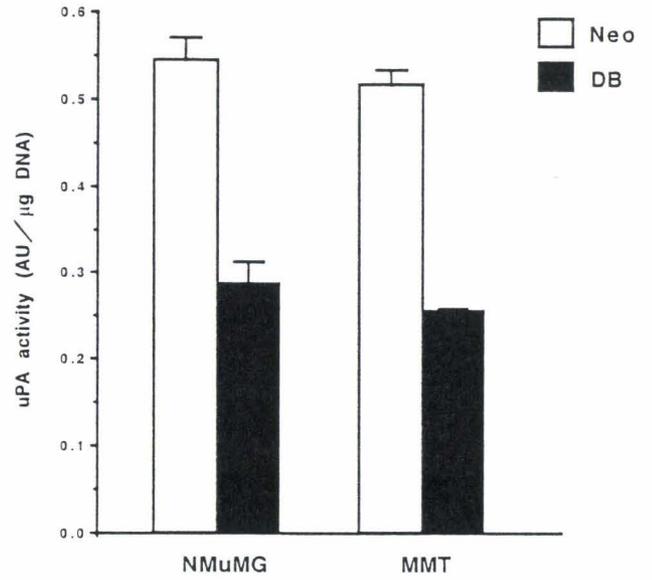
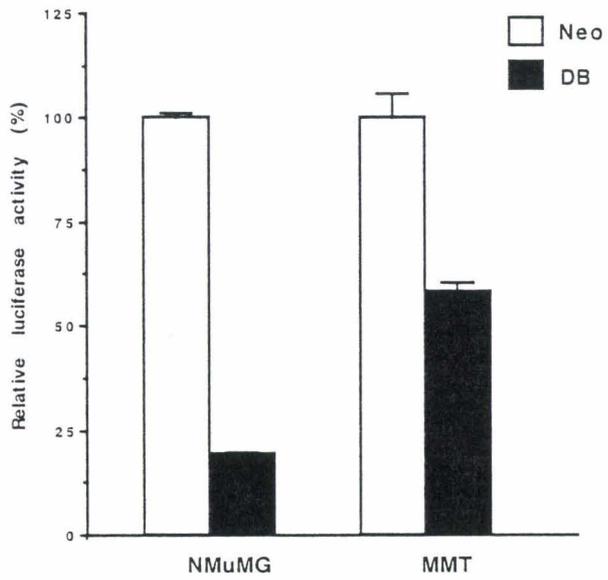
WT MMT cells (WT) were hybridized with c-ets1 (A, B) or uPA (C, D) antisense probes; Neo MMT cells (Neo) were hybridized with c-ets1 (E, F) or uPA (G, H) antisense probes. DB MMT cells (DB) were hybridized with uPA (I, J) antisense probe.

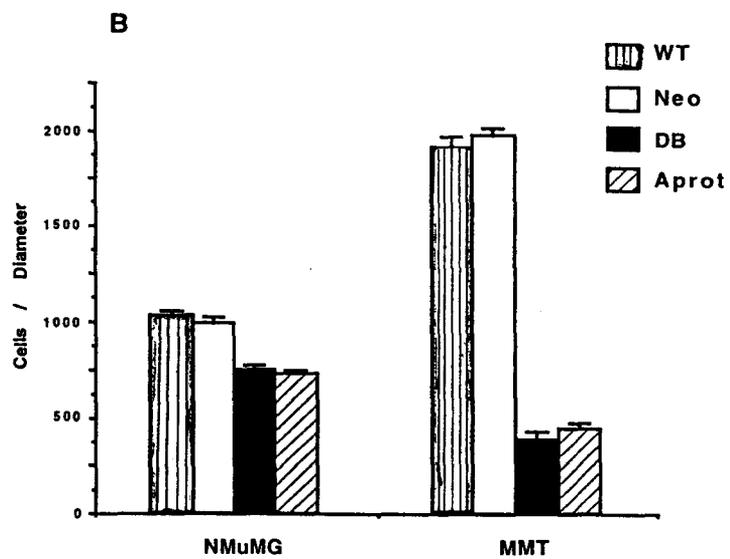
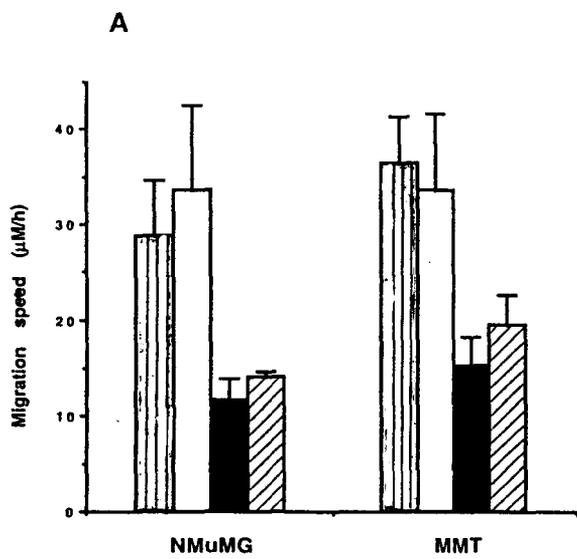
A

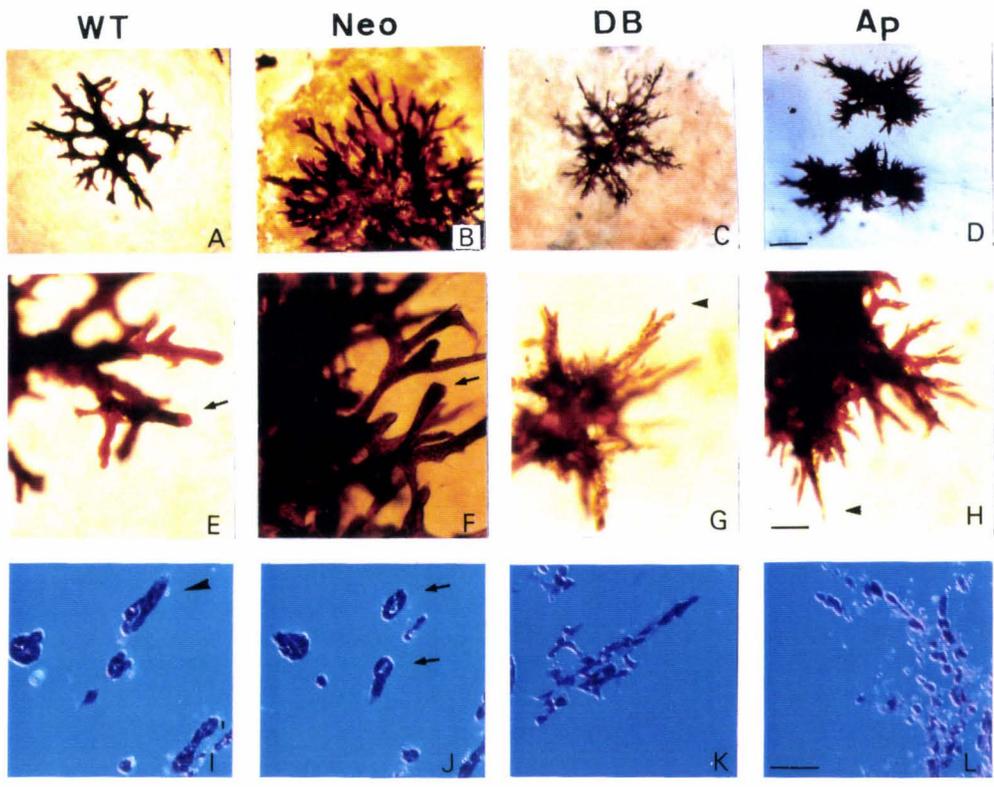


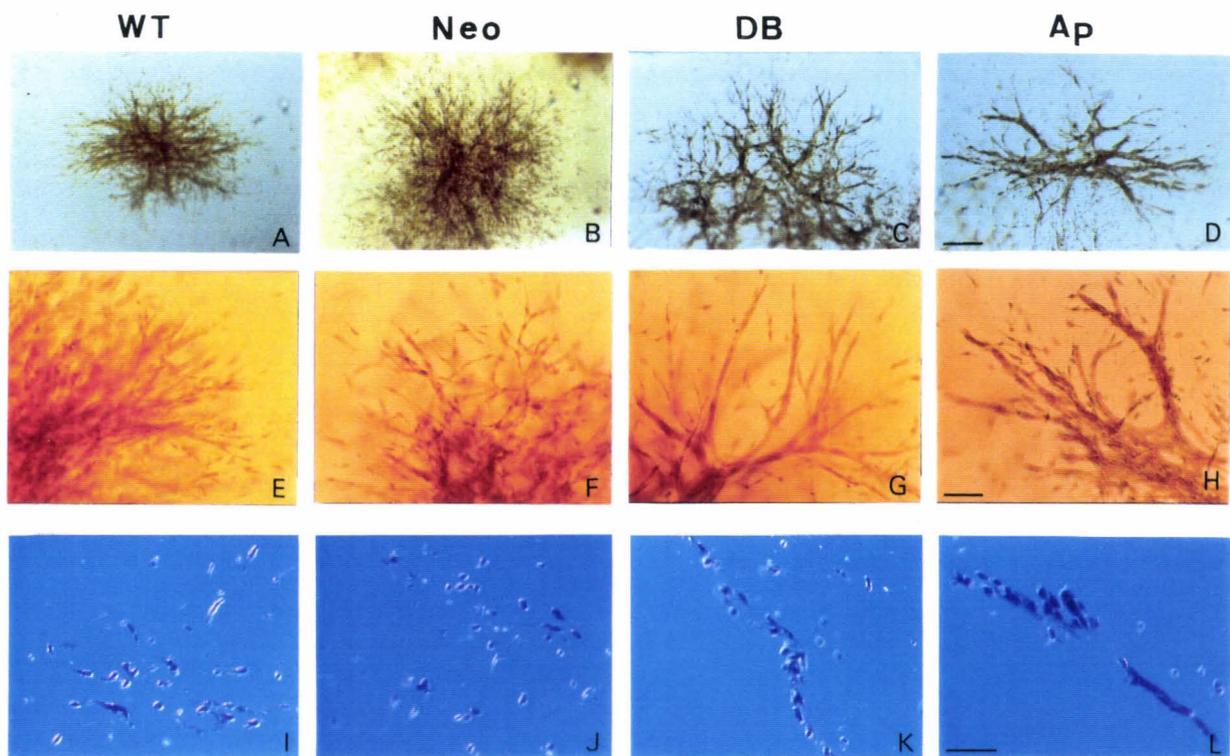
B

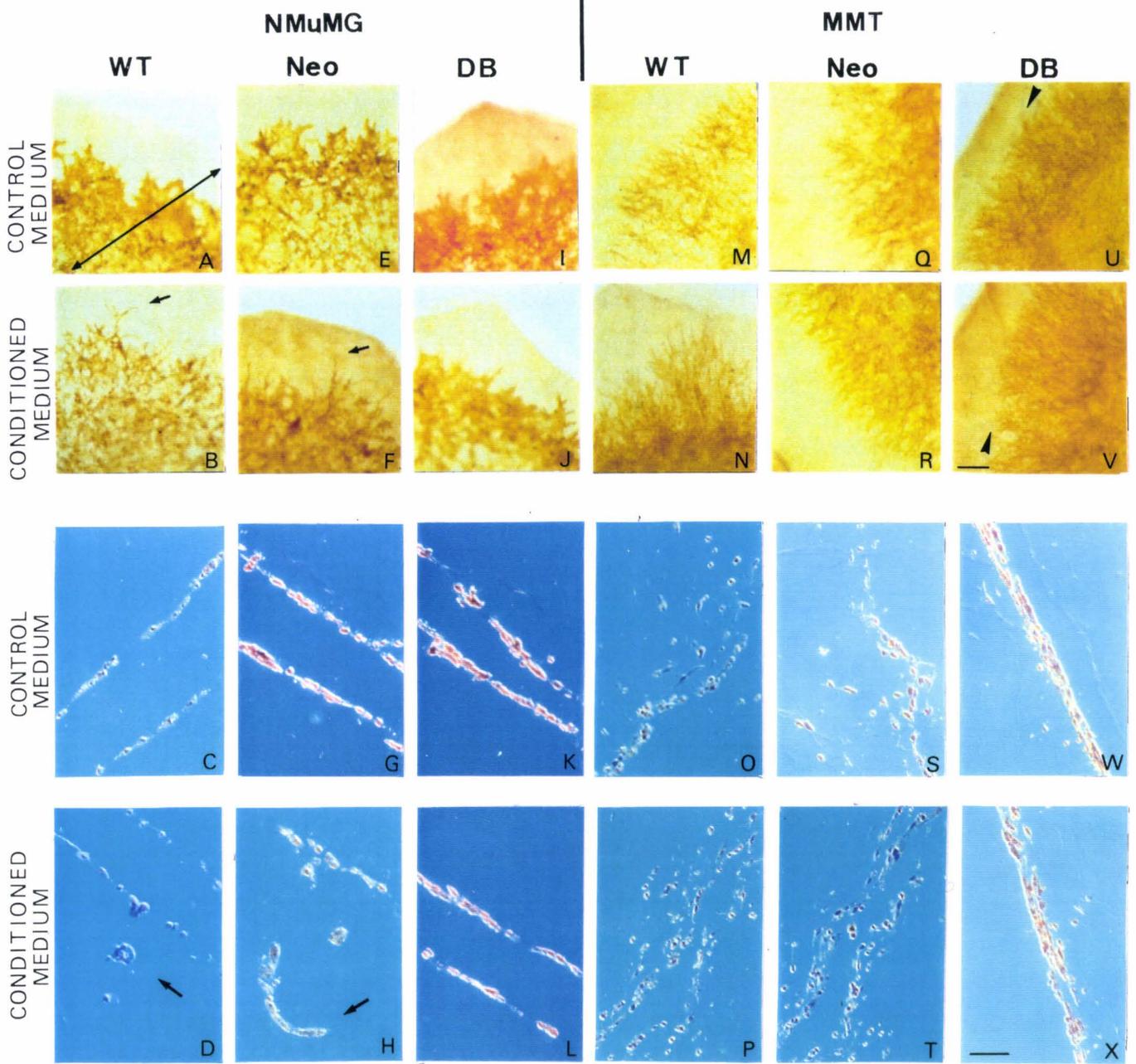


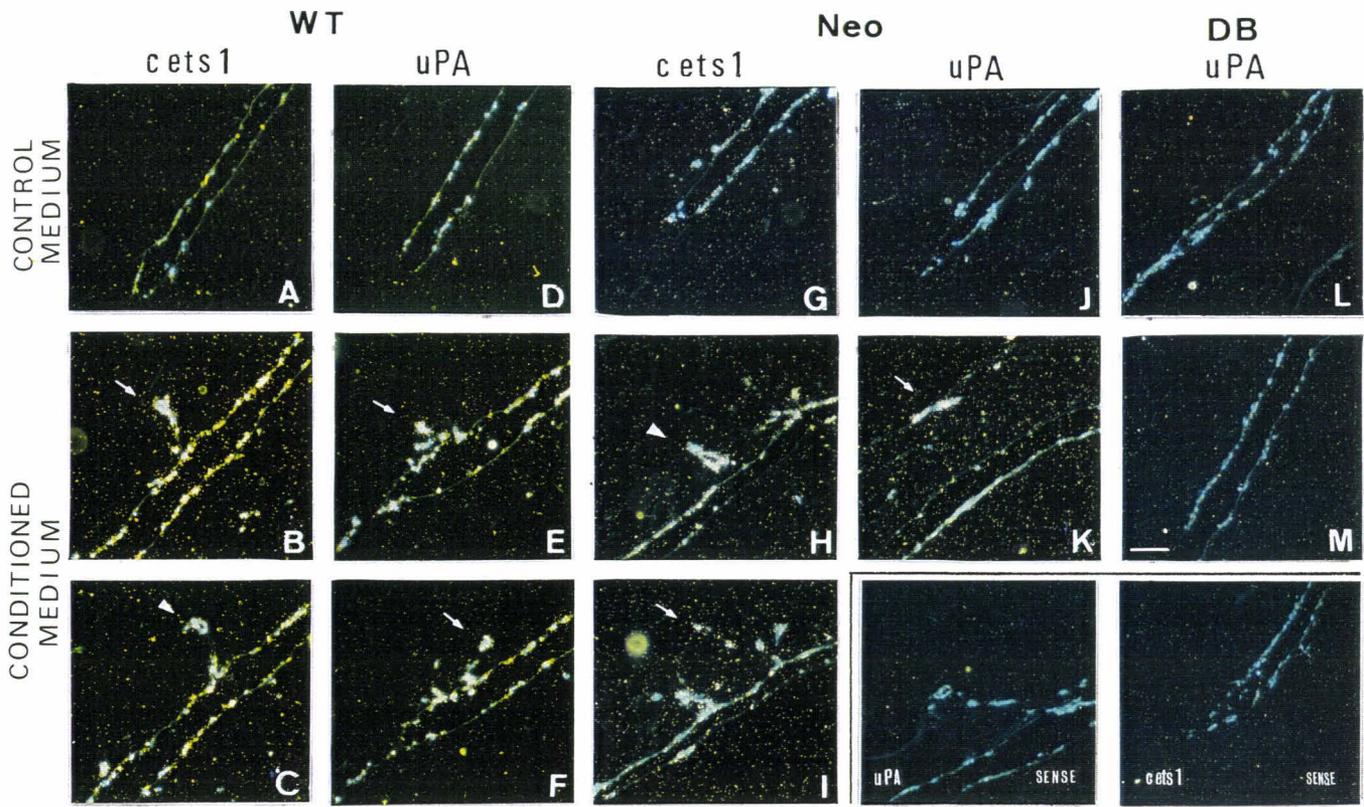


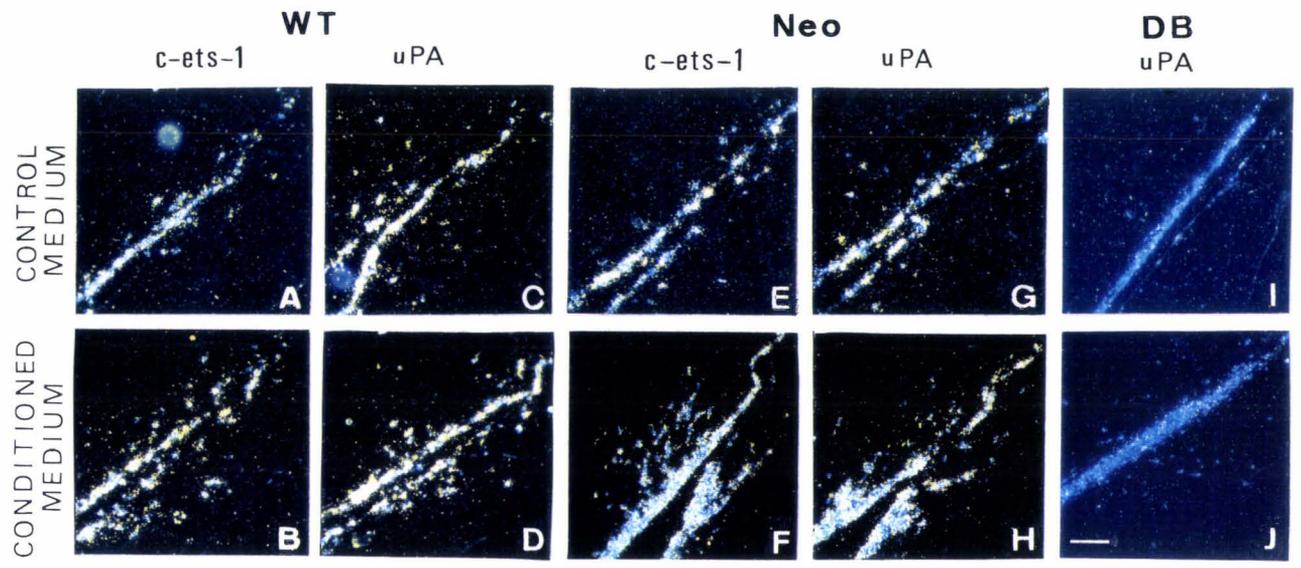












ECLAIRAGES RECENTS

A l'issue de notre étude, il apparaît que les facteurs de transcription de la famille Ets sont impliqués dans les mécanismes de migration et d'invasion *via* l'activation de l'*uPA*. Cette sérine protéase, nous l'avons signalé précédemment, a un rôle fondamental dans les phénomènes de migration grâce à la cascade protéolytique qu'elle déclenche. Aussi, le contrôle de ses inhibiteurs constitue un aspect important dans la régulation de la migration. *In vivo*, l'équilibre entre activateurs et inhibiteurs de protéases doit être respecté sous peine d'apparition de lésions tumorales (Liotta et al., 1991). Un mécanisme de contrôle commun permet d'assurer, dans des situations normales, une réponse rapide empêchant un déséquilibre d'un côté ou de l'autre de la balance. Il se trouve que les facteurs de transcription de la famille Ets peuvent assurer à la fois, la régulation de gènes codant des protéases (dont nous avons abondamment parlé) et celles de leurs inhibiteurs.

Des sites Ets/ AP-1 ont été décrits dans le promoteur du TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Metallo-Proteinase-1), inhibiteur de métallo-protéases. La coopération entre les protéines Ets et AP-1 a effectivement été mise en évidence dans l'activation de la transcription de ce gène (Logan et al., 1996).

Zhang et al. (1997) ont montré que le promoteur de la maspine, un inhibiteur de sérines protéases, contient des sites Ets et AP-1. Il est intéressant de noter que la maspine est fortement exprimée dans les cellules épithéliales mammaires normales, très peu exprimée dans les cellules de tumeurs primaires et complètement absente dans les cellules cancéreuses métastatiques. De plus, la transfection de l'ADNc de la maspine dans des cellules épithéliales mammaires tumorales inhibe leur invasion en tests *in vitro*, et réduit leur potentiel métastatique après injection dans la souris nude (Sager et al., 1995; Sheng et al., 1996). Ces résultats indiquent que la capacité d'inhiber les protéases dans les cellules tumorales, entraîne une baisse de la capacité invasive de ces cellules. Des expériences de délétions et de mutations des sites Ets et AP-1 montrent que dans les cellules épithéliales mammaires normales, le site Ets suffit à activer la transcription de la maspine, et que les facteurs Ets et AP-1 coopèrent pour stimuler cette

transactivation (Zhang et al., 1997). Dans les cellules cancéreuses, la perte d'expression de la maspine est due à la perte de la transactivation par Ets et AP-1.

Ainsi, les facteurs Ets apparaissent comme les garants de l'équilibre entre l'activation et l'inhibition de l'uPA dans les cellules épithéliales mammaires. Bien sûr, la dégradation ou le maintien des molécules de la MEC qui découlent de cet équilibre ne sont pas les seuls facteurs de la régulation des migrations cellulaires. Nous avons donc poursuivi notre étude en cherchant les implications des facteurs Ets dans d'autres mécanismes associés aux processus migratoires.

TROISIEME PARTIE :

Ancrage cellulaire, migration et facteurs de transcription Ets

INTRODUCTION

Nous avons pu montrer précédemment qu'un mutant transdominant négatif de Ets-1 est capable de réduire la mobilité des cellules épithéliales mammaires, la tubulogenèse et l'essaimage. Ce modèle nous permet d'appréhender l'implication des facteurs de transcription de la famille Ets dans les phénomènes migratoires mis en jeu par les cellules épithéliales mammaires.

Les cellules qui migrent dans leur environnement doivent à la fois franchir l'obstacle de la MEC et se servir de ses constituants comme support pour avancer. De plus, les cellules au cours de leur déplacement doivent moduler le degré de connexion qu'elles établissent entre elles. Des molécules d'ancrage sont alors sollicitées, telles que les intégrines qui établissent le lien entre MEC et squelette intra-cellulaire, et telles que les molécules d'adhérence inter-cellulaires. Ces molécules sont capables d'interagir avec des molécules du cytosquelette qui, en modifiant leur agencement peuvent moduler les déplacements cellulaires. Dans cette optique, il nous a paru intéressant d'explorer l'implication de ces molécules d'ancrage dans les aptitudes de migration des cellules épithéliales mammaires. Parallèlement, nous avons voulu savoir si certains des gènes codant ces molécules pouvaient être des gènes cibles pour les facteurs de transcription de la famille Ets.

L'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ (récepteur aux collagènes de types I et IV, laminine) joue un grand rôle dans la tubulogenèse mammaire (Klinowska et al., 1996), et la perte de son expression est corrélée à l'acquisition de la capacité invasive et de la malignité des cellules épithéliales mammaires cancéreuses (Hanby et al., 1993). De plus, un site PU.1, a été décrit dans le promoteur de l'intégrine $\alpha 2$ (Zutter et al., 1994).

L'E-cadhérine établit entre les cellules épithéliales normales des contacts étroits de façon à ce qu'elles puissent former des feuilletts organisés. Sommers et al. (1991) ont montré que la baisse d'expression de cette molécule est associée à l'augmentation du potentiel invasif des cellules épithéliales mammaires. L'I-CAM intervient aussi dans le contact entre cellules épithéliales et l'augmentation de son expression accompagne la régression des lésions tumorales dans les carcinomes mammaires (Ozello et al., 1992). Un site de fixation fonctionnel pour le membre Erm de la famille PEA-3, a récemment été décrit dans le promoteur du gène de l'I-CAM (de Launoit et al. soumis).

La vimentine, qui fait partie des filaments intermédiaires, est exprimée de façon constitutive à un haut niveau dans les cellules épithéliales mammaires invasives, MDA-MB-231 (Hendrix et al., 1997). Ces auteurs indiquent que l'inhibition de synthèse de la vimentine par un nucléotide antisens réduit significativement l'invasion de ces cellules en test *in vitro* à travers des filtres coatés au collagène. Chen et al. (1996) ont montré que le gène *PEA-3* participe à l'activation de la vimentine dans les cellules tumorales mammaires invasives.

Si des sites de fixation pour les protéines de la famille Ets ont été décrits dans les promoteurs de certains gènes impliqués dans l'ancrage cellulaire, l'activation de la transcription de ces gènes n'en n'est pas pour autant effective. Nous avons vu précédemment que la fixation et l'activité transactivatrice d'une protéine Ets dépend d'un grand nombre de facteurs. La forme de la protéine (due à l'épissage alternatif), la phosphorylation de cette protéine, et sa coopération avec des cofacteurs (dont le complexe Jun/ Fos maintes fois cité) sont autant d'éléments qui peuvent moduler la transactivation du gène cible, voire même la contrôler dans des sens opposés. Le recrutement de l'une ou l'autre des protéines de la famille Ets en fonction de la séquence spécifique du site de fixation dans le promoteur du gène cible, de l'interaction avec les cofacteurs présents, et de la compétition avec d'autres facteurs de la famille Ets peut selon les cas orienter positivement ou négativement la transactivation. Ce fonctionnement complexe est illustré dans l'étude de Buttice et al. (1996) montrant que Erg peut induire la transactivation de la collagénase I mais pas de la stromélysine 1, et que Erg inhibe la transcription de la stromélysine 1 par Ets-2.

Nous nous sommes donc intéressés aux statuts de l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$, de l'E-cadhérine, de l'I-CAM et de la vimentine dans les cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses, exprimant ou non la protéine Ets1-DB. En effet, ce mutant dominant négatif qui inhibe la migration, la capacité invasive, la tubulogenèse et l'essaimage, est susceptible d'induire des modifications qualitatives ou quantitatives de ces « molécules d'ancrage » impliquées dans les déplacements cellulaires.

MATERIELS ET METHODES

Types cellulaires et conditions de culture

La lignée cellulaire épithéliale MMT (Mouse Mammary Tumor) a été établie à partir de tumeurs mammaires apparues spontanément dans des souris hybride C 57 BL x AfF1. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) contenant 2mM de glutamine (Eurobio), 100 UI de pénicilline, 100 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine, 4 $\mu\text{g/ml}$ de gentamycine (Sigma), 4.5 g/l de glucose, 1% d'acides aminés non essentiels (Eurobio), 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio).

La lignée cellulaire épithéliale NMuMG (Normal Murine Mammary Gland), est dérivée de tissus mammaires glandulaires normaux de souris adulte NAMRU. Ces cellules sont cultivées dans le milieu précédent additionné de 2 $\mu\text{g/ml}$ d'insuline (Endopanocrine). Ces deux types cellulaires sauvages (Wild Type) ont été obtenus par l'ATCC, et sont nommées dans nos expériences NMuMG WT et MMT WT.

Ces cellules ont été infectées par deux types de virus construits par le Dr Virginie Mattot (Mattot et al., soumis; les détails de construction et d'infection sont mentionnés dans l'article n°2 : Delannoy-Courdent et al., soumis). L'un des virus contient la séquence codant le domaine « DNA-binding » de la protéine Ets-1 de souris (DB), clonée devant la séquence IRES-Néo permettant la traduction continue de la séquence DB et de la protéine de résistance à la néomycine. Les lignées infectées par ce virus sont nommées dans nos expériences NMuMG DB et MMT DB. L'autre virus contient uniquement la séquence IRES-Néo. Les lignées infectées par ce virus sont nommées NMuMG Néo et MMT Néo, et servent de contrôle au cours de nos manipulations. Ces 4 derniers types cellulaires sont cultivés dans les milieux précédemment décrits, additionnés de 800 $\mu\text{g/ml}$ de généticine (Gibco).

L'ensemble des cellules épithéliales est entretenu dans des flacons de plastique de 75 cm² (Falcon) dans 10ml de milieu adapté et incubé en atmosphère humide contenant 5% de CO₂, à 37°C . Les cellules sont collectées selon les conditions standards par 0,25% de Trypsine-EDTA, mises en suspension dans du milieu approprié et comptées. Elles sont alorsensemencées à densité voulue soit sur fond de boîtes coatées avec une solution de collagène de

type I à 0,5 mg/ml pour les cultures bidimensionnelles, soit dans un gel de collagène à 1,5 mg/ml pour les cultures tridimensionnelles.

Nous utilisons du milieu conditionné par des fibroblastes comme inducteur de dispersion et de morphogenèse (Montesano et al., 1991a et b). Ce milieu est obtenu en collectant le surnageant de cultures de fibroblastes NIH-3T3 sub-confluents après 2 jours de culture dans du milieu DMEM sans sérum.

Western blot

Les NMuMG WT, Neo et DB ont étéensemencées à raison de 800000 cellules par boîte de 100mm, les MMT WT, Néo et DB à raison de 600000 par boîte. Après un jour de croissance, les cellules sont traitées avec du milieu conditionné par des NIH-3T3. 24 heures après, les cellules sont rincées avec du PBS et lysées dans 250 μ l de tampon approprié (0,3% SDS ; 1% 2- β -mercaptoéthanol ; 0,5% Triton X-100) sur glace. Les échantillons sont alors mis à bouillir pendant 10 minutes, puis stockés à -20°C jusqu'à utilisation. 15 μ g de protéines totales mélangés à 6 μ l de glycérol et 1 μ l de bleu de bromophénol sont concentrés sur gel d'acrylamide à 4,5%, séparés sur gel à 10% et transférés sur membrane de nitrocellulose (Transfer Membrane, Protran BA 85, Life Science). La membrane subit un blocage par 3% de BSA et 5% de lait dans du TBST (10mM Tris ; 150mM NaCl ; 0,1% Tween 20) pendant 2 heures et elle est incubée avec l'anticorps primaire à 4°C durant la nuit. Les anticorps monoclonaux anti E-cadhérine (Transduction Laboratories) et anti I-CAM (R&D Systems) sont dilués au 1/ 500 dans le tampon de blocage. La membrane est lavée pendant 1 heure dans du TBST, puis l'anticorps secondaire anti-immunoglobuline de souris biotinylé (Sigma) est appliqué à température ambiante pendant 2 heures dilué au 1/ 1000 dans le TBST. La membrane est lavée 1 heure dans le TBST, puis incubée avec l'ExtrAvidine-péroxydase (Sigma) diluée au 1/1000 pendant 2 heures. La membrane est alors rincée pendant la nuit dans le TBST à 4°C . Le blot est révélé par les réactifs de chimioluminescence (ECL, Amersham, Life Science), selon les indications du fabricant. Les signaux sont détectés par exposition de la membrane contre un film Kodak X-OMAT.

Immunocytochimie (ICC)

Les cellules ont étéensemencées dans les puits de lames Lab Tech à 8 puits (Nunc) à raison de 31000 cellules/puits pour les NMuMG WT, Neo, DB et à raison de 10000 cellules/puits pour les MMT WT, Néo, DB. Après un jour de croissance, les cellules sont traitées avec du milieu conditionné par des fibroblastes NIH-3T3. 24 heures après, les cellules sont fixées avec du méthanol et stockées à -20°C jusqu'à utilisation.

Les cellules sont alors réhydratées 5 minutes dans du PBS. Le blocage et la saturation des peroxydases endogènes sont réalisés si nécessaire (révélation par le système DAB) respectivement par l'incubation dans 1,5% de sérum de chèvre dilués dans du PBS et par l'incubation dans 0,3% H_2O_2 dilué dans du PBS pendant 20 minutes. Les cellules sont rincées 5 minutes dans du PBS. On applique alors l'anticorps primaire dilué dans du PBS additionné de 0,5% de Tween 20 et de 0,5% de sérum albumine bovine (SAB). L'anticorps polyclonal anti-intégrine $\alpha 2$ (Chemicon) est dilué au 1/100, les anticorps monoclonaux anti-intégrine $\beta 1$ (Chemicon) et anti-E-cadhérine (Transduction Laboratories) au 1/100, l'anticorps monoclonal anti-vimentine (Sigma) au 1/200. Les lames sont incubées en atmosphère humide à 4°C , pendant la nuit.

Les cellules sont alors rincées dans du PBS, puis incubées 30 minutes à température ambiante avec l'anticorps secondaire dans le mélange PBS, Tween 20, SAB. On utilise l'anticorps anti-immunoglobuline de souris biotinyllé dilué au 1/20 pour amplifier le signal de l'anticorps anti-intégrine $\beta 1$, et l'anticorps anti-immunoglobuline de lapin biotinyllé dilué au 1/20 pour l'anticorps anti-intégrine $\alpha 2$. Dans ces deux cas, les cellules sont rincées 5 minutes dans du PBS, puis incubées à température ambiante pendant 30 minutes avec l'ExtrAvidine peroxydase diluée au 1/ 20 dans un mélange PBS/0,5% de Tween 20. Après rinçage le signal est révélé par le procédé DAB (Sigma). Les cellules sont contre-colorées 30 secondes avec l'hématoxyline de Harris, rincées à l'eau courrante puis à l'eau distillée et montées dans le Xam (DBH Laboratory, Gurr). En ce qui concerne les anticorps anti E-cadhérine et I-CAM, l'anticorps secondaire choisi, un anti immunoglobuline de souris couplé au FITC (Sigma), est dilué au 1/ 100. Après un rinçage de 5 minutes dans le PBS, les cellules sont contre-colorées 2 minutes soit dans l'iodure de propidium à $250\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de PBS, ce qui fera apparaître les noyaux

oranges et la vimentine en vert sous illumination UV, soit au bleu Evans dilué au 1/ 10.000 dans du PBS, ce qui fera apparaître le cytoplasme en rouge et la E-cadhérine en jaune sous l'illumination choisie. Après un dernier rinçage, les lames sont montées dans le glycérol/ PBS (v/v). L'ensemble des lames est observé sur microscope Olympus BH 2, en lumière visible pour visualiser le marquage des intégrines $\alpha 2$ et $\beta 1$ révélé par la DAB, sous illumination UV pour le signal FITC de l'E-cadhérine et de la vimentine.

Tests de morphogénèse

Les cellules ont été cultivées à faible densité dans des gels de collagène de type I, de façon à comparer les aptitudes morphogénétiques des différentes lignées. Le collagène de queue de rat a été préparé selon la technique utilisée par Montesano et al.(1991a). Le gel de collagène est préparé en mélangeant à 4°C, 8 volumes d'une solution de collagène à 2 mg/ ml à 1 volume de milieu essentiel minimum 10 fois concentré (MEM 10x) et 1 volume de bicarbonate de sodium à 22,2 g/l. Les cellules épithéliales WT, Néo et DB sont alors resuspendues à raison de 4000 cellules/ ml de gel. 300 μ l de cette suspension sont déposés dans le fond d'un puits d'une plaque 24 puits (Costar). Après 15 minutes de gélification, 500 μ l de milieu contenant 10% de SVF sont ajoutés. La culture est ainsi entretenue pendant 5 jours. Les cellules sont alors traitées avec du milieu conditionné par des fibroblastes NIH-3T3 pendant 4 jours. Des cultures de cellules WT ont, pendant ces 4 derniers jours, été traitées par 10 μ g/ ml d'anticorps neutralisant anti intégrine $\alpha 2 \beta 1$ (Sigma).

A l'issue de la culture, les cellules sont colorées pendant 15 minutes avec du rouge neutre dilué au 1/10000 dans le volume total et fixées à 4°C pendant 16 heures dans du paraformaldéhyde dilué à 4% dans du PBS. Les gels sont alors rincés en PBS et deshydratés. Les photographies « *in toto* » sont prises sur microscope Olympus BH2.

Les gels sont alors inclus en paraffine puis coupés. Les coupes de 7 μ m d'épaisseur sont transférées sur des lames Superfrost/Plus (Polylabo) et séchées à 37°C pendant 5 jours. Après déparaffinage et réhydratation les coupes sont colorées au rouge nucléaire pendant 10 minutes, et au micro-indigo-carmin pendant 10 secondes. Après rinçage à l'eau du robinet, réhydratation et passage dans des bains de toluène, les lames sont montées au Xam (DBH Laboratory). Les

photographies de ces coupes sont réalisées sur microscope Olympus BH2 équipé d'un système Nomarski.

RESULTATS

I. LE MUTANT DOMINANT NEGATIF DE ETS-1 A-T-IL UN EFFET SUR LA PRESENCE DES INTEGRINES $\alpha 2$ ET $\beta 1$?

Nous avons procédé à des ICC et des Western blots à partir de cellules épithéliales mammaires cultivées sur fond de boîtes coatées au collagène, traitées avec du milieu conditionné par des fibroblastes NIH-3T3.

I.1. Détection de la présence de l'intégrine $\alpha 2$ (Fig. 27).

Les NMuMG Néo montrent un marquage dans les cellules situées à la périphérie des amas et les cellules isolées qui se sont détachées de ces amas. Pour les NMuMG DB, un très faible signal est détecté sur le bord des amas cellulaires.

Les MMT Néo qui poussent sans former d'amas cellulaires, présentent un marquage dans la plupart des cellules. En ce qui concerne les MMT DB, un très léger signal est détecté dans quelques cellules.

I.2. Détection de la présence d'intégrine $\beta 1$ (Fig. 27).

Un signal intégrine $\beta 1$ est détecté dans les NMuMG Néo constituants de petits amas cellulaires étoilés, indépendants des larges tapis cellulaires. Les NMuMG DB ne présentent aucun signal. En ce qui concerne les MMT Néo, un marquage est observé dans la plupart des cellules. Les MMT DB, montrent un signal extrêmement faible dans quelques cellules seulement.

II. EFFET DU TRAITEMENT PAR UN ANTICORPS ANTI-INTEGRINE $\alpha 2\beta 1$ SUR LA MORPHOGENESE DES NMUMG ET DES MMT DE TYPE SAUVAGE (Fig. 28).

Alors que les NMuMG sauvages et Néo non traitées sont capables, en culture tridimensionnelle, de former de canaux épithéliaux (Fig. 28, A, B, C), sous l'influence de l'anticorps, les NMuMG ne peuvent constituer que des massifs hérissés sans formation de bourgeons terminaux caractéristiques de la morphogénèse normale (Fig. 28, D). Ces cellules s'alignent sans former de tubes (Fig. 28, E). Ces aspects morphologiques sont également observés pour les cultures de NMuMG DB (Fig. 28, F, G).

Les MMT, traitées par l'anticorps, ne présentent plus les essaimages périphériques de cellules dispersées observés pour les MMT non traitées (Fig. 28, H, I), mais forment un ensemble de cordons de cellules alignées (Fig. 28, J, K). Les cultures de MMT DB présentent également ce type de cordons même s'ils sont moins bien différenciés (Fig. 28, L, M).

III. LE MUTANT DOMINANT NEGATIF DE ETS-1 A-T-IL UN EFFET SUR LA PRESENCE DES MOLECULES D'ADHERENCE INTER-CELLULAIRES ?

Nous avons réalisé ces analyses par la technique de **Western blot** à partir de NMuMG Néo ou DB (cultivées sur fond de boîte coatées au collagène et traitées ou non pendant 24 heures avec du milieu conditionné par des fibroblastes NIH-3T3). Les niveaux de synthèse de l'E-cadhérine et de l'I-CAM ont été analysés (Fig. 29). Nos résultats révèlent des quantités de protéines apparemment identiques dans chaque cas.

Nous avons alors réalisé des ICC de façon à savoir si la répartition de ces protéines dans les cellules est la même dans les différentes situations. L'anticorps anti-I-CAM ne s'est pas révélé adéquat pour une analyse par ICC ; par contre, l'anticorps anti-E-cadhérine a donné des signaux très nets (Fig. 30).

Dans les cultures de NMuMG Néo, la cadhérine est détectée sous la forme d'un liseré fluorescent continu et uniforme donnant un aspect régulier aux contours des cellules qui sont accolées les unes aux autres constituant un tapis cellulaire. A la périphérie de ces tapis, certaines cellules commencent à se dissocier sous l'effet du milieu conditionné. Au niveau où les cellules se séparent les unes des autres, les marquages d'E-cadhérine s'étirent entre les cellules et montrent un aspect diffus. Les cellules qui se sont isolées au cours de l'essaimage ne présentent pas de signal.

Les NMuMG DB montrent un signal E-cadhérine qui n'est pas uniforme. On observe des accumulations d'E-cadhérine sous forme de petites plaques entre les cellules voisines indiquant la présence de contacts ponctuels. Ces petites plaques sont aussi détectées à la surface de certaines cellules isolées sans contacts avec leurs voisines. Le marquage E-cadhérine apparaît sous la forme d'un dépôt intercellulaire discontinu, constitué d'enchevêtrements irréguliers de filaments, ce qui confère un aspect « flou » aux contours des cellules.

En ce qui concerne les MMT, le signal E-cadhérine n'a pas été détecté.

IV. LE MUTANT DOMINANT NEGATIF DE ETS A-T-IL UN EFFET SUR LA PRESENCE DE VIMENTINE ?

Il a été suggéré précédemment que la répartition des molécules d'adhérence à la surface cellulaire est corrélée à l'organisation du squelette intracellulaire (Pignatelli et al., 1992 a et b). L'expression de la vimentine, molécule du cytosquelette, est associée aux mouvements cellulaires. C'est pourquoi, nous avons tenté de localiser par ICC d'éventuelles redistributions de la vimentine selon les types cellulaires et les conditions de culture (Fig. 31).

Les NMuMG WT et Néo, montrent des expansions cytoplasmiques qui s'allongent sur le substrat et dans lesquelles sont détectés des faisceaux de vimentine. Un réseau de vimentine est présent dans des zones où le cytoplasme s'étale sur le substrat. Dans les NMuMG DB un signal vimentine apparaît dans des zones plus internes du cytoplasme, et proches du noyau. Par contre, on n'observe plus de vimentine dans les aires d'étalement des cellules sur le substrat.

Les MMT WT et Néo sont des cellules cancéreuses qui ont une capacité migratoire intrinsèque. Dans les MMT Néo, la vimentine se présente sous forme de filaments dans les expansions cytoplasmiques et sous forme de réseau dans les zones où le cytoplasme s'étale sur le substrat, ainsi qu'autour du noyau. On peut observer que le réseau de vimentine périnucléaire se poursuit par des filaments qui s'engagent dans les prolongements cellulaires. Dans les MMT DB, le réseau intracytoplasmique et périnucléaire semble absent, on n'observe plus que les filaments de vimentine dans les expansions cytoplasmiques.

DISCUSSION

I. LA PRESENCE DES INTEGRINES $\alpha 2$ ET $\beta 1$ EST INFLUENCEE PAR L'EXPRESSION DU MUTANT DOMINANT NEGATIF DE ETS-1

Les signaux intégrines $\alpha 2$ et $\beta 1$ décroissent dans les cellules infectées par le dominant négatif. Or, nos précédents travaux ont pu montrer que ces cellules ont une capacité de migration et d'invasion très réduite. Ceci suggère que la baisse d'expression de ces intégrines $\alpha 2$ et $\beta 1$, en limitant les interactions entre cellules et substrat peut réduire la mobilité cellulaire. Ce mécanisme est en accord avec les données fournies par Schön et al. (1996) qui indiquent que la perte d'expression de l'intégrine $\alpha 2$ entraîne une décroissance de migration. Ces auteurs ont montré que des cellules de mélanomes de souris qui n'expriment pas l'intégrine $\alpha 2$ ne présentent pas de capacités à adhérer, s'étaler et migrer sur des supports traités avec du collagène de type I. Par contre, la transfection de ces cellules avec un plasmide contenant le gène de l'intégrine $\alpha 2$ restaure ces capacités.

Pour conforter l'hypothèse selon laquelle la réduction de l'interaction des cellules avec leur support matriciel, *via* l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, limite la migration, nous avons traité des cultures tridimensionnelles de cellules épithéliales avec un anticorps bloquant anti-intégrine $\alpha 2\beta 1$. Nous avons alors observé l'inhibition de la tubulogenèse des NMuMG et de l'essaimage des MMT.

Ainsi, nous pouvons suggérer qu'en bloquant l'action de l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ par l'anticorps nous avons suffisamment inhibé les interactions entre cellules et matrice pour empêcher la réorganisation des NMuMG en tubes. Il a été montré dans ce sens que le blocage de l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ par un oligonucléotide antisens dans les cellules épithéliales mammaires ou dans les MDCK inhibe la tubulogenèse en empêchant l'adhérence au collagène (Saelman et al., 1995 ; Keely et al., 1995b). Nous pouvons proposer en ce qui concerne les MMT, que le traitement par l'anticorps bloquant anti-intégrines $\alpha 2 \beta 1$ en empêchant l'adhérence des cellules à leur support de collagène, réduise les tractions nécessaires à l'invasion cellulaire cancéreuse. La réduction de l'invasion *in vivo* a d'ailleurs pu être observée par Newton et al. (1995) qui, en injectant un anticorps anti-intégrine $\beta 1$ dans des souris nude, en même temps que des MDA-MB-231, cellules épithéliales mammaires cancéreuses invasives, ont pu diminuer le nombre de colonies métastatiques.

Pour chaque type cellulaire, la morphologie des cultures tridimensionnelles observée après traitement par l'anticorps bloquant anti-intégrine $\alpha 2 \beta 1$ ressemble à celle obtenue avec les cellules produisant le dominant négatif. La protéine Ets1-DB pourrait donc avoir comme effet d'empêcher l'expression des intégrines $\alpha 2$ et/ou $\beta 1$. Précédemment, nous avons pu attribuer l'inhibition de la tubulogenèse et de l'essaimage par le dominant négatif à la baisse d'expression et d'activité de l'uPA. L'inhibition d'un autre mécanisme, en l'occurrence faisant intervenir l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$, également nécessaire à la formation de tubes ou la dispersion cellulaire, peut conduire à un résultat morphologique assez similaire en entraînant le blocage d'un processus commun et crucial : la migration cellulaire.

Il est intéressant de noter que le promoteur de l'intégrine $\alpha 2$ possède des sites AP-1, AP-2 et PU.1 (Zutter et al., 1994). Cette intégrine représente une cible potentielle pour les facteurs de transcription de la famille Ets et pour la protéine Ets1-DB.

Des expériences de transactivation, après transfection d'un plasmide associant le promoteur de l'intégrine $\alpha 2$ ou $\beta 1$ et un gène rapporteur, dans les cellules épithéliales infectées ou non par le dominant négatif devraient indiquer clairement si ce dominant négatif est capable de réguler directement la transcription de ces intégrines. En effet, dans l'état actuel de nos

travaux, nous ne pouvons exclure que la baisse du niveau d'intégrines $\alpha 2$ et $\beta 1$ soit une conséquence indirecte d'autres régulations induites par la protéine Ets1-DB.

II. LA REPARTITION DES MOLECULES ASSURANT LA COHESION EPITHELIALE EST MODULEE PAR LE DOMINANT NEGATIF DE ETS-1.

Les molécules d'adhérence intercellulaire peuvent moduler la mobilité des cellules les unes par rapport aux autres. Nous avons analysé la présence de l'I-CAM et de l'E-cadhérine dans les cellules épithéliales mammaires normales infectées ou non par le dominant négatif. Il s'avère que les niveaux des protéines ne varient pas entre les cellules exprimant la protéine Ets1-DB et les cellules sauvages. Le dominant négatif ne semble donc pas intervenir dans la modulation de la quantité de protéines produites, il n'agirait donc pas sur la transcription de ces gènes.

Mais, la quantité produite n'est pas forcément la clef du fonctionnement. Dans les cancers mammaires, particulièrement les plus agressifs, l'expression de l'E-cadhérine est hétérogène et la localisation de la protéine plus diffuse (Foekins et al., 1992), entraînant une perte d'adhérence. Nous avons donc observé par ICC, la répartition de l'E-cadhérine sur les cellules épithéliales mammaires.

Les NMuMG WT et Néo poussent sous forme de tapis cellulaires où les signaux d'E-cadhérine bordent les cellules jointives sous forme d'un liseré homogène. Les cellules se séparant de l'amas cellulaire, sous l'influence du milieu conditionné, présentent un marquage d'E-cadhérine qui s'étire au fur et à mesure de l'éloignement des cellules. Les molécules d'E-cadhérine, qui maintiennent la cohésion du tapis cellulaire se désorganisent et perdent leur rôle de connexion quand ces cellules amorcent leurs déplacements.

Les NMuMG DB, quant à elles, montrent des accumulations irrégulières d'E-cadhérine sous forme de petites plaques situées au niveau des contacts intercellulaires ou en dehors de ces contacts. Ces cellules, lors d'expériences précédentes ont montré un potentiel migratoire et invasif réduit par rapport aux NMuMG WT et Néo. On peut alors penser que la réorganisation

de l'E-cadhérine sous formes d'accumulations ponctuelles, modifie l'adhérence entre les cellules voisines, perturbe leurs déplacements.

La redistribution de l'E-cadhérine, est souvent accompagnée par celle des caténines. En effet, la destruction des jonctions intercellulaires observée lors de la perte de polarité des cellules épithéliales mammaires est associée à la dispersion de l'E-cadhérine et de la β caténine sur toute la surface cellulaire, ces deux protéines étant normalement concentrées aux sites de jonction étroite (Fialka et al., 1996). La modification de l'organisation de l'E-cadhérine peut être associée à un défaut des caténines qui se lient au domaine cytoplasmique de l'E-cadhérine. En effet, les cellules PC-9 de carcinomes pulmonaires, qui sont dépourvues d' α caténine, présentent des molécules d'E-cadhérine réparties au hasard à la surface cellulaire (Watabe et al., 1994). Les caténines pourraient donc constituer un relai dans l'effet du dominant négatif sur la répartition de l'E-cadhérine.

Les MMT, cellules épithéliales mammaires cancéreuses, invasives, ne présentent aucun signal E-cadhérine. Cette observation est en accord avec les résultats indiquant que l'expression de l'E-cadhérine est inversement corrélée à la capacité invasive *in vitro* et à la métastase *in vivo* (Oka et al., 1993 ; Maguire et al., 1997).

Si l'E-cadhérine est largement impliquée dans la cohésion cellulaire et la limitation de la capacité invasive, c'est plus dans le changement de répartition de la protéine que dans la modulation quantitative de sa synthèse qu'il faut chercher, dans notre modèle, un effet du dominant négatif.

III. LA REPARTITION DE LA VIMENTINE EST MODULEE PAR LE DOMINANT NEGATIF DE ETS-1

L'expression de la vimentine dans les cellules épithéliales de cancer du sein est corrélée à leur potentiel invasif. Les cellules invasives de cancer du sein exhibant un phénotype de transition épithélium-mésenchyme expriment à la fois *c-ets-1* et la vimentine (Gilles et al., 1997). Dans notre modèle, une modification de la répartition cellulaire de vimentine a été révélée

entre les cellules épithéliales mammaires de type sauvage et celles infectées par le dominant négatif.

Les NMuMG WT et Néo, montrent des signaux vimentine uniquement dans les prolongements cellulaires sous forme de fins filaments et dans les zones où le cytoplasme périphérique s'étale sur le substrat. Ces résultats indiquent que la vimentine joue un rôle dans la traction de ces cellules sur leur support. La vimentine est présente sous forme de réseau dans des régions plus interne du cytoplasme des NMuMG DB, particulièrement autour du noyau. Les signaux ne sont plus observés dans les expansions cellulaires au contact cellule-substrat. Sachant que ces cellules ont, par rapport aux cellules de Néo ou WT, une capacité migratoire réduite, le changement de localisation de la vimentine des zones de contact cellule-substrat aux zones périnucléaires, empêcherait cette protéine de remplir sa fonction de traction lors du déplacement. Mattot et al. (soumis) ont décrit dans des cellules endothéliales infectées par le même dominant négatif, une réorganisation du squelette intracellulaire parallèlement à une augmentation de l'étalement et de l'adhérence de ces cellules. La répartition des molécules d'actine, de vinculine et d' α actine, ces deux dernières établissant des liens entre molécules d'adhérence et actine, dans les cellules endothéliales infectées par le dominant négatif est très différente de celle observée dans les cellules sauvages. Ceci suggère que l'expression de la protéine Ets-1-DB, en modifiant la distribution des protéines du cytosquelette, modifie les interactions de la cellule avec son substrat, entraînant une augmentation de l'adhérence observée dans les cellules endothéliales et une diminution de la migration décrite dans les cellules épithéliales mammaires (Delannoy-Courdent et al., soumis).

Les MMT ont, de façon constitutive, une capacité de migration importante et montrent une morphologie effilée. La vimentine forme des filaments dans les prolongements cellulaires des MMT Néo et WT, filaments qui sont reliés à un réseau cytoplasmique. Dans les MMT DB, le réseau intracytoplasmique a complètement disparu, seuls subsistent les filaments de vimentine dans les expansions cytoplasmiques. Nous avons pu montrer précédemment que les MMT DB migrent moins que les cellules sauvages. On peut alors raisonnablement penser que le bouleversement observé dans l'organisation des molécules de vimentine en empêchant la mise en place d'une architecture cohérente, ne permet pas à cette molécule de remplir son rôle et de

contribuer au mécanisme de migration. La localisation de la vimentine, différente dans les cellules NMuMG et MMT de type sauvage, suggère que l'organisation de cette molécule correspond à la capacité migratoire propre à ces deux types cellulaires.

Le réarrangement des molécules de cadhérine ou de vimentine pourrait être une conséquence indirecte de l'activité de la protéine Ets1-DB dont les effets pourraient transiter par des gènes intermédiaires restant à déterminer.

Finalement, lors de cette étude, nous avons mis en évidence dans les cellules épithéliales mammaires infectées par le dominant négatif dont la mobilité est réduite, une baisse d'expression des intégrines $\alpha 2$ et $\beta 1$ molécules d'interaction entre cellules et substrat. Une modification de répartition de l'E-cadhérine, molécule d'interaction cellule-cellule, et de la vimentine, molécule du cytosquelette a également été décrite dans les cellules produisant le dominant négatif. Ces résultats indiquent que la protéine Ets1-DB affecte les fonctions d'adhérence et de traction toutes deux impliquées dans la modulation de la migration cellulaire.

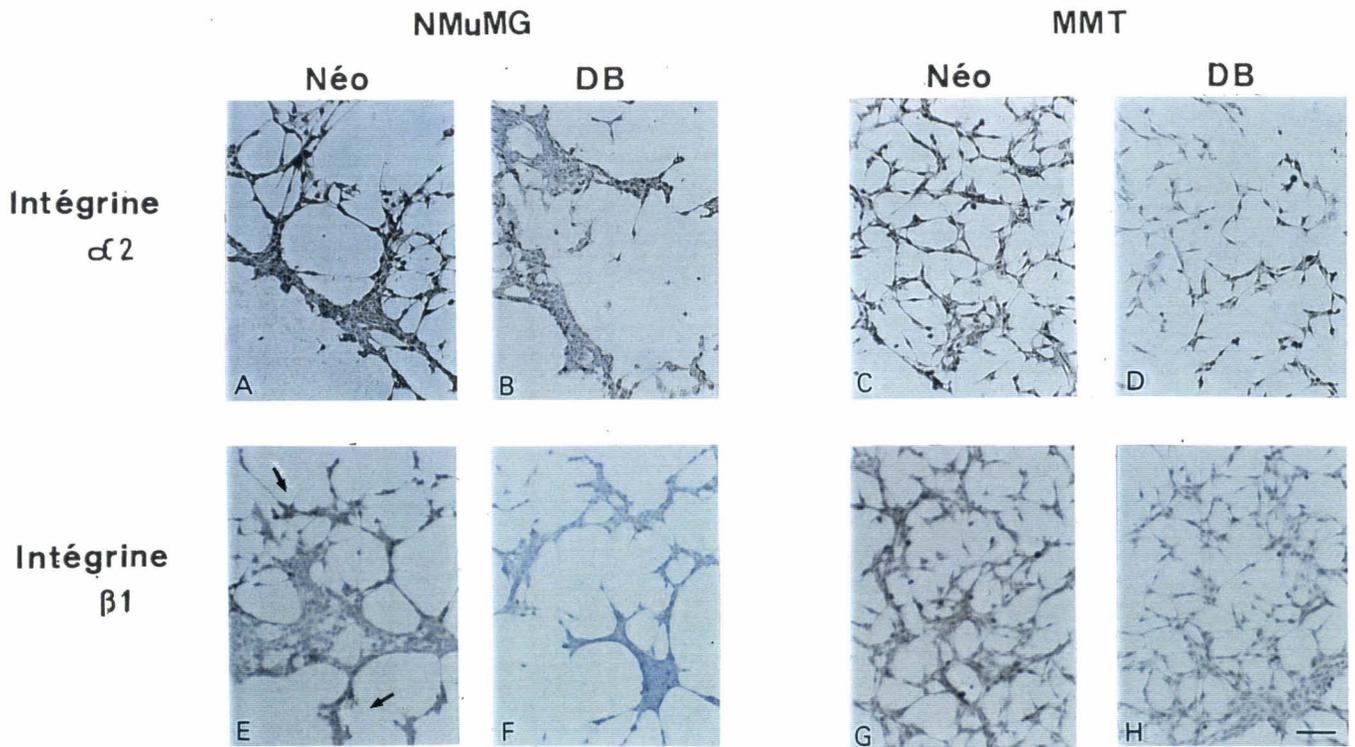


Fig. 27 : Détection de la présence des intégrines $\alpha 2$ et $\beta 1$ dans les NMuMG Néo et DB et les MMT Néo et DB.

Les photographies A à D correspondent aux cellules ayant subi une ICC avec l'anticorps anti-intégrine $\alpha 2$. Les vues E à H correspondent aux cellules ayant subi une ICC avec l'anticorps anti-intégrine $\beta 1$. Les photographies A et E représentent les NMuMG Néo, B et F les NMuMG DB. Les vues C et G représentent les MMT Néo, D et H les MMT DB. La barre correspond à 50 μm .

L'intégrine $\alpha 2$ est présente dans les NMuMG Néo qui migrent en périphérie des amas cellulaires (A), mais n'est détectée que très faiblement dans les NMuMG DB au bord des amas (B). Le signal est détecté dans la plupart des MMT Néo (C) alors qu'il est faiblement présent dans quelques MMT DB (D).

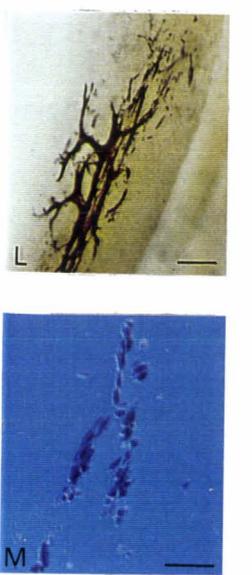
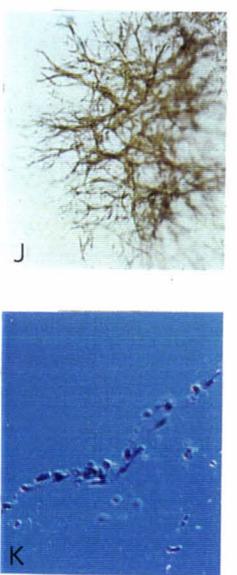
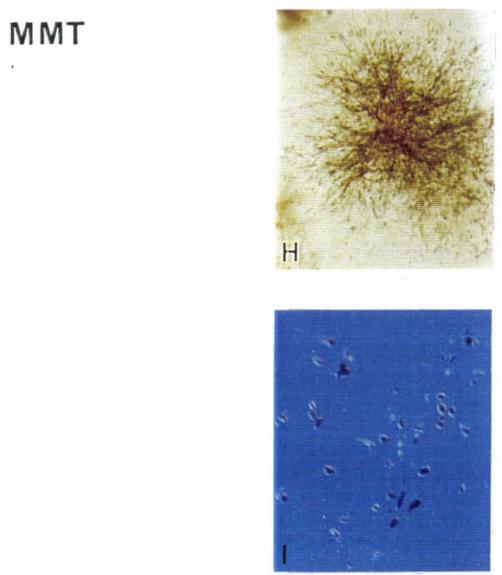
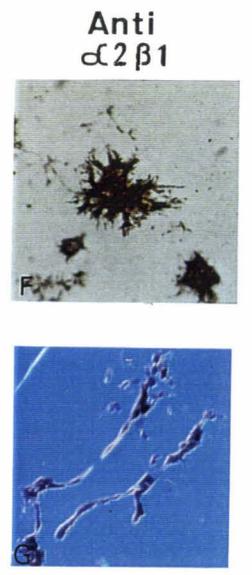
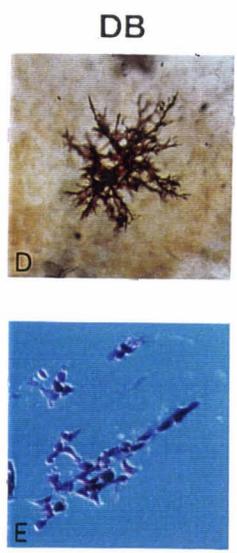
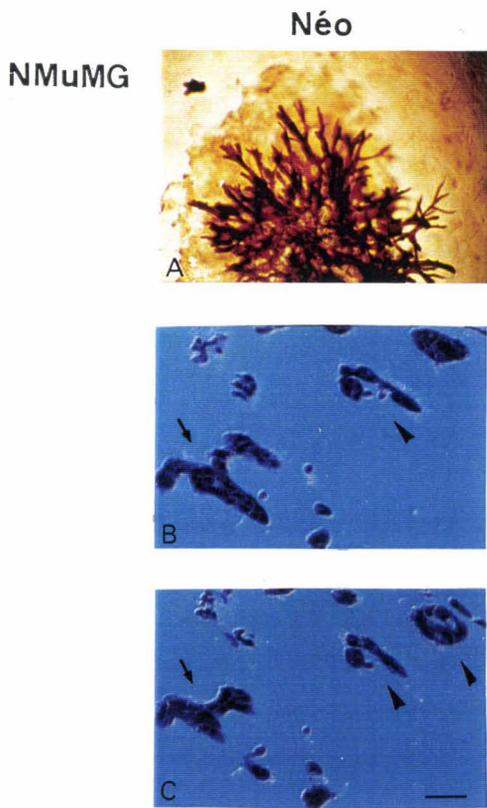
Les NMuMG Néo montre un signal intégrine $\beta 1$ dans de petits amas cellulaires indépendants E, flèche). Cette intégrine n'est pas du tout détectée dans les NMuMG DB (F). Le signal est présent un grand nombre de MMT Néo (G), mais devient extrêmement faible dans les MMT DB (H).

Fig. 28: Tests de morphogénèse des NMuMG et MMT traitées par un anticorps bloquant anti-intégrine $\alpha 2 \beta 1$, des NMuMG et MMT Néo et des NMuMG et MMT DB.

Les photographies A, B, C, H et I représentent les cellules Néo ; D, E, J et K les cellules DB ; F, G, L et M les cellules traitées par l'anticorps anti-intégrine $\alpha 2 \beta 1$. Les vues « *in toto* » A, D et F représentent les NMuMG ; H, J et L les MMT. Pour ces vues, la barre correspond à 100 μm . Les photographies de coupes B, C, E et G représentent les NMuMG ; I, K et M les MMT. Pour les vues B et C la barre correspond à 12,5 μm . Pour les vues E, G, I, K et M la barre correspond à 25 μm .

Les NMuMG Néo sont capables de s'organiser en tubes présentant des bourgeons terminaux (A). Des coupes sériées à travers ces cultures révèlent la présence de lumière (B, C, tête de flèche) à l'intérieur des tubes qui s'allongent (B, C, flèches). Les NMuMG DB constituent de petites amas cellulaires hérissés (D) dans lesquels les cellules s'alignent sans former de tubes (E). Les NMuMG sauvages traitées par l'anticorps montrent également ces structures hérissées constituées d'alignements de cellules (F et G).

Les MMT Néo forment des petites masses cellulaires (H) où des cellules isolées essaient vers la périphérie (I). Les MMT DB présentent des cordons cellulaires (J et K). Les MMT sauvages constituent aussi des cordons de cellules jointives (L et M).



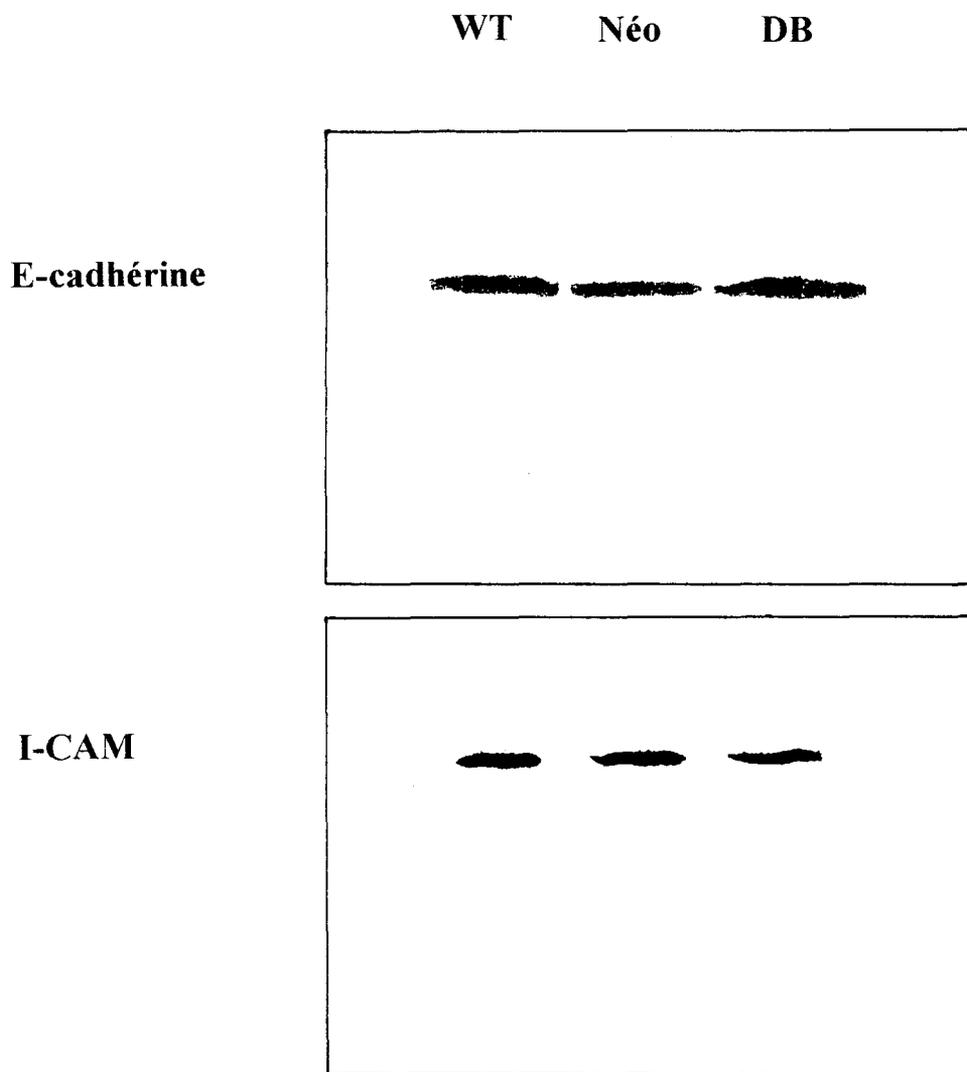


Fig. 29 : Détection par western blot de l'E-cadhérine et de l'ICAM dans les NMuMG.

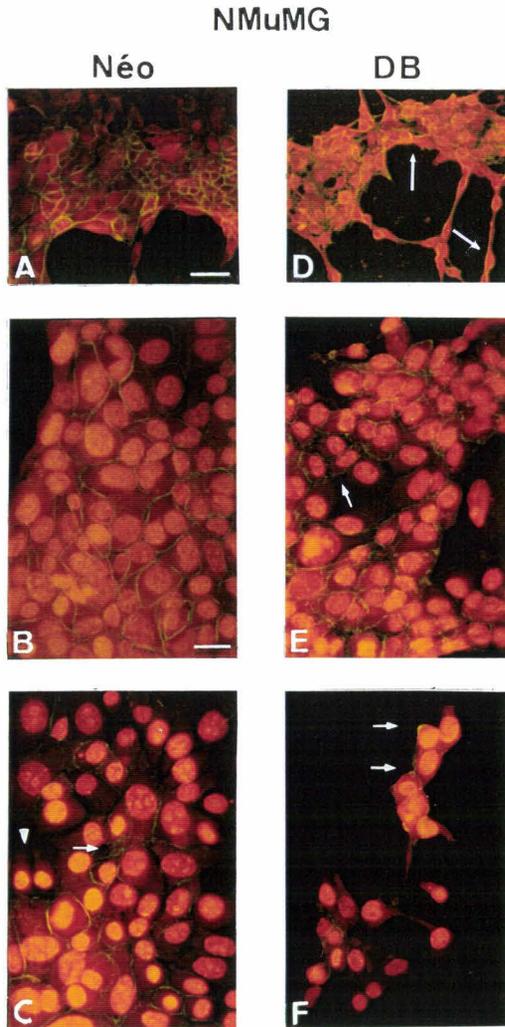


Fig. 30 : Répartition de l'E-cadhérine dans les NMuMG Néo et DB.

Les photographies A à C représentent les NMuMG Néo, D à F les NMuMG DB. Pour les vues A et D la barre correspond à 50 μm ; pour les vues, B, C, E et F elle correspond à 12,5 μm .

Le signal E-cadhérine délimite des contours nets dans les zones où les NMuMG Néo sont jointives (A), et forme un liseré continu (B). Dans les zones où ces cellules se séparent le marquage s'étire (C, flèche) puis disparaît quand les cellules sont isolées (C, tête de flèche). Un marquage irrégulier entoure les NMuMG DB et apparaît sous forme de petites plaques (D, flèches). Des accumulations discontinues d'E-cadhérine sont visibles à la périphérie des cellules qu'il y ait ou non contacts inter-cellulaires (E et F, flèches).

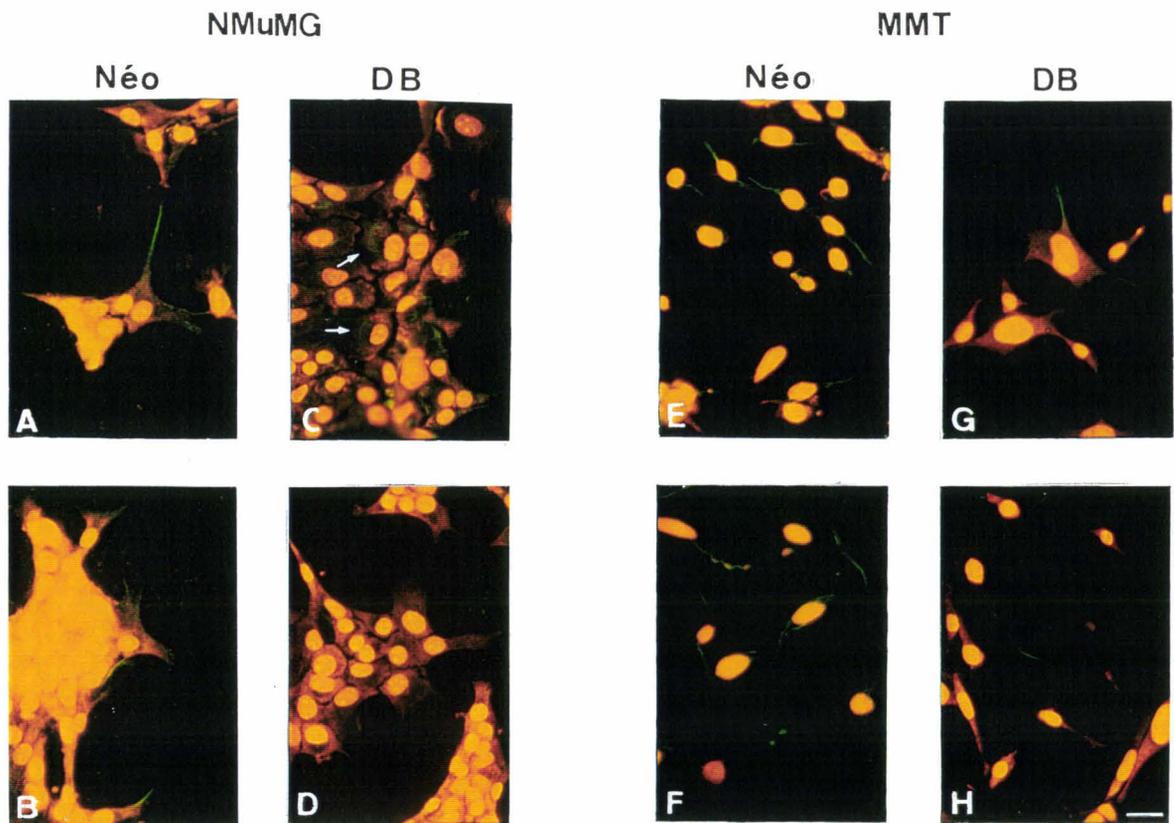


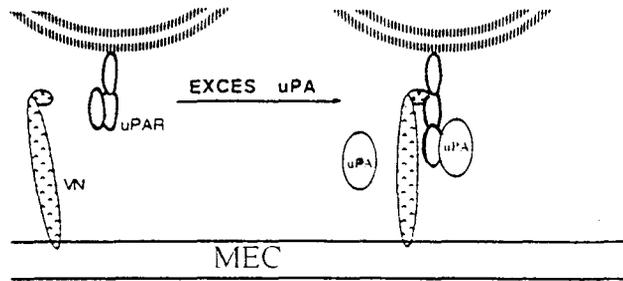
Fig. 31 : Répartition de la vimentine dans les cellules NMuMG Néo et DB et les MMT Néo et DB.

Les photographies A et B représentent les NMuMG Néo, C et D les NMuMG DB. Les photographies E et F représentent les MMT Néo, G et H les MMT DB. La barre correspond à 12,5 μm .

En ce qui concerne les NMuMG Néo, le signal vimentine apparaît dans les fins prolongements cellulaires (A) ainsi que dans les zones d'étalement du cytoplasme sur le substrat à la périphérie des cellules (B). La vimentine, dans les NMuMG DB, est présente dans des zones plus internes du cytoplasme (C, flèches) et n'est pas détectée dans les expansions cytoplasmiques (D). Les MMT Néo montrent un signal autour des noyaux qui se poursuit dans les prolongements cellulaires (E, F). Dans les MMT DB, la vimentine n'est plus détectée qu'à l'extrémités de ces prolongements (G, H).

DISCUSSION GENERALE

A



B

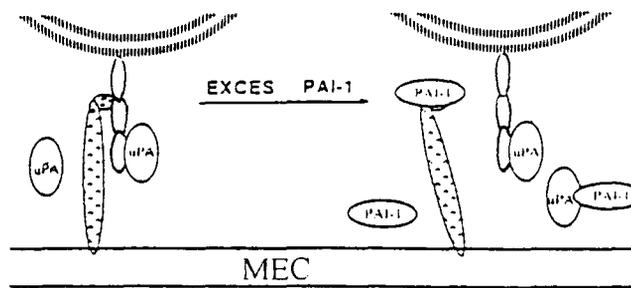


Fig. 32 : Modèle de régulation de l'adhésion cellulaire *via* le récepteur de l'uPA, et dépendant de l'équilibre entre la quantité d'uPA et de PAI-1.

VN : Vitronectine

D'après Deng et al., 1996.

Nos résultats indiquent donc que le rôle de *c-ets-1* dans la migration des cellules épithéliales mammaires est, au moins en partie, de réguler l'activation de l'uPA. Nous avons pu montrer que l'infection de ces cellules par le mutant dominant négatif de *c-ets-1* induit une baisse de la mobilité et de la morphogénèse, réduit la synthèse des intégrines $\alpha 2$ et $\beta 1$, et modifie la répartition des filaments de vimentine ainsi que l'organisation de l'E-cadhérine. Les différentes molécules étudiées entrent en jeu lors d'étapes distinctes de la migration: l'uPA participe à la **dégradation** de la matrice extracellulaire ce qui facilite l'infiltration des cellules, les intégrines sont responsables de l'**adhérence** à la MEC et permettent ainsi la progression des cellules sur un substrat adapté, le cytosquelette contribue à la **traction** de la cellule sur son support, l'E-cadhérine qui assure la cohésion des cellules peut s'opposer à la migration. Si ces éléments paraissent indépendants, ils correspondent en réalité à des mécanismes très intriqués et doivent alors faire l'objet de systèmes de régulation intégrés.

I UPA/ UPA-R ET PAI-1 : COMPÉTITEURS OU COLLABORATEURS ?

Le système uPA est impliqué dans la migration non seulement en induisant la protéolyse matricielle mais aussi en régulant l'adhérence des cellules à leur substrat et ceci indépendamment de son activité protéolytique.

Dans cette optique, l'**uPA-R** fonctionne comme un récepteur pour un ligand de la matrice : il est capable de se fixer à la vitronectine sur un site qui se superpose au site de fixation du PAI-1 (Deng et al., 1996), ce qui entraîne une compétition entre uPA-R et PAI-1 au niveau du site de fixation sur la vitronectine. Le déséquilibre de la balance uPA / PAI-1 vers l'un ou l'autre des composants peut influencer subtilement le comportement adhésif et/ou migratoire (Fig. 32).

L'excès d'**uPA** favorise la migration grâce à deux mécanismes. D'une part, il ouvre une brèche dans la matrice *via* l'activation de la plasmine qui dégrade le support matriciel, ce qui permet un détachement cellulaire ménagé (Waltz et al., 1997). D'autre part, en se fixant à son récepteur il induit une conformation de l'uPA-R propice à la liaison de l'uPAR sur la

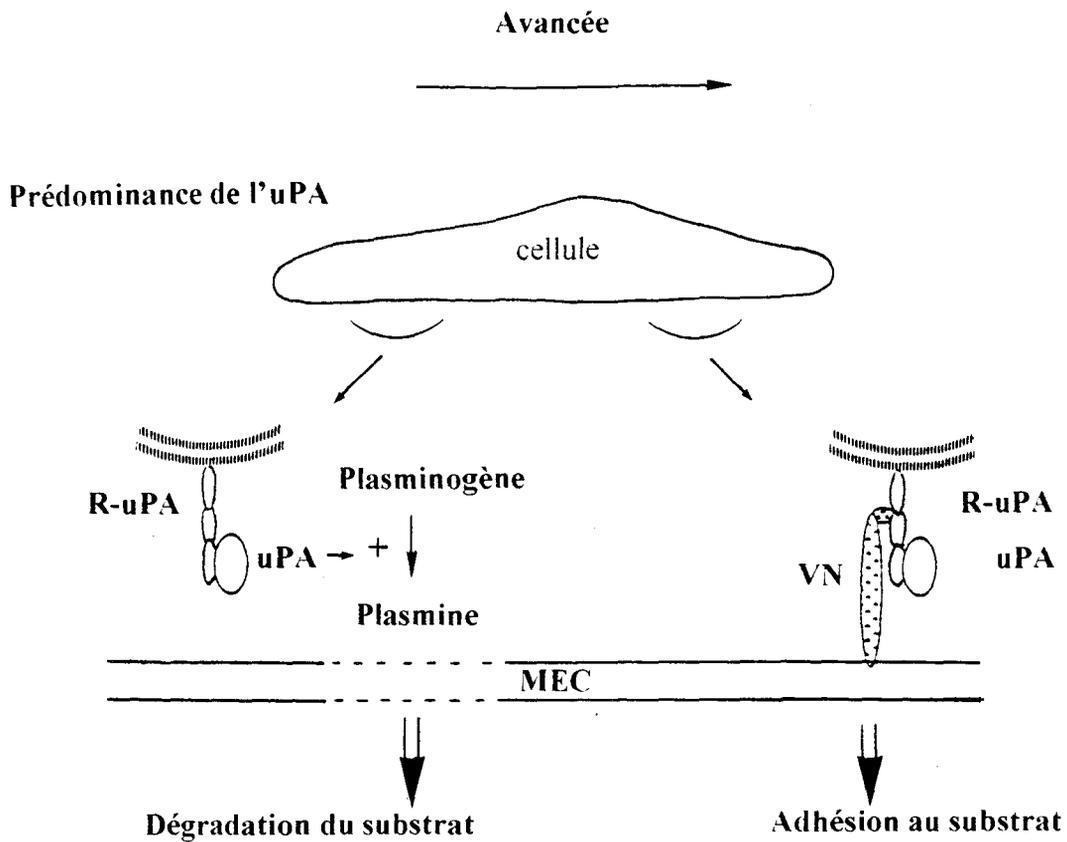


Fig. 33 : L'uPA stimule la migration en favorisant l'adhérence et la dégradation du substrat.

VN : Vitronectine

vitronectine, ce qui promeut l'adhérence cellulaire (Wei et al., 1994). Il a pu être montré que ces deux mécanismes se réalisent simultanément sur une même cellule mais à des localisations différentes de façon à potentialiser la migration cellulaire. L'adhérence est favorisée au niveau d'avancée de la cellule pour permettre sa traction, le détachement se réalise sur les parties postérieures (Fig. 33).

L'excès de **PAI-1** peut favoriser la migration cellulaire en limitant l'adhérence. En effet, le PAI-1 peut dissocier la liaison entre l'uPA-R et la vitronectine et ainsi favoriser le détachement des cellules de leur substrat (Fig. 32 b). D'autre part, l'internalisation de l'uPA-R complexé au PAI-1 élimine les possibilités d'interaction uPA-R-vitronectine et facilite le détachement de l'arrière de la cellule (Fig. 34). Après l'endocytose, l'uPA-R est recyclé vers le front d'avancée de la cellule pour permettre une nouvelle séquence de traction sur le substrat (pour revue Andreasen et al., 1997).

Inversement, le PAI-1 peut réduire la migration quand, en bloquant l'interaction des intégrine $\alpha v \beta 3$ à la vitronectine il inhibe largement l'adhérence (Kjoller et al., 1997; Stefansson et Lawrence, 1996) (Fig. 35). Bien entendu, le rôle d'inhibiteur de sérine protéase de PAI-1 promeut la persistance de la matrice qui se présente alors comme barrière physique à la migration.

II LA FIXATION UPA/UPA-R PEUT GENERER UN SIGNAL DE TRANSDUCTION MOTOGENE.

II.1. L'activité protéolytique de l'uPA n'est pas nécessaire à la signalisation de la migration.

Busso et al. (1994) ont montré que la liaison de l'uPA à l'uPA-R est capable de stimuler la migration de cellules épithéliales sans faire intervenir d'activité uPA. Franco et al. (1997), ont mis en évidence qu'une forme de l'uPA ne pouvant plus être phosphorylée sur deux de ses résidus sérine, peut encore se lier au récepteur mais abolit la mobilité de cellules de carcinomes humains. Ces différents résultats suggèrent que l'uPA initie par sa seule fixation à son récepteur, des signaux intracellulaires déclenchant une réponse migratoire.

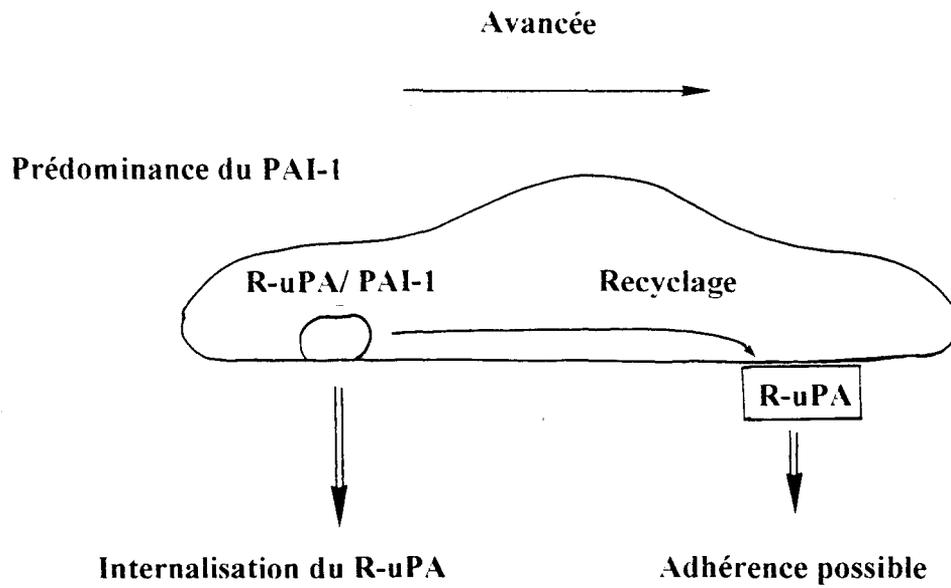


Fig. 34 : Le PAI-1 est un régulateur de la localisation du récepteur de l'uPA.

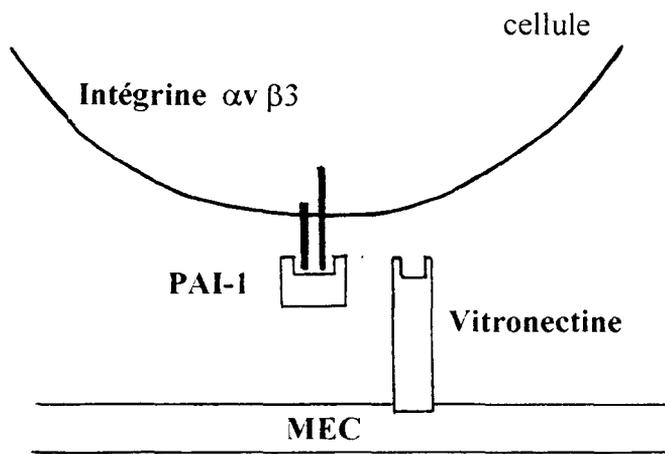


Fig. 35 : Le PAI-1 peut empêcher la fixation de la cellule à la vitronectine.

Il a effectivement été rapporté que la liaison entre un fragment amino terminal de l'uPA (ATF) dépourvu d'activité protéolytique, avec l'uPA-R stimule la mobilité de cellules épidermiques en même temps que la formation de diacylglycérol qui agit alors comme second messenger du signal motogène (Del Rosso et al., 1993). Il a été montré que la fixation de l'ATF à l'uPA-R induit la phosphorylation de la tyrosine kinase p56/ p59^{hck} de la famille de src, (Resnati et al. 1996) et que l'interaction uPA/uPA-R mènent à l'induction de c-fos, *via* la phosphorylation de protéines intermédiaires restant à identifier, dans des cellules de cancer ovarien (Dumler et al., 1994). Les expériences de Busso et al, (1994) indiquent que la migration induite par la fixation de l'uPA sur son récepteur provoque la phosphorylation des cytokératines 8 et 18 par une kinase identifiée comme la PKC ϵ .

II.2. Les intégrines constituent un relai dans la transduction du signal motogène.

Etant donné que le récepteur de l'uPA est attaché à la membrane par un domaine glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) et qu'il ne possède pas de domaine intra-cytoplasmique, la transmission du signal de migration vers l'intérieur de la cellule doit être relayée par l'association à une autre molécule.

L'observation de colocalisations indique la possibilité d'une association physique entre l'uPA-R et les intégrines. La présence d'uPA-R fixant l'uPA est détectée au niveau du front d'avancée des cellules en migration, sur les pseudopodes s'infiltrant dans la matrice au cours de tests d'invasion et aux sites d'adhérence focaux où s'accumulent les intégrines. Le domaine cytoplasmique de ces intégrines interagit avec les molécules du cytosquelette (Revue dans Vaheri et al, 1990; Bastholm et al., 1994; Clark and Brugge, 1995).

De plus, les fonctionnements des intégrines et du système uPA s'influencent mutuellement. Les voies de signalisation induites par les intégrines, telles que l'activation de GRB2 et des kinases de type ERK, induisent l'expression de l'uPA (Wary et al., 1996). L'association uPA/uPA-R est un prérequis à la migration dépendante de la fibronectine et transmise par l'intégrine $\alpha\beta 5$. Dans ce cas, l'uPA-R potentialise l'attachement à la vitronectine en partie réalisé par l'intégrine qui déclenche le signal de transduction (Yebra et al., 1996).

De nombreux travaux ont donc été consacrés aux aspects d'interaction uPA-R/ intégrines et à la transduction du signal à partir de l'association de ces molécules. Il a pu être montré que, lors d'expériences de gel filtration, les intégrines $\beta 2$ co-migrent avec l'uPA-R, qu'elles sont co-localisées avec l'uPA-R à la surface cellulaire et qu'elles peuvent se lier à l'uPA-R (Adreassen et al., 1997). La liaison des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ à leurs ligands entraîne l'association entre intégrine et uPA-R (Xue et al., 1997). L'interaction des domaines extra-cellulaires des intégrines et de l'uPA-R inhiberait de façon réversible la liaison intégrine-ligand et, le signal de migration issu de l'uPA-R emprunterait la voie de transduction des intégrines. Un mécanisme particulier mettant en jeu le complexe uPA-R/ intégrine $\beta 1$ /calvéoline a pu être décrit (Wei et al., 1996). La calvéoline, protéine membranaire, peut elle-même s'engager dans une voie de transduction propre en se liant à des molécules telles que les kinases de la famille src, les protéines G et shc (Li et al., 1996; Wary et al., 1996). L'intervention de la calvéoline dans ce complexe modulerait la fonction adhésive initiale des intégrines engagées en éliminant leur liaison avec le ligand et en induisant un signal de transduction propre à l'uPA-R.

La micro-organisation des divers partenaires reflète les différentes fonctions du système uPA qui sont apparues dans le mécanisme de migration. Le signal de transduction issu de l'interaction uPA/uPA-R et la régulation associée aux intégrines se réalisent au front d'avancée de la cellule. L'activation de la plasmine et la désorganisation des relations avec les molécules de la MEC a lieu dans les zones postérieures. Cette coopération favorise la progression des cellules sur leur substrat, la micro-répartition potentialise la migration.

II.3. Le cytosquelette est impliqué dans la transduction du signal motogène

Le récepteur de l'uPA, quand il est complexé à l'uPA, est également capable de transférer des forces mécaniques depuis la membrane jusqu'au cytosquelette.

Wang et al. (1995), considérant la colocalisation du complexe uPA/uPA-R, de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ et de la vinculine aux sites d'adhérence focaux, ont suggéré que l'intégrine $\alpha v \beta 3$ en couplant l'uPA-R au squelette intra-cellulaire transmet les signaux mécaniques

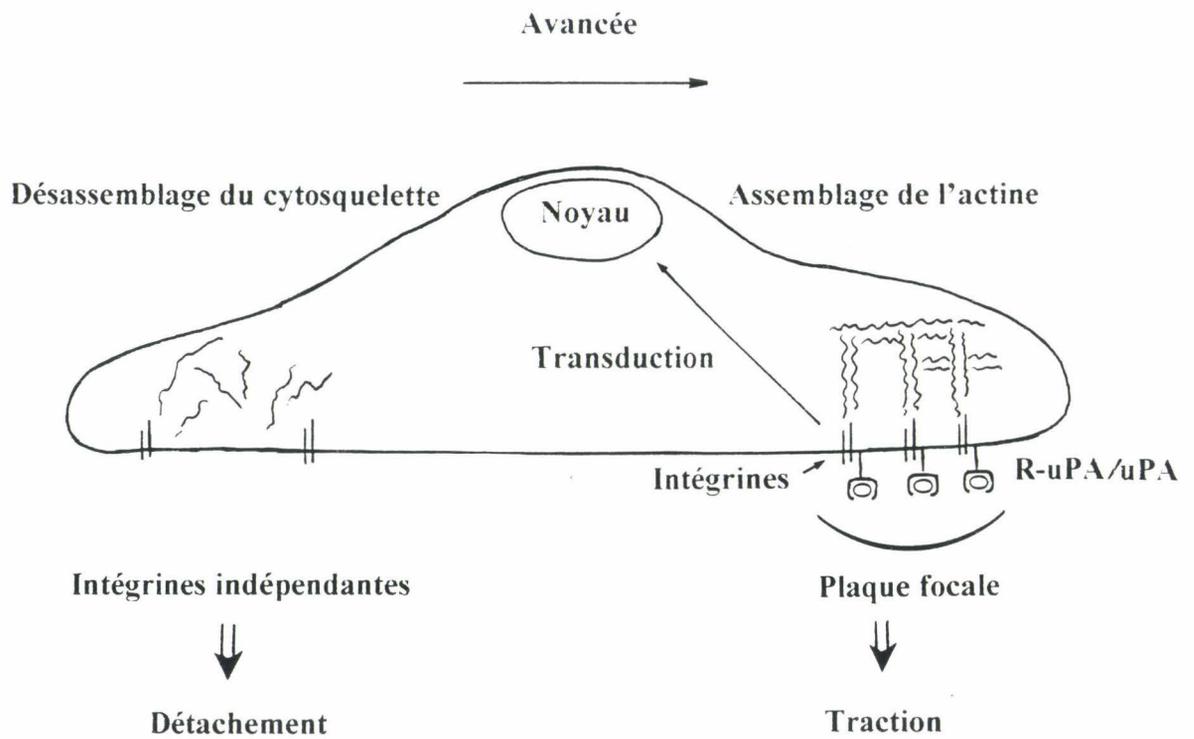


Fig. 36 : Le récepteur de l'uPA s'associe aux intégrines qui assurent le relais de la transduction et le couplage au cytosquelette.

d'ancrage et de migration. Bien sûr, ce rôle n'est pas restreint à cette intégrine. Nous l'avons vu précédemment, les intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$, capables de se lier à la fois à l'uPA-R et aux molécules du cytosquelette, sont aussi des candidats à la transmission de ce signal mécanique. C'est la réorganisation du cytosquelette couplée à une répartition précise des molécules d'adhérence qui va permettre la migration des cellules sur leur substrat (Fig. 36). Au niveau du front d'avancée des cellules, les intégrines, points d'ancrage au niveau des plaques focales, transmettent les signaux mécaniques de la surface jusqu'au cytosquelette et entraînent ainsi l'assemblage des filaments d'actine qui permet la traction cellulaire (Wang et al., 1993). Dans la partie postérieure de la cellule, les intégrines ne sont pas organisées en plaques focales et les molécules du cytosquelette subissent un désassemblage qui a pour conséquence le détachement de la zone postérieure (Revue dans Lauffenburger and Horwitz, 1996).

Si l'uPA-R est capable d'induire une réorganisation du cytosquelette, celui-ci peut également, en retour, stimuler la synthèse d'uPA. Cette boucle d'amplification favorise encore la migration. En effet, la destruction du cytosquelette accroît l'expression de l'uPA et du PAI-1 ce qui suggère que ces deux systèmes sont inter-connectés (Botteri et al., 1990 ; Higgins et al., 1994). Des études récentes indiquent que la réorganisation du cytosquelette provoquée par la cytochalasine D induit la cascade Ras/Raf puis une kinase de la famille ERK qui phosphoryle finalement c-Jun . Ce dernier pourrait alors participer à l'activation de la transcription de l'uPA (Irigoyen et al., 1997).

La cytokératine 8, qui appartient à la famille des filaments intermédiaires, a été identifiée comme une protéine fixant le plasminogène soit à la surface des cellules de cancer du sein soit sous forme libre *in vivo* et *in vitro* après avoir été relarguée par ces cellules. Dans les deux cas, cette fixation promeut l'activation du plasminogène (Hembrough et al., 1995 ; 1996). La cytokératine 8 a donc un double rôle dans la migration de ces cellules cancéreuses, comme molécule du cytosquelette et comme activateur du système plasmine.

Enfin, Frixen et Nagamine (1993) ont induit une désorganisation des filaments d'actine dans des cellules de cancer du sein après traitement par un anticorps décompactant anti-E-cadhérine. Ils observent alors un accroissement de l'expression, la synthèse et l'activité de l'uPA concomitante à l'augmentation de la capacité invasive *in vitro* de ces cellules. Cette étude

met en évidence les liens qui existent entre l'adhérence inter-cellulaire, les molécules du cytosquelette, et l'activité protéolytique dans la régulation du mécanisme de migration.

Enfin, si nous avons abordé, lors de notre étude, le rôle de l'uPA dans la migration cellulaire à travers l'aspect protéolytique, il est indéniable que d'autres mécanismes, s'interconnectent avec le « système uPA » au sens large et contribuent à la régulation de la mobilité cellulaire.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de nos travaux nous avons pu mettre en évidence l'expression de *c-ets-1* et de l'*uPA* lors de la morphogenèse de la glande mammaire dans le mésenchyme mais aussi dans l'épithélium de l'organe en formation. Nos résultats indiquent que des facteurs de la famille Ets peuvent favoriser la migration des cellules épithéliales mammaires *via* l'activation de l'*uPA*, et peuvent contribuer par ce biais à la tubulogenèse des cellules normales et l'invasion des cellules cancéreuses. Notre étude ouvre un champ d'investigations concernant l'implication des facteurs Ets dans la réorganisation de molécules impliquées dans l'adhérence cellulaire. Si le processus migratoire constitue un aspect important au cours du développement normal ou cancéreux de la glande mammaire, les dérives tumorales sont la conséquence de multiples mécanismes restant à explorer. Dans ce cadre, un faisceau de voies de recherche vise la régulation de la prolifération, de la migration mais aussi celle de la différenciation des cellules épithéliales mammaires. De façon intéressante, ce dernier aspect peut également concerner les protéines de la famille Ets. La synthèse de protéines du lait se réalise spécifiquement dans les cellules épithéliales mammaires lors d'étapes de différenciation. Or, un site Ets, a été décrit dans le promoteur de la protéine du petit lait (whey acidic protein: WAP). Ce site peut fixer des facteurs de la famille Ets, dont Ets-1, et sa présence est nécessaire à l'activation de la transcription du gène de la WAP au cours de la gestation (Welte et al., 1994; Mc Knight et al., 1995).

Les facteurs de transcription Ets sont donc actuellement impliqués dans deux types de mécanismes essentiels au développement de la glande mammaire, celui de la migration et celui de la différenciation. L'importance de ces facteurs comme régulateurs majeurs est également apparue lors de nos expériences. Il s'est avéré qu'après migration sur gel d'extraits protéiques totaux issus des cellules produisant ou non la protéine Ets1-DB, une simple coloration protéique du gel a mis en évidence la disparition et l'apparition de bandes différentes entre les NMuMG Néo et les NMuMG DB. Si la nature de ces protéines reste pour l'instant non identifiée, ces

données attestent que des changements majeurs dans la synthèse de protéines peuvent être induits par le dominant négatif de *c-ets-1*. L'identification de ces protéines par électrophorèse bidimensionnelle et l'analyse en spectrométrie de masse devrait permettre de compléter nos connaissances à la fois sur les molécules régulées directement ou indirectement par des facteurs Ets et sur les conséquences de ces régulations dans la migration et le fonctionnement global des cellules épithéliales mammaires.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS J.C. AND WATT F.M. (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* . **117**, 1183-1198.
- ADNANE J., GAUDRAY P., DIONNE C.A., CRUMLEY G., JAYE M., SCHLESSINGER J., JEANTEUR P., BIRNHAUM D. AND THEILLET C. (1991). *BEK* and *FLG*, two receptors to members of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancers. *Oncogene* . **6**, 659-663.
- AGGELER J., WARD J., MACKENZIE BLACKIE L., BARCELLOS-HOFF M.H., STREULI C.H. AND BISSELL M.J. (1991). Cytodifferentiation of mouse mammary epithelial cells cultured on a reconstituted basement membrane reveals striking similarities to development *in vivo*. *J. Cell .Sci* . **99**, 407-417.
- ALBAGLI O., KLAES A., FERREIRA E., LEPRINCE D. AND KLAMBT C. (1996). Function of ets genes is conserved between vertebrates and Drosophilia. *Mech. Dev.* **59**, 29-40.
- ALBELDA S. M., METTE S. A., ELDER D. E., STERWART R., DAMJANOVIGH L., HERLYN M. AND BUCK C. A. (1990). Integrin distribution in malignant melanoma: association of β 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res.* **50**, 6757-6764.
- ALBRECHTSEN R., NIELSEN M., WEWER U., ENGVALL E. AND RUOSHAHTI E. (1981). Basement membranes changes in breast cancer detected by immunohistochemical staining for laminin. *Cancer Res.* **41**, 5076-81.
- ALEXANDER C.M. AND WERB Z. (1989). Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Cur. Opin. Cell Biol.* **1**, 974-982.
- ALEXANDER C.M., HOWARD E.W., BISSELL M.J. AND WERB Z. (1996). Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinase I transgene. *J. Cell Biol.* **35**, 1669-1677.
- ALI S., EDERY M., PELLEGRINI I., LESUEUR L., PALY J., DJIANE J. AND KELLY P.A. (1992). The Nb2 form of prolactin receptor is able to activate a milk protein gene promoter. *Mol Endocrinol.* **6**, 1242-1248.
- AMOUYEL P., GEGONNE A.; DELACOURTE A., DEFOSSEZ P. A. AND STEHELIN D. (1988). Expression of Ets proto-oncogenes in astrocytes in human cortex. *Brain res.* **447**, 149-153.
- ANANDAPPA S.Y., WINSTANLEY J.H.R., LEINSTER S., GREEN B., RUDLAND P.S. AND BARRACLOUGH R. (1994). Comparative expression of fibroblast growth factor mRNAs in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer.* **69**, 772-776.
- ANDREASEN P.A., KJOLLER Lars, CHRISTENSEN L. AND DUFFY M.J. (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis : a review. *Int. J. Cancer.* **72**, 1-22.
- APPELLA E., ROBINSON E.A., ULLRICH S.J., STOPPELLI M.P., CORTI A., CASSANI G. AND BLASI F. (1987). The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of protease. *J. Biol. Chem.* **262**, 4437-4440.
- ARIHIRO K., INAI K., KURIHARA K., TAKEDA S., KHATUN N., KUROI K. AND TOGE T. (1993). A role of VLA-6 laminin receptor in invasion of breast carcinoma. *Acta Pathologica Japonica.* **43**, 662-669.
- ARRICK B.A., KORC M. AND DERYNCK R. (1990). Differential regulation of expression of three transforming growth factor β species in human breast cancer cell lines by estradiol. *Cancer Res.* **50**, 299-303.
- ARTEAGA C.L, TANDON A.K, VON HOFF D.D. AND OSBORNE C.K. (1988). Transforming growth factor β : potential autocrine growth inhibitor of estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Cancer Res.* **48**, 3898-3904.
- ASCIONE R.; THOMPSON D. M., THOMAS R., PANAYIOTAKIS A., RAMSAY R., TYMMS M., KOLA I. AND SETH A. (1992). Influence of nucleotides flanking the GGAA core sequence on ets-1 and ets-2 DNA-binding activity and the mechanisms of ets-1 atoregulation. *Intren. J. of Onc.* **1**, 631-637.
- BACHARACH E., ITIN A. AND KESHET E. (1992). *In vivo* patterns of expression of urokinase and its inhibitor PAI-1 suggest a concerned role in regulating physiological angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 10686-10690.
- BAE S.N., ARAND G., AZZAM H., PAVASANT P., TORRI J., FRANDSEN T.L. AND THOMPSON E.W. (1993). Molecular and cellular analysis of basement membrane invasion by human breast cancer cells in Matrigel-based *in vitro* assays. *Breast Cancer Research and Treatment.* **24**, 241-255.
- BAERT J. L., MONTE D., MUSGROVE E.; ALBAGLI O.; SUTHERLAND R. AND DE LAUNOIT Y. (1997). Expression of the PEA-3 group of Ets-related transcription factors in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer.* **70**, 590-597.
- BAILLY R. A., BOSSELUT R., ZUCMAN J., CORMIER F., DELATTRE O., ROUSSEL M., THOMAS G. AND GHYSDAEL J. (1994). DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11; 22) translocation in Ewing sarcoma. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3230-3241.

- BALLIN M., MACKAY A. R., HARTZLER J. L., NASON A., PELINA M. D. AND THORGEIRSSON U. P. (1991). Ras levels and metalloproteinase activity in normal versus neoplastic rat mammary tissues. *Clin. Exp. Metastasis*. **9**, 179-189.
- BARCELLOS-HOFF M.H., AGGELER J., RAM T.G. AND BISSELL M.J. (1989). Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development*. **105**, 223-235.
- BARRACLOUGH R., FERNIG D.G., RUDLAND P.S. AND SMITH J.A. (1990). Synthesis of basic fibroblast growth factor upon differentiation of rat mammary epithelial to myoepithelial-like cells in culture. *J Cell Physiol*. **144**, 333-344.
- BASSET P., BELLOCQ J.P., WOLF C., STOLL I., HUTIN P., LIMACHER J. M., PODHAJECER O. L., CHENARD M.P., RIO M. C. AND CHAMBON P. (1990). A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*. **34**, 699-704.
- BASSUK A. G. AND LEIDEN J. M. (1995). A direct physical association between Ets and AP-1 transcription factors in normal human T-cells. *Immunity*. **3**, 223-237.
- BASTHOLM L., NIELSEN M.H., De MEY J., DANO K., BRUNNER N., HOYER-HANSEN G., RONNE E. AND ELLING F. (1994). Confocal fluorescence microscopy of urokinase plasminogen activator receptor and cathepsin D in human MDA-MB-231 breast cancer cells migrating in reconstituted basement membrane. *Biotechnic & histochemistry*. **69**, 61-67.
- BASUYAUX J.P., FERREIRA E., STEHELIN D. AND BUTTICE G. (1997). The Ets transcription factors interact with each other and with the c-Fos/c-Jun complex via distinct protein domains in a DNA-dependent and -independent manner. *J. Biol. Chem*. **272**, 26188-26195.
- BECQUEMONT L., NGUYEN G., PERALDI M.N., HE C.J., SRAER J.D. AND RONDEAU E. (1994). Expression of plasminogen/plasmin receptors on human glomerular epithelial cells. *Renal Fluid Electrolyte Physiol*. **36**, F303-F310.
- BEHRENS J. (1993). The role of cell adhesion molecules in cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.Treat*. **24**, 175-184.
- BEN-DAVID Y., GIDDENS E. B. AND BERNSTEIN A. (1990). Identification and mapping of common viral integration site Fli-1 in erythroleukemia cells by Friend murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 1332-1336.
- BEN-DAVID Y., GIDDENS E. B., LETWIN K. AND BERNSTEIN A. (1991). Erythroleukemia induction by Friend murine leukemia virus: insertional activation of a new member of the ets-1 gene family, fli-1, closely linked to ets-1. *Gene Dev*. **5**, 908-918.
- BEN-ZE'EV A. (1997). Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. *Current Opinion in Cell Biology*. **9**, 99-108.
- BENNETT D.C. (1980). Morphogenesis of branching tubules in cultures of cloned mammary epithelial cells. *Nature*. **285**, 657-659.
- BENSON J.R. AND BAUM M. (1994). Transforming growth factor β isoforms in breast cancer. *Br J Cancer*. **70**, 1278.
- BERDICHEVSKY F., ALFORD D., D'SOUZA B. AND TAYLOR-PAPADIMITRIOU J. AND (1994). Branching morphogenesis of human mammary epithelial cells in collagen gels. *J. Cell Sci*. **107**, 3557-3568.
- BERDICHEVSKY F., GILBERT C. AND TAYLOR-PAPADIMITRIOU J. (1992). Collagen-induced rapid morphogenesis of human mammary epithelial cells : the role of $\alpha 2\beta 1$ integrin. *J. Cell Sci*. **102**, 437-446.
- BERGSTRAESSER L.M. AND WEITZMAN S.A. (1994). Alteration in integrin and basement membrane protein expression by malignant breast cells. *International Journal of Oncology*. **4**, 915-930.
- BERNSTEIN L., ROSS R.K. AND PIKE M.C. (1990). Hormone levels in older women : a study of post-menopausal breast cancer patients and healthy population controls. *Brit. J. Cancer*. **61**, 298-302.
- BERTHON P., PANCINO G., DE CREMOUX P., ROSETO, A., GESPACH C. AND CALVO F. (1992). Characterization of normal breast epithelial cells in primary cultures: differentiation and growth factor receptors studies. *In Vitro Cell. Dev. Biol*. **28 A**, 716-724.
- BERX G., CLETON-JANSEN A.M., STRUMANE K., De LEEUW W.J.F., NOLLET F., VAN ROY F. AND CORNELISSE C. (1996). E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancer by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene*. **13**, 1919-1925.
- BESSER D., PRESTA M. AND NAGAMINE Y. (1995). Elucidation of a signaling pathway induced by FGF-2 leading to uPA gene expression in NIH-3T3 fibroblasts. *Cell Growth Differ*. **6**, 1009-1017.
- BESSER D., BARDELLI A., DIDICHENKO S., THELEN M., COMOGLIO P.M., PONZETTO C. AND NAGAMINE Y. (1997). Regulation of the urokinase-type plasminogen activator gene by the oncogene Trp-Met involves GRB2. *Oncogene*, **14**, 705-711.

- BEUG H., LEUTZ A., KAHN P. AND GRAFT T. (1984). Ts mutant of E26 leukemia virus allow transformed myeloblasts, but not erythroblasts or fibroblasts, to differentiate at the non permissive temperature. *Cell*. 39, 579-588.
- BHAT N.K., KOMSCHLIES K. L., FUJIWARA S., FISCHER R. J., MATHEISON B. J., GEGORIO T. A., YOUND H. A., KASIK J. W., OZATO K. AND PAPAS T. (1989). Expression of ets genes in mouse thymocytes subsets and T-cells. *J. Immun.* 142, 172-178.
- BHAT N.K., THOMPSON C. B., LINDSTEN T., JUNE C., FUJIWARA S., KOIZUMI S., FISCHER R. J. AND PAPAS T. (1990). Reciprocal expression of human ets-1 and ets-2 genes during T-cell activation: regulatory role of the proto-oncogene ets-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3723-3727.
- BHAT N.K., FISCHINGER P.J., SETH A., WATSON D.K. AND PAPAS T. (1996). Pleiotropic functions of ETS-1. *Int. J. Oncol.* 8, 841-846.
- BIDDLE D. AND SPANAU D.F. (1996). Expression of vimentin in cultured human keratinocytes is associated with cell - extracellular matrix junctions. *Arch. Dermatol. Res.* 288, 621-624.
- BISSELL M. AND HALL G. (1987). Form and fonction in the mammary gland: the role of extracellular matrix. *In: The Mammary Gland* (Neville M, Daniel C, eds) Plenum Press, New York, 97-146.
- BLOCK K.L. AND PONCZ M. (1995). Platelet glycoprotein IIb gene expression as a model of megakaryocyte-specific expression. *Stem Cells.* 13, 135-145.
- BOLON I., GOUYER V., DEVOUASSOUX M., VANDENBUNDER B., WERNERT N., MORO D., BRAMBILLA C. AND BRAMBILLA E. (1995). Expression of c-ets-1, collagenase 1, and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas. *Am. J. Pathol.* 147, 1298-1310.
- BORIES J. C., WILLERFORD D. M., GREVIN D., DAVIDSON L., CAMUS A., MARTIN P., STEHELIN D. AND ALT F. W. (1995). Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of ets-1 prto-oncogene. *Nature.* 377, 635-638.
- BOSELUT R., DUVAL J.F., GEGONNE A., BAILLY M., HÉMAR A., BRADY J. AND GHYSDAEL J. (1990). The product of c-ets-1 proto-oncogene and the related c-ets-1 protein act as transcriptional activators of the long terminal repeat of human T cell leukemia virus HTLV-1. *EMBO J.* 9, 3315-3322.
- BOTTERI F. M., BALLMER-HOFER K., KAJPUT B. AND NAGAMINE Y. (1990). Disruption of cytoskeletal structures results in the induction of the urokinase-type plasminogen activator gene expression. *J. Biol. Chem.* 265, 13327-13334.
- BOTTINGER C.S., SHELLEY C.S., FAROKHZAD O.C. AND ARNAOUT M.A. (1994). The human $\beta 2$ integrin CD18 promoter consists of two inverted Ets cis elements. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2604-2615.
- BOULUKOS K. E., POGNONEC P., RABAULT B., BEGUE A. AND GHYSDAEL J. (1989). Definition of an Ets-1 protein domain required for nuclear localization in cells and DNA-binding *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5718-5721.
- BOYLE W. J., LAMPERT M. A., LIPSICK J. S. AND BALUDA M. A. (1984). Avian myeloblastosis virus nd E26 virus oncogene products are nuclear proteins. *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* 81, 4265-4269.
- BRAUN B. S., FRIEDEN R., LESSNICK S. L., MAY W. AND DENNY C. T. (1995). Identification of target genes for the Ewing's sarcoma EWS/FLI fusion protein by representational difference analysis. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4623-4630.
- BRENNAN R.G. (1993). The winged-helix DNA binding motif : another helix-turn-helix take off. *Cell.* 74, 773-776.
- BRINKMANN V., FOROUTAN H., SACHS M., WEIDNER K.M. AND BIRCHMEIER W. (1995). Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells. *J Cell Biol.* 131, 1573-1586.
- BROWN P.D., BLOXIDGE R.E., ANDERSON E. AND HOWELL A. (1993). Expression of activated gelatinase in human invasion breast carcinoma. *Clin Exp. Metastasis.* 11, 183-189.
- BUISSON A.C., GILLES C., POLETTE M., ZAHM J.M., BIREMBAUT P. AND TOURNIER J.M. (1996). Wound repair-induced expression of a stromelysins is associated with the acquisition of a mesenchymal phenotype in human respiratory epithelial cells. *Lab. Invest.* 74, 658-669.
- BUGGE T. H., KOMBRINCK K. W., FLICK M. J., DAUGHERTY C. C., DANTON M. J. AND DEGEN J. L. (1996). Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen defficiency. *Cell.* 87, 709-719.
- BUJIA J., BEHREND S., ROTTER N., PITZKE P., WILMES E. AND HAMMER C. (1996). Expression of ICAM-1 on intact cartilage and isolated chondrocytes. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Animal.* 32, 116-122.
- BUSSO N., HUARTE J., VASSALLI J.D., SAPPINO A.P. AND BELIN D. (1989). Plasminogen activators in the mouse mammary gland : decreased expression during lactation. *J Biol Chem.* 13, 7455-7457.

- BUSSO N., MASUR S.K., LAZEGA D., WAXMAN S. AND OSSOWSKI L. (1994). Induction of cell migration by pro-urokinase binding to its receptor : possible mechanism for signal transduction in human epithelial cells. *J. Cell Biol.* **126**, 259-270.
- BUTTICE G., DUTERQUE-COQUILLAUD M., BASUYAUX J.P., CARRERE S., KURKINEN M. AND STEHELIN D. (1996). Erg, an Ets-family member, differentially regulates human collagenase 1 (MMP1) and stromelysin 1 (MMP3) gene expression by physically interacting with the Fos/Jun complex. *Oncogene*. **13**, 2297-2307.
- BYATT J.C., EPPARD P.J., VEENHUIZEN J.J., CURRAN T.L., CURRAN D.F., MCGRATH M.F. AND COLLIER R.J. (1994). Stimulation of mammaryogenesis and lactogenesis by recombinant bovine placental lactogen in steroid-primed dairy heifers. *J Endocrinol.* **140**, 33-73.
- BYERS S., PARK M., SOMMERS C. AND SESLAR S. (1994). Breast carcinoma : a collective disorder. *Breast Canc Res Treat.* **31**, 203-215.
- CARME LIET P., SCHOONJANS L., KIECKENS L., REAM B., DEGEN J., BRONSON R., DE VOS R., VAN DEN OORD J.J., COLLEN D. AND MULLIGAN R.C. (1994). Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature*. **368**, 419-424.
- CHARPIN C., GARCIA S., BOUVIER C., DEVICTOR B., ANDRAC L., CHOUX R. AND LAVAUT M. (1997). E-cadherin quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas. *Journal of Pathology*. **181**, 294-300.
- CHEN J. H. (1985). The proto-oncogene c-ets-1 is preferentially expressed in lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 2993-3000.
- CHEN J. H. (1988). Complementary DNA clones of chicken proto-oncogene c-ets : sequence divergence from the viral oncogene v-ets. *Onc. Res.* **2**, 371-384.
- CHEN J. H. (1990). Cloning and sequencing of mouse c-ets-1 cDNA in baculovirus expression system. *Oncogene res.* **5**, 277-285.
- CHEN J. H., JEHA S. AND OKA T. (1993). Negative regulatory elements in the human Ets-1 gene promoter. *Oncogene*. **8**, 133-139.
- CHEN J.H., VERCAMER C., LI Z., PAULIN D., VANDENBUNDER B. AND STEHELIN D. (1996). PEA3 transactivates vimentin promoter in mammary epithelial and tumor cells. *Oncogene*. **13**, 1667-1675.
- CHINOT O., MURACCIOLE X. ET ROMAIN S. (1996). Les Protéases: cancer du sein 20 ans de progrès. *Tome 1 : Biologie du cancer du sein progrès récents*. R. Poulenc, Bellon.
- CHIQUET-EHRISMAN R., KALLA P. AND PEARSON C.A. (1989). Participation of tenascin and transforming growth factor- β in reciprocal epithelial-mesenchymal interactions of MCF-7 cells and fibroblasts. *Cancer Res.* **49**, 4322-4325.
- CHIQUET-EHRISMAN R., MACKIES E.J., PEARSON C.A. AND SAKAKURA T. (1986). Tenascin : an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell*. **47**, 131-139.
- CHOTTEAU-LELIEVRE, A., DESBIENS, X., PELCZAR, H., DEFOSSEZ, P. A., AND DE, L. Y. (1997). Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development. *Oncogene* **15**, 937-952.
- CHRISTENSEN L., WIBORG SIMONSEN A.C., HEEGAARD C.W., MOESTRUP S.K., ANDERSEN J.A. AND ANDREASEN P.A. (1996). Immunohistochemical localization of urokinase-type plasminogen activator, type-1 plasminogen-activator inhibitor, urokinase receptor and α 2-macroglobulin receptor in human breast carcinomas. *Int. J. Cancer*. **66**, 441-452.
- CLARK E.A. AND BRUGGE J.S. (1995). Integrins and signal transduction pathways : the road taken. *Science*, **268**, 233-239.
- CLARKE A.S., LOTZ M.M., CHAO C. AND MERCURIO A.M. (1995). Activation of the p21 pathway of growth arrest and apoptosis by the β 4 integrin cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* **270**, 22673-22676.
- CLAVEL C., CHAVANEL G. AND BIREMBAUT P. (1986). Detection of the plasmin system in human mammary pathology using immunofluorescence. *Cancer Res.* **46**, 5743-7.
- COLEMAN S., SILBERSTEIN G.B. AND DANIEL C.W. (1988). Ductal morphogenesis in the mouse mammary gland: evidence supporting a role for epidermal growth factor. *Dev Biol.* **127**, 304-315.
- COLEMAN-KRNACIK S. AND ROSEN E.M. (1994). Differential temporal and spatial gene expression of fibroblast growth factor family members during mouse mammary gland development. *Mol Endocrinol.* **8**, 218-229.
- CREPIEUX P., LEPRINCE D., FLOURENS A., ALBAGLI O., FERREIRA E. AND STEHELIN D. (1993). The two functionally distinct amino termini of chicken c-ets-1 products arise from alternative promoter usage. *Gene Expression*. **3**, 215-225.
- COUCKE P., DE LEVAL L., LEYH P., BONJEAN K., SIWEK B., NOEL A., De PAUW-GILLET M.CI., PAULUS J.M., BASSLEER R. AND FOIDART J.M. (1992). Influence of laminin or fibroblasts upon colony formation in the mouse by B 16 melanoma cell spheroids : a morphometric analysis. *In vivo*. **6**, 119-124.

- COWIE A.T., HARTMANN P.E. AND TURVEY A. (1969). The maintenance of lactation in the rabbit after hypophysectomy. *J Endocrinol.* **43**, 651-662.
- CYBULSKY M. I., ALLAN-MOTAMED M. AND COLLINS T. (1993). Structure of the murine VCAM1 gene. *Genomics.* **18**, 387-391.
- DAMSKY C.H. AND WERB Z. (1992). Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix : cooperative processing of extracellular information. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **4**, 772-781.
- DANIEL C.W., BERGER J.J., STRICKLANG P. AND GARCIA R. (1984). Similar growth patterns of mouse mammary cells cultivated in collagen matrix *in vivo* and *in vitro*. *Dev Biol.* **104**, 57-64.
- DANIEL C.W. AND SILBERSTEIN G.B. (1987). Postnatal development of the rodent mammary gland. *In: The Mammary Gland* (Neville M, Daniel C, eds) Plenum Press, New York, 03-36.
- DANIEL C.W., SILBERSTEIN G.B., VAN HORN K., STRICKLAND P. AND ROBINSON S. (1989). TGF β 1-induced inhibition of mouse ductal growth : developmental specificity and characterization. *Dev Biol.* **135**, 20-30.
- DANIEL C.W. AND ROBINSON S.D. (1992). Regulation of mammary growth and function by TGF- β . *Mol Reprod Dev* **32**, 145-151.
- DANIEL C.W., STRICKLAND P. AND FRIEDMANN Y. (1995). Expression and functional role of E- and P-cadherins in mouse mammary ductal morphogenesis and growth. *Dev. Biol.* **169**, 511-519.
- DANO K., BEHRENDT N., BRUNNER N., ELLIS V., PLOUG M. AND PYKE C. (1994). The urokinase receptor. Protein structure and role in plasminogen activation and cancer invasion. *Fibrinolysis.* **8**, 189-203.
- DELANNOY-COURDENT A., FAUQUETTE W., DONG-LE BOURHIS X., BOILLY B., VANDENBUNDER B. AND DESBIENS X. (1996). Expression of *c-ETS-1* and *uPA* genes is associated with mammary epithelial cell tubulogenesis or neoplastic scattering. *Int J Dev Biol.* **40**, 1097-1108.
- DELATTRE O., ZUCMAN J., PLOUGASTEL B., DESMAZE, C., MELOT T., PETRE M., KOVAR H., JOUBERT I., DE JONG P., ROULEAU G., AURIAS A. AND TOMAS G. (1992). Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumors. *Nature.* **359**, 162-165.
- DELEHEDDE M., DEUDON E., BOILLY B. AND HONDERMARCK H. (1996). Heparan sulfate proteoglycans play a dual role in regulating fibroblast growth factor-2 mitogenic activity. *Exp Cell Res.* **229**, 398-406.
- DELEHEDDE M., DEUDON E., BOILLY B. AND HONDERMARCK H. (1997). Production of sulfated proteoglycans by human breast cancer cell lines. Binding to Fibroblast Growth Factor-2. *J Cell Biochem.* **64**, 605-617.
- DELGADO M. D., HALLIER M., MENECOEUR T., TAVITIAN A. AND MOREAU-GACHELIN F. (1994). Inhibition of Friend cells proliferation by spi-1 antisense nucleotides. *Oncogene.* **9**, 1723-1727.
- DEL ROSSO M., ANICHINI E., PEDERSEN N., BLASI F., FIBBI G., PUCCI M. AND RUGGIERO M. (1993). Urokinase-urokinase receptor interaction : non-mitogenic signal transduction in human epidermal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 347-352.
- DENG G., CURRIDEN S.A., WANG S., ROSENBERG S. AND LOSKUTOFF D.J. (1996). Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release. *J. Cell. Biol.* **134**, 1563-1571.
- DESBIENS X., QUEVA C., JAFFREDO T., STEHELIN D. AND VANDENBUNDER B. (1991). The relationship between cell proliferation and the transcription of the nuclear oncogenes *c-myc*, *c-myb* and *c-ets-1* during feather morphogenesis in the chick embryo. *Development.* **111**, 699-713.
- DE TAISNE C., GEGONNE A., STEHELIN D., BERNHEIM A. AND BERGER R. (1984). Chromosomal localization of the human proto-oncogene *c-ets*. *Nature.* **310**, 581-583.
- DIAZ M. O., LE BEAU M.M., PITHA P., AND ROWLEY J.D. (1986). Interfeon and *c-ets-1* genes in the translocation (9; 11) (p22; q23) in human acute monocytic leukemia. *Science.* **231**, 265-267.
- DIB A., ADELAIDE J., COURJAL F., COURSEAUX A., JACQUEMIER J., GAUDRAY P., THEILLET C., PEBUSQUE M.J. AND BIRNBAUM D. (1994). Co-amplification in human breast tumors and physical linkage at chromosomal band 12p13, of CCND2 and FGF6 genes. *Int J Oncol.* **5**, 1375-1378.
- DICKSON S.R. AND WARBURTON M.J. (1992). Enhanced synthesis of gelatinase and stromelysin by myoepithelial cells during involution of the rat mammary gland. *J Histochem Cytochem.* **40**, 697-703.
- DOMAGALA W., LESZEK W., LASOTA J., WEBER K. AND OSBORN M. (1990). Vimentin is preferentially expressed in high-grade ductal and medullary, but not in lobular breast carcinomas. *Am. J. Pathol.* **137**, 1059-1064.

- DOMENGET C., LEPRINCE D., PAIN B., PEYROL S., LI R.P., STEHELIN D., SAMARUT J. AND JURDIC P. (1992). The various domain of v-myb and v-ets oncogenes of E26 retrovirus contribute differently, but cooperatively, in transformation of hematopoietic lineages. *Oncogene*. **7**, 2231-2241.
- DONAHUE J.P., SUGG N. AND HAWIGER J. (1994). The integrin αv gene identification and characterization of the promoter region. *Biochim. Biophys. Acta*. **1219**, 226-232.
- DONALDSON L.W., PETERSEN J.M., GRAVES B.J. AND McINTOSH L.P. (1994). Secondary structure of the ETS domain places murine Ets-1 in the superfamily of winged helix-turn-helix DNA-binding proteins. *Biochem*. **33**, 13509-13516.
- DONALDSON L.W., PETERSEN J.M., GRAVES B.J. AND McINTOSH L.P. (1996). Solution structure of the ETS domain from murine Ets-1 : a winged helix-turn-helix DNA-binding motif. *EMBO J*. **15**, 125-134.
- D'SOUZA B. AND TAYLOR-PAPADIMITRIOU J. (1994). Overexpression of erb-B2 in human mammary epithelial cells signals inhibition of transcription of the E-cadherin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 7202-7206.
- DUMLER I, PETRI T. AND SCHLEUNING W. D. (1994). Induction of c-fos gene expression by urokinase-type plasminogen activator in human ovarian cancer cells. *FEBS. Lett*. **343**, 103-106.
- DUTERQUE-CIQUILLAUD M., LEPRINCE D., FLOURENS A., HENRY C., GHYSDAEL J., DEBUIRE B. AND STEHELIN D. (1988). Cloning and expression of chicken p54 ^{c-ets1} coding exon is located into the 40,0 kbp genomic domain unrelated to v-ets. *Oncogene Res*. **2**, 335-344.
- EL YAZIDI I. AND BOILLY-MARER Y. (1995). Production of acidic and basic fibroblast growth factor by the hormone-independent breast cancer cell line MDA-MB-231. *Anticancer Res*. **15**, 1-8.
- ELLIS V., BEHRENDT N. AND DANO K. (1991). Plasminogen activation by receptor bound urokinase. *J. Biol. Chem*. **266**, 12752-12758.
- EMERMAN J.T. AND PITELKA D.R. (1977). Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. *In vitro*. **13**, 316-328.
- ERNST P., KAHM K., AND SMALE S.T. (1993). Both Lyf-1 and Ets protein interact with a critical promoter element in the murine terminal transferase gene. *Mol. Cell. Biol*. **13**, 2982-2992.
- ESPIE M. ET GORINS A. (1995). Le sein. ESKA ed. Paris.
- ESCOT C., ZHAO Y., PUECH C. AND ROCHEFORT H. (1996). Cellular localisation by *in situ* hybridisation of cathepsin D, stromelysin 3, and urokinase plasminogen activator in breast cancer. *Breast cancer Research and Treatment*. **38**, 217-226.
- FAFEUR, V., TULASNE, D., QUEVA, C., VERCAMER, C., DIMSTER, V., MATTOT, V., STEHELIN, D., DESBIENS, X., AND VANDENBUNDER, B. (1997). The Ets1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter-factor stimulated MDCK epithelial cells. *Cell Growth and Differ*. **8**, 655-665.
- FERRIER P., KRIPPL B., BLACKWELL T. K., FURLEY A. J., SUH H., WINOTO A., COOK W. D., HOOD L., COSTANTINI F. AND ALT F. W. (1990). Separate elements control DJ and VDJ rearrangement in a transgenic recombination substrate. *EMBO J*. **9**, 117-125.
- FIALKA I., SCHWARZ H., REICHMANN E., OFT M., BUSSLINGER M. AND BEUG H. (1996). The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. *J. Cell Biol*. **132**, 1115-1132.
- FISHER R. J., MAVROTHALASSITIS G., KONDOH A. AND PAPAS T. S. (1991). High-affinity DNA-protein interactions of the cellular Ets-1 protein: the determination of the ETS binding motif. *Oncogene*. **6**, 2249-2254.
- FISHER R. J., KOIZUMI S., KONDOH A., MARIANO J. M., MAVROTHALASSITIS G., BHAT N. AND PAPAS T. S. (1992). Human ets-1-oncoprotein: Purification, isoforms, SH modification and DNA sequence-specific binding. *J. Biol. Chem*. **267**, 17957-17965.
- FISHER R. J., FIVASH M., CASASFINET J., ERICKSON J. W., KONDOH A., BLADEN S; V., FISHER C., WATSON D. K. AND PAPAS T. S. (1994). Real-time DNA-binding measurement of the ets-1 recombinant oncoproteins reveal significant kinetic differences between the p42 and p51 isoforms. *Protein Sci*. **3**, 257-266.
- FLAMM S.L., WELLSTEIN A., LUPU R., KERN F., LIPPMAN M.E. AND GELMANN E.P. (1989). Expression of fibroblast growth factor peptides in normal and malignant human mammary epithelial cells. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol*. **30**, 71.
- FLEISCHMAN L. F.; HOLTZCLAW L., RUSSEL J; T., MAVROTHALASSITIS G. AND FISHER R. J. (1995). Ets-1 in astrocytes: expression and transmitter evoked phosphorylation. *Mol. Cell. Biol*. **15**, 925-931.
- FOEKENS J. A., SCHMITT M.; VAN PUTTENN W. L., PETERS H. A., BONTENBAL M., JANICKE F. AND KLIJN J. G. (1992). Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients *Cancer Res*. **52**, 6101-6105.

- FRANCO P., IACCARINO C., CHIARADONNA F., BRANDAZZA A., IAVARONE C., MASTRONICOLA M.R., NOLLI M.L. AND STOPPELLI M.P. (1997). Phosphorylation of human pro-urokinase on Ser 138/303 impairs its receptor-dependent ability to promote myelomonocytic adherence and motility. *J. Cell. Biol.* **137**, 779-791.
- FREIJE J.M.P., DIEZ-ITZA I., BALBIN M., SANCHEZ L.M., BLASCO R., TOLIVIA J. AND LOPEZ-OTIN C. (1994). Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *The Journal of Biological Chemistry*. **269-24**, 16766-16773.
- FRIXEN U.H., BEHRENS J., SACHS M., EBERLE G., VOSS B., WARDA A., LOCHNER D. AND BIRCHMEIER W. (1991). E-cadherin mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cell lines. *J. Cell. Biol.* **111**, 173-1785.
- FRIXEN U.H. AND NAGAMINE Y. (1993). Stimulation of urokinase-type plasminogen activator expression by blockage of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion. *Cancer Res.* **53**, 3618-3623.
- FRYKBERG L., METZ T., BRADY G., INTRONA M., BEUG H., VENNSTROM B. AND GRAF T. (1988). A point mutation in the DNA-binding domain of the v-myb oncogene of E26 virus confers temperature sensitivity for transformation of myelomonocytic cells. *Onc. Res.* **3**, 313-322.
- FUNAHASHI T., SHIMAMURA M., KOCHA T., FUKUDA T. AND AOYAGI T. (1994). Proportionality of protease activities in malignant cells to their metastatic potentials. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 1118-1120.
- GALSON D. L., HENSOLD J. O., BISHOP, T. R., SCHALLING M., D'ANDREA A; D., JONES C., AURON P. E. AND HOUSMAN D. E. (1993). Mouse β -globin DNA-binding protein B1 is identical to a proto-oncogene, the transcription factor Spi/Pu.1, and is restricted in expression to hematopoietic cells and the testis. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2929-2941.
- GAMALLO C., PALACIOS J., BENITO N., LIMERES M.A., PIZARRO A., SUAREZ A., PASTRANA F., CANO A. AND CALERO F. (1996). Expression of E-cadherin in 230 infiltrating ductal breast carcinoma : relationship to clinicopathological features. *international Journal of Oncology.* **9**, 1207-1212.
- GARCIA M., PLATET N.; LIAUDET E., LAURENT V., DEROCQ D., BROUILLET J. P. AND ROCHEFORT H. (1996). Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Stem Cells.* **14**, 642-650.
- GEGONNE A., LEPRINCE D., DUTERQUE-CIQUILLAUD M., VANDENBUNDER B., FLOURENS A., GHYSDAEL J., DEBUIRE B. AND STEHELIN D. (1987a). Multiple domains for the chicken cellular sequences homologous to the v-ets oncogene of the E26 retrovirus. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 806-812.
- GEGONNE A., LEPRINCE D., POGONEC P., DERNIS D., FAES M.B., STEHELIN D., GHYSDAEL J., (1987b). The 5' extremity of the v-ets oncogene of avian leukemia virus E26 encodes amino acid sequences not derived from the major c-ets-encoded cellular proteins. *Virology.* **156**, 177-180.
- GEGONNE A., PUNHYAMMALEE B., RABAULT B., BOSSELUT R., SENECE S., CRABEEL M. AND GHYSDAEL J. (1992). Analysis of the DNA binding and transcriptional activation properties of the Ets-1 oncoprotein. *New Biol.* **4**, 512-519.
- GHYSDAEL J., GEGONNE A., POGNONEC P., BOULUKOS K., LEPRINCE D., DERNIS D., LAGROU C. AND SEHELIN D. (1987). Identification in chicken macrophages of a set of proteins related to, but distinct from, the chicken cellular c-ets-encoded protein p54-ets. *EMBO J.* **5**, 2251-2256.
- GIESE K., KINGSLEY C., KIRSHNER J. R. AND GROSSCHEDL R. (1995). Assembly and function of a TCR α enhancer complex is dependent on LEF-1 induced DNA-binding and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev.* **9**, 985-1008.
- GILLES C., POLETTE M., BIREMBAUT P., BRUNNER N. AND THOMPSON E.W. (1997). Expression of c-ets-1 mRNA is associated with an invasive, EMT-derived phenotype in breast carcinoma cell lines. *Clin. Exp. Metastasis.* **15**, 519-526.
- GILLES F., RAES M.B., STEHELIN D., VANDENBUNDER B. AND FAFEUR V. (1996). The c-ets-1 proto-oncogene is a new early-response gene differentially regulated by cytokines and growth factors in human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **222**, 370-378.
- GLUCK U., KWIATKOWSKI D.J. AND BEN-ZE'EV A. (1993). Suppression of tumorigenicity in Simian virus 40-transformed cells transfected with α -actinin cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 383-387.
- GO Y., CHINTALA S.K., MOHANAM S., GOKASLAN Z., VENKAIHAH B., BJERKVIG R., OKA K., NICOLSON G.L., SAWAYA R. AND RAO J.S. (1997). Inhibition in vivo tumorigenicity and invasiveness of human glioblastoma cell line transfected with antisense uPAR vectors. *Clin. Exp. Metastasis.* **15**, 440-446.
- GOLAY J., INTRONA M. AND GRAF T. (1988). A single point mutation in v-ets oncogene affects both erythroid and myelomonocytic cell differentiation. *Cell.* **55**, 1147-1158.

- GOMM J.J., SMITH J., RYALL G.K., BAILLIE R., TURNBULL L. AND COOMBES R.C. (1991). Localization of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor b1 in the human mammary gland. *Cancer Res.* **51**, 4685-4692.
- GRAF T., MC NAGNY K., BRADY G. AND FRAMPTON J. (1992). Chicken erythroid cells transformed by the gag-myb-ets-encoding E26 leukemia virus are multipotent. *Cell.* **70**, 201-213.
- GRANT A., ARULAMPALAM V., AHLUND-RICHTER L. AND PETTERSSON S. (1992). Identification of Ets-like lymphoid specific element within the immunoglobulin heavy chain 3' enhancer. *Nucleic. Acids Res.* **20**, 4401-4408.
- GRANT D.S., KLEINMAN H.K., GOLDBERG I.D., BHARGAVA M.M., NICKOLOFF B.J., KINSELLA J.L., POLVERINI P. AND ROSEN E.M. (1993). Scatter factor induces blood vessels formation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* . **90**, 1937-1941.
- GRASSE P.P. (1969). Mammelles. In: *Traité de zoologie* (Masson et Cie, eds) Tome XVI, Fascicule VI, 1-147.
- GREEN K.J. AND GOLDMAN R.D. (1986). Evidence for an interaction between the cell surface and intermediate filaments in cultured fibroblasts. *Cell Motil Cyto*, **6**, 389-405.
- GREVIN D., CHEN J.H., RAES M.B., STEHELIN D., VANDENBUNDER B. AND DESBIENS X. (1993). Involvement of the proto-oncogene c-ets-1 and the urokinase plasminogen activator during mouse implantation and placentation. *Int. J. Dev. Biol.*, **37**, : 519-529.
- GRONER B. (1992). Oncogene expression in mammary epithelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry.* **49**, 128-136.
- GUNTHER C. V., NYE J.A., BRYNER R.S. AND GRAVES B.J. (1990). Sequence-specific DNA binding of the proto-oncoprotein Est-1 define a transcriptional activator sequence within the long terminal repeat of the Moloney murine sarcoma virus. *Genes Dev.*, **4**, 667-679.
- GURIEC N., MARCELLIN L., GAIRARD B., CALDEROLI H., WILK A., RENAUD R., BERGERAT J.P. AND OBERLING F. (1996). E-Cadherin mRNA expression in breast carcinomas correlate with overall and disease-free survival. *Invasion Metastasis*, **16**, 19-26.
- GUTMAN A. AND WASYLYK C. (1990). The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J.* **9**, :2241-2246.
- HAGMAN J. AND GROSSCHELD R. (1992). An inhibitory carboxy-terminal domain in Ets-1 and Ets-2 mediates differential binding of ETS family factors to promoter sequences of the mb-1 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 8889-8893.
- HANBY A. M., GILLETT, C. E., PIGNATELLI, M. AND STRAMP, G. W. (1993). $\beta 1$ and $\beta 4$ integrin expression in methacarn and formalin-fixed material from in situ ductal carcinoma of breast. *J. Pathol.* **171**, 257-262.
- HAHN S. L. AND WASYLYK B. (1994). The oncoprotein v-ETS is less selective in DNA binding than c-ets-1 due to the C terminal sequence change. *Oncogene.* **9**, 2499-2512.
- HASLAM S.Z. AND SHYAMALA G. (1979). Effect of oestradiol on progesterone receptors in normal mammary gland and its relationship to lactation. *Biochem J.* **182**, 127-131.
- HASLAM S.Z. AND SHYAMALA G. (1980). Progesterone receptors in normal mammary gland: receptor modulation in relation to differentiation. *J Cell Biol.* **86**, 730-737.
- HASLAM S.Z. AND SHYAMALA G. (1981). Relative distribution of estrogen and progesterone receptors among epithelial, adipose and connective tissues of normal mammary gland. *Endocrinology.* **108**, 825-830.
- HASLAM S.Z. (1986). Mammary fibroblast influence on normal mouse mammary epithelial cell responses to estrogen *in vitro*. *Cancer Res.* **45**, 310-316.
- HASLAM S.Z. AND NUMMY K.A. (1992). The ontogeny and cellular distribution of estrogen receptors in normal mouse mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **42**, 589-595.
- HE C., WILHEM S.M., PENTLAND A.P., MARMER B.L., GRANT G.A., EISEN A.Z. AND GOLDBERG G.I. (1989). Tissue cooperation in proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, :2632-2636.
- HEARING J.V., LAW L.W., CORTI A., APPELLA E. AND BLASI F. (1988). Modulation of metastatic potential by cell surface urokinase of murine melanoma cells. *Cancer Res.* **48**, 1270-1278.
- HEMBROUGH T.A., KRALOVICH K.R., LI L. AND GONIAS S.L. (1995). Cytokeratin 8 released by breast carcinoma cells in vitro binds plasminogen and tissue-type plasminogen activator and promotes plasminogen activation. *Biochem. J.*, **317**, 763-769.
- HEMBROUGH T.A., LI L. AND GONIAS S.L. (1996). Cell-surface cytokeratin 8 is the major plasminogen receptor on breast cancer cells and is required for accelerated activation of cell-associated plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* **271**, 25684-25691.
- HENDRIX M.J.C., SEFTOR E.A., CHU Y.W., TREVOR K.T. AND SEFTOR R.E.B. (1996). Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews.* **15**, 507-525.

- HENDRIX M.J.C., SEFTOR E.A., SEFTOR R.E.B. AND TREVOR K.T. (1997). Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior. *American Journal of Pathology*. **150**, 483-495.
- HERMANS M. H., HARTSUIKER H. AND OPSTELTEN D. (1989). An in situ study of B-lymphopoiesis in rat bone marrow : topographical arrangement of nucleotidyl transferase-positive cells and pre-B cells. *J. Immunol.* **142**, 67-73.
- HEUBERGER B., FITZKA I., WASNER G. AND KRATOCHWIL K. (1982). Induction of androgen receptor formation by epithelial-mesenchymal interaction in embryonic mouse mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA*. **79**, 2957-2961.
- HIDA K., SHINDOH M., YASUDA M., HANZAWA M., FUNAOKA K., KOHGO T., AMEMIYA A., TOTSUKA Y., YOSHIDA K. AND FUJINAGA K. (1997). Antisens E1AF transfection restrains oral cancer invasion by reducing matrix proteinase activities. *Am. J. Pathol.* **150**, 2125-2132.
- HIGASHINO, F., YOSHIDA, K., NOUMI, T., SEIKI, M., AND FUJINAGA, K. (1995). Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters. *Oncogene* **10**, 1461-1463.
- HIGGINS P. J., RYAN M. P. AND PROVIDENCE K. M. (1994). Induced expression of p52 (PAI) in normal kidney cells. by the micro-filament disrupting agent cytochalasin D. *J. Cell. Physiol.* **159**, 187-195.
- HILDENBRAND R., DILGER I., HORLIN A. AND STUTTE H.J. (1995). Urokinase plasminogen activator induces angiogenesis and tumor vessel invasion in breast cancer. *Path. Res. Pract.* **191**, 403-409.
- HIMELSTEIN B.P. AND MUSCHEL R.J. (1996). Induction of matrix metalloproteinase 9 expression in breast carcinoma cells by a soluble factor from fibroblasts. *Clin. Exp. Metastasis*. **14**, 197-208.
- HO I. C., BHAT N.K., GOTTSCHALK L.R., LINDSTEN T., THOMPSON C.B., PAPAS T.S. AND LEIDEN J.M. (1990a). Sequence specific binding of human c-ets-1 to T cell receptor α gene enhancer. *Science*. **250** : 814-818.
- HO I. C. AND LEIDENJ. M. (1990b). The Ta2 nuclear protein binding site from the human T cell receptor α enhancer functions as both a T cell-specific transcriptional activator and repressor. *J. of Exp. Medicine*. **172**, 1443-1449.
- HOLSTHANSEN C., JOHANNESSEN B., HOYERHANSEN G., ROMER J., ELLIS V. AND BRUNNER N. (1996). Urokinase-type plasminogen activation in three human breast cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Clinical & Experimental Metastasis*. **14**, 297-307.
- HUANG C.C., PAPAS T. S., AND BHAT N.H. (1997). A variant form of Ets-1 induces apoptosis in human colon cancer cells. *Oncogene*. **15**, 851-856.
- HUNT G. (1989). The role of lamini in cancer cell invasion and metastasis. *Exp. Cell Biol.* **57**, 165-176.
- HUTTENLOCHER A., GINSBERG M. H. AND HORWITZ A. F. (1996). Modulation of cell migration by integrin mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. *J. Cell Biol.* **134**, 1551-1562.
- HYNES R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*. **69**, 11-25.
- IMAGAWA W., YANG J., GUZMAN R. AND NANDI S. (1994). Control of mammary gland development. In: *The Physiology of Reproduction, Second Edition* (Knobil E and Neill J D, eds.) Raven Press, Ltd., New York, 1033-1063.
- IRIGOYEN J.P., BESSER D. AND NAGAMINE Y. (1997). Cytoskeleton reorganization induces the urokinase-type plasminogen activator gene via the Ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 1904-1909.
- ITO A., NAKAJIMA S., SASAGURI Y., NAGASE H. AND MORI Y. (1995). Co-culture of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells and human dermal fibroblasts enhances the production of matrix metalloproteinases 1, 2 and 3 in fibroblasts. *British Journal of Cancer*. **71**, 1039-1045.
- IVANOV X., MLADENOV Z., NEDYALKOV S. AND TODOROV T.G. (1962). Experimental investigations into avian leukosis I. Transmission experiments of certain diseases of the avian leukosis complex, found in Bulgaria. *Bull. Inst. Pathol. Comp. Animaux Domestiques*. **9**, 5-36.
- JACOBS L.S. (1977). The role of prolactin in mammogenesis and lactogenesis. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology : Comparative Endocrinology of Prolactin* (Dellman HD, Johnson JA and Klachko DM, eds.) Plenum Press, New York, **80**, 173-191.
- JACQUEMIER J., ADELAIDE J., PARC P., PENAULT-LLORCA F., PLANCHE J., DELAPEYRIERE O. AND BIRNBAUM D. (1994). Expression of the *FGFR1* gene in human breast carcinoma cells. *Int J Cancer*. **59**, 373-378.
- JALLAL B., POWELL J., ZACHWIEJA J., BRAKEBUSH C., GERMAIN L., JACOBS J., LOCABELLI S. AND ULLRICH A. (1995). Suppression of tumor growth *in vivo* by local and systemic 90K level increase. *Cancer Res.* **1**, 55 (15), 3223-3227.

- JANKUN J., MERRICK H.W. AND GOLDBLATT P.J. (1993). Expression and localization of elements of the plasminogen activator system in benign breast disease and breast cancers. *J. Cell. Biochem.* **53**, 135-144.
- JEON I. S., DAVIS J. N., BRUAN B. S., SUBLETT J; E., ROUSSEL M. F. DENNY C. T. AND SAPIRO D. N. (1995). A variant Ewing sarcoma translocation (7; 22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene.* **10**, 1229-1234.
- JIANG, W. G., PUNTIS M. C. AND HALLETT M. B. (1994). Molecular and cellular basis of cancer invasion and metastasis: implications for treatment. *British J. Surgery.* **81**, 1576-1590.
- JOENSUU H., TOIKKANEN S. AND ISOLA J. (1995). Stromal cell cathepsin D expression and long-term survival in breast cancer. *British Journal of Cancer.* **71**, 155-159.
- JOFFE E.B.D.K., PURICELLI L., MORIOTTO R., EIJAN A.M. AND DE LUSTING, E.S. (1988). Fibronectin and laminin expression in breast cancer and lymph node metastases. Lack of correlation with fibronectin plasmatic levels. *Medicina (Buenos Aires),* **48**, 499-505.
- JONES J.L., CRITCHLEY D.R. AND WALKER R.A. (1992). Alteration of stromal protein and integrin expression in breast - A marker of pre-malignant change. *J. Pathol.* **167**, 399-406.
- JONES P.L., BOUDREAU N., MYERS C.A., ERICKSON H.P. AND BISSEL M.J., (1985). Tenascin-C inhibits extracellular matrix-dependant gene expression in mammary epithelial cells. *Journal of Cell Science.* **108**, 519-527.
- JONJIC N., LUCIN K., KRSTULJA M., ITERNICKA Z., MUSTAC E., 1993. Expression of Beta-1 integrins on tumor cells of invasive ductal breast carcinoma. *Path. Res. Pract.* **189**, 979-984.
- JONSEN M.D., PETERSEN J.M., XU Q. AND GRAVES B.J. (1996). Characterization of the cooperative function of inhibitory sequences of Ets-1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2065-2073.
- JORCYK C.L., WATSON D.K., MAVROTHALASSITIS G.F. AND PAPAS T.S. (1991). The human ETS1 gene : genomic structure, promoter characterization and alternative splicing. *Oncogene.* **6**, 523-532.
- JORCYK C.L., GARRETT L.J., MAROULAKOU I.G., WATSON D.K. AND GREEN J.E. (1997). Multiple regulatory regions control the expression of Ets-1 in the developing mouse : vascular expression conferred by intron I. *Cell. Mol. Biol.* **43**, 211-225.
- JOUSSET C., CARRON C., BOUREUX A., QUANG C.T., OURY C., DUSANTER-FOURT I., CHARON M., LEVIN J., BERNARD O. AND GHYSDAEL J. (1997). A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR β oncoprotein. *EMBO J.* **16**, 69-82.
- JUDWARE R. AND CULP L.A. (1997). Extracellular matrix and matrix receptors : alterations during tumor progression. *Encyclopedia of cancer.* **1**, 660-679.
- JULIANO R. AND HASKILL S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell. Biol.* **120**, 577-585.
- KARIM F. D., URNESS L. D., THUMMEL C. S., KLEMSZ M. J., MC KERCHER S. R., CELADA A., VAN BEVEREN C., MAKI R. A., GUNTHER C. V., NYE J. A. AND GRAVES B. J. (1990). The Ets domain: a new DNA -binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence. *Gens and Dev.* **4**, 1451-1453.
- KAMEI Y., XU L., HEINZEL T., TORCHIA J., KUROKAWA R., GLOSS B., LIN S., HEYMAN R. A., ROSE D. W., GLASS C. K. AND ROSENFELD M; G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell.* **85**, 403-414.
- KAYA M., YOSHIDA K., HIGASHINO F., MITAKA T., ISHII S., FUJINAGA K. AND (1996). A single *ets*-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells. *Oncogene.* **12**, 221-227.
- KEELY P.J., WU J.E. AND SANTORO S.A. (1995 a). The spatial and temporal expression of the $\alpha 2\beta 1$ integrin and its ligands, collagen I, collagen IV, and laminin, suggest important roles in mouse mammary morphogenesis. *Differenciation.* **59**, 1-13.
- KEELY P.J., FONG A.M., ZUTTER M.M. AND SANTORO S.A. (1995 b). Alteration of collagen-dependant adhesion, motility, and morphogenesis by the expression of antisense $\alpha 2$ integrin mRNA in mammary cells. *Journal of Cell Science.* **108**, 595-607.
- KEY T.J.A. AND PIKE M.C. (1988). The role of estrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **24**, 29-43.
- KIM S., PLOW E.F. AND MILES L.A., (1996). Regulation of plasminogen receptor expression on monocytoic cells by $\beta 1$ -integrin-dependent cellular adherence to extracellular matrix proteins. *J. Biol. Chem.* **271**, 23761-23767.
- KJOLLER L., KANSE S.M., KIRKEGAARD T., RODENBURG K.W., RONNE E., GOODMAN S.L., PREISSNER K.T., OSSOWSKI L. AND ANDREASEN P.A. (1997). *Exp. Cell Res.* **232**, 420-429.
- KLAMBT C. (1993). The Drosophila gene *pointed* encode two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glial cells. *Development.* **117**, 163-176.

- KLEINMAN H.K., Mc GARVEY M.L., HASSELL J.R., STAR V.L., CANNON F.B., LAURIE G.W. AND MARTIN G.R. (1989). Basement membrane complexes with biological activity. *25*, 312-318.
- KLEMSZ M. J., MC KERCHER S. R., CELADA A., VAN B. C. AND MAKI R. A. (1990). The macrophage and B-cellspecific transcription factor PU.1 is related to the ETS oncogene. *Cell*. **61**, 113-124.
- KLINOWSKA T.C., IRELAND G.W. AND KIMBER S.J. (1994). A new *in vitro* model of murine mesoderm migration : the role of fibronectin and laminin. *Differentiation*. **57**, 7-19.
- KLINOWSKA T.C.M., BROOMHEAD G. AND STREULI C. (1996). Requirement for $\beta 1$ integrins in the development of mouse mammary gland. *Biochemical Society Transactions*. **24**, 349S.
- KNABBE C., LIPPMAN M.E., WAKEFIELD L.M., FLANDERS K.C., KASID A., DERYNCK R. AND DICKSON R.B., (1987). Evidence that transforming growth factor- β is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell*. **48**, 417-428.
- KNABBE C., ZUGMAIER G., DICKSON R.B., AND LIPPMAN M.E. (1988). Transforming growth factor β and other growth inhibitory polypeptides in human breast cancer. *Progress in Cancer Research and Therapy*. **35**, 234-237.
- KNIGHT C.H. AND PEAKER M. (1982). Development of the mammary gland. *J.Reprod.Fertil.* **65**, 521-536.
- KOLA I., BROOKES S., GREEN A. R., GARBER R., TYMMS M., PAPAS T. S. AND SETH A. (1993). The Ets transcription factor is widely expressed during embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenetic processes such as organ formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 7588-7592.
- KRAFT A., ZVIBEL I., DOERR R., CHIUTEN D., OCHS A. AND REID L.M. (1992). Matrix influences organ-site specificity of metastases by regulating production and response to autocrine growth factors. *Metastasis: Basic research and its clinical applications*. **44**, 203-223.
- KRAUT N., FRAMPTON J., McMAGNY K.M. AND GRAF T. (1994). A functional ETS DNA-binding domain is required to maintain multipotency of hematopoietic progenitors transformes by Myb-Ets. *Genes Dev.*, **8**, 33-44.
- KUPPUSWAMY M., SUBRAMANIAN T., SRINIVASAN A. AND CHINNADURAL G. (1989). Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res.* **17**, 3551-3561.
- KYONG S. L., SUN Y. R., SEA J. K., JOO H. K., JAE K. R., BYUNG S. K. AND HYUN C. C. (1996). Sequential activation and production of matrix metalloproteinase 2 during breast cancer progression. *Clin. Exp. Metastasis*. **14**, 512-519.
- LAGACE R., GRIMAUD J.A., SCHURCH W. AND SEEMAYER T.A. (1984). Myofibroblastic stromal reaction in carcinoma of the breast : variations of collagenous matrix and structural glycoproteins. *Virchows Arch. (Pathol Anat)*, **408**, 49-59.
- LANZAFAME S., EMMANUELE C. AND TORRISI A. (1996). Correlation of $\alpha 2\beta 1$ integrin expression with histological type and hormonal receptor status in breast carcinomas. *Path. Res. Pract.* **192**, 1031-1038.
- LAUDET V., NIEL C., DUTERQUE M., LEPRINCE D. AND STEHELIN D. (1993). Evolution of the Ets gene family. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **59**, 283-292.
- LAUFFEBURGER D. A. AND HORWITZ A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*. **84**, 359-369.
- LAURENT-HUCK F.M., EGLES C., KIENLEN P., STOECKEL M.E. AND FELIX J.M. (1996). Expression of the c-ets-1 gene in the hypothalamus and pituitary during rat development. *Dev. Brain Res.* **97**, 107-117.
- LEE C.S. AND OKA T. (1992). Progesterone regulation of a pregnancy-specific transcription repressor to beta-casein gene promoter in mouse mammary gland. *Endocrinology*, **131**, 2257-2262.
- LEE E.Y.H.P., LEE W.H., KAETZEL C.S., PARRY G. AND BISSELL M.J. (1985). Interaction of mouse mammary epithelial cells with collagen substrata : regulation of casein gene expression and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1419-1423.
- LEFEBVRE O., REGNIER C., CHENARD M.P., WENDLING C., CHAMBON P., BASSET P. AND RIO M.C. (1995). Developmental expression of mouse stromelysin-3 mRNA. *Development*. **121**, 947-955.
- LEFF A.R., HAMANN K.J. AND WEGNER C.D. (1991). Inflammation and cell-cell interactions in airway responsiveness. *Am. J. Physiol.*, **260**, L189-L206.
- LEMARCHANDEL V., GHYSDAEL J., MIGNOTTE V., RAHUEL C. AND ROMEO P. H. (1993). GATA and Ets cis-acting sequences mediate megakaryocyte-specific expression. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 668-676.
- LEPRINCE D., GEGONNE A., COLL J., DE TAISNE C., SCHNEEBERGER A., LAGROU C. AND STEHELIN D. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukemia virus E-26. *Nature*, **306**, 395-397.

- LEPRINCE D., DUTERQUE-COQUILLAUD M., LI R.P., HENRY C., FLOURENS A., DEBUIRE B. AND STEHELIN D. (1988). Alternative splicing within the chicken c-ets-1 locus : implications for transduction within the E26 retrovirus of the c-ets proto-oncogene. *J. Virol.* **62**, 3233-3241.
- LEPRINCE D., GESQUIERE J. C. AND STEHELIN D. (1990). The chicken cellular progenitor of v-ets oncogene, p68 c-ets-1, is a nuclear DNA-binding protein not expressed in lymphoid cells of the spleen. *Oncogene Res.* **5**, 255-265.
- LEPRINCE D., CREPIEUX P., LAUDET V., FLOURENS A. AND STEHELIN D. (1993). A new mechanism of oncogenic activation : E26 retroviral v-ets oncogene has inverted the C-terminal end of the transcription factor c-ets-1. *J. Virol.* **194**, 855-857.
- LETO G., GEBBIA N., RAUSA L. AND TUMMINELLO F.M. (1992). Cathepsin D in the malignant progression of neoplastic diseases (Review). *Anticancer Research.* **12**, 235-240.
- LEUNG-HAGESTEIJN C. Y., MILANKOV K., MICHALAK M., WILKINS J. AND DEDHAR S. (1994). Cell attachment to the extracellular matrix substrates is inhibited upon down regulation of expression of caretulin, an intracellular integrin alpha-subunit-binding protein. *J. Cell Sci.* **107**, 589-600.
- LI M.L., AGGELER J., FARSON D.A., HATIER C., HASSELL J. AND BISSELL M.J. (1987). Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 136-140.
- LI S. AND SHIPLEY G.D. (1991). Expression of multiple species of basic fibroblast growth factor mRNA and protein in normal and tumor-derived mammary epithelial cells in culture. *Cell Growth Different.* **2**, 195-202.
- LI X., NAGAYASU H., HAMADA J.I., HOSOKAWA M. AND TAKEICHI N. (1993). Enhancement of tumorigenicity and invasion capacity of rat mammary adenocarcinoma cells by epidermal growth factor and transforming growth factor- β . *Jpn Cancer Res.* **84**, 1145-1149.
- LI S., COUET J. AND LISANTI M. P. (1996). Src tyrosine kinases, G alpha subunits, and H-ras share a common membrane anchored scaffolding protein, calveoline. *J. Biol. Chem.* **271**, 29182-29190.
- LIDEREAU R., CALLAHAN R., DICKSON C., PETERS G., ESCOT C. AND ALI I.U. (1988). Amplification of the int-2 gene in primary human breast tumors. *Oncogene Res.* **2**, 285-291.
- LIJNEN H.R., VAN HOEF B. AND COLLEN D. (1996). Characterization of the murine plasminogen/urokinase-type plasminogen-activator system. *Eur. J. Biochem.* **241**, 840-848.
- LIM F., KRAUT N., FRAMPTON J. AND GRAF T. (1992). DNA binding by c-ets-1, but not v-ets, is repressed by an intramolecular mechanism. *The EMBO J.* **11**, 643-652.
- LIN C.Y., WANG J.K., TORRI J., DOU L., SANG Q.A. AND DICKSON R.B. (1997). Characterization of a novel, membrane-bound, 80-kDa matrix-degrading protease from human breast cancer cells. *J. of Biological Chemistry.* **272-14**, 9147-9152.
- LIOTTA L. A., STEEG P. S. AND STETLER-STEVENSON W. G. (1991) Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, **64**, 327-336.
- LISSENI P., SORMANI A.L. AND TANCINI G. (1990). Postoperative hyperprolactinaemia and early recurrence rate in breast cancer. *Europ. J. Cancer.* **26**, 953-6.
- LOGAN S.K., GARABEDIAN M.J., CAMPBELL C.E. AND WERB Z. (1996). Synergistic transcriptional activation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promoter via functional interaction of AP-1 and ETS transcription factors. *J. Biol. Chem.* **271**, 774-782.
- LORIDON-ROSA B., VIELH P., CUADRADO C. AND BURTIN P. (1988). Comparative distribution of fibronectin and vitronectin in human breast and colon carcinomas. An immunofluorescence study. *Am J Clin Pathol.* **90**, 7-16.
- LUND L. R., ROMER J., THOMASSET N., SOLBERG H., PYKE C. BISSELL M., DANO K. AND WERB Z. (1996). Two distinct phase of apoptosis in mammary gland involution: proteinase independent and dependent pathways. *Development.* **122**, 181-193.
- LUQMANI Y.A., GRAHAM M. AND COOMBES R.C. (1992). Expression of basic fibroblast growth factor, FGFR-1 and FGFR-2 in normal and malignant human breast and comparison with other normal tissues. *Br J Cancer.* **66**, 273-280.
- MACHOTKA S.V., GARETT C.T., SCWARTZ A.M. AND CALLAHAN R. (1989). Amplification of the proto-oncogenes *int-2*, *c-erb B-2* and *c-myc* in human breast cancer. *Clinica Chimica Acta* **184**, 207-218.
- MAC LEOD K., LEPRINCE D. AND STEHELIN D. (1992). The ets gene family. *Trends Biol. Sci.* **17**, 251-256.
- MAGUIRE T.M., SHERING S.G., MC DERMOTT E.W., O'HIGGINS N., FENNELLY J.J., CROWN J. AND DUFFY M.J. (1997). Assay of E-cadherin by ELISA in human breast cancers. *Eur. J. Cancer*; **33**, 404-408.
- MAINIERO F., PEPE A., WARY K.K., SPINARDI L., MOHAMMADI M., SCHLESSINGER J. AND GIANCOTTI F.G. (1995). Signal transduction by the $\alpha_6\beta_4$ integrin : distinct β_4 subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes. *EMBO J.*, **14**, 4470-4481.

- MAJERUS M.A., BIBOLLET-RUCHE F., TELLIEZ J.B., WASYLYK B. AND BAILLEUL B. (1992). Serum, AP-1 and Ets-1 stimulate the human ets promoter. *Nucleic Acids Res* **20**, 2699-2703.
- MAREEL M., BRACKE M. AND VAN ROY F. (1994). Invasion promoter versus invasion suppressor molecules : the paradigm of E-cadherin. *Molecular Biology Reports*, **19**, 45-67.
- MAROUA KOU I. G., PAPAS T. S., AND GREEN J. E. (1994). Differential expression of ets-1 and ets-2 proto-oncogenes during murine embryogenesis. *Oncogene*. **9**, 1551-1565.
- MARS W.M., ZARNEGAR R., MICHALOPOULOS G.K., 1993. Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *American Journal of Pathology*. **143**, 949-957.
- MAVROTHALASSITIS G. H., WATSON D. K. AND PAPAS, T. S. (1990). Molecular and functional caractérisation of the promoter of ETS-2, the human c-ets-2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 1047-1051.
- MAVROTHALASSITIS G. H., FISHER R. J., SMYTH F., WATSON D. K. AND PAPAS, T. S. (1994). Structural interferences of the Ets-1 DNA binding domain determined by mutational analysis. *Oncogene*. **9**, 425-435.
- MAYALL T.P., SHERIDAN P. L., MONTMINY M. R. AND JONES K. A. (1997). Distinct roles for P-CREB and LEF-1 in TCR alpha enhancer assembly and activation on chromatin templates in vitro. *Genes Dev.* **11**, 887-899.
- MBALAVIELE G., DUNSTAN C.R., SASAKI A., WILLIAMS P.J., MUNDY G.R. AND YONEDA T. (1996). E-cadherin expression in human breast cancer cells suppresses the development of osteolytic bone metastases in an experimental metastasis model. *Cancer Research*. **56**, 4063-4070.
- MC CALLUM J., BARTLETT J.M.S., THOMPSON A.M., KEEN J.C, DIXON J.M. AND MILLER W.R. (1994). Expression of transforming growth factor beta mRNA isoforms in human breast cancer. *Br J Cancer*. **69**, 1006-1009.
- MC LESKEY S.W., DING I.Y.F., LIPPMAN M.E. AND KERN F.G. (1994). MDA-MB-134 breast carcinoma cells overexpress fibroblast growth factor (FGF) receptors and are growth-inhibited by FGF ligands. *Cancer Res* , **54**, 523-530.
- MC KERCHERS. R., TORBETT B. E., ANDERSON K; L., HENKEL G. W., VESTAL D. J., BARIBAUT H., KLEMSZ M., FEENEY A; J., WU G. E., PAIGE C.J. AND MAKI R. A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* **15**, 5647-5658
- MC KNIGHT R.A., SPENCER M., DITTMER J., BRADY J.N., WALL R.J. AND HENNIGHAUSEN L. (1995). An ets site in the whey acidic protein gene promoter mediates transcriptional activation in the mammary gland of pregnant mice but is dispensable during lactation. *Molecular Endocrinology*. **9**, 717-724.
- MERRILEES M.J. AND FINLAY G.J. (1985). Human tumor cells in culture stimulate glycosaminoglycan synthesis by human skin fibroblasts. *Lab Invest*. **53**, 30-36.
- METZ T. AND GRAF T. (1991a). v-myb and c-ets transform chicken erythroid cells and cooperate both in trans and in cis to induce distinct differentiation phenotypes. *Genes Dev.* **5**, 369-380.
- METZ T. AND GRAF T. (1991b). Fusion of the nuclear oncoproteins v-Myb and v-Ets is required for the leukemogenicity of E26 virus. *Cell*. **66**, 95-105.
- MEYER D., STIEGLER P., HINDELANG C., MAGER A.M. AND REMY P. (1995). Whole-mount in situ hybridization reveals the expression of the XI-Fli gene in several lineages of migrating cells in *Xenopus* embryos. *Int. J. Dev. Biol.* **39**, 909-919.
- MEYER D., DURLIAT M., SENAN F., WOLFF M., ANDRE M., HOURDRY J. AND REMY P. (1997). Ets-1 and Ets-2 prot-oncogenes exhibit differential and restricted expression patterns during *Xenopus laevis* oogenesis and embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **41**, 607-620.
- MIYAMOTO S., TERAMOTO H., COSO O.A., GUTKIND J.S., BURBELO P.D., AKIYAMA S.K. AND YAMADA K.M. (1995). Integrin function : molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J. Cell. Biol.* **131**, 791-805.
- MONTESANO R., SCHALLER G. AND ORCI L. (1991a). Induction of epithelial tubular morphogenesis *in vitro* by fibroblast-derived soluble factors. *Cell*. **66**, 697-711.
- MONTESANO R., MATSUMOTO K., NAKAMURA T. AND ORCI L. (1991b). Identification of a fibroblast derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* . **67**, 901-908.
- MONTESANO R., VASALLI J.D., BAIRD A., GUILLEMIN R. AND ORCI L. (1986). Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* **83**, 7297-7301.
- MOSCATELLI D., PRESTA M. AND RIFKIN D.B. (1986). Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis and migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 2091-2095.

- MOREAU G. F., TAVITIAN A; AND TAMBOURIN P. (1988). PU.1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukemias. *Nature*. **331**, 277-280.
- MOREAU-GACHELIN F. (1994). Spi-1/PU.1: an oncogene of the Ets family. *Biochem. Biophys. Acta*. **1198**, 149-163.
- MOULTON K.S., SEMPLE K., WU H. AND GLASS C. K. (1994). Cell-specific expression of the macrophage scavenger receptor gene is dependent on PU-1 and a composite AP-1/ETS motif. *Moll. Cell. Biol.* **14**, 4408-4418.
- MUTHUSAMY N., BARTON K. AND LEIDEN J; M. (1995). Defective activation and survival of T-cells lacking the Ets-1 transcription factor. *Nature*. **377**, 639-642.
- NAGY J., CURRY G.W., HILLAN K.J., MCKAY I.C., MALLON E., PURUSHOTHAM A.D. AND GEORGE W.D. (1996). Hepatocyte growth factor/scatter factor expression and c-met in primary breast cancer. *Surg Oncol.* **5**, 15-21.
- NALDINI L., VIGNA E., NARSIMHAM R.P., GAUDINO G., ZARNEGAR R., MICHALOPOULOS G.K., COMOGLIO P.M. (1991). Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene*. **6**, 501-504.
- NALDINI L., TAMAGNONE L., VIGNA E., SACHS M., HARTMANN G., BIRCHMEIER W., DAIKUHARA Y., TSUBOUCHI H., BLASI F. AND COMOGLIO P.M. (1992). Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J.* **11**, 4825-4833.
- NALDINI L., VIGNAS E., BARDELLI A., FOLLENZI A., GALIMI F. AND COMOGLIO P.M. (1995). Biological activation of pro-HGF (Hepatocyte Growth Factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *Journal of Biological Chemistry*, **13**, 603-611.
- NELSEN B., TIAN G., ERMAN B., GREGOIRE J., MAKI R., GRAVES B. AND SEN R. (1993). Regulation of lymphoid-specific immunoglobulin mu heavy chain gene enhancer by ETS-domain protein. *Science*. **261**. 82-86.
- NERLOV C., DECESARE D., PERGOLA F., CARACCILO A., BLASI F., JOHNSEN M. AND VERDE P. (1992). A regulatory element that mediates co-operation between PEA-3-AP-1 element and an AP-1 site is required for phorbol ester induction of urokinase enhancer activity in HepG2 hepatoma cells. *EMBO J.* **11**, 4573-4582.
- NEWTON S.A., REEVES E.J., GRALNICK H., MOHLA S., YAMADA K.M. AND OLDEN K., AKIYAMA S.K. (1995). In hibition of experimental metastasis of human breast carcinoma cells in athymic nude mice by anti- $\alpha 5\beta 1$ fibronectin receptor integrin antibodies. *International Journal of Oncology*, **6**, 1063-1070.
- NIELSEN B.S., SEHESTED M., TIMSHEL S., PYKE C. AND DANO K., (1996). Messenger RNA for urokinase plasminogen activator is expressed in myofibroblasts adjacent to cancer cells in human breast cancer. *Laboratory Investigation*. **74**, 168-177.
- NILSSON T.M., WOODS A.E. AND ROFE A.M. (1996). *In vivo* studies of macrophages and intracellular adhesion molecule-1 following lipopolysaccharide treatment in tumour-bearing rats. *Immuno Cell Biol.* **74**, 408-412.
- NIRANJAN B., BULUWELA L., YANT J., PERUSINGHE N., ATHERTON A., PHIPPARD D., DALE T., GUSTERSON B. AND KAMALATI T. (1995). HGF/SF : a potent cytokine for mammary growth, morphogenesis and development. *Development*. **121**, 2897-2908.
- NOEL A., SIMON N., RAUS J. AND FOIDART J.M. (1992). Basement membrane components (matrigel) promote human breast adenocarcinoma MCF7 cells tumorigenicity and provide an *in vivo* model to assess cell responsiveness to estrogen. *Biochem Pharmacol*, **43**, 1263-1267.
- NOEL A., EMONARD H., POLETTE M., BIREMBAUT P AND FOIDART J.M. (1994). Role of Matrix, Fibroblasts and type IV collagenases in tumor progression and invasion. *Path. Res. Pract.* **190**, 934-941.
- NOTI J.D., REINEMANN B.C. AND PETRUS M.N. (1996). Regulation of the leucocyte integrin gene CD11c is mediated by AP1 and Ets transcription factors. *Molecular Immunology*, **33**, 115-127.
- NUNN M.F., SEEBURG P.H., MOSCOVI C. AND DUESBERG P. H. (1983). Tri partite structure of the avian erythroblastosis virus E 26 transforming gene. *Nature*, **306**, 391-395.
- NUNN M.F. AND HUNTER T. (1989). The ets sequence is required for induction of erythroblastosis in chicken by avian retrovirus E26. *J. Virol.* **63**, 398-402.
- NYE J. A., PETERSEN J. M., GUNTHER C. V., JONSEN M. D. AND GRAVES B. J. (1992). Interaction of murine Ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes and Dev.* **6**, 975-990.

- OKA H., SHIOZAKI H., KOBAYASHI K., INOUE M., TAHARA H., KOBAYASHI T., TAKATSUKA Y., MATSUYOSHI N., HIRANO S. AND TAKEICHI M. (1993). Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res.* **53**, 1696-1701.
- ORMEROD E.J., RUDLAND P.S. 1982. Mammary gland morphogenesis *in vitro* : formation of branched tubules in collagen gels by a cloned rat mammary cell line. *Dev Biology.* **91**, 360-375.
- ORR-URTREGER A., BEDFORD M.T., BURAKOVA T., ARMAN E., ZIMMER Y., YAYON A., GIVOL D., LONAI P., 1993. Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev Biol.* **158**, 475-486.
- OSSOWSKI L., BIEGEL D. AND REICH E. (1979). Mammary plasminogen activator: correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue. *Cell.*, **16**, 929-940.
- OTEY C.A., VASQUEZ G.B., BURRIDGE K. AND ERICKSON B.W. (1993). Mapping of the α actinin binding site within the β 1 integrin cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* **268**, 21193-21197.
- OZZELLO L., HABIF D.V., DE ROSA C.M. AND CANTELL K. (1992). Cellular events accompanying regression of skin recurrences of breast carcinomas treated with intralesional injections of natural interferons alpha and gamma. *Cancer Res.*, **52** (17), 4571-4581.
- PAGAN R., LLOBERA M. AND VILARO S. (1995). Epithelial-mesenchymal transition in cultured neonatal hepatocytes. *Hepatology.* **21**, 820-831.
- PAGAN R., MARTIN I., ALONSO A., LLOBERA M. AND VILARO S. (1996). Vimentin filaments follow the preexisting cyokeratin network during epithelial-mesenchymal transition of cultured neonatal rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* **222**, 333-344.
- PARANJPE M., ENGEL L., YOUNG,N. AND LIOTTA L.A. (1980). Activation of human breast carcinoma collagenase through plasminogen activator. *Life Sci.* **26**, :1223-1231.
- PARDANAUD L. AND DIETERLEN-LIEVRE F. (1993). Expression of c-ets-1 in early chick embryo mesoderm: relationship to the hemangioblastic lineage. *Cell adhesion and communication.* **1**, 151-160.
- PARSONS J.T. (1996). Integrin-mediated signaling-regulation by protein-tyrosine kinase and small GTP-binding proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**, 146-152.
- PATRIARCA C., RONCALLI M., GAMBACORTA M., COMINOTTI M., COGGI G; AND VIALE G. (1993). Patterns of integrin common chain b1 and collagen IV immunoreactivity in hepatocellular carcinoma. Correlation with tumor rate, grade and size. *J. Pathol.* **171**, 5-11.
- PEPPER M.S., VASSALLI J.D., MONTESANO R. AND ORCI L. (1987). Urokinase-type plasminogen activator in induced in migrating capillary endothelial cells. *J. Cell. Biol.* **105**, 2535-41.
- PEPPER M.S., SAPPINO A.P., STOCKLIN R., MONTESANO R., ORCI L. AND VASSALLI J.D. (1993). Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells. *Journal of Cell Biology.* **122**, 673-684.
- PEPPER M.S., SORIANO J.V., MENOUD P.A., SAPPINO A.P., ORCI L. AND MONTESANO R. (1995). Modulation of hepatocyte growth factor and *c-met* in the rat mammary gland during pregnancy, lactation and involution. *Exp Cell Res.* **219**, 204-210.
- PETERSEN O. W., RONNOV-JESSEN L., HOWLETT A. R. AND BISSEL M. J. (1992). Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 9064-9068.
- PETERSEN J.M., SKALICKY J.J., DONALDSON L.W., McINTOSH L.P., ALBER T. AND GRAVES B.J. (1995). Modulation of transcription factor Ets-1 DNA binding : DNA induced an folding of an α helix. *Science.* **269**, 1866-1869.
- PEYRAT J.P., HONDERMARCK H., LOUCHEZ M.M. AND BOILLY B. (1991). Demonstration of basic fibroblast growth factor high and low affinity binding sites in human breast cancer cell lines. *Cancer communi.* **3**, 323-329.
- PIGNATELLI M., HANBY A. AND STAMP G.W. (1991). Low expression of β 1, α 2 and β 3 subunits of VLA integrins in malignant mammary tumors. *J. Pathol.* **165**, 25-32.
- PIGNATELLI M., CARDILLO M.R., HANBY A. AND STAMP G.W. (1992a). Integrins and their accessory molecules in mammary carcinomas. Loss of polarization in poorly differentiated tumors. *Human Pathol.* **23**, 1159-1166.
- PIGNATELLI M., LIU D, NASIM M.M., STAMP G.W., HIRANO S. AND TAKEICHI M. (1992b). Morphoregulatory activity of E-cadherin and β 1 integrins in colorectal tumor cells. *Br. J. Cancer.* **66**, 629-634.
- PLANUS E., BARLOVATZ-MEIMON G., ROGERS R.A., BONAUAUD S., INGBER D.E. AND WANG N. (1997). Binding of urokinase to plasminogen activator inhibitor type-1 mediates cell adhesion and spreading. *J. Cell Science,* **110**, 1091-1098.

- PLAZA S., GREVIN D., MAC LEOD K., STEHELIN D. AND SAULE S. (1994). Pax-QNR/Pax-6, a paired and homeo-box containing protein, recognizes ets-binding sites and can alter the transactivating properties of ets transcription factors. *Gene expression*, **4**, 43-52.
- PLOPPER G.E., Mc NAMEE H.P., DIKE L.E., BOJANOWSKI K. AND INGBER D.E. (1995). Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex. *Mol. Biol. Cell.*, **6**, 1349-1365.
- PLOW E.F., HERREN T., REDLITZ A., MILES L.A. AND HOOVER-PLOW J. (1995). The cell biology of the plasminogen system. *Review*, **9**, 939-945.
- POLETTE, M., CLAVEL C., COCKETT M., GIROD DE BENTZAMM S., MURPHY S. AND BIREMBAUT P. (1993). Detection and localisation of mRNA encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in human breast pathology. *Invasion and metastasis*, **13**, 31-37.
- POLLAREN J., STEPHENS R., SOLONEN E.M. AND VAHEN A. (1989). Proteolytic mechanisms operating at the surface of invasive cells. *Adv. Exp. Biol. Med.*, **233**, 187-189.
- POGNONEC P., BOULUKOS K. E., GESQUIERE J. C., STEHELIN D. AND GHYSDAEL J. (1988). Mitogenic stimulation of thymocytes results in the calcium dependent phosphorylation of c-ets-1 proteins. *EMBO J.* **7**, 977-983.
- POGNONEC P., BOULUKOS K. E., GESQUIERE J. C. AND GHYSDAEL J. (1989). The c-ets-1 protein is chromatin associated and binds to DNA *in vitro*. *Oncogene*, **4**, 691-697.
- POGNONEC P., BOULUKOS K. E., BOSSELOT R., BOYER C., SCHMITT-VERHULST A. M. AND GHYSDAEL J. (1990). Identification of a c-ets-1 variant protein unaffected in its chromatin and *in vitro* DNA-binding capacities by T cell antigen receptor triggering and intracellular calcium rises. *Oncogene*, **5**, 603-610.
- PONGUBALA J. M., NAGULAPLALI S., KLEMSZ M. J., MC KERCHER S. R., MAKI R. A. AND ATCHINSON M. L. (1992). PU.1 recruits a second nuclear factor to a site important for immunoglobulin κ 3' enhancer activity. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 368-378.
- PONGUBALA J. M., VAN BEVEREN C., NAGULAPLALI S., KLEMSZ M. J., MC KERCHER S. R., MAKI R. A. AND ATCHINSON M. L. (1993). Effect of PU.1 phosphorylation on interaction with NF-EM5 and transcriptional activation. *Science*, **259**, 1622-1625.
- PRESTA M., MOSCATELLI D., JOSEPH-SILVERSTEIN J. AND RIFKIN D.B. (1986). Purification from human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis and migration. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 4060-4066.
- PROSSER H. M., WOTTON D., GEGONNE A., GHYSDAEL J., WANG S., SPECK N. A. AND OWEN M. J. (1992). A phorbol ester response element within the human T-cell receptor *b*-chain enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 9934-9938.
- PYKE C., GRAEM N., RALFKIAER E., RONNE E., HOYER-HANSEN G., BRÜNNER N. AND DANO K. (1993). Receptor for urokinase is present in tumor-associated macrophages in ductal breast carcinoma. *Cancer Res*, **53**, 1911-1915.
- PYKE C., KRISTENSEN P., RALFKIAER E., GRONDAHL-HANSEN, J., ERIKSEN J., BLASI F. AND DANO K. (1991). Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas. *Am. J. Pathol.* **138**, 1059-1067.
- QUEVA C., LEPRINCE D., STEHELIN D. AND VANDENBUNDER B. (1993). p54c-ets-1 and p68c-ets-1 the two transcription factors encoded by the c-ets-1 locus are differentially expressed during the development of the chick embryo. *Oncogene*, **8**, 2511-2520.
- RABAUULT B. AND GHYSDAEL J. (1994). Calcium induced phosphorylation of ETS-1 inhibits its specific DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 28143-28151.
- RABAUULT B., ROUSSEL M., TRAN QUANG C. AND GHYSDAEL J. (1996). Phosphorylation of Ets-1 regulates the complementation of CSF-1 receptor impaired in mitogenesis. *Oncogene*, **13**, 877-881.
- RADKE K., BEUG H., KORNFELD S. AND GRAF T. (1982). Transformation of both erythroid and myeloid cells by E26, an avian leukemia virus that contains the myb gene. *Cell*, **31**, 643-653.
- RAHIMI R., SAULNIER R., NAKAMURA T., PARK M. AND ELLIOTT B. (1994). Role of Hepatocyte growth factor in breast cancer : a novel mitogenic factor secreted by adipocytes. *DNA Cell Biol.* **13**, 1189-1197.
- RASCLE A., FERRAND N., GANDRILLON O. AND SEMARUT J. (1996). Myb-ets fusion oncoprotein inhibits thyroid-hormone receptor/ c-erb-A and retinoic acid receptor functions: a novel mechanism of action for leukemogenic transformation by E26 avian retrovirus. *Mol. Cell; Biol.* **16**, 6338-6351.
- RAO E., DANG W., TIAN G. AND SEN R. (1997). A three-protein-DNA complex on a B cell-specific domain of the immunoglobulin mu heavy chain gene enhancer. *J. Biol. Chem.* **272**, 6722-6732.
- RAYMOND W.A. AND LEONG A.S.Y. (1989). Vimentin - a new prognostic parameter in breast carcinoma. *J. Pathol.* **158**, 107-114.

- RAYNAUD A. AND FRILLEY M. (1947). Etat de développement des ébauches mammaires et du cordon vaginal chez les foetus mâles et femelles de souris, dont les ébauches de glande génitales ont été détruites par une irradiation au moyen des rayons X à l'âge de 13 jours. *C. R. Acad. Sci.* **225**, 1380-1382.
- RECHSTEINER M. AND ROGERS S; W. (1996). PEST sequence and regulation by proteolysis. *trends Biochem. Sci.* **21**, 267-271.
- REDDY E. S. AND RAO. (1990). Localization and modulation of the DNA-binding domain activity of the human c-ets-1 proto-oncogene. *Canc. Res.* **50**, 5013-5016.
- REINARTZ J., BATRLA R., BOUKAMP P., FUSENIG N. AND KRAMER M.D. (1993). Binding and activation of plasminogen at the surface of human keratinocytes. *Exp Cell Res.* **208**, 197-208.
- REMY, P., SENAN, F., MEYER, D., MAGER, A. M., AND HINDELANG, C. (1996). Overexpression of the Xenopus XI-fli gene during early embryogenesis leads to anomalies in head and heart development and erythroid differentiation. *Int J Dev Biol* **40**, 577-589.
- RENAUD F., EL YAZIDI I., BOILLY-MARER Y., COURTOIS Y. AND LAURENT M. (1996). Expression and regulation by serum of multiple FGF1 mRNA in normal, transformed and malignant human mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **219**, 679-685.
- RENNI P. S., MAWJI N. R., COLDMAN A. J., GODOLPHIN W., JONES E. C., VIELKIND J. R. AND BRUCHOVSKY N. (1993). Relationship between variant forms of oestrogen receptor RNA and an apoptosis-related RNA, TRMP-2, with survival in patients with breast cancer. *Cancer.* **72**, 3648-3654.
- RESNATI M., GUTTINGER M., VALCAMONICA S., SIDENIUS N., BLASI F. AND FAZIOLI F. (1996). Proteolytic cleavage of the urokinase receptor substitutes for the agonist-induced chemotactic effect. *EMBO J.* **15**, 1572-1582.
- RESTUCCI R., DE VICO G. AND MAIOLINO P. (1995). Expression of β integrin in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary gland. *J. Comp. Path.* **113**, 165-173.
- REVILLON F., VANDEWALLE B., HORNEZ L. AND LEFEBVRE J. (1993). Influence of cAMP on E-cadherin expression and cell surface heparan sulfate proteoglycan synthesis in human breast cancer cells. *Anticancer Res.* **13**, 1625-1630.
- RHA S.Y., KIM J.H., ROH J.K., LEE K.S., MIN J.S., KIM B.S. AND CHUNG H.C. (1997). Sequential production and activation of matrix-metalloproteinase-9 (MMP-9) with breast cancer progression. *Breast Cancer Research and Treatment* , **43**, 175-181.
- RICHARDS J., PASCO D., YANG J., GUZMAN R. AND NANDI S. (1983). Comparison of the growth of normal and neoplastic mouse mammary cells on plastic, on collagen gels and in collagen gels. *Exp Cell Res*, **146**, 1-14.
- RICHARSON W. D., ROERTS B. L. AND SMITH A. E. (1986). Nuclear localization signals in polyoma virus large-T. *Cell.* **44**, 77-85.
- RICARDSON A. AND PARSONS J. T. (1995). Signal transduction through integrins: a central role for focal adhesion kinase? *Bioassays.* **17**, 229-236.
- RIVERA R.R., STUIVER M.H., STEENBERGEN R. AND MURRE C. (1993). Ets proteins new factors that regulate immunoglobulin heavy-chain gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7163-7169.
- ROBINSON S.D., SILBERSTEIN G.B., ROBERTS A.B., FLANDERS K.C. AND DANIEL C.W. (1991). Regulated expression and growth inhibitory effects of transforming growth factor- β isoforms in mouse mammary gland development. *Development* . **113**, 867-878.
- RODRIGUEZ FERNANDEZ J.L., GEIGER B., SALOMON D., SABANAY I. AND ZOLLER M., BEN-ZE'EV A. (1992a). Suppression of tumorigenicity in transformed cells after transfection with vinculin cDNA. *J. Cell. Biol.* **119**, 427-438.
- RODRIGUEZ FERNANDEZ J.L., GEIGER B., SALOMON D. AND BEN-ZE'EV A. (1992b). Overexpression of vinculin suppresses cell motility in Balb/C3T3 cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **22**, 127-134.
- RODRIGUEZ FERNANDEZ J.L., GEIGER B., SALOMON D. AND BEN-ZE'EV A. (1993). Suppression of vinculin expression by antisense transfection confers changes in cell morphology, motility and anchorage-dependent growth of 3T3 cells. *J. Cell. Biol.* , **122**, 1285-1294.
- ROMANOSPICA V., SUZUKI H., GEORGIU P., CHEN S. L., ASCIONE R., PAPAS T. S. AND BHAT N.K. (1994). Expression of ets family genes in hematopoietic cells. *Int. J. Oncol.* **4**, 521-531.
- ROMER J., BUGGE T.H., PYKE C., LUND L.R., FLICK M.J., DEGEN J.L. AND DANO K. (1996). Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *Nat. Med.* **2**, 287-292.
- RONNE E., HOYER-HANSEN G., BRUNNER N., PEDERSEN H., RANK F., OSBORNE C.K., CLARK G.M., DANO K. AND GRONDAHL-HANSEN J. (1995). Urokinase receptor in breast cancer tissue extracts. Enzyme-linked immunosorbent assay with a combination of mono- and polyclonal antibodies. *Breast Cancer Research and Treatment.* **33**, 199-207.

- RORTH P., NERLOV C., BLASI F. AND JONHNSEN M. (1990). Transcription factor PEA3 participates in the induction of urokinase plasminogen activator transcription in murine keratinocytes stimulated with epidermal growth factor or phorbol-ester. *Nucleic Acid Research*. **18**, 5009-5017.
- ROSEN E.M, JOSEPH A., JIN L., ROCKWELL S., ELIAS J.A, KNESEL J., WINES J., MCCLELLAN J., KLUGER M.J., GOLBERG I.D. AND ZITNIK R. (1994a). Regulation of scatter factor production via a soluble inducing factor. *J Cell Biol*. **127**, 225-234.
- ROSEN E.M., KNESEL J., GOLDBERG I.D., JIN L., BHARGAVA M., JOSEPH A., ZITNIK R., WINES J., KELLEY M. AND ROCKWELL S. (1994b). Scatter factor modulates the metastatic phenotype of the EMT6 mouse mammary tumor. *Int J Cancer*. **57**, 706-714.
- ROSEN G.D., BARKS J.L., IADEMARCO M.F., FISHER R.J. AND DEAN D.C. (1994c). An intricate arrangement of binding sites for the Ets family of transcription factors regulates activity of the $\alpha 4$ integrin gene promoter. *J. Biol. Chem*. **269**, 15652-15660.
- ROSKELLEY C.D., DESPREZ P.Y. AND BISSELL M.J. (1994). Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 12378-12382.
- ROSKELLEY C.D., SREBROW A. AND BISSELL M.J. (1995). A hierarchy of ECM-mediated signalling regulates tissue-specific gene expression. *Curr. Opin Cell. Biol.*, **7**, 736-747.
- ROUSSEL M. SAULE S., LAGROU C., ROMMENS C., BEUG H., GRAF T. AND STEHELIN D. (1979). Three new types of virla oncogenes of cellular specific origin for hematopoietic cell transformation. *Nature*. **281**, 452-455.
- ROVIGATTI U., WATSON D., K. AND YUNIS J. J. (1986). Amplification and rearrangement of Hu-ets- in leukemia and lymphoma with involvement of 11q23. *Science*. **232**, 398-400.
- ROZENBAUM H. (1985). Evolution des conceptions concernant les relations entre hormones et pathologie mammaire. *Horm. Repro. Métab*. **2**, 32-39.
- ROZENBAUM H. (1995). Exploration hormonales et pathologies mammaires. *Le Sein*, Espie et Gorins. ESKA ed. Paris.
- RUDLAND P.S, PLATT-HIGGINS A.M, WILKINSON M.C. AND FERNIG D.G. (1993). Immunocytochemical identification of basic fibroblast growth factor in the developing rat mammary gland : variations in location are dependent on glandular structure and differentiation. *J Histochem Cytochem*. **41**, 887-898.
- SACCHI N., WATSON D. K., GUERTIS M., VAN KESSEL H. M., HAGEMEIJER A., KERSEY J., DRABKIN H. D., PATTERSON D. AND PAPAS T. S. (1986). Hu-ets-1 and Hu-ets-2 genes are transposed in acute leukemias with (4; 11) and (8; 21) translocations. *Science*. **231**, 379-382.
- SACCHI N., WENDTNER C.M AND THIELE C. J. (1991). Single-cell detection of ets-1 transcripts in human neuroectodermal cells. *Oncogene*. **6**, 2149-2154.
- SAELMAN E.U.M., KEELY P.J. AND SANTORO S.A. (1995). Loss of MDCK cell $\alpha 2\beta 1$ integrin expression results in reduced cyst formation, failure of hepatocyte growth factor/scatter factor-induced branching morphogenesis, and increased apoptosis. *J. Cell Science*, **108**, 3531-3540.
- SAGER R., ANISOWICZ A., NEVEU M., LIANG P. AND SOTIROPOULOU G. (1993). Identification by differential display of $\alpha 6$ integrin as a candidate tumor suppressor gene. *FASEB J*. **7**, 964-970.
- SAGER R., SHENG S., PEMBERTON P. AND HENDRIX M. J. (1995). Maspin, a tumor suppressing serpin. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. **1**, 51-64.
- SAKAKURA T. (1991). New aspects of stroma-parenchyma relations in mammary gland differentiation. *Int Rev Cytol*. **125**, 165-202.
- SAKSELA O. AND RIFKIN D.B. (1990). Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *J. Cell Biol*. **110**, 767-775.
- SALMON P., GIOVANE A., WASYLYK B. AND KLATZMANN D. (1993). Characterization of the human CD4 gene promoter transcription from the CD4 gene core promoter is tissue-specific and is activated by Ets proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 7739-7743.
- SASAKI M., NISHIO M., SASAKI T. AND ENAMI J. (1994). Identification of mouse mammary fibroblast-derived mammary growth factor as hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. **199**, 772-779.
- SCHMIDHAUSER C., CASPERSON G.F., MYERS C.A., SANZO K.T., BOLTEN S. AND BISSELL M.J. (1992). A novel transcriptional enhancer is involved in the prolactin and extracellular matrix-dependent regulation of β -casein gene expression. *Mol. Biol. Cell*. **3**, 699-709.
- SCHNEIKERT J., LUTZ Y. AND WASYLYK B. (1992). Two independent activation domains in c-ets-1 and c-ets-2 located in non-conserved sequences of the ets gene family. *Oncogene*. **7**, 249-256.

- SCHON M., SCHON M.P., KUHROBER A., SCHIRMBECK R., KAUFMANN R. AND EBERHARD-KLEIN C. (1996). Expression of the human $\alpha 2$ integrin subunit in mouse melanoma cells confers the ability to undergo collagen-directed adhesion, migration, and matrix reorganization. *J. Invest. Dermatol.* **106**, 1175-1181.
- SELTZER J. L., LEE A. Y., AKERS K. T., SUDBECK B., SOUTHON A. A., WAYNER E. A. AND EISEN A. Z. (1994). Activation of 72 kDa type IV collagenase/ gelatinase by normal fibroblasts in collagen lattices is mediated by integrin receptors but is not related to lattice concentration. *Exp. Cell. Res.* **213**, 365-374.
- SESLAR S.P., NAKAMURA T. AND BYERS S.W. (1993). Regulation of fibroblast hepatocyte growth factor/scatter factor expression by human breast carcinoma cell lines and peptide growth factors. *Cancer Res.* **53**, 1233-1238.
- SESLAR S.P., NAKAMURA T. AND BYERS S.W. (1995). Tumor-stroma interactions and stromal cell density regulate hepatocyte growth factor protein levels: a role for transforming growth factor-beta activation. *Endocrinology.* **136**, 1945-1953.
- SETH A. AND PAPAS T. S. (1990). The c-ets-1 proto-oncogene has oncogenic activity and is positively autoregulated. *Oncogene.* **5**, 1761-1767.
- SETH A., ASCIONE R., FISHER R. J., MAVROTHALASSITIS G. H., BATH N. K. AND PAPAS T. S. (1992). The Ets gene family. *Cell Growth Diff.* **3**, 327-334.
- SETH A., ROBISON L., THOMPSON D. L., WATSON D. K. AND PAPAS T. S. (1993). Transactivation of GATA-1 promoter with Ets-1, Ets-2 and ERGB/Hu-FLI-1 proteins: stabilization of the Ets-1 protein binding on GATA-1 promoter sequences by monoclonal antibody. *Oncogene.* **8**, 1783-1790.
- SHAPIRO R. L., DUQUETTE J. G., ROSES D. F., NUNES I., HARRIS M. N., KAMINO H., WILSON E. L. AND RIFKIN D. B. (1996). Induction of primary cutaneous neoplasms in urokinase-type plasminogen activator (uPA)-deficient and wild type mice: cellular blue navy invade but not progress to malignant melanoma in uPA deficient animals. *Cancer Res.* **56**, 3597-3604.
- SHARMA C.P., EZZELL R.M. AND ARNAOUT M.A. (1995). Direct interaction of filamin (ABP280) with the $\beta 2$ integrin subunit CD18. *J. Immunol.* **154**, 3461-3470.
- SHENG S., CAREY J., SEFTOR E. A., DIAS L. AND HENDRIX M. J. (1996). Maspin act at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cell. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 11669-11674.
- SHIN M. K. AND KOSHLAND M. E. (1993). Ets related protein PU.1 regulates expression of the immunoglobulin J-chain gene through a novel Ets-binding element. *Genes Dev.* **7**, 2006-2015.
- SHINDOH, M., HIGASHINO, F., KAYA, M., YASUDA, M., FUNAOKA, K., HANZAWA, M., HIDA, K., KOHGO, T., AMEMIYA, A., YOSHIDA, K., AND FUJINAGA, K. (1996). Correlated expression of matrix metalloproteinases and ets family transcription factor E1A-F in invasive oral squamous-cell-carcinoma-derived cell lines. *Am. J. Pathol.* **148**, 693-700.
- SHOUKAT D. AND HANNIGAN G.E. (1996). Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Current Opinion in Cell Biology.* **8**, 657-669.
- SHYAMALA G. AND FERENCZY A. (1984). Mammary fat pad may be a potential site for initiation of estrogen action in normal mouse mammary glands. *Endocrinology.* **110**, 1078-1081.
- SIEGAL G.P., BARSKY S.H., TERRANOVA V.P. AND LIOTTA L.A. (1981). Stages of neoplastic transformation of human breast tissue as monitored by dissolution of basement membrane components. *Invasion and Metastasis.* **1**, 54-70.
- SILBERSTEIN G.B. AND DANIEL C.W. (1982). Elvax 40P implants : sustained, local release of bioactive molecules influencing mammary ductal development.
- SILBERSTEIN G.B. AND DANIEL C.W. (1987). Reversible inhibition of mammary gland growth by transforming growth factor- β . *Science* , **237**, 291-293.
- SILBERSTEIN G.B., STRICKLAND P., COLEMAN S. AND DANIEL C.W. (1990). Epithelium-dependent extracellular matrix synthesis in transforming factor- $\beta 1$ -growth-inhibited mouse mammary gland. *J Cell Biol.* **110**, 2209-2219.
- SILBERSTEIN G.B., FLANDERS K.C., ROBERTS A.B. AND DANIEL C.W. (1992). Regulation of mammary morphogenesis: evidence for extracellular matrix-mediated inhibition of ductal budding by transforming growth factor-beta 1. *Dev Biol.* **152**, 354-362.
- SKALLI O. AND GOLDMAN R. D. (1991). Recent insights into the assembly, dynamics and function of intermediate filament networks. *Cell motility cytoskel.* **19**, 67-6-79
- SKALICKY J.J., DONALDSON L.W., PETERSEN J.M., GRAVES B.J. AND McINTOSH L.P. (1996). Structural coupling of the inhibitory regions flanking the Ets domain of murine Ets-1. *Prot. Science.* **5**, 296-309.

- SOMMERS C.L., WALKER-JONES D., HECKFORD S.E., WORLAND P., VALVERIUS E., CLARK R., Mc CORMICK F., STAMPFER M., ABULARACH S. AND GELMANN E. (1989). Vimentin rather than keratin expression in some hormone-independent breast cancer cell lines and in oncogene-transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res.*, **49**, 4258-4263.
- SOMMERS C.L., THOMPSON E.W., TORRI J.A., KEMLER R., GELMANN E.P. AND BYERS S.W. (1991). Cell adhesion molecule uvomorulin expression in human breast cancer cell lines : relationship to morphology and invasive capacities. *Cell Growth & Differentiation*. **2**, 365-372.
- SOMMERS C.L., BYERS S.W., THOMPSON E.W., TORRI J.A. AND GELMANN E.P. (1994). Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* . **31**, 325-335.
- SORENSEN P. H., LESSNICK S. L., LOPEZ T. D., LIU X. F., TRICHE T. J. AND DENNY C. T. (1994). A second Ewing's sarcoma translocation, t(21, 22), fuses the EWS gene to another ETS family transcription factor ERG. *Nat. Genet.* **6**, 146-151.
- SORIANO J.V., PEPPER M.S., NAKAMURA T., ORCI L. AND MONTESANO R. (1995). Hepatocyte growth factor stimulates extensive development of branching duct-like structures by cloned mammary gland epithelial cells. *J Cell Sci.* **108**, 413-430.
- STOVER D. M., CAREY I., GARZON R. J. AND ZEHNER Z. E. (1994). A negative regulatory factor is missing in a human metastatic breast cancer cell line. *Cancer Res.* **54**, 3092-3095.
- SOUDANT N., ALBAGLI O., DHORDAIN P., FLOURENS A., STEHELIND. AND LEPRINCE D. (1994). A residu in the ETS domain mutated in the v-ets oncogene is essential for the DNA-binding and transactivating properties of the Ets-1 and Ets-2 proteins. *Nucl. Acids Res.* **22**, 3871-3879.
- SOULIER S., VILOTTE J.L., L'HUILLIER P.J. AND MERCIER J.C. (1996). Developmental regulation of murine integrin $\beta 1$ subunit- and Hsc73-encoding genes in mammary gland : sequence of a new mouse Hsc73 cDNA. *Gene*, **172**, 285-289.
- STACEY K. J., FOWLES L.S., COLMAN M.S., OSTROWSKI M.C. AND HUME D.A. (1995). Regulation of urokinase-type plasminogen activator gene transcription by Macrophage Colony Stimulating Factor. *Mol. Cell. Biol.* **15**, **6**, 3430-3441.
- STAHL S., WEITZMAN S. AND JONES J.C.R. (1997). The role of laminin-5 and its receptors in mammary epithelial cell branching morphogenesis. *J. Cell .Sci* ., **110**, 55-63.
- STEFANSSON S. AND LAWRENCE D.A. (1996). The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin $\alpha v \beta 3$ binding to vitronectin. *Nature*, **383**, 441-443.
- STEPHENS R.W., PÖLLÄNEN J., TAPIOVAARA H., LEUNG K.C., SIM P.S. SALONEN E.M., RONNE E., BEHRENDT N., DANO K. AND VAHERI A. (1989). Activation of pro-urokinase and plasminogen on human sarcoma cells : a proteolytic system with surface bound reactants. *J. Cell Biol.*, **108**, 1987-1995.
- STREULI C.H. AND BISSELL M.J. (1990). Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum. *J. Cell Biol.* **110**, 1405-1415.
- STREULI C.H., BAILEY N. AND BISSELL M.J. (1991). Control of mammary epithelial differentiation : basement membrane induces tissue-specific expression in the absence of cell interaction and morphological polarity. *J. Cell Biol.* **115**, 1383-1395.
- STREULI C.H., SCHMIDHAUSER C., KOBRIN M., BISSELL M.J. AND DERYNCK R. (1993). Extracellular matrix regulates expression of the TGF- $\beta 1$ gene. *Cell Biol.* **120**, 253-260.
- STREULI C.H., SCHMIDHAUSER C., BAILEY N., YURCHENCO P., SKUBITZ A.P., ROSKELLEY C. AND BISSELL M.J. (1995). Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. *J. Cell Biol.*, **129**, 591-603.
- SUDLOW A.W., WILDE C.J., BURGOYNE R.D. AND (1994). Transforming growth factor- $\beta 1$ inhibits casein secretion from differentiating mammary-gland explants but not from lactating mammary cells. *Biochem J.* **304**, 333-336.
- SUMIYOSHI K., BABA S., SAKAGUCHI S., URANO T., TAKADA Y. AND TAKADA A. (1991). Increase in levels of p^ulasminogen activator and type-1 plasminogen activator inhibitor in human breast cancer. Possible roles in tumor progression and metastasis. *Thromb Res.* **63**, 59-71.
- SUN L., WU G., WILLSON J.K.V., ZBOROWSKA E., YANG J., RAJKARUNANAYAKE I., WANG J., GENTRY L.E., WANG X. AND BRATTAIN M.G. (1994). Expression of transforming growth factor β type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem* , **269**, 26449-26455.
- SUZUKI H., ROMANOSPICA V., PAPAS T. S. AND BHAT N.K. (1995). ETS-1 supresses tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 4442-4446.
- SYMPSON C.J., TALHOUK R.S., ALEXANDER C.M., CHIN J.R., CLIFT S.M., BISSELL M.J. AND WERB Z. (1994). Target expression of stromelysin-1 in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue specific gene expression. *J. Cell Biol.* **125**, 681-693.

- TAKAHASHI K., SUZUKI K., KAWAHARA S. AND ONO T. (1989). Growth stimulation of human breast epithelial cells by basic fibroblast growth factor in serum-free medium. *Int J Cancer* , **43**, 870-874.
- TAKEICHI M. (1993). Cadherins in cancer : implications for invasion and metastasis. *Cell Biol.*, **5**, 806-811.
- TALHOUK R.S., CHIN J.R., UNEMORI E.N., WERB Z. AND BISSELL M.J. (1991). Proteinases of the mammary gland : developmental regulation *in vivo* and vectorial secretion in culture. *Development*, **112**, 439-449.
- TALHOUK R.S., BISSELL M.J. AND WERB Z. (1992). Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial functions during involution. *J Cell Biol* , **118**, 1271-1282.
- TALWALKER P.K. AND MEITES J. (1961). Mammary lobulo-alveolar growth induced by anterior pituitary hormones in adreno-ovariectomized and adreno-ovariectomized-hypophysectomized rats. *Proc Soc Exp Biol Med* , **107**, 880-883.
- THEILLET C., LE ROY X., DE LAPIEYRIERE O., GROSGEORGES J., ADNANE J., RAYNAUD S.D., SIMONY-LAFONTAINE J., GOLDFAB M., ESCOT C., BIRNBAUM D. AND GAUDRAY P. (1989). Amplification of FGF related genes in human tumors : possible involvement of HST in breast carcinomas. *Oncogene*. **4**, 915-922.
- THOMPSON E.W., PAIK S., BRUNNER N., SOMMERS C.L., ZUGMAIER G., CLARKE R., SHIMA T.B., TORRI J., DONOHUE S., LIPPMANN M.E., MARTIN G.R. AND DICKSON R.B. (1992a). Association of increased basement membrane invasiveness with absence of oestrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J. Cell Physiol.* **150**, 534-544.
- THOMPSON C.C., WANG C.Y., HO I.C., BOHJANEN P.R., PETRYNIAL B., JUNE C.H., MIESFELDT S., ZHANG L., NABEL G.J., KARPINSKI B. AND LEIDEN J.M. (1992b). Cis-acting sequences required for inducible interleukin-2 enhancer function bind a novel Ets-related protein, Elf-1. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1043-1053.
- TRIMBLE M. S., XIN J. H., GUY C. T., MULLER W. J. AND HASSEL J. A. (1993). PEA3 is overexpressed in mouse metastatic mammary adenocarcinomas. *Oncogene*. **8**, 3037-3042.
- TRYGGVAISON K., HOYHTYA M. AND SALO T. (1987). Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion and metastasis. *Biochem Biophys Acta*, **907**, 191-217.
- TSARFATY I., RESAU J.H., RULONG S., KEYDAR I., DONNA L., FALETTO D.L. AND VANDE WOUDE G.F. (1992). The *met* proto-oncogene receptor and lumen formation. *Science*. **257**, 1258-1261.
- ULICH T.R., YI E.S., CARDIFF R., YIN S., BIKHAZI N., BILTZ R., MORRIS C.F. AND PIERCE G.F. (1994). Keratinocyte growth factor is a growth factor for mammary epithelium *in vivo*. The mammary epithelium of lactating rats is resistant to the proliferative action of keratinocyte growth factor. *Am J Pathol.* **5**, 862-868.
- URANO F., UMEZAWA A., HONG W., KIKUCHI H. AND HATA J. H. (1996). A novel chimera gene between EWS and E1AF, encoding the adenovirus E1A enhancer binding protein, in extraosseous Ewing's sarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **219**, 608-612.
- VAHERI A., STEPHENS R. W., SALONEN E. M., POLLANEN J. AND TAPIOVAARA H. (1990). Plasminogen activation at the cell surface-matrix interface. *Cell Differentiation Dev.* **32**, 255-262.
- VAN DEN BROECKE C., VLEMINCKX K., DE BRUYNE G., VAN HOORDE L., VAKAET L., VAN ROY F. AND MAREEL M. (1996). Morphotypic plasticity *in vitro* and in nude mice of epithelial mouse mammary cells (NMuMG) displaying an epithelioid (e) or a fibroblastic (f) morphotype in culture. *Clin. Exp. Metastasis.* **14**, 282-296.
- VANDENBUNDER B., PARDANAUD L., JAFFREDO T., MIRABEL M.A. AND STEHELIN D. (1989). Complementary patterns of expression of c-ets-1, c-myb and c-myc in the blood forming system of the chick embryo. *Development.* **107**, 265-274.
- VANDENBUNDER B., QUEVA C., DESBIENS X., WERNERT N. AND STEHELIN D. (1995). Expression of the transcription factor c-ets-1 correlates with the occurrence of invasive processes during normal and pathological development. *Invasion and Metastasis*, **14**, 198-209.
- VAN ROOZENDAAL C.E.P., KLIJN J.G.M., SIEUWERTS A.M., HENZEN-LOGMANS S.C. AND FOEKENS J.A. (1996). Role of urokinase plasminogen activator in human breast cancer : active involvement of stromal fibroblasts. *Fibrinolysis.* **10**, Suppl. **2**, 79-83.
- VASSALLI J.D. (1994). The urokinase receptor. *Fibrinolysis.* **8**, Suppl. **1**, 172-181.
- VITALE M., BASSI V., ILLARIO M., FENZI G., CASAMASSIMA A. AND ROSSI G. (1994). Loss of polarity and de novo expression of $\beta 1$ family of integrins in thyroid tumors. *Int. J. cancer.* **59**, 185-190.
- VLEMINCKX K., VAKAET L., MAREEL M., FIERS W. AND VAN ROY F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumour cells reveals an invasion suppressor role. *Cell.* **66**, 107-119.

- WALKER R.A., DEARING S.J. AND GALLGHER B. (1994). Relationship of transforming growth factor- β to extracellular matrix and stromal infiltrates in invasive breast carcinoma. *Br. J. Cancer.* **69**, 1160-1165.
- WALTZ D.A., NATKIN L.R., FUJITA R.M., WEI Y. AND CHAPMAN H.A. (1997). Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin. *J. Clin. Invest.* **100**, 58-67.
- WANG C. Y., PRETRYNIK B., HO I. C., THOMPSON C. B. AND LEIDEN J. M. (1992). Evolutionarily conserved ets family members display distinct DNA binding specificities. *J. Exp. Med.* **175**, 1391-1399.
- WANG N. BUTLER J. P. AND INGBER D. E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science.* **260**, 1124-1127.
- WANG Y., SELDEN A.C., MORGAN N., STAMP G. AND HODGSON H.J.F. (1994a). Hepatocyte growth factor expression in human mammary epithelium. *Am.J.Pathol.* **144**, 675-682.
- WANG C. Y., BASSUK A. G., BOISE L. H., THOMPSON R. AND LEIDEN J. M. (1994b). Activation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter in T cells requires cooperating binding of Elf-1 and AP-1 transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1153-1159.
- WANG N., PLANUS E., POUCHELET M. FREDBERG J.J. AND BARLOVATZ-MEIMON G. (1995). Urokinase receptor mediates mechanical force transfer across the cell surface. *Am. J. Physiol.* **268**, C1062-C1066.
- WARY K. K., MANEIRO F., ISAKOFF S. J., MARCANTONIO E. E. AND GIANCOTTI F. G. (1996). The adaptator protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell.* **87**, 733-743.
- WASYLYK B., WASYLYK C., FLORES P., BEGUE A., LEPRINCE D. AND STEHELIN, D. (1990). The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* **346**, 191-193.
- WASYLYK C., GUTMAN, A., NICHOLSON R. AND WASYLYK B. (1991). The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same element as several non-nuclear oncoproteins. *EMBO J.* **10**, 1127-1134.
- WASYLYK C. AND WASYLYK B. (1992). Oncogenic conversions alters the transcriptional properties of ets. *Cell Growth and Diff.* **3**, 617-625.
- WASYLYK C., MAIRA S. M., SOBIESZCZUK P. AND WASYLYK B. (1994). Reversion of Ras transformed cells by Ets transdominant mutants. *Oncogene.* **9**, 3665-3673.
- WATABE M., NAGAFUCHI A., TSUKITA S. AND TAKEICHI M. (1994). Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. *J. Cell Biol.* **127**, 247-256.
- WATSON D. K., MAC WILLIAMS M.J., NUNN M.F., DUESBERG P., O'BRIEN S.J. AND PAPAS T.S. (1985). The ets sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21 : both loci are transcriptionally active. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 7294-7298.
- WATSON D. K., MAC WILLIAMS M.J. AND PAPAS T.S. (1988 a). Molecular organization of the chicken ets locus. *Virology.* **164**, 99-105.
- WATSON D. K., MAC WILLIAMS M.J., LAPIS P., LAUTENBERGER J.A., SCHWEINFEST, C.W. AND PAPAS T.S. (1988 b). Mammalian ets-1 and ets-2 genes encode highly conserved proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 7862-7866.
- WEAVER V.M. AND ROSKELLEY C.D. (1997). Extracellular matrix : the central regulator of cell and tissue homeostasis. *Cell Biology.* **7**, 40-42.
- WEHR R. AND GRUSS P. (1996). Pax and vertebrate development. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 369-377.
- WEI Y., WALTZ D.A., RAO N., DRUMMOND R.J., ROSENBERG S. AND CHAPMAN H.A. (1994). Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin. *J. Biol. Chem.* **269**, 32380-32388.
- WEI Y., LUKASHEV M., SIMON D.I., BODARY S.C., ROSENBERG S., DOYLE M.V. AND CHAPMAN H.A. (1996). Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science.* **273**, 1551-1555.
- WEIDNER K.M., SACHS M. AND BIRCHMEIER W. (1993). The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation and morphogenetic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J Cell Biol.* **121**, 145-154.
- WELTE T., GARIMORTH K., PHILIPP S., JENNEWEIN P., HUCK C., CATO A.C. AND DOPPLER W. (1994). Involvement of Ets-related proteins in hormone-independent mammary cell-specific gene expression. *Eur. J. Biochem.* **223**, 997-1006.
- WERNER M.H., CLORE G.M., FISHER C.L., FISHER R.J., TRING L., SCHILOACH J. AND GRONENBORN A.M. (1995). The solution structure of the human ETS-1-DNA complex reveals a novel mode of binding and true side chain intercalation. *Cell.* **83**, 761-771.

- WERNERT N., RAES M.B., LASSALLE B., DEHOUCQ M.P., GOSSELIN B., VANDENBUNDER B. AND STEHELIN D. (1992). C-ets-1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans. *Am. J. Pathol.* **138**, 111-117.
- WERNERT N., GILLES F., FAFEUR V., BOUALI F., RAES M.B., PYKE C., DUPRESSOIR T., SEITZ G., VANDENBUNDER B. AND STEHELIN D. (1994). Stromal expression of c-ets-1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res.* **54**, 5683-5688.
- WESTERMARCK J., SETH A. AND KAHARI V. (1997). Differential regulation of interstitial collagenase (MMP-1) gene expression by ETS transcription factors. *Oncogene.* **14**, 2651-2660.
- WILSON S.E., WENG J., CHWANG E.L., GOLLAHON L., LEITCH A.M. AND SHAY J.W. (1994). Hepatocyte growth factor (HGF), keratinocyte growth factor (KGF), and their receptors in human breast cells and tissues : alternative receptors. *Cell Mol Biol Res.* **40** 337-350.
- WOODS D.B., GHYSDAEL J. AND OWEN M.J. (1992). Identification of nucleotides preferences in DNA sequences recognised specifically by c-Ets-1 protein. *Nucl. Acids Res.* **20**, 699-704.
- WOLF C., LEFEBVRE O., ROUYER N., CHENARD M. P., BELLOCQ J. P., RIO M. C., CHAMBON P. AND BASSET P. (1994). Protéases d'origine stromale et progression tumorale. *Medecine/Science.* **10**, 507-515.
- WOTTON D., GHYSDAEL J., WANG S., SPECK N.A. AND OWEN M.J. (1994). Cooperative binding of Ets-1 and core binding factor to DNA. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 840-850.
- WU H., MOULTON K., HORVAI A., PARIK S. AND GLASS C.K. (1994). Combinatorial interactions between AP-1 and ets domain proteins contribute to the developmental regulation of the macrophage scavenger receptor gene. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2129-2139.
- XING R.H. AND RABBANI S.A. (1996). Overexpression of urokinase receptor in breast cancer cells results in increased tumor invasion, growth and metastasis. *International Journal of Cancer.* **67** (3), 423-429.
- XUE W., MIZUKAMI I., TODD R. F. AND PETTY H. R. (1997). Urokinase-type plasminogen activator receptor associate with $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins of sarcoma cells: dependence of extracellular matrix components. *Cancer Res.* **57**, 1682-1689.
- YAGASAKI R., NOGUCHI M., MINAMI M. AND EARASHI M. (1996). Clinical significance of E-cadherin and vimentin co-expression in breast cancer. *International Journal of Oncology.* **9**, 755-761.
- YAMADA K.M. AND GEIGER B. (1997). Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Current Opinion in Cell Biology.* **9**, 76-85.
- YAMAGUCHI T., KAWAMOTO K., UCHIDA N, UCHIDA K AND WATANABE S (1992) Three cell lines showing androgen-dependent, independent and suppressed phenotypes, established from a single tumor of androgen dependent shionogi carcinoma 115. *In Vitro Cell Dev Biol.* **28A**, 245-254.
- YAMAMOTO T., KOMURA H., MORISHIGE K., TADOKORO C., SAKATA M., KURACHI H. AND MIYAKE A. (1994). Involvement of autocrine mechanism of transforming growth factor- β in the functional differentiation of pregnant mouse mammary gland. *Eur J Endocrinol.* **130**, 302-307.
- YAMASHITA J. I., OGAWA M., YAMASHITA S., NOMURA K., KURAMOTO M., SAISHOJI T. AND SHIN S. (1994). Immunoreactive hepatocyte growth factor is strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast. *Cancer Res.* **54**, 1630-1633.
- YANG Y., SPITZER E., MEYER D., SACHS M., NIEMANN C., HARTMANN G., WEIDNER K.M., BIRCHMEIER C. AND BIRCHMEIER W. (1995). Sequential requirement of hepatocyte growth factor and neuregulin in the morphogenesis and differentiation of the mammary gland. *J Cell Biol.* **131**, 215-226.
- YANG B., HAUSER C. A., HENKEL G., COLMAN M; S., VANBEVEREN C., STACEY K. J., HUME D; A., MAKI R. A. AND OSTROWSKI M. C. (1996). Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-ets-1 and c-Ets-2. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 538-547.
- YEBRA M., PARRY G.C.N., STROMBLAD S., MACKMAN N., ROSENBERG S., MUELLER B.M. AND CHERESH D.A. (1996). Requirement of receptor-bound urokinase-type plasminogen activator for integrin $\alpha v\beta 5$ -directed cell migration. *J. Biol. Chem.* **271**, 29393-29399.
- YI E.S., BEDOYA A.A., LEE H., KIM S., HOUSLEY R.M., AUKERMAN S.L., TARPLEY J.E., STARNES C., YIN S., PIERCE G.F. AND ULICH T.R. (1994). Keratinocyte growth factor causes cystic dilation of the mammary glands of mice. Interactions of keratinocyte growth factor, estrogen, and progesterone in vivo. *Am J Pathol.* **145**, 1015-1022.
- ZHAO Y., ESCOT C., MAUDELONDE T., PUECH C., ROUANET P. AND ROCHEFORT H. (1993). Correlation between Mannose-6-phosphate/IGFII receptor and cathepsin D RNA levels by *in situ* hybridization in benign and malignant mammary tumors. *Cancer Research*, **53**, 2901-2905.

- ZHANG L., EDDY A., TENG Y. T., FRITZLER M., KULPPEL M., MELET F. AND BERNSTEIN A. (1995). An immunological renal disease in transgenic mice that overexpress *fli-1*, a member of the ETS family of transcription factor genes. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6961-6970.
- ZHANG M., MAASS N., MAGIT D. AND SAGER R. (1997). Transactivation through Ets and Ap1 transcription sites determines the expression of the tumor-suppressing gene *maspin*. *Cell Growth & Differentiation*. **8**, 179-186.
- ZUTTER M.M., MAZOUJIOU G AND SANTORO S.A. (1990a). Decreased expression of integrin adhesive receptors in adenocarcinoma of the breast. *Am. J. Pathol.* **137**, 863-870.
- ZUTTER M.M. AND SANTORO S.A. (1990b). Widespread histologic distribution of the $\alpha 2\beta 1$ integrin cell-surface collagen receptor. *Am. J. Pathol.* **137**, 113-120.
- ZUTTER M.M., KRIGMAN H.R. AND SANTORO S.A. (1993). Altered integrin expression in adenocarcinoma of the breast-analysis by in situ hybridization. *Am J Pathol.* **142**, 1439-1448.
- ZUTTER M.M., SANTORO S.A., PAINTER A.S., TSUNG Y.L. AND GAFFORD A. (1994). The human $\alpha 2$ integrin gene promoter identification of positive and negative regulatory elements important for cell-type and developmentally restricted gene expression. *J. Biol. Chem.* **269**, 463-469.
- ZUTTER M.M., SANTORO S.A., STAATZ W.D. AND TSUNG Y.L. (1995). Re-expression of the $\alpha 2\beta 1$ integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 7411-7415.

