

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE-LILLE I

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

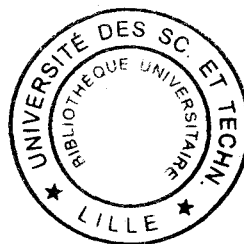
Présentée et soutenue publiquement

par

Frédéric LIONNETON

le Jeudi 12 Juin 2003

Identification d'un variant du facteur de transcription Ets-1 chez la souris.
Régulation de l'activité transcriptionnelle du promoteur de la VE-cadhérine.



Président : Pr. Jean-Pierre VILAIN
Rapporteurs : Dr. Georg BREIER
Dr. Philippe HUBER
Examineur : Pr. Dominique STEHELIN
Directeur de thèse : Dr. Fabrice SONCIN

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE-LILLE I

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Présentée et soutenue publiquement

par

Frédéric LIONNETON

le Jeudi 12 Juin 2003

Identification d'un variant du facteur de transcription Ets-1 chez la souris.
Régulation de l'activité transcriptionnelle du promoteur de la VE-cadhérine.

Président : Pr. Jean-Pierre VILAIN
Rapporteurs : Dr. Georg BREIER
Dr. Philippe HUBER
Examineur : Pr. Dominique STEHELIN
Directeur de thèse : Dr. Fabrice SONCIN

Ce travail a débuté dans l'EP560 et s'est poursuivi dans l'UMR8526.

Je remercie Monsieur Jean-Pierre Vilain pour me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Merci à Messieurs Georg Breier et Philippe Huber pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je tiens également à remercier Monsieur Dominique Stéhelin de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Fabrice Soncin pour m'avoir encouragé tout au long de ces années, pour ses conseils avisés et l'attention qu'il a portée à ce travail.

Je remercie Monsieur Bernard Vandebunder de m'avoir donné ma chance en m'accueillant dans son laboratoire lors de mon DEA.

Merci aux membres de l'ex-EP560 et de l'UMR8526

Merci à Nathalie qui a été mon vis à vis de paillasse pendant quelques années et qui m'a fait partager les histoires de son 'Bébé', merci à Nicole et Marie-Christine pour leur disponibilité et leur bonne humeur (et surtout pour le 'manger' de 11h30 audible à tout l'étage).

Merci à Jérôme, Etienne, Sébastien, David(s), Vincent, Nicolas, Barbara pour toutes les discussions scientifiques (ou pas) que nous avons pu partager.

Je remercie ma mère qui a toujours crû en moi et a toujours été à mes cotés dans les moments les plus durs.

Un grand merci à toute ma famille pour le soutien qu'elle m'a apporté tout au long de ces années.

Je tiens également à remercier mes beaux-parents pour leur bonne humeur et leur soutien.

Enfin, Céline, je te remercie pour tout ce que tu m'apportes jour après jour, merci pour ta patience, ta gentillesse, ton soutien..... et surtout de partager ma vie.

Je dédie cette thèse à mon père et à Rosa.....tous deux partis trop tôt pour voir aboutir ce travail. J'espère que de là-haut vous êtes fiers de moi.

Résumé

Le facteur de transcription Ets-1 est le membre fondateur de la famille ETS dont l'expression est associée aux cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse. Les protéines ETS partagent un domaine conservé de 85 acides aminés, appelé domaine ETS, capable de reconnaître un motif d'ADN contenant une séquence centrale GGAW, nommé EBS.

Nous avons identifié chez la souris un variant d'épissage alternatif de l'exon VII qui code pour une protéine de 40,5 kDa, nommée p42Ets-1. Le domaine codé par l'exon VII est impliqué dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de la protéine p51Ets-1. Le transcrit de ce variant est exprimé, à un niveau plus faible, dans toutes les lignées cellulaires exprimant celui de p51Ets-1 ainsi que dans l'embryon. Nous avons montré que la protéine p42Ets-1 reconnaît des EBS plus variés que p51Ets-1. La principale variation observée se situe au niveau de la base localisée en -1 du motif GGAW. En construisant une série de mutants de délétion, nous avons localisé la région responsable de cette différence de reconnaissance entre Val₂₈₀ et Glu₃₀₂ du domaine codé par l'exon VII. Nous avons montré que les deux isoformes de Ets-1 activent le promoteur de la VE-cadhérine par deux EBS fonctionnels et ce, de façon différente. Nos travaux suggèrent que p42Ets-1 est un facteur de transcription à part entière distinct de p51Ets-1 et susceptible de réguler l'expression de ses propres gènes.

D'autre part, nous avons recherché les gènes cibles de Ets-1 dans les cellules endothéliales. En analysant l'effet de la sur-expression de Ets-1 sur l'expression de différents marqueurs endothéliaux, nous avons montré que Ets-1 induisait l'expression du gène *fli-1* dans les cellules endothéliales et analysé la régulation du promoteur de *fli-1*. Nous avons également mis en évidence une boucle d'autorégulation de *fli-1*.

Enfin, nous avons mis en évidence une régulation de l'expression du gène de la VE-cadhérine par l'hypoxie.

Mots clés

Ets-1, endothélium, régulation transcriptionnelle, VE-cadhérine, Fli-1

Laboratoire

CNRS UMR8526/Institut de Biologie de Lille-Institut Pasteur de Lille

Mécanismes du Développement et de la Cancérisation

1, rue du Professeur Calmette, BP447, 59021 LILLE Cedex

Title:

Identification of a variant of the mouse Ets-1 transcription factor.

Regulation of the transcriptional activity of the *VE-cadherin* gene promoter.

Summary:

The Ets-1 transcription factor (p51Ets-1) is the founding member of ETS family and its expression is correlated with endothelial cells throughout embryonic development. The ETS proteins share a conserved domain of 85 amino acids, named ETS domain, which binds to a consensus DNA sequence centered on the core GGAA/T and named the Ets-Binding Site or EBS.

We have identified the mouse *ets-1* exon VII splice variant, which codes for a 40.5 kDa p42Ets-1 protein. The domain encoded by exon VII is involved in the regulation of the transcriptional activity of p51Ets-1. The splice variant is detected at lower levels in all cell lines which expressed *ets-1*, and also in the embryo. We showed that p42Ets-1 recognizes more various EBS than p51Ets-1, the most significant variation being observed at base -1 respective to the GGAW core. Using successive deletion mutants, we have located the region responsible for the differential recognition between Val₂₈₀ and Glu₃₀₂, this region is contained in the domain encoded by exon VII. We show that the two Ets-1 isoforms can differently activate the *VE-cadherin* promoter gene through two essential EBS. In summary, our work suggests that p42Ets-1 acts as a distinct transcription factor from p51Ets1 and can regulate the expression of its own genes.

Moreover, we have searched for Ets-1 targets genes in endothelial cells by over-expressing Ets-1 and analyzing the expression levels of various genes involved in angiogenesis. We showed that Ets-1 induces *fli-1* expression specifically in endothelial cells and identified the different functional EBS in the *fli-1* promoter. In addition, Fli-1 was found to bind to and transactivate its own promoter.

Keywords:

Ets-1, endothelium, transcriptional regulation, VE-cadherin, Fli-1

Laboratory:

CNRS UMR8526/Institut de Biologie de Lille-Institut Pasteur de Lille

Mécanismes du développement et de la cancérisation

1, rue du Professeur Calmette, BP447, 59021 LILLE Cedex

Abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AML-1	Acute Myeloid Leukemia-1
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
b-HLH	basic Helix-Loop-Helix
CBF	Core Binding Factor
CBP	CREB Binding Protein
CRE	cAMP Responsive Element
CREB	CRE Binding Protein
EBS	Ets Binding Site
Elf-1	E74 Like Factor 1
Erg	Ets Related Gene
Ets	E Twenty Six
F-MuLV	Friend Murine Leukemia Virus
Fli-1	Friend Leukemia Integration-1
GABP	GA Binding Site
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HUVEC	Human Umbilical Vascular Endothélium Cell
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
NERF2	New ETS Related Factor 2
Net	New Ets Factor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PU.1	Purine rich 1
RAG2	Recombination-Activating Gene 2
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
SFFV	Spleen Focus Forming Virus
Spi-1	SFFV Proviral Integration 1
Tel	Translocated Ets Leukemia
uPA	urokinase Plasminogen Activator
VEGF	Vascular Endothelium Growth Factor

Sommaire

PREAMBULE	8
INTRODUCTION	9
I Présentation de la famille ETS	9
II Les facteurs ETS impliqués dans l'angiogenèse	11
II.1 Ets-1	11
II.2 Fli-1.....	12
II.3 Erg.....	14
II.4 Tel	17
II.5 NERF2	18
III La signature de la famille ETS : le domaine ETS	18
III.1 Description du domaine ETS.....	18
III.2 Le complexe ADN/Domaine ETS	19
IV Régulation de la fixation à l'ADN	20
IV.1 Par changement de conformation : le complexe inhibiteur	20
IV.2 Par interactions avec d'autres partenaires protéiques.....	22
IV.3 Par phosphorylation.....	25
V Le variant d'épissage alternatif de l'exon VII de ets-1	27
V.1 Les deux isoformes de Ets-1 et leur capacité à fixer l'ADN	27
V.2 Rôle des isoformes de Ets-1	27
VI Revues	31
VI.1 Mises à Jour.....	32
VI.1.1 Ets-1.....	32
VI.1.2 Elf-1	33
VI.1.3 Net	33
VII La VE-cadhérine	34
VII.1 Les cadhérines.....	34
VII.2 Rôles de la VE-cadhérine.....	35
VII.2.1 Formation et maintien des capillaires sanguins	35
VII.2.2 La perméabilité	36
VII.2.3 Inhibition de la prolifération	36
VII.3 Expression de la <i>VE-cadhérine</i> au cours du développement	37
VII.4 L'inactivation du gène de la <i>VE-cadhérine</i> :	37
VII.5 Etude du promoteur de la <i>VE-cadhérine</i> :.....	38
VIII Les facteurs impliqués dans la réponse à l'hypoxie	40
VIII.1 ARNT/HIF-1 β	40
VIII.2 HIF-1 α	41
VIII.3 HIF-2 α /EPAS1	43
VIII.4 Les différents mécanismes régulant l'activité des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α	45

RESULTATS	48
I Expression et purification du facteur de transcription recombinant Ets-1 de souris ...	48
I.1 Article 1	49
I.2 Discussion	50
II Caractérisation de l'isoforme p42Ets-1 chez la souris	50
II.1 Article 2	53
II.2 Discussion	54
III HIF-2α régule l'activité du promoteur de la VE-cadhérine en hypoxie	55
III.1 Commentaires	59
IV Ets-1 régule l'expression du gène <i>fli-1</i> dans les cellules endothéliales.....	60
IV.1 Article 3	62
IV.2 Discussion	63
DISCUSSION GENERALE	64
I p42Ets-1 est un facteur de transcription distinct de p51Ets-1	64
II Spécificité de reconnaissance à l'ADN.....	65
III Expression et contrôle de l'activité de p42Ets-1.....	65
IV Qu'en est-il de la famille ETS ?	66
V Quel est le rôle de Ets-1 dans les cellules endothéliales ?	67
REFERENCES.....	69

Préambule

Les facteurs de transcription déterminent l'expression des gènes en se fixant sur des séquences d'ADN spécifiques présentes dans leurs régions promotrices. Lors de cette fixation, ces facteurs interagissent avec la machinerie transcriptionnelle, ce qui a pour effet de transactiver ou de réprimer l'expression des gènes. La formation d'organes au cours du développement embryonnaire ainsi que l'organisation d'une réponse cellulaire à un stimulus demandent une coordination spatiale et temporelle de ces facteurs pour l'expression des gènes régulés.

Notre groupe s'intéresse à l'identification des gènes régulés par le facteur de transcription Ets-1 au cours de l'angiogenèse. L'angiogenèse est un processus biologique qui consiste en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau vasculaire déjà établi. L'endothélium vasculaire forme une monocouche continue de cellules endothéliales délimitant la lumière interne des vaisseaux sanguins. Chez l'adulte, les cellules endothéliales sont normalement quiescentes et sont induites à former de nouveaux vaisseaux dans certaines situations physiologiques ou pathologiques. En résumé, lors de ce phénomène, les cellules endothéliales quiescentes sont activées sous l'influence d'un stimulus angiogénique, elles dégradent la matrice extracellulaire, migrent et prolifèrent en direction de la source du stimulus pour former de nouveaux vaisseaux sanguins (Carmeliet, 2000).

Dans l'introduction, je vais dans un premier temps présenter brièvement la famille des facteurs de transcription ETS puis développer plus en détail ceux impliqués dans l'angiogenèse, Ets-1, Fli-1, Erg, Tel et NERF2. Dans une seconde partie, je développerai l'aspect structural du domaine ETS, les différentes interactions qu'il réalise lors de sa fixation à l'ADN et les mécanismes qui régulent cette fixation. Enfin, dans la dernière partie de cette introduction, je présenterai les principales molécules rencontrées tout au long de mon travail : le variant d'épissage alternatif de l'exon VII de Ets-1 codant pour p42Ets-1, la VE-cadhérine et les facteurs de l'hypoxie.

Introduction

I Présentation de la famille ETS

Le premier facteur ETS a été identifié dans le génome du rétrovirus E26 qui induit, après une courte période de latence des leucémies mixtes érythrocytaires/myélocytaires chez le poulet. L'étude de ce rétrovirus a permis d'identifier le gène viral responsable de l'apparition de cette maladie. Ce gène est une structure tripartite composée des oncogènes *v-myb* et *v-ets* et d'une partie du gène *gag* (Leprince et al., 1983; Nunn et al., 1983). Il donne naissance à une protéine de 135 kDa localisée dans le noyau des cellules infectées (Klempnauer et al., 1984). L'homologue cellulaire de *v-ets*, *c-ets-1*, a été décrit dans les cellules de poulet non transformées par le virus E26. Par la suite, de nombreux homologues cellulaires ont été identifiés chez diverses espèces. Actuellement, plus de 50 membres, classés en plusieurs groupes ont été décrits, tous participent à la régulation de l'expression de gènes (Laudet et al., 1999). Les protéines de la famille ETS ont en commun une région hautement conservée de 85 acides aminés correspondant au domaine de fixation à l'ADN, appelé domaine ETS. Ce domaine est généralement rencontré dans la partie carboxy-terminale des protéines ETS, excepté dans Elk-1, Sap1a et Efl1 où il est localisé dans la région amino-terminale (figure 1). Par l'intermédiaire de ce domaine, les protéines ETS reconnaissent une séquence d'ADN d'environ 10bp, centrée autour d'un motif GGAA/T, nommée Ets Binding Site (EBS). L'identité des bases environnant ce motif joue un rôle primordial dans la spécificité d'interaction des facteurs ETS avec l'ADN (Tableau I). Un second domaine conservé, appelé domaine *Pointed*, se retrouve dans les facteurs appartenant aux groupes ETS, ERG, ELG et TEL (figure 1). Ce domaine, localisé dans la région amino-terminale, est impliqué dans les interactions protéines-protéines lors de l'homo-dimérisation (Kim et al., 2001) ou de l'hétéro-dimérisation (Baker et al., 2001) des protéines ETS. A l'exception des protéines Erf, Net, Tel et Yan, qui sont des répresseurs transcriptionnels, les autres facteurs ETS possèdent une activité transactivatrice. Les facteurs ETS interviennent dans de nombreux mécanismes tels que la migration et la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation hématopoïétique, l'angiogenèse et l'embryogenèse (pour revue (Ghysdael and Boureux, 1997)).

Tableau I. Séquences consensus de fixation des protéines Ets-1, Ets-2, PU.1, Spi-B, Fli, GABP α et Elk-1
D'après Ghysdael *et al*, 1997.

Protéines	Consensus de fixation à l'ADN									
Ets-1	A/G	C/G	C/A	G	G	A	A/T	G/A	T/C	
Ets-2	C/A	C	A/C	G	G	A	A/T	G/A	T/C	
PU.1	A/T	G/C	A/C	G	G	A	A	G/C	T	
Spi-B	A/T	G/C	A/C	G	G	A	A	G/C	T	A/T
Fli-1	A	C	C/A	G	G	A	A	G/A	T/C	A/G
GABP α	G/A	C/G	C/A	G	G	A	A/T	G/A	T/C	
Elk-1	A/G	C/A	C/A	G	G	A	A/T	G/A	T/C	

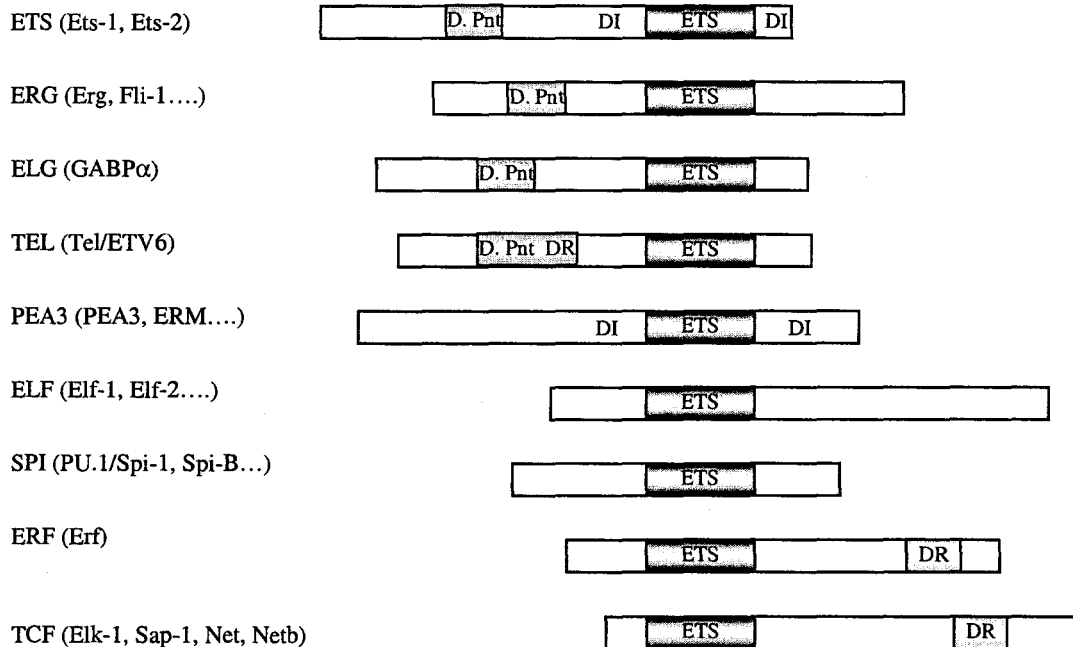


Figure 1. Représentation schématique de la structure des membres de la famille ETS. D. ETS :
Domaine ETS, Pnt : Domaine *Pointed*, DR : Domaine répresseur, DI : Domaine inhibiteur

II Les facteurs ETS impliqués dans l'angiogenèse

II.1 Ets-1

Dans le génome humain, le gène *ets-1* s'étend sur plus de 60kbp sur le bras long du chromosome 11 (de Taisne et al., 1984). Pendant le développement embryonnaire, *ets-1* est exprimé dans les cellules endothéliales; chez le poulet, l'ARNm *ets-1* est exprimé dans les cellules de l'aire opaque où se forment les îlots sanguins extra-embryonnaires. Lorsque les cellules endothéliales se différencient à la périphérie de ces îlots, le transcrit *ets-1* n'est détecté que dans ces cellules (Pardanaud and Dieterlen-Lièvre, 1993; Quéva et al., 1993). Par la suite et tout au long du développement, le transcrit *ets-1* est détecté dans les cellules endothéliales pendant la formation des nouveaux vaisseaux sanguins et cette expression décroît quand les vaisseaux se différencient en vaisseaux matures (Maroulakou et al., 1994; Vandebunder et al., 1989). Pendant l'implantation et la placentation chez la souris, *ets-1* est exprimé dans le réseau vasculaire nouvellement formé de l'endomètre (Grevin et al., 1993). Chez l'adulte, l'expression de *ets-1* n'est détectée ni dans les gros vaisseaux ni dans les capillaires. Elle est induite dans l'endothélium de l'aorte après sa dénudation (Tanaka et al., 1998). Cette expression est également observée pendant l'angiogenèse, la cicatrisation et le développement tumoral (Wernert et al., 1992). *In vitro*, de nombreux résultats montrent que l'expression de *ets-1* est liée à l'activation de l'endothélium : *ets-1* est exprimé dans les cellules endothéliales qui prolifèrent (Wernert et al., 1992), qui migrent (Tanaka et al., 1998) mais pas dans les cellules qui ont atteint la confluence (Wernert et al., 1992). Cette expression est augmentée dans les cellules endothéliales stimulées par différents facteurs angiogéniques tels que le FGFa,b, le VEGF et EGF (Chen et al., 1997; Iwasaka et al., 1996; Wernert et al., 1992). Elle est aussi augmentée dans les cellules musculaires lisses stimulées par l'endothéline-1 et le PDGF-BB (Naito et al., 1998). Dans l'embryon, l'expression de *ets-1* n'est pas strictement restreinte à l'endothélium. Elle est également détectée dans le mésenchyme proche des épithéliums au cours de l'organogenèse, dans les tissus lymphoïdes tels que la rate et le thymus, dans les lymphocytes T et B matures et dans les cellules NK (Chen, 1985; Maroulakou and Bowe, 2000; Maroulakou et al., 1994).

Ets-1 régule l'expression de protéases ainsi que la migration des cellules endothéliales. L'expression de gènes tels que celui de l'activateur de plasminogène (uPA) et la métalloprotéase MMP-1 de même que la capacité de migration de cellules endothéliales sont fortement diminuées en présence d'un oligonucléotide anti-sens anti-Ets-1 (Iwasaka et al.,

1996). *In vivo*, des expériences similaires ont été réalisées sur la membrane chorioallantoïdienne de poulet. Dans ce modèle animal, la transfection de l'oligonucléotide anti-sens anti-Ets-1, 5 jours après le début du développement, a pour effet de diminuer le nombre et le diamètre des vaisseaux sanguins (Wernert et al., 1999).

Les premières études d'inactivation du gène *ets-1* ont montré que ce facteur était essentiel pour assurer la survie des cellules lymphoïdes matures. Deux équipes ont utilisé le système de complémentation RAG-2 (Recombination Activating gene 2) dont le principe est que les blastocystes *Rag-2^{-/-}* sont incapables de développer des cellules T et B matures. L'injection de cellules ES permet de compléter ces défauts. L'injection de cellules ES *ets-1^{-/-}* permet d'étudier spécifiquement la contribution de *ets-1* dans le développement des lignées lymphoïdes. Dans ce système, l'inactivation de *ets-1* provoque, en particulier, une induction de l'apoptose des cellules T (Bories et al., 1995; Muthusamy et al., 1995). Pour mieux comprendre l'implication du facteur Ets-1 dans le développement embryonnaire, l'inactivation du gène *ets-1* par recombinaison homologue a été réalisée chez la souris. Les souris *ets-1^{-/-}* sont viables et fertiles. Cependant, 50% des souris *ets-1^{-/-}* meurent dans les quatre semaines suivant la naissance. Les causes de cette augmentation de la mortalité périnatale ne sont pas encore connues. Les souris adultes *ets-1^{-/-}* possèdent un taux normal d'érythrocytes, de monocytes, de granulocytes et de plaquettes. Le principal défaut observé est une diminution importante du nombre de cellules NK. L'analyse du développement des cellules T et B chez les souris *ets-1^{-/-}* révèle que le nombre de thymocytes diminue de 65% par rapport aux souris sauvages (Barton et al., 1998). Cette étude montre que le facteur de transcription Ets-1 n'est pas indispensable pour le développement vasculaire et hématopoïétique chez l'embryon.

II.2 Fli-1

Le gène *fli-1* (Friend Leukemia Integration-1) a été identifié pour la première fois comme un site d'insertion rétroviral du virus de Friend (F-MuLV). Cette insertion a pour effet d'augmenter fortement l'expression de *fli-1* et d'induire des érythroleucémies. *fli-1* est localisé à 240kb du proto-oncogène *ets-1* sur le chromosome 9 chez la souris et 11q23 chez l'homme, suggérant que *ets-1* et *fli-1* proviennent de la duplication du même gène ancestral (Ben David et al., 1991; Ben-David et al., 1990).

L'étude de son patron d'expression montre qu'au stade E7.5, *fli-1* est détecté au niveau du sac vitellin et des cellules endothéliales de la décidue mais pas dans l'embryon proprement dit. A partir du stade E8.0, son expression dans l'embryon est détectée au niveau des cellules du mésenchyme puis dans les cellules des crêtes neurales en migration, les cellules endothéliales des vaisseaux nouvellement formés, le foie et les mégacaryocytes (Melet et al., 1996).

La première expérience d'inactivation du gène *fli-1* par recombinaison homologue a montré que les souris *fli-1*^{-/-} étaient viables et présentaient un défaut de développement des thymocytes. Cependant, l'inactivation du gène *fli-1* n'était pas complète et une protéine Fli-1 tronquée était encore détectée dans les mégacaryocytes (Melet et al., 1996). Par la suite, deux équipes ont réalisé l'inactivation du gène *fli-1*, toutes deux aboutissant au même phénotype ; les embryons *fli-1*^{-/-} ne sont pas viables et meurent au stade E12.5. L'analyse de ces embryons aux stades précoces de développement ne met en évidence aucune anomalie morphologique avant le stade E10. A partir du stade E11, des zones hémorragiques massives apparaissent au niveau cérébral ainsi que des défauts de développement hématopoïétique (Hart et al., 2000; Spyropoulos et al., 2000). Ces résultats signifient que Fli-1 joue un rôle important dans la régulation de l'hématopoïèse et de l'hémostase.

Trois promoteurs majeurs de *fli* ont été décrits. Le premier a été identifié dans les cellules érythroleucémiques infectées par le F-MuLV. L'initiation de la transcription se fait en position -398 en amont du codon d'initiation de la traduction (+1) (Barbeau et al., 1996). Un second promoteur responsable de l'initiation de la transcription en -204 a été décrit (Starck et al., 1999). Dans les deux cas, la même protéine est synthétisée, composée de 452 acides aminés et d'un poids moléculaire de 51kDa. Un troisième promoteur a été localisé à 1,8 Kbp en amont de l'ATG (+1). Ce promoteur entraîne la synthèse d'un variant d'épissage alternatif de Fli-1, appelé Fli-1b, dont le poids moléculaire est de 48kDa. L'épissage se fait entre l'exon 1b et l'exon 2 excisant ainsi l'exon 1 qui contient les six premiers acides aminés de Fli. Le site d'initiation de la traduction est alors localisé dans l'exon 2 en +100 par rapport au site d'initiation classique (figure 2) (Dhulipala et al., 1998). Deux autres exons 1 (a et b) alternatifs, différents de ceux décrits précédemment, ont été identifiés par RACE dans des tumeurs neuroectodermes humaines. Ces exons 1a et 1b sont localisés respectivement à 1,3 et 2,5kbp de l'exon 1. Seul l'exon 1b présente une activité promotrice qui n'est pas conservée chez la souris (Barat et al., 2000).

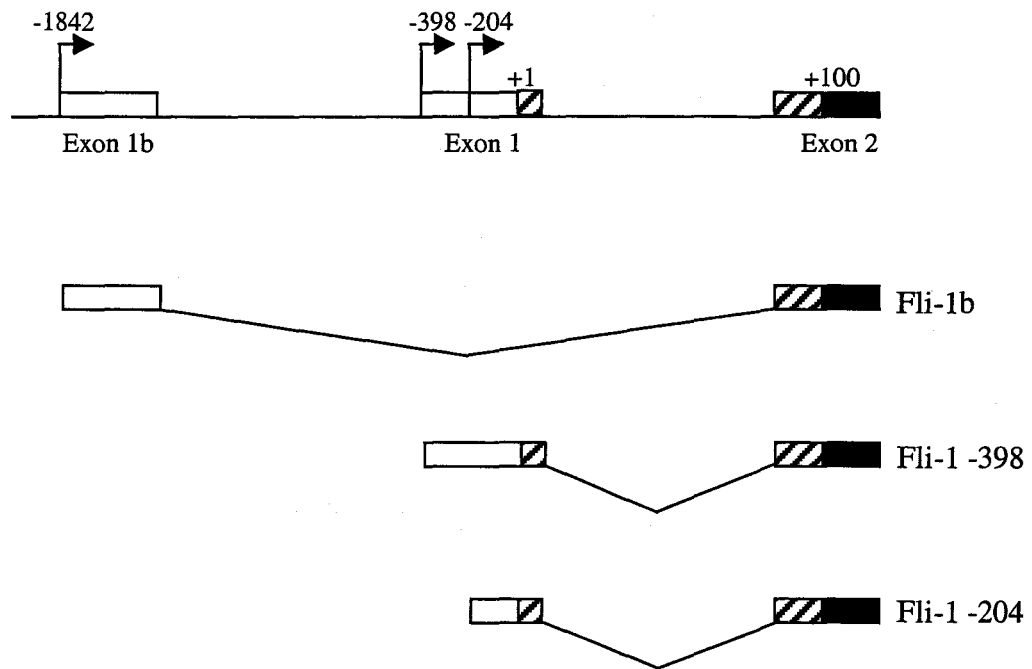
Les virus SFFV (Spleen Focus Forming Virus) et F-MuLV entraînent l'apparition d'érythroleucémie chez les souris infectées. Les cellules infectées par SFFV ou F-MuLV

expriment des niveaux de protéines Fli-1 équivalents. De plus, le facteur de transcription de la famille ETS Spi-1/PU.1 est sur-exprimé dans les cellules infectées par SFFV mais pas dans celles infectées par F-MuLV. L'analyse des différents transcrits de *fli-1* montre que la transcription est initiée préférentiellement en -398 dans les cellules transformées par F-MuLV alors qu'elle est majoritairement initiée en -204 dans celles infectées par SFFV. Des alignements de séquences des parties 5' du gène *fli-1* humain et murin ont mis en évidence deux régions fortement conservées autour de la position -200 et -500. La région située en -200 présente des éléments de réponse de facteurs de transcription tels que GATA et ETS. Deux EBS situés en amont du site d'initiation de la transcription -204 sont parfaitement conservés entre l'homme, la souris et le xénope. Des expériences de retard sur gel et des tests de co-transfection révèlent que le facteur de transcription Spi-1/PU.1 est capable d'activer le promoteur de *fli-1* en interagissant directement avec ces deux EBS (Starck et al., 1999). Le facteur GATA-1 se fixe sur l'élément de réponse GATA localisé en 5' de l'exon 1 (Barbeau et al., 1999). L'ensemble de ces résultats montre que Spi-1 et GATA-1 jouent un rôle important dans la régulation de l'expression de Fli-1.

II.3 Erg

Le gène *erg* humain est localisé sur le chromosome 21. Il est à l'origine de plusieurs transcrits résultants d'épissage alternatif. Les deux premiers ADNc (Erg-1 et Erg-2) ont été identifiés lors d'un criblage d'une banque de cellules d'adénocarcinome colique humain sur la base de leur homologie de séquence avec le gène *ets-2* (Rao et al., 1987; Reddy et al., 1987). Par la suite, le criblage d'une banque d'ADNc de foie foetal humain utilisant une sonde Erg-1/-2, a permis d'identifier trois autres transcrits appelés *ergp38*, *ergp49* et *ergp55* (Duterque-Coquillaud et al., 1993). *erg* est impliqué dans des translocations chromosomiques responsables de l'apparition de leucémies myéloïdes et de tumeurs d'Ewing (Shimizu et al., 1993; Zucman et al., 1993). L'analyse par hybridation *in situ* montre que l'expression de *erg* est fortement liée au développement de l'arbre vasculaire. Son expression est détectée dès le stade E8.0 dans l'endothélium intra- et extra-embryonnaire, au niveau du placenta et du trophoblaste. Cette expression endothéliale diminue au stade E10.5 et 17 pour ne persister que dans les capillaires formés. *erg* est également détecté au niveau des zones de formation cartilagineuse puis son expression diminue au fur et à mesure de la formation du cartilage.

A



B

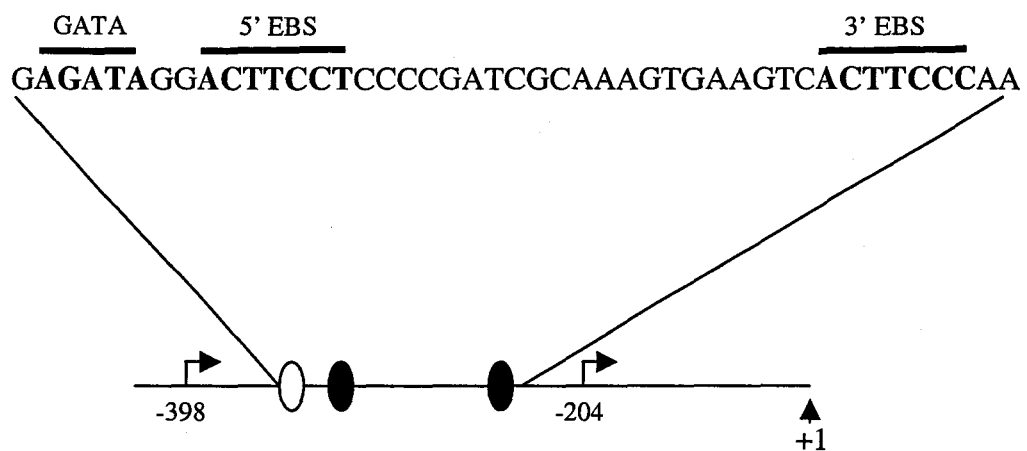


Figure 2. (A) Représentation schématique de la structure génomique située en 5' du gène Fli-1 (haut) et des différent transcrits (bas). Les rectangles blancs représentent les séquences 5'UTR et les rectangles hachurés et noirs représentent les séquences codantes communes de Fli. D'après Sarazin *et al*, 2000. (B) Localisation des éléments de réponses présents dans la partie du promoteur -398/-204.

Cette étude montre également que *erg* est exprimé au niveau des cellules de crêtes neurales en cours de migration. Actuellement, peu de données sont disponibles sur le rôle de Erg *in vivo* et l'inactivation du gène devrait apporter des précisions sur son rôle au cours du développement embryonnaire. Toutefois, plusieurs séries de résultats ont mis en évidence l'implication de Erg dans l'angiogenèse et la formation du cartilage.

L'homologue du gène *erg* humain a été caractérisé chez le xénope (XIErg). Lors du développement de cet amphibien, la micro-injection d'ARNm dans la région ventrale permettant l'expression ectopique de XIErg entraîne une différenciation endothéliale ectopique (Baltzinger et al., 1999). Erg transactive le promoteur de ICAM-2 (McLaughlin et al., 1999), du facteur de von Willebrand (Schwachtgen et al., 1997) et de la collagénase I (Buttice et al., 1996). Des expériences de retard sur gel réalisées avec des extraits nucléaires de cellules endothéliales ont révélé que Erg ou Fli-1 étaient capables de se fixer sur des EBS présents dans le promoteur de la VE-cadhérine (Gory et al., 1998) et de la stromélysine 1 (Buttice et al., 1996). Afin de mieux définir le rôle de Erg dans l'angiogenèse, l'expression du gène *erg* a été réduite dans des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) par l'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens anti-Erg. Le traitement des cellules par l'oligonucléotide anti-sens provoque une diminution significative de l'expression de 5 gènes ; ICAM-2, le facteur de von Willebrand, SPARC, thrombospondine (TSP-1) et RhoA. Toutes ces protéines ont été décrites comme possédant des propriétés pro- ou anti-angiogéniques, hormis ICAM-2 dont le rôle dans l'endothélium n'est pas encore bien compris. Dans cette même étude, les auteurs ont montré que l'application de l'oligonucléotide anti-sens anti-Erg sur les cellules HUVEC cultivées sur du Matrigel a aussi pour effet d'inhiber la formation de tubes et de branchements normalement observés (McLaughlin et al., 2001). Tous ces résultats indiquent que l'expression du gène Erg est requise pour la morphogénèse vasculaire.

Quelques données expérimentales suggèrent que Erg intervient dans la mise en place du cartilage ; des expériences réalisées chez le poulet ont montré que l'implantation dans le sillon interdigital de billes délivrant le facteur de croissance TGF β , a pour effet de diminuer l'apoptose dans cette zone et de favoriser le développement ectopique d'un doigt surnuméraire. La formation du cartilage de ce membre surnuméraire est précédée d'une forte expression du gène *erg* (Ganan et al., 1996). L'expérience inverse, consistant à favoriser l'apoptose pour empêcher la formation de cartilage, a été réalisée en implantant des billes imbibées du facteur BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein 2). Dans ce cas, l'expression de *erg* est inhibée (Macias et al., 1997).

II.4 Tel

Le gène *tel* a été initialement isolé pour sa faculté à se recombinaison avec le gène de la chaîne β du récepteur au PDGF, causant une leucémie chronique myéломonocytaire (Golub et al., 1994). Il est localisé sur le bras court du chromosome 12 humain. Depuis, ce gène a été décrit comme étant réarrangé dans plusieurs autres types de leucémies. *tel* est susceptible de se réarranger avec *ABL* (tyrosine kinase Abelson) (Papadopoulos et al., 1995) et le gène du facteur de transcription *AML1* (Golub et al., 1996). Des données préliminaires avaient montré que Tel était capable de reconnaître des EBS (Poirel et al., 1997). Les premières expériences permettant d'étudier les capacités de régulation transcriptionnelle de Tel ont été réalisées sur un vecteur nommé E74₃tk80Luc. Ce vecteur contient le gène de la luciférase dont l'expression est sous la dépendance d'une cassette promoteur/enhancer artificielle qui contient trois EBS en tandem localisés en amont du promoteur viral. Tel réprime l'activité de ce vecteur de façon dose-dépendante en s'homodimérisant par l'intermédiaire de son domaine *Pointed*. Lors de cette même étude, les auteurs ont montré que Tel était capable de réprimer l'activité du promoteur -270/-41 de *fli-1* (Lopez et al., 1999). Ce promoteur contient deux EBS essentiels pour son activation par Spi-1/PU.1 (Starck et al., 1999). Par la technique de doubles hybrides, il a été montré que Tel est capable d'interagir avec lui-même mais également avec l'autre membre de la famille ETS, Fli-1. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont confirmé ces résultats. Lors de cette interaction, Tel a pour effet d'inhiber l'activité transactivatrice de Fli (Kwiatkowski et al., 1998).

Par Northern Blot et hybridation *in situ*, *tel* est détecté, chez la souris, dès le stade E7.0 et le taux d'ARNm augmente fortement à partir du stade E17. Au stade E8.5 *tel* est observé au niveau du sac vitellin et de l'embryon proprement dit. Au stade E12.5, le transcrite de *tel* est détecté dans le foie, les reins et les poumons. Chez l'adulte, *tel* est détecté dans de nombreux tissus (Wang et al., 1997).

L'inactivation du gène *tel* chez la souris suggère que ce facteur est important dans la mise en place et le maintien du réseau vasculaire. Son invalidation par recombinaison homologue est létale. Les embryons *tel*^{-/-} meurent entre le stade E10.5 et E11.5. Dès le stade de développement E9.5, 65% des embryons *tel*^{-/-} présentent des défauts de branchement au niveau des vaisseaux du sac vitellin. Aucun défaut histologique n'est détecté au niveau de l'aorte dorsale et des vaisseaux intersomitiques. Au stade E10.5, la majorité des embryons mutants ont un important retard de croissance et un sac péricardiaque dilaté. Des zones

apoptotiques sont observées au niveau du tube neural et des tissus du mésenchyme (Wang et al., 1997).

II.5 NERF2

L'ADNc de *nerf* (New Ets Related Factor 2) a été isolé à partir d'une banque d'ADNc humaine par homologie de séquences avec le domaine ETS. Trois variants d'épissage alternatif, *nerf1a*, *nerf1b* et *nerf2* sont générés à partir du gène *nerf*. Parmi ces trois isoformes, seul NERF2 agit comme un facteur de transcription (Oettgen et al., 1996). Chez le poulet, l'expression de *nerf2* a été étudiée par hybridation *in situ*. Au stade E11 et E14, *nerf2* est exprimé au niveau de la membrane chorioallantoïdienne dans les gros vaisseaux et à des taux plus faibles dans les petits vaisseaux et les capillaires. Au niveau de l'embryon proprement dit, *nerf2* est observé dans l'aorte et le tube neural (Gaspar et al., 2002).

Peu de données sont disponibles sur le rôle de NERF2. *nerf2* est exprimé dans les cellules endothéliales et son produit transactive le gène *tie2* par l'intermédiaire d'EBS présents dans son promoteur (Dube et al., 1999). Récemment, il a été montré que l'hypoxie a pour effet d'augmenter l'expression de *tie1*, *tie2* et *nerf2* dans les cellules endothéliales. L'augmentation d'expression de *nerf2* précède celle de *tie2*. L'angiopoïétine-1 induit l'expression de *nerf2* chez les cellules quiescentes. De plus, l'expression de *nerf2* et *tie2* induite par l'hypoxie est bloquée par l'angiopoïétine-2, un inhibiteur compétitif de l'angiopoïétine-1. Ces nouvelles données suggèrent que l'angiopoïétine-1 régule l'expression de *nerf2* et de son propre récepteur en condition d'hypoxie (Christensen et al., 2002).

III La signature de la famille ETS : le domaine ETS

III.1 Description du domaine ETS

La famille ETS est caractérisée par un domaine de fixation à l'ADN hautement conservé d'environ 85 acides aminés, le domaine ETS. Ce domaine commun implique que toutes les protéines ETS reconnaissent des séquences d'ADN similaires appelées Ets Binding Site (EBS) d'environ 10 bases et contenant un motif central GGAA/T. L'identité des bases situées de part et d'autre du motif central GGAA/T permet de déterminer quelle protéine ETS va se fixer sur un EBS (Tableau I). Ce domaine est à la fois nécessaire et suffisant pour fixer

l'ADN. L'analyse du domaine ETS de Ets-1 par résonance magnétique nucléaire révèle que sa structure secondaire est composée de 3 hélices alpha (H1, H2, H3) et 4 feuillets bêta (S1, S2, S3, S4). Les trois hélices réalisent des contacts hydrophobes avec les feuillets bêta anti-parallèles pour former une structure de type winged Hélice-Boucle-Hélice (Donaldson et al., 1994; Donaldson et al., 1996; Werner et al., 1997). Le terme « Wing » définit le coude formé entre les hélices H2 et H3, et la boucle formée entre les feuillets bêta S3 et S4 (Kodandapani et al., 1996; Pio et al., 1996). Cette structure de type Hélice-Boucle-Hélice se retrouve dans de nombreuses protéines fixant l'ADN aussi bien chez les procaryotes, CAP, LexA, que chez les eucaryotes, histone H5, Heat Shock Factor.

III.2 Le complexe ADN/Domaine ETS

Une analyse cristallographique du complexe PU.1/ADN a permis de décrire précisément les différentes interactions réalisées lors de la fixation de ce facteur à un EBS (Kodandapani et al., 1996). Cette étude a été réalisée à partir d'un fragment de 112 acides aminés de PU.1 contenant le domaine ETS et d'un oligonucléotide double brin de 16bp contenant un EBS. Quatre régions du domaine ETS participent à la reconnaissance de l'ADN :

- l'hélice H3
- la boucle formée entre les feuillets S3 et S4
- le coude formé entre les hélices H2 et H3
- l'hélice H1

Par l'intermédiaire du grand sillon, deux arginines (Arg232, Arg235) de l'hélice H3 sont en contact direct avec les bases du motif central GGA de l'EBS. L'arginine 232 fait une liaison hydrogène avec la guanine la plus 5' du motif central, alors que l'arginine 235 forme des liaisons hydrogènes à la fois avec la deuxième guanine et l'adénine (Pio et al., 1996). Ces deux arginines sont fortement conservées chez les membres de la famille ETS (figure 3).

Deux lysines (Lys245, Lys219) également fortement conservées jouent un rôle prépondérant dans la reconnaissance des parties adjacentes au motif central GGA. En effet, la lysine 245 située dans le feuillet S3, interagit avec le squelette phosphate par le petit sillon situé en 5' du motif GGA. La Lys219 est localisée au niveau du coude situé entre les hélices



H2 et H3, et interagit avec le squelette phosphate du brin opposé au motif GGA. Cette interaction s'effectue par l'intermédiaire du petit sillon situé en 3' du motif GGA (figure 3A). La mutation de ces résidus en glycine abolit totalement la fixation à l'ADN.

Au niveau de l'hélice H1, la leucine 174, également très conservée chez les différents membres de la famille ETS, réalise des interactions avec le squelette phosphate par le petit sillon situé en 3' du motif GGA.

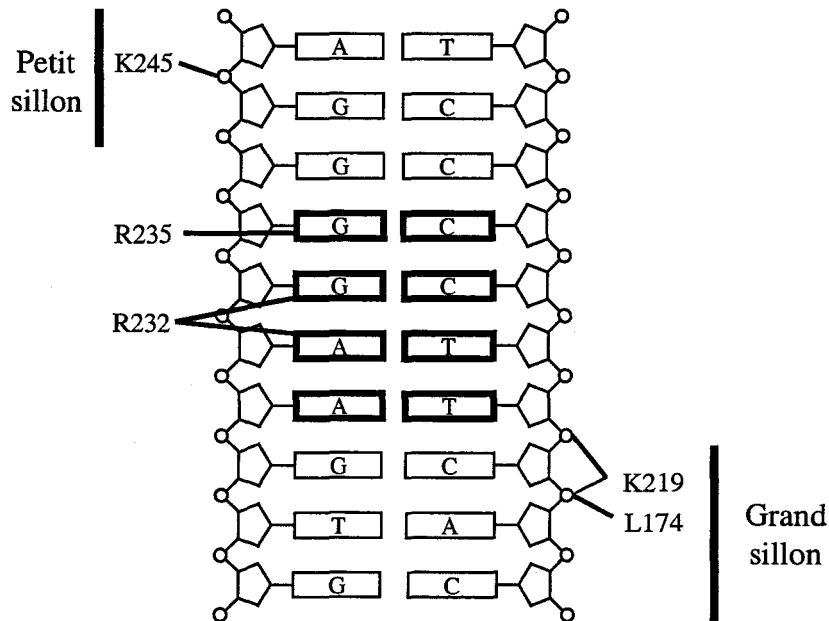
Les différentes études réalisées sur les complexes Ets-1/ADN (Donaldson et al., 1996; Werner et al., 1995; Werner et al., 1996), Fli-1/ADN (Liang et al., 1994a; Liang et al., 1994b) et PU.1/ADN (Kodandapani et al., 1996; Pio et al., 1996) montrent que les protéines ETS se fixent de la même façon sur leur EBS et qu'il n'est donc pas surprenant que ces différents facteurs fixent des séquences d'ADN similaires. Les bases du motif GGA sont en contact avec des acides aminés hautement conservés dans le domaine ETS (figure 3B). Il est intéressant de noter que les séquences d'ADN situées de part et d'autre du motif GGA semblent jouer un rôle dans la spécificité de reconnaissance de l'ADN par les protéines ETS. Ces séquences sont reconnues par les acides aminés du domaine ETS par interaction avec le squelette phosphate de l'ADN et non par un contact direct avec les bases. Dans ce type d'interaction, l'identité de la séquence d'ADN détermine la conformation du squelette phosphate et donc son accessibilité. La longueur et la séquence des régions du domaine ETS les plus variables, telles que la boucle localisée entre S3 et S4 et le coude situé entre H2 et H3, semblent jouer un rôle dans la discrimination de fixation des EBS.

IV Régulation de la fixation à l'ADN

IV.1 Par changement de conformation : le complexe inhibiteur

Des études moléculaires et structurales de Ets-1 ont permis d'identifier les régions inhibitrices impliquées dans la régulation de la fixation à l'ADN. Une première étude réalisée sur les mutants de délétion $\Delta N280$ et $\Delta N331$ a montré que le mutant $\Delta N331$ a une affinité pour un EBS dix à vingt fois plus importante que le mutant $\Delta N280$. De nombreuses données laissent penser que la fixation du mutant $\Delta N280$ sur l'ADN entraîne un changement de conformation le rendant sensible à la protéolyse (Petersen et al., 1995). En effet, la protéolyse partielle réalisée en présence de trypsine ou de chymotrypsine a montré que $\Delta N331$ seul ou complexé à une séquence d'ADN spécifique, ainsi que $\Delta N280$ seul ne sont pas sensibles aux clivages protéolytiques. Ces mêmes expériences réalisées avec le mutant $\Delta N280$

A



B

	H1	S1	S2	H2	H3	S3	S4
mu-Ets1	IQWQWLELHITDKS	CQSFISVTG	DGWEEKLS	DPDEVARRNGKRA	NKPKNEEKLS	GLHYDYDKNIHHTA	GKRYVIREV
av-Ets2	IQWQWLELHITDKS	CQSFISVTG	DGWEEKLA	DPDEVARRNGRRR	NKPKNEEKLS	GLHYDYDKNIHHTS	GKRYVIREV
v-Ets	IQWQWLELHITDKS	CQSFISVTG	DGWEEKLS	DPDEVARRNGKRR	NKPKNEEKLS	GLHYDYDKNVIHHTA	GKRYVIREV
hu-GABP	IQWQWLELHITDKD	ARDCEWVG	DEGEEKLN	QPELVACKGQRR	NKPTNEEKLS	GLHYDYDGMICIVQ	GKRFVIREV
hu-Erg2	IQWQWLELHITDSS	NSSCINWEG	TNGEIKMT	DPDEVARRNGERR	SKPNNNDKLS	GLHYDYDKNIMIVH	GKRYAKED
hu-Flil	IQWQWLELHITDSSA	NASCINWEG	TNGEIKMT	DPDEVARRNGERR	SKPNNNDKLS	GLHYDYDKNIMIVH	GKRYAKED
dr-Ets6	IQWQWLELHITADSS	NANALWEG	QSGERLI	DPDEVARRNGERR	AKPNNNDKLS	GLHYDYDKNIMIVH	GKRYAKED
mu-PEA3	IQWQWLELHITDDPT	NAHFIAVTG	RGMEKLI	EPEEVARLNGIQN	NRPANNDKLS	GLHYDYKGMIVVA	GERYVIREV
hu-Elk1	VITWQWLELHITREQG	NGHIESVT	SRDGGKLV	DAEEVARLNGLRN	NKTNNDKLS	GLHYDYDKNIIRIVS	GQRFVIREV
hu-SAP1	IITWQWLELHITQKQP	NKHMCTT	SNDGQRLL	QAEVARLNGIRN	NKPNNDKLS	GLHYDYVKNIIIVN	GQRFVIREV
hu-Elf1	IYTWQWLELHITQDKA	TCPKYKCT	QREKGIKLV	DSKAVSRLNGKHN	NKPDNNDKLS	GLHYDYVQRGILAVVE	GQRLVIREV
dr-E74A	TYTWQWLELHITQDREY	CERFCT	TNREKGVKLV	DSKAVSRLNGMHN	NKPDNNDKLS	GLHYDYVQRGILAVVD	GQRLVIREV
dr-Ets4	IHWQWLELHITASPOV	NGTADR	IDRSKGIKIE	DSVRVAKLNGRRR	NRPANNDKLS	GLHYDYVYKKGIMK	ITERSQRLVIREV
dr-Yan	RLRWQWLELHITGDRNQKYS	DLAKKCRD	TGVKIV	DPAGLAKLNGIQN	NHLSNNDKMS	GLHYDYVYVNLIRIVQ	GERHCYQEL
hu-PU.1	IRTYQWLELHITGDRSGDMK	DSYVVDKDRGT	QFSSKHKEALAHRR	GIQNGNRKRNTG	QKMAHALNNG	GKTGEVIREV	KRLTYQEL

Figure 3. (A) Représentation des interactions effectuées par PU.1 lors de sa fixation sur un EBS double brin. (B) Alignement des acides aminés de 15 domaines ETS. Les acides aminés invariants sont représentés en grisés. Les structures secondaires sont indiquées par des rectangles noirs pour les hélices alpha et par des flèches noires pour les feuillets bêta. D'après Donalson *et al*, 1996.

complexé à l'ADN font apparaître un produit de clivage protéolytique de 16kDa. Les différents sites de clivage ont été identifiés au niveau de l'arginine 309 et 311 pour la trypsine et de la phénylalanine 304 et de la tyrosine 307 pour la chymotrypsine. Tous ces acides aminés sont situés dans la partie carboxy-terminale de la région codée par l'exon VII. Les études structurales réalisées sur le mutant de délétion $\Delta N280$ font apparaître deux régions inhibitrices de part et d'autre du domaine ETS (Skalicky et al., 1996). La région inhibitrice située en N-terminal du domaine ETS contient deux hélices alpha, HI1 et HI2, et celle localisée en C-terminal contient une petite hélice alpha H4 et une plus longue appelée H5 (Garvie and Wolberger, 2001) (figure 4A).

En absence d'ADN, les quatre hélices HI1, HI2, H4 et H5 interagissent avec l'hélice H1 du domaine ETS pour former une poche hydrophobe appelée complexe inhibiteur. En présence d'ADN, $\Delta N280$ change de conformation et devient sensible à la protéolyse. L'hélice H1 joue un rôle clé lors de ce changement de conformation. Cette hélice participe à la stabilisation du complexe inhibiteur en absence d'ADN ainsi qu'à la fixation de l'ADN en réalisant des contacts avec le squelette phosphate en présence d'ADN. Un modèle de régulation du complexe inhibiteur par l'hélice H1 a été proposé (Garvie et al., 2002; Wang et al., 2002). Le contact entre les groupements phosphate de l'ADN et H1 déstabilise les liaisons intramoléculaires entre H1 et les hélices inhibitrices (HI1, HI2, H4 et H5) ce qui aboutit à une déstructuration du complexe inhibiteur. Lors de ce changement, l'hélice HI1 se déstructure ce qui la rend sensible à la protéolyse (figure 4B).

Il est à noter que toutes ces études moléculaires et structurales ont été réalisées sur des protéines tronquées et non sur des protéines natives recombinantes. Il est donc difficile d'évaluer réellement le rôle joué par les régions situées en amont de l'hélice HI1. Seule la cristallographie ou la RMN de la protéine Ets-1 native pourra répondre à ces questions.

IV.2 Par interactions avec d'autres partenaires protéiques

Les interactions protéines-protéines permettent de contrôler l'expression de certains gènes de façon combinatoire au cours du développement embryonnaire. Les facteurs de la famille ETS voient également leur capacité à fixer l'ADN régulée par l'interaction avec d'autres protéines.

La protéine GABP de souris est un membre de la famille ETS composée d'une sous-unité α (GABP α), et de deux isoformes de la sous-unité β (GABP β 1, GABP β 2). Les sous

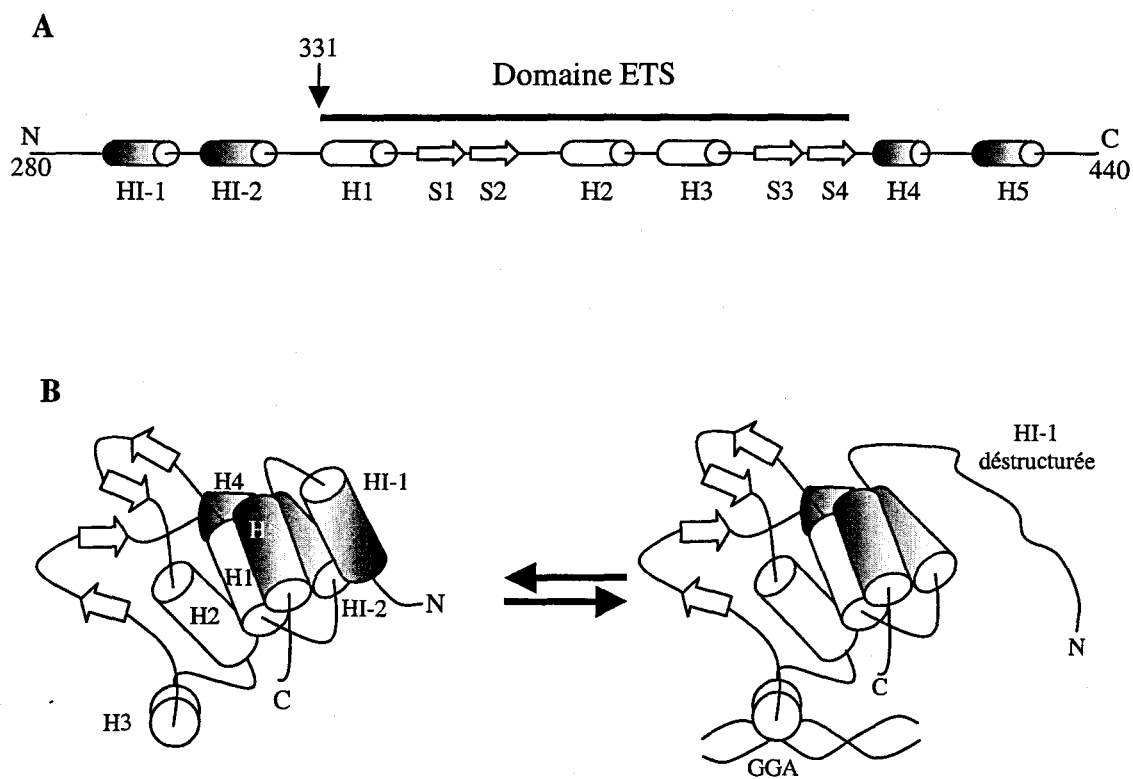


Figure 4. Modèle d'autoinhibition de Ets-1. (A) Structure secondaire du module d'inhibition et du domaine ETS : les cylindres représentent les hélices α et les flèches représentent les feuillettes β . (B) Modèle structurale du complexe inhibiteur. En absence d'ADN, les hélices H1, HI-1, HI-2, H4 et H5 interagissent entre elles pour former le complexe inhibiteur. La fixation à l'ADN entraîne un changement conformationnel qui se traduit par la déstructuration de HI-1. D'après Cowley *et al*, 1999.

unités $\beta 1$ et $\beta 2$ diffèrent l'une de l'autre par leur partie carboxy-terminale. La sous-unité α est capable de fixer l'ADN par l'intermédiaire de son domaine ETS, alors que les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$ en sont incapables. L'association de $GABP\alpha$ avec $GABP\beta$ a pour effet de stabiliser le complexe $GABP\alpha/ADN$ et donc d'augmenter sa fixation à l'ADN. Cette interaction s'effectue par l'intermédiaire d'un motif présent dans la partie N-terminale de $GABP\beta$, contenant 4 répétitions de 33 acides aminés ressemblant aux répétitions de la protéine Notch de *D. melanogaster*, et d'une région de $GABP\alpha$ comprenant le domaine ETS ainsi que les 37 acides aminés situés immédiatement en sa partie C-terminale (Gugneja et al., 1995; LaMarco et al., 1991; Thompson et al., 1991).

Les protéines $CBF\alpha 1$, $CBF\alpha 2$ et $CBF\alpha 3$ fixent l'ADN alors que $CBF\beta$ ne le fixe pas. $CBF\alpha 1$ est impliqué dans le développement des os chez les mammifères, $CBF\alpha 2$ et $CBF\beta$ sont essentiels pour la maturation des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques. La protéine $CBF\alpha 2$, également appelée AML1, possède un domaine de fixation à l'ADN appelé Runt, et un domaine d'auto-inhibition appelé NRDB pour « *Negative Regulatory region for DNA Binding* » localisé dans la partie carboxy-terminale du domaine Runt (Gu et al., 2000). Les facteurs de transcription AML1 et Ets-1 sont capables d'interagir entre eux par l'intermédiaire de leurs domaines inhibiteurs (le domaine codé par l'exon VII pour Ets-1 et NRBD pour AML1). Cette interaction a pour effet de favoriser la fixation Ets-1 sur l'enhancer de $TCR\beta$ (T Cell Receptor β) et également d'augmenter de façon synergique sa capacité transactivatrice. L'interaction de AML1 avec Ets-1 pourrait déstructurer le module d'inhibition de Ets-1 et ainsi lever son auto-inhibition (Goetz et al., 2000; Kim et al., 1999).

Une approche de double hybrides utilisant le domaine ETS comme sonde a montré que MafB interagit avec Ets-1. Cette interaction se réalise entre le domaine ETS de Ets-1 et le domaine « leucine zipper » de MafB. La sur-expression de MafB dans des érythroblastes a pour effet d'empêcher leur différenciation et d'inhiber la transactivation du gène de la transferrine par Ets-1. MafB est donc capable d'inhiber l'activité transactivatrice de Ets-1 en interagissant avec son domaine ETS. MafB a été décrit comme étant capable d'activer un promoteur artificiel contenant plusieurs éléments de réponse Maf (Kataoka et al., 1994). Suivant le type de promoteur, MafB pourrait donc avoir une fonction de répresseur ou d'activateur (Sieweke et al., 1996).

IV.3 Par phosphorylation

L'activité de nombreux facteurs de transcription est régulée par l'intermédiaire de voies de signalisation. Un stimulus extracellulaire active un récepteur membranaire, qui à son tour active une cascade de kinases pour aboutir à une modification post-traductionnelle du facteur de transcription. Par exemple, la phosphorylation peut réguler la fixation à l'ADN, les interactions entre protéines, la localisation nucléaire de certains facteurs. Ainsi, dans de nombreuses espèces (*D.melanogaster*, *Coenorhabditis elegans*, souris, homme), la phosphorylation régule l'activité des facteurs ETS.

Le degré de phosphorylation de Ets-1 est modulé par la concentration de calcium libre présent dans les cellules. Lors de la migration des protéines Ets-1 aviaires, murines et humaines en gel d'électrophorèse, une bande surnuméraire due à un retard de migration apparaît. Des études réalisées sur les lymphocytes T démontrent que ce retard de migration est causé par la phosphorylation de Ets-1. L'activation des cellules T par la concanavaleine A entraîne une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire et de la phosphorylation de Ets-1. Cette phosphorylation est également observée après traitement des cellules avec un ionophore calcique (Pognonec et al., 1988). Ces études sur la phosphorylation ont permis de mettre en évidence l'existence d'un variant d'épissage alternatif naturel de Ets-1. Ce variant n'est plus sensible à la phosphorylation causée par l'activation des cellules T (Koizumi et al., 1990; Pognonec et al., 1990). Cette isoforme est la conséquence d'un épissage de l'exon VII. La région codée par cet exon contient 13 sérines susceptibles d'être phosphorylées. La mutation de ces sérines en alanine a permis de déterminer que sur les 13 sérines, seules les sérines 251, 257, 282 et 285 sont phosphorylées (Rabault and Ghysdael, 1994). La sérine 282 est localisée dans une séquence consensus RXXS reconnue par les protéines kinases calmoduline calcium dépendantes (CaM kinases) (Pearson et al., 1985). Des expériences réalisées *in vitro* montrent que la CaM kinase II est capable de phosphoryler ces 4 sérines. Cette phosphorylation a pour effet de diminuer la fixation de Ets-1 sur l'ADN d'environ 50 fois (Cowley and Graves, 2000; Rabault and Ghysdael, 1994).

Des données récentes ont permis de créer un modèle selon lequel la phosphorylation de Ets-1 a un effet inhibiteur sur la fixation de l'ADN *via* la stabilisation du complexe inhibiteur. Selon ce modèle, les charges négatives portées par les phosphates favorisent les interactions électrostatiques entre la région phosphorylée et le complexe d'inhibition. L'environnement des 4 sites de phosphorylation dépendant du calcium est composé de résidus

acides chargés positivement. La phosphorylation de ces sérines pourrait augmenter localement la charge négative et ainsi faciliter les interactions avec les charges positives portées par le module d'inhibition. L'hélice inhibitrice HI-1 est composée de 21 acides aminés dont 8 sont basiques. L'interaction entre ces résidus basiques et les sérines phosphorylées pourrait, en absence d'ADN, réduire la déstructuration locale de HI-1 et ainsi stabiliser le complexe inhibiteur dans son ensemble (Cowley and Graves, 2000) (figure 5).

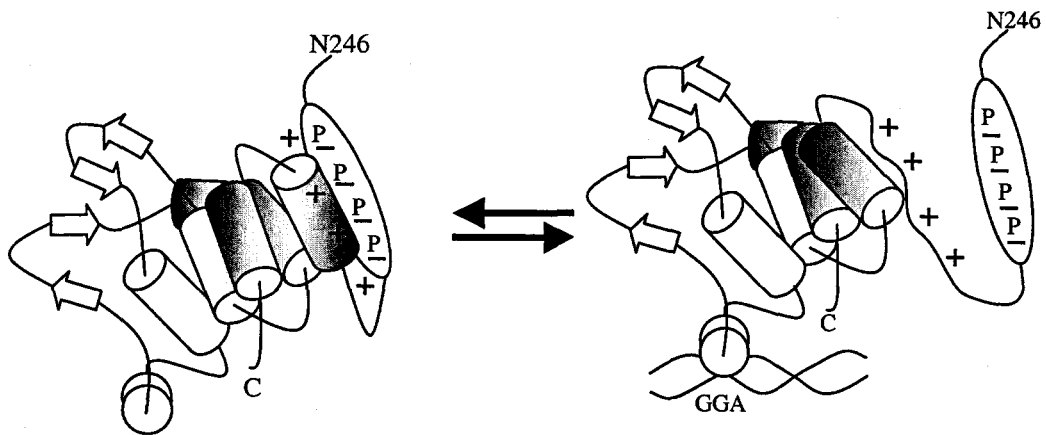


Figure 5. Modèle d'inhibition de la fixation de Ets-1 par la phosphorylation. Les interactions électrostatiques entre les phosphosérines (P) et les résidus basiques du module d'inhibition stabilisent le complexe inhibiteur en absence d'ADN. D'après, Cowley *et al* , 2000.

V Le variant d'épissage alternatif de l'exon VII de ets-1

Chez l'homme, l'ARNm de Ets-1 subit un épissage alternatif de l'exon VII donnant naissance à deux isoformes de la protéine Ets-1. Une isoforme de poids moléculaire 51kDa (p51Ets-1) correspondant à la protéine pleine longueur, et une seconde de 42kDa (p42Ets-1) correspondant à la protéine Ets-1 sans le domaine codé par l'exon VII. Ce domaine est impliqué dans la régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur. Comme nous l'avons vu précédemment, l'association de la région située en amont du domaine ETS, codée par l'exon VII, du domaine ETS lui-même et du domaine situé en aval, inhibe l'interaction de Ets-1 avec l'ADN. Cette association est perturbée par le réarrangement moléculaire lors de la fixation du facteur à l'ADN. La phosphorylation des quatre sérines (251, 257, 282 et 285) présentes dans le domaine codé par l'exon VII semble également jouer un rôle important dans le contrôle de ce remaniement.

V.1 Les deux isoformes de Ets-1 et leur capacité à fixer l'ADN

L'étude cinétique de la fixation de p51Ets-1 et p42Ets-1 sur un même EBS a été faite en utilisant la technologie BIAcore[®], qui consiste à mesurer les variations de résonance plasmonique de surface. Les résultats obtenus révèlent que p51Ets-1 a une phase de fixation initiale très rapide qui conduit à la formation d'un complexe stable. A l'inverse, p42Ets-1 possède une phase de fixation initiale beaucoup plus lente. Le complexe p51Ets-1/ADN est caractérisé par un « *turn-over* » plus rapide que le complexe p42Ets-1/ADN, 4 à 20 fois plus stable. L'impact de la phosphorylation sur la fixation à l'ADN a également été mesuré lors de cette étude. La phosphorylation de p51Ets-1 *in vitro* par la CAM kinaseII abolit presque totalement sa fixation à l'ADN alors que la phosphorylation de p42Ets-1 n'affecte pas sa capacité à fixer l'ADN. Une étude stœchiométrique a montré qu'une molécule de Ets-1 interagit avec une molécule d'ADN (Fisher et al., 1994).

V.2 Rôle des isoformes de Ets-1

Des études préliminaires indiquaient que Ets-1 était fortement exprimé dans les cellules T quiescentes et non dans les cellules T activées, suggérant qu'il pourrait réguler l'expression de gènes impliqués dans le maintien des cellules au stade quiescent (Bhat et al.,

1990). Afin de vérifier cette hypothèse, p51Ets-1 a été sur-exprimé de manière ectopique dans deux types de lignées humaines de carcinome colique (DLD-1 et HCT116) qui n'expriment pas de protéines Ets-1 endogène. La capacité à former des clones stables dépend du niveau d'expression de la protéine Ets-1 : plus le niveau d'expression du facteur p51Ets-1 est élevé, plus le nombre et la taille des colonies obtenues sont réduits. L'injection des cellules DLD-1 ou HCT116 chez des souris « *nudes* » entraîne la formation de tumeurs dans les 3 semaines. Au contraire, l'injection des clones stables de ces cellules exprimant de hauts niveaux de protéines Ets-1 ne fait apparaître aucune tumeur. L'expression du facteur de transcription p51Ets-1, dans ces cellules de carcinome de colon, diminue leur potentiel tumoral de manière dose-dépendante (Suzuki et al., 1995).

Des expériences similaires ont été réalisées en utilisant la protéine p42Ets-1. Des clones stables de cellules DLD-1 exprimant la protéine p42Ets-1 sous contrôle de la tétracycline ont été sélectionnés. Ce système d'expression permet de réguler assez finement l'expression de p42Ets-1 en fonction de la concentration de tétracycline présente. Afin de déterminer le potentiel tumorigène de la protéine p42Ets-1, les clones inductibles p42Ets-1 sont injectés chez des souris « *nude* » en présence d'une bille diffusant la tétracycline ou le placebo. En absence de tétracycline, lorsque p42Ets-1 est exprimé, aucune tumeur ne se développe dans les 6 mois suivant l'injection. A l'inverse, en présence de tétracycline, lorsque p42Ets-1 est réprimé, des tumeurs commencent à se développer 4 semaines après l'injection. En jouant sur les concentrations de tétracycline, les auteurs ont observé l'apparition de petites tumeurs quand p42Ets-1 est faiblement exprimé. L'ensemble de ces résultats montre que l'effet suppresseur de tumeur dépend directement du niveau d'expression de la protéine p42Ets-1. Afin de comprendre par quel mécanisme p42Ets-1 a un effet inhibiteur sur la prolifération tumorale, les auteurs ont comparé les taux de croissance des clones inductibles p42Ets-1 en présence ou non de tétracycline. Aucune différence de croissance n'est observée lorsque les cellules poussent en présence d'une haute concentration de sérum. Néanmoins, en présence d'une faible concentration de sérum, les cellules exprimant p42Ets-1 ont une morphologie différente, caractéristique des cellules apoptotiques. De plus, le nombre de cellules vivantes est significativement plus élevé lorsque les cellules poussent en présence de tétracycline que dans un milieu n'en contenant pas. Ces résultats indiquent que la diminution du nombre de cellules est directement liée à l'induction de p42Ets-1. En absence de tétracycline, les cellules entrent dans un processus d'apoptose qui se caractérise par des noyaux condensés et l'ADN fragmenté. p42Ets-1 peut donc réduire le potentiel tumorigène des cellules cancéreuses humaines de colon en induisant l'apoptose (Huang et al., 1997).

Afin de mieux comprendre par quel mécanisme p42Ets-1 induit l'apoptose, le pourcentage de cellules viables a été mesuré chez les cellules DLD-1 induit par Fas et exprimant p51Ets-1 ou p42Ets1. L'interaction entre Fas et ligand Fas joue un rôle clé dans l'initiation de la mise en place du programme de mort cellulaire qu'est l'apoptose. Le récepteur Fas est exprimé de manière ubiquitaire à la surface des cellules alors que le ligand Fas est majoritairement exprimé chez les lymphocytes T et les cellules *Natural Killer*. Dans de nombreux cas de cancers, les cellules tumorales échappent à la cytolysse provoquée par les cellules du système immunitaire en devenant résistantes à l'apoptose induite par le ligand Fas. L'identification et la caractérisation des protéines FLIP (*FLICE inhibitory protein*) et XIAP (*X-chromosome linked IAP*) ont permis de mieux comprendre par quel mécanisme les cellules cancéreuses ne sont plus sensibles à l'apoptose. Ces deux protéines inhibent l'activité de certaines protéases impliquées dans la mise en place du programme de mort cellulaire. La protéine FLIP inhibe la caspase-8 alors que la protéine XIAP inhibe la protéase CCP32/caspase3.

Les cellules DLD-1 activées par Fas et transfectées avec un vecteur témoin ou un vecteur exprimant p51Ets-1 restent viables. En revanche, les cellules exprimant p42Ets-1 et activées par Fas meurent. Les cellules DLD-1 exprimant p42Ets-1 subissent donc l'apoptose induite par Fas. La variation du niveau d'expression des différentes protéines intervenant dans la voie apoptotique induite par Fas a été analysée par RT-PCR. Lorsque les cellules DLD-1 expriment p42Ets-1 et sont activées par Fas, les résultats montrent que le niveau d'expression des caspases 3, 4, 5, 7, du récepteur Fas, des protéines XIAP et FLIP ne varient pas. En revanche, le niveau d'expression de l'ARNm de la caspase-1/ICE (*interleukin 1 β converting enzyme*) augmente. Cette variation observée au niveau de l'ARNm se traduit également par une augmentation de l'activité de ICE/caspase-1. Tous ces résultats montrent que le facteur p42Ets-1 et au contraire de p51Ets-1 induit l'apoptose des cellules cancéreuses de colon humaines par induction directe ou indirecte de la caspase-1/ICE (figure 6) (Li et al., 1999). p42Ets-1 est donc capable de réguler l'expression de gènes différents de p51Ets-1.

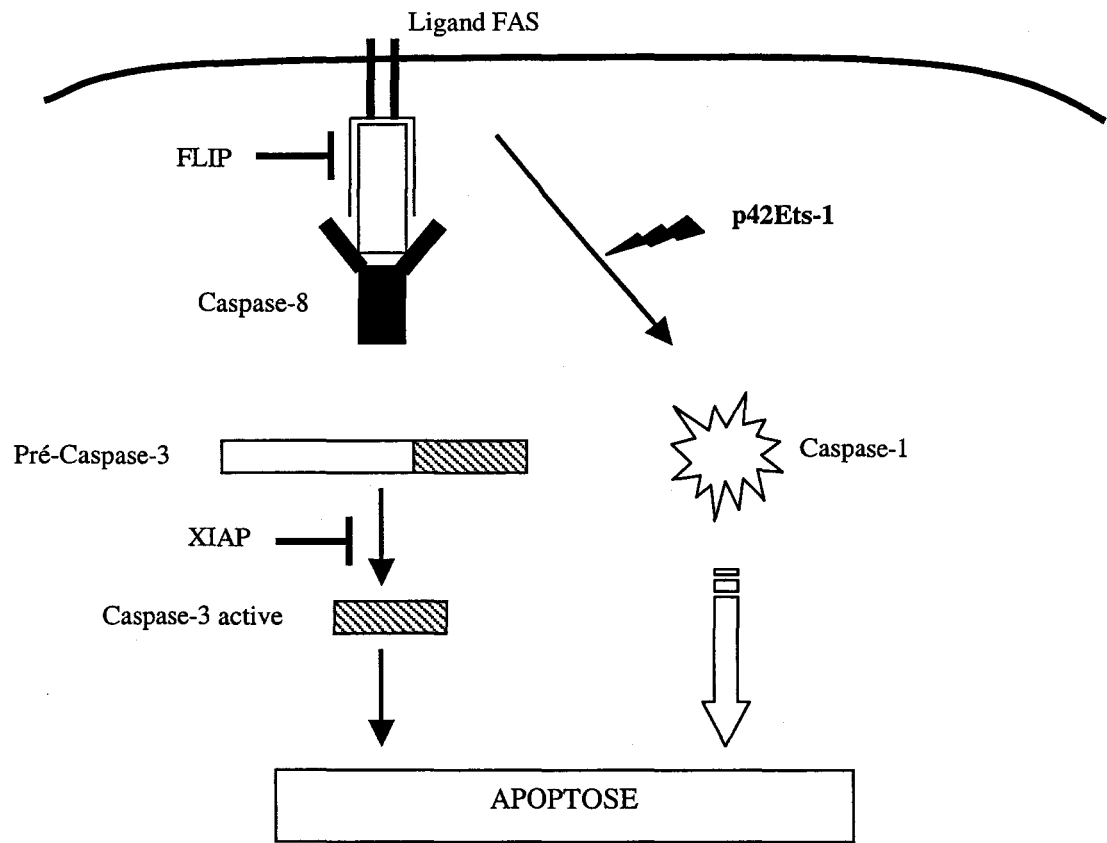


Figure 6. Modèle du rôle de p42Ets-1 dans la voie apoptotique induite par le ligand FAS. D'après Li *et al*, 1999.



PERGAMON

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 33 (2001) 391–407

IJBCB

www.elsevier.com/locate/ijbcb

Review

The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis

Etienne Lelièvre, Frédéric Lionneton, Fabrice Soncin, Bernard Vandembunder *

Institut de Biologie de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, BP 447, 59021, Lille Cedex, France

Received 21 March 2000; accepted 23 January 2001

Abstract

The Ets family contains a growing number of transcriptional activators and inhibitors, which activity is regulated by phosphorylation and protein–protein interactions. Among these factors, Ets1, Erg1 and Fli1 are expressed in endothelial cells during angiogenesis in normal and pathological development. The expression of these transcription factors is regulated by angiogenic factors in cultured endothelial cells, as well as by various stresses occurring during angiogenesis. Transfection experiments and transgenic mice analysis revealed that Ets family members are involved in the transcriptional regulation of endothelial specific genes such as those encoding Tie1 and -2, VEGFR1 and -2 and VE-Cadherin. In vitro studies plead for a role of Ets family members in endothelial cell adhesion, spreading and motility. Gene inactivation experiments show that Ets1 is dispensable for embryonic development. The phenotype of knocked-out embryos indicates that Tie1 is required for maintenance of the developing vascular network in the yolk sac. Altogether, we suggest that Ets family members act both positively and negatively during the different steps of the angiogenic process. The regulation of the initiation of gene transcription arises from the combined activity of different transcriptional regulators. Therefore very few transcription factors are specific for a physiological process, or a given cell type. The transcriptional network that regulates blood vessel formation involves transcription factors which are expressed in a variety of situations. The Lung Kruppel Like Factor (LKLK) which is required for blood vessel stabilisation during murine development is also expressed in the primitive vertebrae and in the lung of the adult (C.T. Kuo, M.L. Veselits, K.P. Barton, M.M. Lu, C. Clendenin, J.M. Leiden, The LKLK transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilisation during murine embryogenesis, *Genes Dev.* 11 (22) (1997) 2996–3006). Scl/Tal1 which is essential for angiogenic remodelling of the yolk sac capillary network (J.E. Visvader, Y. Fujiwara, S.H. Orkin, Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development, *Genes Dev.* 12 (4) (1998) 473–479), is involved in blood cell development and is also expressed in the developing brain. The EPAS transcription factor which was thought to be endothelial cell specific in the mouse embryo (H. Tian, S.L. McKnight, D.W. Russell, Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells, *Genes Dev.* 11 (1) (1997) 72–82) is also expressed in the liver, kidney and

* Corresponding author. Tel.: + 33-3-20871090; fax: + 33-3-20871111.

E-mail address: bernard.vandembunder@ibl.fr (B. Vandembunder).

cells of the sympathetic nervous system of the chick embryo (J. Favier, H. Kempf, P. Corvol, J.M. Gasc, Cloning and expression pattern of EPAS1 in the chicken embryo. Colocalization with tyrosine hydroxylase, *FEBS Lett.* 462 (1-2) (1999) 19–24). Ets1, which expression was originally detected in lymphoid cells of adult tissues, has been the first transcription factor to be identified in endothelial cells during angiogenesis in the embryo (B. Vandebunder, L. Pardanaud, T. Jaffredo, M.A. Mirabel, D. Stehelin, Complementary patterns of expression of c-ets1, c-myb and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo, *Development* 107 (1989) 265–274) and in tumours (N. Wernert, M.B. Raes, P. Lassalle, M.P. Dehouck, B. Gosselin, B. Vandebunder, D. Stehelin, 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. Path.* 140 (1992) 119–127). Since then, the Ets family has extended and this review will emphasise the relationships between these factors and angiogenesis. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Transcription factors; Angiogenesis; Adhesion; Embryos; Tumours

Contents

1. A short presentation of Ets family members, their domains and their partners	393
1.1. The Ets protein domains	393
1.2. The Ets partners	399
2. Expression patterns of Ets family members during normal and pathological development . . .	395
3. Control of the expression and activity of Ets members	396
4. The involvement of Ets1 in the stress response	397
5. From promoters studies to the identification of target genes	397
5.1. The Tie genes	397
5.2. The VE-cadherin gene.	398
5.3. The Flt1 and Flk1 genes	398
6. What is the role of Ets members in endothelial cells? Insights from in vitro studies.	399
7. In vivo studies and the proof by KO	400
7.1. Ets1	400
7.2. Erg and Fli.	400
7.3. Ets2	401
7.4. Tel.	401
8. Conclusion and directions for future research.	402
Acknowledgements	403
References	403

1. A short presentation of Ets family members, their domains and their partners

The proto-oncogene *ets1* is the cellular progenitor of *v-ets*, a viral oncogene found in the genome of the E26 acute leukaemia retrovirus [1,2]. *Ets-1* is the founder of a growing family of transcription factors which includes over 50 members characterised by a conserved DNA-binding domain. Some proteins of the family, such as *Ets1*, *Ets2*, *Erg*, *Tel* and *Fli1* harbour another conserved region named the pointed domain, located in their

N-terminal part. The origin of the Ets family seems extremely ancient and may be traced back to the appearance of early metazoans. This family can be subdivided into 13 groups based on sequence analogies (Fig. 1). This classification suggests that other members or group of members will be described in the future [3].

1.1. The Ets protein domains

Ets family members share a conserved sequence of 85 amino acids named the Ets domain gener-

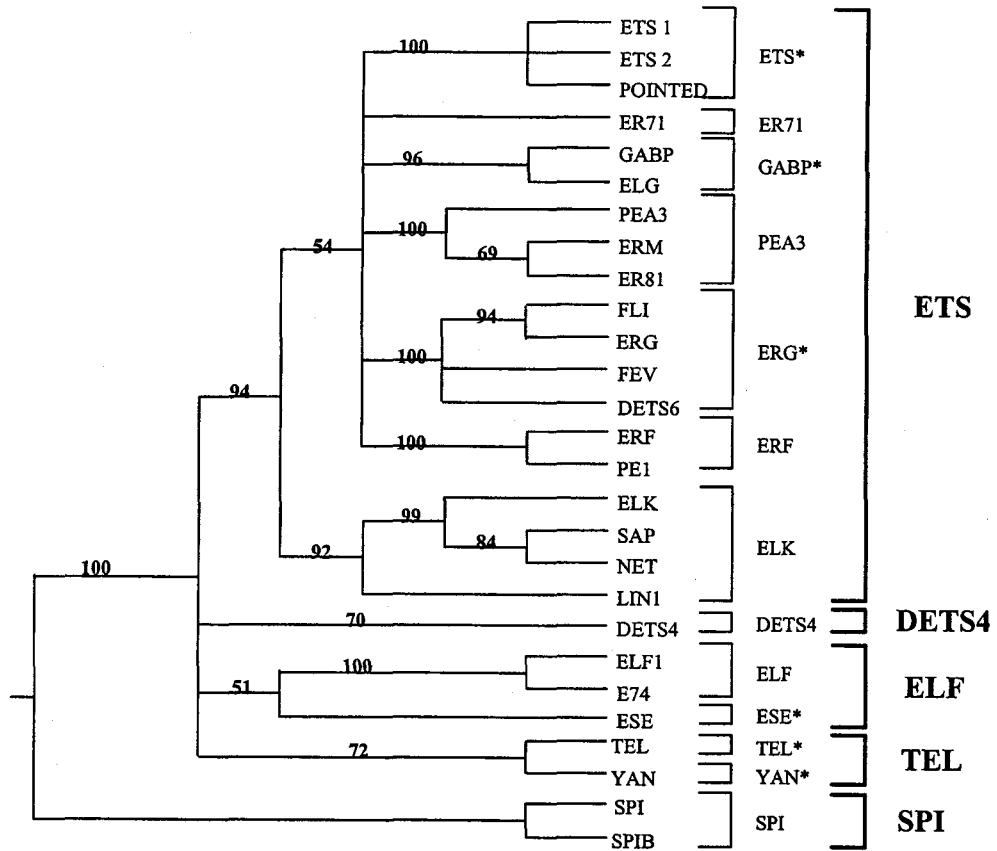


Fig. 1. Consensus tree for Ets family members, according to [3]. Both distance analysis and bootstrap analysis of the Ets domain sequences allow delineating several groups that can be clustered together into subfamilies. Thus the Ets family is divided into five subfamilies: the Spi subfamily which is on one side of the root, the Tel and the Elf subfamilies, the DETS4 subfamily which contains only the *Drosophila Ets4* gene, and the very large Ets subfamily which contains the Ets, *Er71*, *GABP α* , *PEA3*, *Erg*, *Erf* and *Elk* groups. Branches lengths are random. Along each branch, the 'bootstrap' robustness value after 1000 replicates is indicated in percent. *Corresponds to the groups containing members with the pointed domain.

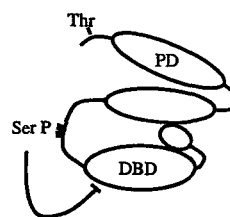
ally located at the carboxyl terminus of the proteins, except for Elk-1, SAP-1 and Elf-1 (reviewed in [4]). The Ets domain folds into a winged helix-turn-helix motif and binds to a consensus DNA sequence centered on the core GGAA/T motif named the Ets-binding site or EBS. The sequences flanking this core motif are variable; they characterise the specificity of binding of the Ets factors (reviewed in [4]).

In at least seven members of the Ets family, two inhibitory regions flanking the Ets domain work together to regulate their affinity for DNA. It has been suggested that the N-terminal inhibitory region interacts with the Ets domain and with the C-terminal inhibitory region in the absence of DNA. The unfolding of an α helix causes the disruption of this inhibitory module and accompanies DNA binding [5]. The Ets partner core binding factor $\alpha 2$ counteracts this auto-inhibition and stimulates Ets1 DNA binding [6]. In Ets1, the domain encoded by exon VII, adjacent to the DNA-binding domain, contains four serine residues that are phosphorylated upon calcium activation (Fig. 2). Their phosphorylation inhibits the ability of Ets1 to bind to specific DNA sequences by reinforcing the auto-inhibition mechanism [7,8]. The human *ets1* gene generates three proteins by alternative splicing of exon VII or exon IV [9]. The exon VII isoform has also been detected in the rat.

Another highly conserved domain in approximately one third of Ets family members has been termed the pointed domain. This domain in the *Drosophila* Ets factor Pointed contains a threonine residue, which is the target of the Ras-MAP kinase signalling during eye development in the fly. The phosphorylation of the homologous threonine residues 38 and 72, respectively, in murine Ets1 and Ets2 controls their transcriptional activity (reviewed in [4]). In contrast with the Ets domain, the activation domains of the Ets proteins are not conserved; this divergence may account for their specificity.

Most Ets proteins activate gene transcription, except for Erf, Net and Tel, which exhibit transcriptional repression properties. The repression activity of Erf could be regulated by the phosphorylation of Thr 526 [10].

Low affinity DNA-binding conformation of Ets1



High affinity DNA-binding conformation of Ets1

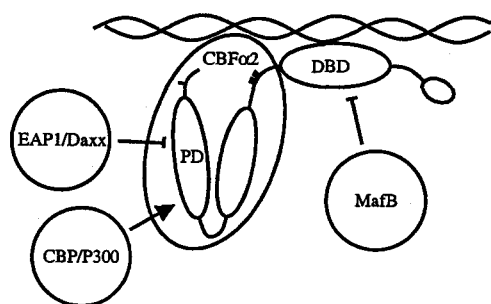


Fig. 2. Model of Ets1 auto-inhibition and regulation by protein-protein interactions. The pointed (PD) and DNA binding domains (DBD) of Ets1 are depicted, together with the threonine (38) and serine (251, 257, 282 and 285) residues that can be phosphorylated. In the absence of DNA the inhibitory α -helices flanking the DBD of Ets1 pack with one α -helix of this DBD. This auto-inhibition is reinforced by the phosphorylation of the serine residues. In the presence of DNA, one of the helices unfolds. The high affinity conformation can be stabilised by the binding of CBF $\alpha 2$ (modified from [6]). Among other Ets1 partners identified, CBP/p300 acts as a coactivator. MafB and EAP1/Daxx inhibit Ets1 activity upon binding respectively to its DBD and PD.

1.2. The Ets partners

The activities of Ets family members are controlled by their interaction with other transcription factors (reviewed in [4]).

A synergy between Ets and AP1 was originally demonstrated in the activation of the polyoma virus enhancer [11]. Closely positioned and functional AP1 and Ets binding sites have been identified in the promoters of genes encoding collagenase1, stromelysin1, urokinase-type plasminogen activator (u-PA), MMP9 (gelatinase B),

tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP1) or maspin. Studies of the collagenase1 and stromelysin1 gene promoters revealed that Ets family members may exhibit differential effects [12]. Thus Ets2 activates both promoters, whereas Erg strongly activates the collagenase1, but not the stromelysin 1 promoter. Fli1 has no effect on both promoters. Moreover, Erg completely inhibits stromelysin1 promoter activation by Ets2. Gel-shifts and in vitro protein interaction studies showed that Ets2 and Erg bind to the cFos/cJun complex. Furthermore, Ets2 was also found to interact with Ets1 and Erg both in vitro and in vivo in yeast. It has been suggested that Erg represses Ets2 mediated activation in part by interacting with its transactivation domain [13].

MafB, an AP1-like protein expressed in myelomonocytic cells, contains a leucine zipper region that can interact directly with the DNA-binding domain of Ets1. MafB represses the Ets1-dependent transactivation of the transferrin receptor gene [14]. This inhibitory action represents a strategy for regulating Ets activity within the Ets/AP1 protein network. The EAP1/Daxx protein previously identified as a Pax3 binding protein also interacts with an N-terminal region of Ets1 that includes the pointed domain. EAP1/Daxx inhibits the Ets1-dependent transactivation of the collagenase1 gene promoter [15].

Ets1 is also able to recruit the transcriptional coactivators CREB Binding Protein (CBP) and the related p300 protein and this interaction is required for Ets1 activity [16]. CBP/p300 co-operates with Ets1 and Ets2 in the transcriptional activation of human stromelysin1 promoter [17].

The Tel protein is unusual among the Ets family members by its ability to self associate in vivo. Deletion of its dimerisation domain impairs the repression activity of Tel on EBS driven transcription [18]. Tel is also able to bind Fli1 and to inhibit Fli1 mediated transactivation of megakaryocytic promoters [19].

2. Expression patterns of Ets family members during normal and pathological development

A first step towards understanding the biological

roles of Ets1 has been the identification of cells in which Ets1 might act. A predominant expression of ets1 has been initially detected in the lymphoid organs of neonatal and adult mice, in discrete T and B cell developmental stages, in lymphoid precursors, in immature NK-like cells and myeloid hematopoietic cells [20].

In situ hybridisation analyses carried out during embryonic development revealed a more widespread expression in a variety of mesodermal cells. Ets1 transcripts are first detected during gastrulation when ectoblastic cells start to invaginate and invade the mesodermal layer. At this stage, ets1 transcripts are more abundant in ventral mesodermal cells in close contact with the endoderm [21,22]. These cells in the *area opaca* condense and form extra-embryonic blood islands. The central cells in these islands differentiate into the primitive erythroid lineage and peripheral cells develop into blood vessel endothelial cells. The detection of ets1 transcripts throughout immature blood islands suggests that ets1 is expressed in hemangioblasts, the common progenitors of endothelial cells and primitive erythroid cells in the early embryo. Later when these blood islands mature the expression of ets1 becomes restricted to peripheral endothelial cells whereas circulating primitive erythrocytes do not contain ets1 transcripts [21,22].

During the first trimester of human pregnancy, ets1 transcripts are detected in the endothelial cells of villous trophoblasts and in the extravillous trophoblastic cells invading the uterine vessels [23]. No transcripts are found in maternal endothelial cells. During mouse embryo implantation and placentation, ets1 is expressed in the newly formed vascular network in the endometrial wall [24]. Throughout development of the embryo, ets1 transcripts are detected in endothelial cells during the formation of new blood vessels, either by angiogenesis or by vasculogenesis [25]. A spatio-temporal correlation between ets1 gene expression and blood vessel formation was also described in the rat hypothalamus and pituitary [26]. Ets1 expression decreases when the vessel wall consists of several cell layers with a basal membrane, and this expression is no longer de-

tected in endothelial cells of large blood vessels or adult capillaries. The accumulation of *ets1* transcripts is induced in the rat aortic endothelium after balloon catheter denuding injury [27], and when angiogenesis resumes in the granulation tissue during wound healing and tumour development [28]. Thus in human astrocytomas, *ets1* gene expression is associated with angiogenesis [29]. During the early phase of the healing process of gastric ulcer, endothelial cells of capillaries are immunopositive for Ets1 and MMP-1, whereas they show negative at the scarred phase and in normal gastric mucosa [30].

The expression of Ets1 during normal and pathological development is not restricted to endothelial cells. Ets1 transcripts accumulate in mesenchymal cells interacting with proximal epithelial sheets during organogenesis [22,24,31] and in the fibroblastic stroma surrounding invasive tumours [32–34]. Ets1 expression has not been detected in embryonic epithelia. This expression is induced when epithelial sheets dissociate, such as in the ventral wall of the somites and in neural crest cells [35], or at the tips of budding mammary ducts [36]. Altogether Ets1 expression correlates with the occurrence of invasive processes during normal and pathological development.

The expression of other members of the Ets family has not been as extensively studied as for Ets1. The expression patterns of *erg* and *fli1*, two members of the Ets family, resemble that of *ets1* at the onset of organogenesis. During chicken development at E1, the expression patterns of *ets1* and *erg* transcripts are indistinguishable in immature extraembryonic blood islands; at E2 they are similar in a variety of cells of mesodermal origin, including endothelial cells [37]. Similar expression patterns have been described for the mouse *fli1*, the avian *fli* and the *Xenopus laevis* Xl-*fli* genes [38,39]. It is interesting to note that *fli1* and *ets1* are located on the same chromosome, within respectively 240 kb and 400 kb in the mouse and in the human genome. It is therefore possible that the expression of these two genes is regulated by common mechanisms. The initial expression of zebrafish *fli1* overlaps with that of *gata2* in potential hemangioblast population; subsequently *fli1* is expressed in the developing vasculature [40]. The

expression of these genes has not been described in tumours. Transcripts encoding Erm, Er81 and Pea3, three highly related transcription factors belonging to the Ets family have not been detected in endothelial cells during embryonic development [41].

3. Control of the expression and activity of Ets members

The expression of Ets1 transcripts is associated in vivo with the activation of endothelial cells and the induction of angiogenesis. In vitro, Ets1 is expressed by proliferating [28] and migrating [27] endothelial cells but not after these cells have reached confluence [28]. In addition, Ets1 is hyper-phosphorylated during early mitosis in T-cell lines, suggesting a regulation of its activity during cell proliferation [42]. Expression of Ets1 in endothelial cells is increased in response to angiogenic factors such as tumour necrosis factor α , fibroblast growth factor2, transforming growth factor β , vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and hepatocyte growth factor [28,43,44]. Ets1 expression is also induced by endothelin1 and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells [45]. Tel expression is detected in endothelial cells during early tube formation and evidence indicates that VEGF down-regulates this expression [46]. Northern-blot analysis revealed a high expression of *erg* and ERM as compared with *ets1* and ER81 in bovine aortic and in murine eEND endothelial cells, indicating a differential regulation of these Ets family members [47].

In addition to their expression, the activity of Ets members may also be regulated after endothelial cell stimulation by angiogenic factors. It has been shown that Ets1, Ets2, Elk1, and PEA3 are phosphorylated by growth factors-induced kinases. The Ras-dependent phosphorylation of a specific threonine residue in the pointed domain of Ets1 and Ets2 allows the transactivation of a Ras-responsive element [48] and the Ca^{2+} -dependent phosphorylation of four serine residues of Ets1 inhibits its binding to DNA [49]. The PEA3 protein is activated by the HER2/Neu receptor

tyrosine kinase through both the Ras-dependent ERK and JNK/SAPK pathways [50]. Such regulations have been also described with the Ets members Elk1, Sap1a and Net/Sap2, involved in the ternary complex factors (TCFs) which interact with the serum response factor (SRF). Both DNA-binding and transactivation activities of the TCFs are regulated by MAP kinases [51], and some of them by the stress-activated JNK/SAPK as well [52]. The studies on TCFs showed that, in response to different stimuli, distinct kinases are able to activate the same Ets transcription factor through binding to domains which are distinct from their phosphorylation sites. To date, there is no reported observation of such complexes in endothelial cells but it is most likely that similar regulations following angiogenic stimulation occur.

4. The involvement of Ets1 in the stress response

The GGAA/T core sequence recognised by Ets factors [53] is present in the sequence recognised by heat-shock factors, and similarities have been found between the DNA-binding domains of heat-shock and of Ets factors [54]. This, together with the regulation of Ets factors activity by stress-kinases, suggests that Ets members are involved in the cell response to stress. The vascular endothelium is one of the prime targets for oxidative stress in a variety of inflammatory conditions, possibly mediated by activated phagocytes that release oxygen radicals. H_2O_2 (0.1–10 μM) increases the rate of proliferation, migration and tube formation by endothelial cells in vitro together with the expression of Ets1 mRNA. The latter phenotype is inhibited by Ets1 antisense oligonucleotides suggesting that Ets1 is a direct actor in the H_2O_2 response [55]. In addition, H_2O_2 -induced expression of ICAM-1, an endothelial cell surface protein involved in the trans-endothelial migration of leukocytes during the inflammatory response, was also reportedly due in part to the activation of an AP1-EBS element located in the ICAM-1 promoter [56].

Mechanical stresses such as those created by the blood flow can also regulate Ets factors. Ets1

expression is down regulated in vascular smooth muscle cells submitted to a small deformation, possibly inducing the down-regulation of the Ets targets matrix metalloproteases expression [52]. Thus the onset of blood flow in newly formed vessels may take part in the inhibition of Ets1 expression that is observed in vivo during the late stages of angiogenesis.

In relation to the general cell response to stress, Ets1 also regulates the activity of the DNA breaks-activated poly(ADP-ribose) polymerase [57] and of p53 promoters [58]. More recently, the promoter of the GADD153 stress gene was shown to be activated by Ets1 and Fli1 [59]. GADD153 is itself a target gene of p53. The Elk-1 factor is activated by MAPK in response to a hypotonic shock, and this induces the expression of the early response gene Egr-1 [60], which is also a direct target of Ets1 in 3T3 cells [61]. These various observations suggest that, in addition to a specific role in endothelial cells, Ets factors such as Ets1 and Elk1 may play a general role in the response of cells to stress.

5. From promoters studies to the identification of target genes

The role of Ets family members during angiogenesis has been partially addressed by the dissection of the cis-acting elements involved in the regulation of endothelial specific genes. An alternative approach has been to over-express or down-regulate these factors in endothelial cells and to analyse variations in the expression levels of endogenous genes. These methods have allowed the identification of several endothelial specific Ets target genes.

5.1. The Tie genes

The Tie1 and Tie2 genes encode receptor tyrosine kinases expressed in the endothelium of blood vessel during embryonic development and angiogenesis in adults. The inactivation of either of these genes led to severe vascular developmental defects [62,63].

A transgenic approach using mouse (0.75 kb) and human (5.0 kb) Tie1 promoter fragments showed that both fragments drive β -galactosidase reporter gene expression in the endothelium. The comparison of mouse and human Tie1 promoter sequences revealed the presence of several conserved DNA motifs including two EBS [64]. These EBS are critical for Tie1 promoter activity. Transfection experiments showed that Nrf2 (an Ets-related factor expressed in endothelial cells *in vitro*), Ets2 and Ets1 are able to transactivate the Tie1 promoter [65].

A similar transgenic approach has been carried out with various fragments of the mouse Tie2 promoter. A 1.2 kb fragment confers endothelial cell lineage-specific expression on β -galactosidase transgene. However transgene activity is restricted to early embryonic stages and is not detected in adult tissues [66]. A combination of a 2.1 kb Tie2 upstream sequence and a 10 kb fragment from the 5' half of the first intron confers uniform and high LacZ expression in all endothelial cells of transgenic mice. A 303-bp fragment from this intron is sufficient to activate the thymidine kinase promoter in endothelial cell specific manner in transgenic mice. Sequence analysis of this fragment revealed the presence of several putative binding sites for general and tissue-specific transcription factors including Ets1 and PEA-3. Mutation of the EBS as well as deletion of the region containing putative sites for PEA3 completely inactivated this enhancer *in vivo* [67]. Another study analysed the role of Ets factors in the control of Tie2 proximal promoter activity *in vitro*. Although Ets1 transactivates the Tie2 promoter, its effect is weaker than the effect of Nrf2. Interestingly, in the same assay Ets1 is a more potent transactivator than Nrf2 on Flt-1 (VEGF-R1) promoter. Deletion analysis of Tie2 promoter suggested that the proximal region of the promoter mediates the major transactivator effect of Nrf2. Mutation of EBS4 and EBS5 within a cluster of 5 EBS found in this region almost completely abolished the response to Nrf2. In EMSA experiments Nrf2 is able to bind these two EBS [68]. Therefore, regarding Tie2 promoter regulation, Ets factors seem to be involved not only in basal promoter activity but also in endothelial-specific expression.

5.2. The VE-cadherin gene

VE-cadherin is a membrane protein specifically expressed in endothelial cells that mediates calcium-dependent homophilic cell–cell adhesion [69]. VE-cadherin gene inactivation results in early lethality of embryos with absence of differentiation of blood islands of the yolk sac into a primary vascular plexus [70,71].

Approximately 2.5 kb of the mouse VE-cadherin promoter region is sufficient to drive expression of a chloramphenicol acetyl transferase transgene in the endothelium of embryos and adult mice [72]. Analysis of the proximal region of the promoter revealed the presence of two essential EBS which mutation dramatically reduces the activity of the promoter. Based on EMSA experiments, a role for Erg in the control of VE-cadherin has been proposed [47]. On the other hand, Ets1 over-expression in mouse endothelial cells and fibroblasts resulted in the up-regulation of VE-cadherin expression. Transactivation assays using a 2.5 kb fragment of the VE-cadherin promoter and its mutated versions on EBS revealed that Ets1 enhances VE-cadherin promoter activity through the two EBS located in the proximal region of this promoter [107].

In contrast to Ets1, VE-cadherin remains expressed in the quiescent endothelium, suggesting that other Ets members are required for the control of VE-cadherin expression after the formation of new blood vessels.

5.3. The Flt1 and Flk1 genes

The two VEGF receptors Flt1 and Flk1 (respectively VEGF-R1 and -R2) are expressed almost exclusively on vascular endothelial cells. Flt1 or Flk1 targeted gene inactivation results in abnormal vascular development (reviewed in [73]).

Systematic truncation of a -2.5 kb/ $+284$ fragment of the human flt1 promoter driving luciferase reporter gene led to the identification of an approx. 1 kb fragment that supports high flt1 activity in transient transfection experiments and behaves in an endothelial specific manner after

adenoviral cell delivery. Deletion of the proximal region of the promoter containing conserved CREB/ATF and Ets binding sites greatly reduced its activity [74]. In transfection assays, the $-229/+8$ promoter region appears essential for endothelial cell specific expression of *flt-1* gene [75]. Both the CREB/ATF site and the EBS located immediately downstream are necessary for the *flt-1* promoter activity, and Ets1, Ets2 and Erg are able to stimulate this activity [76]. A significant correlation has been reported between *ets1* and *flt1* gene expression in endothelial cells during normal and tumour development, such as in the microvasculature of human gliomas [29], suggesting that Ets1 could regulate *flt-1* gene transcription in vivo.

Despite their activity in cultured endothelial cells, *flk1* promoter sequences extending up to -5.5 kb are not sufficient to confer a reproducible transgene expression. In combination with a 2.3 kb fragment from the first intron of the *flk1* gene, a 939 bp *flk1* promoter fragment can specifically drive LacZ expression in endothelial cells. The transgene expression pattern closely reproduces that of the endogenous *flk1* throughout development [77]. A 430 bp. minimal enhancer contained in this first intron is also sufficient for reporter gene expression in endothelial cells. Several potential binding sites for the transcription factors of the Ets, GATA and Scl/Tal families are localised in this enhancer. The individual mutation of a single GATA or of a single EBS results in ectopic reporter gene expression, whereas the mutation of any of two Scl/Tal motifs reduced LacZ expression in transgenic mice [116]. In addition, Ets1 activates the 939 bp *flk1* promoter via two EBS. One of these sites is required for high level endothelial gene expression. Thus transcription factors of the GATA and Ets families are involved in specifying the expression of *flk1* in endothelial cells.

Besides these remarkable and well documented examples, Ets transcription factors are also involved in the regulation of numerous promoters of genes that could participate by various ways in angiogenesis (Table 1).

6. What is the role of Ets members in endothelial cells? Insights from in vitro studies

Ets factors are able to transactivate the genes encoding matrix degrading proteases, cell-to-matrix and cell-to-cell adhesion molecules such as integrins, cadherins and intercellular adhesion

Table 1
Some Ets target genes

<i>Transcription factors</i>		
Early Growth Response (Egr1)	Ets1	[91]
p53	Ets2	[58]
Ets1	Ets1	[92]
GATA-1	Ets1, Ets2, Fli	[93]
myc	Ets1	[94]
junB	Ets1, Ets2	[95]
<i>Growth control</i>		
PDGF-B		[96]
PF4	Ets1	[97]
Flt-1 (VEGF-R1)	Ets1, Ets2, Erg	[76,116]
Flk-1(VEGF-R2)		
Tie-1	Nerf2, Ets2, Ets1	[65]
Tie-2	Nerf2, ets1	[68]
Endoglin		[98]
Met	Ets1	[99]
<i>Extracellular matrix remodelling</i>		
Tenascin-C	Fli1	[100]
Maspin		[101]
collagenase1	Ets1, Ets2, Erg	[12,102]
	(-)	
stromelysin 1	Ets1, Ets2	[103]
Gelatinase B (MMP-9)		[81]
u-PA	Ets1, Ets2	[104]
TIMP-1	Ets1	[105]
Cathepsin B	Ets1	[106]
<i>Adhesion</i>		
VE-cadherin	Ets1, Erg	[47,107]
β 2 integrin (CD18)		[108]
α 4 integrin		[109]
ICAM-1	ERM, Ets2	[110]
von Willebrand factor	Ets1, Ets2, Erg	[111]
<i>Miscellaneous</i>		
PARP	Ets1	[57]
cyclin D1	Ets2	[112]
GADD153	Ets1, Fli1	[59]
Endothelial Nitric-Oxide synthase (eNOS)	Ets1, Elf1 (-)	[113]
Heme Oxygenase HO-1	Ets1, Fli1, Erg	[114]
Endothelin-converting enzyme 1 β	Ets1	[115]



molecules. Several studies on the effects of various Ets mutants have indicated that Ets factors could be involved in regulating cell adhesion, spreading and migration. Expression of the DNA binding domains of PU1, Ets1 and Ets2 reverts Ras-transformed 3T3 cells, which become larger and flatter with an increased adhesion to their substrate [78]. Ets1 antisense oligonucleotides inhibit EGF- or FGF1-induced migration [47] and VEGF-induced invasion [44] of human endothelial cells.

The DNA-binding domain of Ets1 has been also used to down-regulate Ets activity in brain capillary endothelial cells. The expression of this trans-dominant negative mutant resulted in an increased spreading and adhesion to various extracellular matrix substrates, together with a reorganisation of the cytoskeleton. The ability of endothelial cells to form branching structures in gels was increased [79]. On the other hand, overexpression of Ets1 in brain capillary endothelial cells lowered their density at confluence and induced the expression of the cell-surface VE-cadherin, which is involved in the formation of the endothelium and the maintenance of its integrity [107]. In the adult, the endothelium is a quiescent tissue that requires a tight growth control when stimulated to form new vessels. Since Ets1 overexpression leads to lower cell growth and density at confluence, Ets1 expression may be induced in order to moderate endothelial cell proliferation during angiogenesis rather than to induce it, and to orient the cells toward differentiation and tube formation by inducing VE-cadherin expression.

Interestingly, different results have been obtained in endothelial cells derived from the spleen of new-born mice. The expression of the DNA binding domain of Ets1 in these cells impaired their proliferation, migration, invasion and ability to form capillary-like structures. This mutant inhibited angiogenesis in a Matrigel plug injected subcutaneously [80]. On the other hand Ets1 overexpression converted these cells to an angiogenic phenotype, with enhanced invasiveness through Matrigel and increased expression of matrix metalloproteinases such as MMP-1, -3 and -9 [81]. These results suggest that the role of Ets1 and Ets family members is dependent upon the type of endothelial cell.

7. In vivo studies and the proof by KO

The search for Ets target genes provided clues for understanding the molecular mechanisms by which these factors might act. In parallel, various strategies have been carried out to understand the role of each Ets family members in the progression of physiological processes.

7.1. *Ets1*

The first results supporting the hypothesis of a necessary function of Ets1 in blood vessel formation came from studies on the chick chorio-allantoic membrane (CAM). It has been shown previously that a 20-mer phosphorothioate oligonucleotide complementary to the AUG initiation codon inhibited Ets1 expression in cultured endothelial cells [43]. In the CAM assay, the transfection of this Ets1 antisense oligonucleotide at day 5 of development specifically induced a dose-dependent inhibition of angiogenesis; both the diameter and the number of blood vessels were reduced [82].

In contrast, no defect in vascular development has been reported after Ets1 gene inactivation. Ets1 $-/-$ mice are viable and fertile but display an increased perinatal mortality since approx. 50% of ets1 $-/-$ mice die before weaning, 4 weeks after birth. The major defect described so far in these mice is a reduced number of natural killer (NK) cells. The reasons of the premature death remain unclear [83], but the existence of viable ets1 $-/-$ mice suggests that Ets1 is dispensable to ensure functional vascular and hematopoietic development in the embryo. Erg and Fli which expression patterns overlap with that of Ets1, including in the endothelium, may relay Ets1 activity in ets1 $-/-$ mice.

7.2. *Erg* and *Fli*

Xenopus laevis has been a valuable model for investigating the role of Ets family members. The expression patterns of ets1, erg and fli display similar features in the xenopus, chicken and mice

embryos. Upon injection of the corresponding mRNA from 45 min after fertilisation up to the 8-cell stage, a functional Fli or Erg protein is detected from blastula until neurula. XI_{Erg} or XI_{Fli} ectopic expression induces multiple developmental defects, such as anomalies in the antero-posterior and dorso-ventral polarities or defects in eye development. When Erg mRNA are injected ventrally, the embryos display ectopic endothelial cell differentiation [88]. XI_{Fli} mRNA microinjection results in developmental defects in the heart with a thicker cardiac jelly and an anarchic accumulation of endothelial cells along the ventricular cavity [89].

These results plead for a role of Erg and Fli in endothelial cell differentiation. But such roles have not been evidenced in mice. A H-2Kk Fli1 transgenic mice overexpressing Fli1 in a wide variety of tissues develop a lethal immunological renal disease. No gross histological abnormalities have been reported in other organs of Fli1 overexpressing mice [86]. However there is no evidence that H-2Kk promoter could direct the fli1 transgene expression in endothelial cells. Homozygous mutants for fli1 are viable and fertile. They exhibit thymic hypocellularity, but the histological analysis of the thymus reveals no vascular defects. Unexpectedly, in these mutant mice a truncated Fli1 protein is detected, that appears to result from an internal translation initiation site and an alternative splicing around the neo cassette used in the gene targeting. This truncated protein retained all of the known functional domains of Fli1 [38]. Mice carrying a different targeted disruption of the fli1 gene have been recently generated. The activity of the resulting Fli1 mutant protein is lower than wild type and its expression is greatly reduced. All homozygotes display abnormal haematopoiesis in the liver at E11, dramatic haemorrhaging into the central nervous system and they die by E12.5. Although immunostaining with an antibody to PECAM demonstrated no obvious defects in vascular organisation in the neuroepithelium, data indicate that the site of haemorrhaging most probably involves blood vessels located in the proximal mesenchyme [87].

7.3. *Ets2*

Ets2 is not expressed in endothelial cells but its expression has been detected in trophoblastic cells, which are from many aspects closely related to endothelial cells. Cytotrophoblastic cells replace the endothelial cells of maternal endometrial arteries during placentation and express endothelial specific markers such as VE-cadherin, PECAM-1, α V β 3 integrin or VCAM-1. The inactivation of *ets2* resulted in the death of homozygous embryos before E8.5 [88]. These embryos reveal defects in the migration of trophoblastic cells that fail to establish a normal connection with the maternal circulation; the expression of PECAM-1 is markedly decreased in these cells. The Reichert's membrane is unusually persistent; the absence of MMP9 expression may explain the failure of appropriate remodelling of this extracellular matrix. When mutant embryos are rescued by aggregation with tetraploid mouse embryos, which provide functional extraembryonic tissues, normal development occurs: *ets2* -/- mice were viable and fertile.

7.4. *Tel*

From E7.0 *Tel* expression is detected in various tissues of the mouse embryo and in the yolk sac. *Tel* loss of function results in embryonic lethality between E10.5 and E11.5. At E9.5, two-thirds of *tel* -/- embryos exhibit yolk sac lacking branching vitelline vessels and present instead a honeycomb-like network of interconnecting sinusoids. The dorsal aorta, intersomitic vessels and branching head veins appear histologically normal. However at E10.5 all mutants are grossly abnormal and lack vitelline vessels. At this stage, two-thirds of *tel* -/- embryos are growth-retarded, and the remaining one-third exhibits the same honeycomb-like vasculature as described at E9.5. Histological analysis also reveals the presence of several regions of apoptosis especially in the neural tube and mesenchymal tissues [89]. These results suggest that *Tel* is required for the maintenance of the developing vascular network rather than for the proliferation or differentiation of endothelial cells.

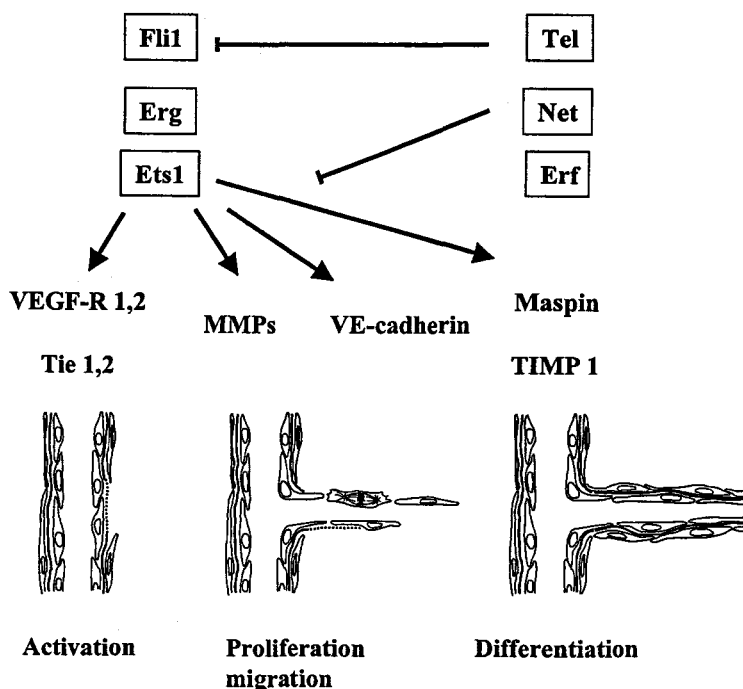


Fig. 3. Ets family members may control angiogenesis both positively or negatively. Ets1 target genes are involved in the various stages of new blood vessel formation: genes encoding the VEGF-R1 and -R2, Tie1 and Tie2 in the activation of endothelial cells, genes encoding MMPs, VE-cadherin or the protease inhibitors maspin and TIMP1 in endothelial cells migration and capillary formation. The activating effects of Ets1, Erg and Fli1 on the transcription of these genes may be balanced by the repressors Tel, Net and Elf, either by a direct protein–protein interaction or by a competition for the binding to regulatory elements.

8. Conclusion and directions for future research

In vitro bioassays and experimental tumour models indicate that the angiogenic switch is governed by a balance between inhibitors (thrombospondins, angiostatin or endostatin) and activators (FGF-2, VEGF). The description of the expression patterns of Ets family members and functional studies suggest that these transcription factors may control angiogenesis both positively and negatively (Fig. 3).

The Ets family contains both transcriptional activators and inhibitors. Specific probes and antibodies will become available to allow the comparison between the kinetics of the expression of the different Ets family members, and to see how the balance between transcriptional activators and inhibitors of the Ets family changes during the formation of new blood vessels. Furthermore, depending on the context, Ets1 has been found to

activate or inhibit the transcription. A dual role for Ets family members has been described in the regulation of the invasiveness of BT-20 mammary epithelial cells [94]. In these cells the expression of the DNA binding domain of Ets2 (Ets2-DB) increases the invasion rate through a Matrigel gel in the absence of CSF-1; in contrast, the expression of Ets2-DB inhibits CSF-1 induced cellular invasion. Further analysis is needed to discriminate between the roles of ets family members at the various stages of blood vessel formation.

The detection of Ets1 transcripts both during normal and tumour angiogenesis may reflect a common role for this transcription factor in these two situations. However normal and tumour microvessels exhibit numerous differences in their structure, organisation and growth. Therefore one may wonder whether both situations can be distinguished by the structure or the regulation of the Ets1 protein, by the pattern of expression of

Ets family members, by the presence of different Ets1 partners or by the activation of different target genes.

The therapeutic implications of these studies are twofold. The activity of Ets family members can provide an useful quantitative assay to screen libraries for the discovery of molecules inhibiting specific steps in the formation of new blood vessels. The Ets family members could be also interesting targets for the design of new therapeutic strategies targeted against angiogenesis. However the efficiency of these two approaches will depend upon the recognition of all the facets of the physiological roles of these transcription factors.

Acknowledgements

Work in the laboratory was funded by the Conseil Régional du Nord Pas de Calais and the European Regional Development Fund, the Association pour la Recherche sur le Cancer, Ligue Nationale contre le Cancer, Fondation pour la Recherche Médicale, Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer. FS is 'Chargé de Recherche de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale'. EL is supported by a fellowship from the 'Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie', FL by a fellowship from the Ligue Nationale contre le Cancer.

References

- [1] D. Leprince, A. Gegonne, J. Coll, C. de Taisne, A. Schneeberger, C. Lagrou, D. Stehelin, A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26, *Nature* 306 (1983) 395–397.
- [2] M.F. Nunn, P.H. Seeburg, C. Moscovici, P.H. Duesberg, Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene, *Nature* 306 (1983) 391–395.
- [3] V. Laudet, C. Hanni, D. Stehelin, M. Duterque-Coquilaud, Molecular phylogeny of the ETS gene family, *Oncogene* 18 (6) (1999) 1351–1359.
- [4] J. Ghysdael, A. Boureux, The ETS family of transcriptional regulators, in: M. Karin (Ed.), *Oncogenes as Transcriptional Regulators*, Birkhäuser, Basel, 1997, pp. 29–89.
- [5] J.M. Petersen, J.J. Skalicky, L.W. Donaldson, L.P. McIntosh, T. Alber, B.J. Graves, Modulation of transcription factor Ets-1 DNA binding: DNA-induced unfolding of an alpha helix, *Science* 269 (5232) (1995) 1866–1869.
- [6] T.L. Goetz, T.L. Gu, N.A. Speck, B.J. Graves, Auto-inhibition of Ets-1 is counteracted by DNA binding cooperativity with core-binding factor alpha2, *Mol. Cell. Biol.* 20 (1) (2000) 81–90.
- [7] B. Rabault, J. Ghysdael, Calcium-induced phosphorylation of ETS1 inhibits its specific DNA binding activity, *J. Biol. Chem.* 269 (45) (1994) 28143–28151.
- [8] D.O. Cowley, B.J. Graves, Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition, *Genes Dev.* 14 (3) (2000) 366–376.
- [9] S. Koizumi, R.J. Fisher, S. Fujiwara, C. Jorcyk, N.K. Bhat, A. Seth, T.S. Papas, Isoforms of the human ets-1 protein: generation by alternative splicing and differential phosphorylation, *Oncogene* 5 (1990) 675–681.
- [10] D.N. Sgouras, M.A. Athanasiou, G.J.J. Beal, R.J. Fisher, D.G. Blair, G.J. Mavrothalassitis, ERF: an ETS domain protein with strong transcriptional repressor activity, can suppress ets-associated tumorigenesis and is regulated by phosphorylation during cell cycle and mitogenic stimulation, *EMBO J.* 14 (1995) 4781–4793.
- [11] B. Wasylyk, C. Wasylyk, P. Flores, A. Begue, D. Leprince, D. Stehelin, The cets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-fos and c-jun for transcriptional activation, *Nature* 346 (1990) 191–193.
- [12] G. Buttice, C.M. Duterque, J.P. Basuyaux, S. Carrere, M. Kurkinen, D. Stehelin, Erg, an Ets-family member, differentially regulates human collagenase (MMP1) and stromelysin (MMP3) gene expression by physically interacting with the Fos/Jun complex, *Oncogene* 13 (11) (1996) 2297–2306.
- [13] J.P. Basuyaux, E. Ferreira, D. Stehelin, G. Buttice, 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 (42) (1997) 26188–26195.
- [14] M.H. Sieweke, H. Tekotte, J. Frampton, T. Graf, MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation, *Cell* 85 (1) (1996) 49–60.
- [15] R. Li, H. Pei, D.K. Watson, T.S. Papas, EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS 1 target genes, *Oncogene* 19 (2000) 745–753.
- [16] C. Yang, L.H. Shapiro, M. Rivera, A. Kumar, P.K. Brindle, A role for CREB binding protein and p300 transcriptional coactivators in Ets-1 transactivation functions, *Mol. Cell. Biol.* 18 (4) (1998) 2218–2229.
- [17] G. Jayaraman, R. Srinivas, C. Duggan, E. Ferreira, S. Swaminathan, K. Somasundaram, J. Williams, C. Hauser, M. Kurkinen, R. Dhar, S. Weitzman, G. Buttice, B. Thimmapaya, p300/cAMP-responsive element-binding protein interactions with ets-1 and ets-2 in the transcriptional activation of the human stromelysin promoter, *J. Biol. Chem.* 274 (24) (1999) 17342–17352.
- [18] R.G. Lopez, C. Carron, C. Oury, P. Gardellino, O. Bernard, J. Ghysdael, TEL is a sequence-specific transcriptional repressor, *J. Biol. Chem.* 274 (42) (1999) 30132–30138.

- [19] B.A. Kwiatkowski, L.S. Bastian, T.R. Bauer Jr, S. Tsai, A.G. Zielinska-Kwiatkowska, D.D. Hickstein, The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity, *J. Biol. Chem.* 273 (28) (1998) 17525–17530.
- [20] M.K. Anderson, G. Hernandez-Hoyos, R.A. Diamond, E.V. Rothenberg, Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage, *Development* 126 (14) (1999) 3131–3148.
- [21] L. Pardanaud, F. Dieterlen-Lièvre, Expression of C-ETS1 in early chick embryo mesoderm: relationship to the hemangioblastic lineage, *Cell Adhes. Commun.* 1 (1993) 151–160.
- [22] C. Queva, D. Leprince, D. Stehelin, B. Vandebunder, p54^{c-ets-1} and p68^{c-ets1}, the two transcription factors encoded by the c-ets-1 locus, are differentially expressed during the development of the chick embryo, *Oncogene* 8 (1993) 2511–2520.
- [23] D. Luton, O. Sibony, J.F. Oury, P. Blot, F. Dieterlen-Lievre, L. Pardanaud, The c-ets 1 protooncogene is expressed in human trophoblast during the first trimester of pregnancy, *Early Hum. Dev.* 47 (2) (1997) 147–156.
- [24] D. Grevin, J.H. Chen, M.B. Raes, D. Stehelin, B. Vandebunder, X. Desbiens, Involvement of the proto-oncogene c-ets 1 and the urokinase plasminogen activator during mouse implantation and placentation, *Int. J. Dev. Biol.* 37 (1993) 519–529.
- [25] B. Vandebunder, L. Pardanaud, T. Jaffredo, M.A. Mirabel, D. Stehelin, Complementary patterns of expression of c-ets1, c-myb and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo, *Development* 107 (1989) 265–274.
- [26] F.M. Laurent-Huck, C. Egles, P. Kienlen, M.E. Stoeckel, J.M. Felix, Expression of the c-ets1 gene in the hypothalamus and pituitary during rat development, *Brain Res. Dev. Brain Res.* 97 (1) (1996) 107–117.
- [27] K. Tanaka, N. Oda, C. Iwasaka, M. Abe, Y. Sato, Induction of Ets-1 in endothelial cells during reendothelialization after denuding injury, *J. Cell. Physiol.* 176 (2) (1998) 235–244.
- [28] N. Wernert, M.B. Raes, P. Lassalle, M.P. Dehouck, B. Gosselin, B. Vandebunder, D. Stehelin, 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. Path.* 140 (1992) 119–127.
- [29] M.M. Valter, A. Hugel, H.J. Huang, W.K. Cavenee, O.D. Wiestler, T. Pietsch, N. Wernert, Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis, *Cancer Res.* 59 (21) (1999) 5608–5614.
- [30] M. Ito, T. Nakayama, S. Naito, M. Matsuu, K. Shichijo, I. Sekine, Expression of Ets-1 transcription factor in relation to angiogenesis in the healing process of gastric ulcer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246 (1) (1998) 123–127.
- [31] I. Kola, S. Brookes, A.R. Green, R. Garber, M. Tymms, T.S. Papas, A. Seth, The Ets1 transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenic processes such as organ formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 7588–7592.
- [32] N. Wernert, F. Gilles, V. Fafeur, F. Bouali, M.B. Raes, C. Pyke, T. Dupressoir, G. Seitz, B. Vandebunder, D. Stehelin, Stromal expression of c-ets1 transcription factor correlates with tumor invasion, *Cancer Res.* 54 (1994) 5683–5688.
- [33] I. Bolon, V. Gouyer, M. Devouassoux, B. Vandebunder, N. Wernert, D. Moro, C. Brambilla, E. Brambilla, Expression of c-ets-1, collagenase1 and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas, *Am. J. Pathol.* 147 (1995) 1298–1310.
- [34] I. Bolon, E. Brambilla, B. Vandebunder, C. Robert, S. Lantuejoul, C. Brambilla, Changes in the expression of matrix proteases and of the transcription factor c-Ets1 during progression of precancerous bronchial lesions, *Lab. Invest.* 75 (1996) 1–13.
- [35] V. Fafeur, D. Tulasne, C. Queva, C. Vercamer, V. Dimster, V. Mattot, D. Stehelin, X. Desbiens, B. Vandebunder, 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 Diff.* 8 (1997) 655–665.
- [36] C.A. Delannoy, W. Fauquette, X. Dong le Bourhis, B.X. Le, B. Boilly, B. Vandebunder, X. Desbiens, Expression of c-ets-1 and uPA genes is associated with mammary epithelial cell tubulogenesis or neoplastic scattering, *Int. J. Dev. Biol.* 40 (6) (1996) 1097–1108.
- [37] P. Dhordain, F. Dewitte, X. Desbiens, D. Stehelin, M. Duterque-Coquillaud, Mesodermal expression of the chicken erg gene associated with precartilaginous condensation and cartilage differentiation, *Mec. Dev.* 50 (1995) 17–28.
- [38] F. Melet, B. Motro, D.J. Rossi, L. Zhang, A. Bernstein, Generation of a novel Fli-1 protein by gene targeting leads to a defect in thymus development and a delay in Friend virus-induced erythroleukemia, *Mol. Cell. Biol.* 16 (6) (1996) 2708–2718.
- [39] A.M. Mager, B.A. Grapin, K. Ladjali, D. Meyer, C.M. Wolff, P. Stiegler, M.A. Bonnin, P. Remy, The avian fli gene is specifically expressed during embryogenesis in a subset of neural crest cells giving rise to mesenchyme, *Int. J. Dev. Biol.* 42 (4) (1998) 561–572.
- [40] L.A. Brown, A.R. Rodaway, T.F. Schilling, T. Jowett, P.W. Ingham, R.K. Patient, A.D. Sharrocks, Insights into early vasculogenesis revealed by expression of the ETSdomain transcription factor Fli-1 in wild-type and mutant zebrafish embryos, *Mech. Dev.* 90 (2) (2000) 237–252.

- [41] A. Chotteau-Lelievre, X. Desbiens, H. Pelczar, P.A. Defossez, Y. de Launoit, Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development, *Oncogene* 15 (8) (1997) 937–952.
- [42] L.F. Fleischman, A.M. Pilaro, K. Murakami, A. Kondoh, R.J. Fisher, T.S. Papas, c-Ets-1 protein is hyperphosphorylated during mitosis, *Oncogene* 8 (3) (1993) 771–780.
- [43] C. Iwasaka, K. Tanaka, M. Abe, Y. Sato, Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells, *J. Cell. Physiol.* 169 (1996) 522–531.
- [44] Z.Q. Chen, R.J. Fisher, C.W. Riggs, J.S. Rhim, J.A. Lautenberger, Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by ETS 1 anti sense oligonucleotides, *Cancer Res.* 57 (10) (1997) 2013–2019.
- [45] S. Naito, S. Shimizu, S. Maeda, J. Wang, R. Paul, J.A. Fagin, Ets-1 is an early response gene activated by ET-1 and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells, *Am. J. Physiol.* 274 (2 Pt1) (1998) C472–480.
- [46] M.J. Edel, The ETS-related factor TEL is regulated by angiogenic growth factor VEGF in HUVE-cells, *Anti-cancer Res.* 18 (6A) (1998) 4505–4509.
- [47] S. Gory, J. Dalmon, M.-H. Prandini, T. Kortulewski, Y. de Launoit, P. Huber, Requirement of a GT box (Spl site) and two Ets binding sites for vascular endothelial cadherin gene transcription, *J. Biol. Chem.* 273 (20) (1998) 6750–6755.
- [48] B.S. Yang, C.A. Hauser, G. Henkel, M.S. Colman, C. Van Beveren, K.J. Stacey, D.A. Hume, R.A. Maki, M.C. Ostrowski, Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets 1 and c-Ets2, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 538–547.
- [49] B. Rabault, J. Ghysdael, Calcium-induced phosphorylation of Ets1 inhibits its specific DNA binding activity, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 28143–28151.
- [50] R. Ohagan, J. Hassell, The PEA3 Ets transcription factor is a downstream target of the HER2/Neu receptor tyrosine kinase, *Oncogene* 16 (1998) 301–310.
- [51] R. Treisman, Regulation of transcription by MAP kinase cascades, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8 (2) (1996) 205–215.
- [52] J.H. Yang, W.H. Briggs, P. Libby, R.T. Lee, Small mechanical strains selectively suppress matrix metalloproteinase-1 expression by human vascular smooth muscle cells, *J. Biol. Chem.* 273 (11) (1998) 6550–6555.
- [53] C.V. Gunther, J.A. Nye, R.S. Bryner, B.J. Graves, Sequence-specific DNA binding of the proto-oncoprotein ets-1 defines a transcriptional activator sequence within the long terminal repeat of the Moloney murine sarcoma virus, *Genes Dev.* 4 (1990) 667–679.
- [54] D. Landsman, A. Wolffe, Common sequence and structural features in the heat-shock factor and Ets families of DNA-binding domains, *TIBS* 20 (1995) 225–226.
- [55] M. Yasuda, Y. Ohzeki, S. Shimizu, S. Naito, A. Ohtsuru, T. Yamamoto, Y. Kuroiwa, Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells, *Life Sci.* 64 (4) (1999) 249–258.
- [56] K. Roebuck, A. Rahman, V. Lakshminarayanan, H₂O₂ and tumor necrosis factor- α activate intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene transcription through distinct cis-regulatory elements within the ICAM-1 promoter, *J. Biol. Chem.* 270 (32) (1995) 18966–18974.
- [57] V.A. Soldatenkov, A. Albor, B.K. Patel, R. Dreszer, A. Dritschilo, V. Notario, Regulation of the human poly(ADP-ribose) polymerase promoter by the ETS transcription factor, *Oncogene* 18 (27) (1999) 3954–3962.
- [58] M.C. Venanzoni, L.R. Robinson, D.R. Hodge, I. Kola, A. Seth, ETS1 and ETS2 in p53 regulation: spatial separation of ETS binding sites (EBS) modulate protein: DNA interaction, *Oncogene* 12 (6) (1996) 1199–1204.
- [59] A. Seth, S. Giunta, C. Franceschil, I. Kola, M.C. Venanzoni, Regulation of the human stress response gene GADD153 expression: role of ETS1 and FLI-1 gene products, *Cell Death Differ.* 6 (9) (1999) 902–907.
- [60] Z. Zhang, X.Y. Yang, D.M. Cohen, Hypotonicity activates transcription through ERK-dependent and-independent pathways in renal cells, *Am. J. Physiol.* 275 (4 Pt1) (1998) C1104–1112.
- [61] L. Robinson, A. Panayiotakis, T.S. Papas, I. Kola, A. Seth, Ets target genes: identification of Egri as a target by RNA differential display and whole genome PCR techniques, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 7170–7175.
- [62] M.C. Puri, J. Rossant, K. Alitalo, A. Bernstein, J. Partanen, The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells, *The EMBO J.* 14 (1995) 5884–5891.
- [63] T.N. Sato, Y. Tozawa, U. Deutsch, K. Wolburg-Buchholz, Y. Fujiwara, M. Gendron-Maguire, T. Gridley, H. Wolburg, W. Risau, Y. Qin, Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation, *Nature* 376 (1995) 70–74.
- [64] J. Korhonen, I. Lahtinen, M. Halmekyto, L. Alhonen, J. Janne, D. Dumont, K. Alitalo, Endothelial-specific gene expression directed by the tie gene promoter in vivo, *Blood* 86 (5) (1995) 1828–1835.
- [65] K. Ujin, A. Dube, S. Kontusaari, J. Korhonen, I. Lahtinen, P. Oettgen, K. Alitalo, Role of Ets factors in the activity and endothelial cell specificity of the mouse Tie gene promoter, *Faseb J.* 13 (2) (1999) 377–386.
- [66] T.M. Schlaeger, Y. Qin, Y. Fujiwara, J. Magram, T.N. Sato, Vascular endothelial cell lineage-specific promoter in transgenic mice, *Development* 121 (4) (1995) 1089–1098.
- [67] T.M. Schlaeger, S. Bartunkova, J.A. Lawitts, G. Teichmann, W. Risau, U. Deutsch, T.N. Sato, Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 3058–3063.

- [68] A. Dube, Y. Akbarali, T.N. Sato, T.A. Libermann, P. Oettgen, Role of the ets transcription factors in the regulation of the vascular-specific tie2 gene, *Circ. Res.* 84 (10) (1999) 1177–1185.
- [69] G. Breier, F. Breviario, L. Caveda, R. Berthier, H. Schnürch, U. Gotsch, D. Vestweber, W. Risau, E. Dejana, Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system, *Blood* 87 (1996) 630–641.
- [70] S. Gory-Faure, M.H. Prandini, H. Pointu, V. Roullot, I. Pignot-Paintrand, M. Vernet, P. Huber, Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis, *Development* 126 (10) (1999) 2093–2102.
- [71] P. Carmeliet, M.G. Lampugnani, L. Moons, F. Breviario, V. Compernelle, F. Bono, G. Balconi, R. Spagnuolo, B. Oostuyse, M. Dewerchin, A. Zanetti, A. Angellilo, V. Mattot, D. Nuyens, E. Lutgens, F. Clotman, M.C. de Ruiter, A. Gittenberger-de Groot, R. Poelmann, F. Lupu, J.M. Herbert, D. Collen, E. Dejana, Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis, *Cell* 98 (2) (1999) 147–157.
- [72] S. Gory, M. Vernet, M. Laurent, E. Dejana, J. Dalmon, P. Huber, The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice, *Blood* 93 (1) (1999) 184–192.
- [73] T. Veikkola, M. Karkkainen, L. Claesson-Welsh, K. Alitalo, Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors, *Cancer Res.* 60 (2) (1999) 203–212.
- [74] K. Morishita, D.E. Johnson, L.T. Williams, A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (fit-1) that confers endothelial-specific gene expression, *J. Biol. Chem.* 270 (46) (1995) 27948–27953.
- [75] T. Ikeda, K. Wakiya, M. Shibuya, Characterization of the promoter region for fit-1 tyrosine kinase gene, a receptor for vascular endothelial growth factor, *Growth Factors* 13 (3–4) (1996) 151–162.
- [76] K. Wakiya, D. Stehelin, A. Begue, M. Shibuya, A cyclic AMP response element and an ETS motif are involved in the transcriptional regulation of fit-1 tyrosine kinase (VEGF receptor 1) gene, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 30823–30828.
- [77] A. Kappel, V. Ronicke, A. Damert, I. Flamme, W. Risau, G. Breier, Identification of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences sufficient for angioblast and endothelial cell-specific transcription in transgenic mice, *Blood* 93 (12) (1999) 4284–4292.
- [78] C. Wasylyk, S.M. Maira, P. Sobieszczuk, B. Wasylyk, Reversion of Ras transformed cells by Ets transdominant mutants, *Oncogene* 9 (1994) 3665–3673.
- [79] V. Mattot, C. Vercamer, F. Soncin, T. Calmels, C. Huguet, V. Fafeur, B. Vandenbunder, Constitutive expression of the DNA-binding domain of Ets1 increases endothelial cell adhesion and stimulates their organization into capillary-like structures, *Oncogene* 19 (2000) 762–772.
- [80] T. Nakano, M. Abe, K. Tanaka, R. Shineha, S. Satomi, Y. Sato, Angiogenesis inhibition by transdominant mutant ets-1, *J. Cell. Physiol.* 184 (2) (2000) 255–262.
- [81] N. Oda, M. Abe, Y. Sato, ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta3, *J. Cell. Physiol.* 178 (2) (1999) 121–132.
- [82] N. Wernert, A. Stanjek, S. Kiriakidis, A. Hugel, H.C. Jha, R. Mazitschek, A. Giannis, Inhibition of angiogenesis in vivo by ets-1 antisense oligonucleotides-inhibition of Ets-1 transcription factor expression by the antibiotic fumagillin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38 (21) (1999) 3228–3231.
- [83] K. Barton, N. Muthusamy, C. Fischer, C.N. Ting, T.L. Walunas, L.L. Lanier, J.M. Leiden, The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice, *Immunity* 9 (4) (1998) 555–563.
- [84] M. Baltzinger, A.M. Mager-Heckel, P. Remy, XI erg: expression pattern and overexpression during development plead for a role in endothelial cell differentiation, *Dev. Dyn.* 216 (4–5) (1999) 420–433.
- [85] P. Remy, F. Senan, D. Meyer, A.M. Mager, C. Hindelang, Overexpression of the *Xenopus* XI-*fl*i gene during early embryogenesis leads to anomalies in head and heart development and erythroid differentiation, *Int. J. Dev. Biol.* 40 (1996) 577–589.
- [86] L. Zhang, A. Eddy, Y.T. Teng, M. Fritzler, M. Kiuppel, F. Melet, A. Bernstein, 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 (12) (1995) 6961–6970.
- [87] D.D. Spyropoulos, P.N. Pharr, K.R. Lavenburg, P. Jackers, T.S. Pappas, M. Ogawa, D.K. Watson, Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the flu transcription factor, *Mol. Cell. Biol.* 20 (15) (2000) 5643–5652.
- [88] A. Yamamoto, D.K. Dhar, A.O. El, M. Igarashi, H. Tabara, N. Nagasue, Thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor), microvessel density and clinical outcome in hepatocellular carcinoma [In Process Citation], *J. Hepatol.* 29 (2) (1998) 290–299.
- [89] L.C. Wang, F. Kuo, Y. Fujiwara, D.G. Gilliland, T.R. Golub, S.H. Orkin, Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL, *EMBO J.* 16 (1997) 4374–4383.
- [90] E. Sapi, M.B. Flick, S. Rodov, B.M. Kacinski, Ets-2 transdominant mutant abolishes anchorage-independent growth and macrophage colony-stimulating factor-stimulated invasion by BT20 breast carcinoma cells, *Cancer Res.* 58 (5) (1998) 1027–1033.
- [91] L. Robinson, A. Panayiotakis, T.S. Pappas, I. Kola, A. Seth, ETS target genes: identification of egr1 as a target by RNA differential display and whole genome PCR techniques, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (14) (1997) 7170–7175.

- [92] A. Seth, T.S. Papas, The c-ets-1 proto-oncogene has oncogenic activity and is positively autoregulated, *Oncogene* 5 (1990) 1761–1767.
- [93] A. Seth, L. Robinson, D.M. Thompson, D.K. Watson, T.S. Papas, Transactivation of GATA-1 promoter with ETS1, ETS2 and ERGB/Hu-FLI-1 proteins stabilization of the ETS 1 protein binding on GATA-1 promoter sequences by monoclonal antibody, *Oncogene* 8 (1993) 1783–1790.
- [94] M.F. Roussel, J.N. Davis, J.L. Cleveland, J. Ghysdael, S.W. Hiebert, Dual control of myc expression through a single DNA binding site targeted by ets family proteins and E2F-1, *Oncogene* 9 (2) (1994) 405–415.
- [95] P. Coffer, M. De Jonge, A. Mettouchi, B. Binetruy, J. Ghysdael, W. Kruijer, *junB* promoter regulation: Ras mediated transactivation by c-Ets-1 and c-Ets-2, *Oncogene* 9 (1994) 911–921.
- [96] L.M. Khachigian, J.W. Fries, M.W. Benz, D.T. Bonthron, T. Collins, Novel cis-acting elements in the human platelet-derived growth factor B-chain core promoter that mediate gene expression in cultured vascular endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 269 (36) (1994) 22647–22656.
- [97] T. Minami, K. Tachibana, T. Imanishi, T. Doi, Both Ets-1 and GATA-1 are essential for positive regulation of platelet factor 4 gene expression, *Eur. J. Biochem.* 258 (2) (1998) 879–889.
- [98] C. Rius, J.D. Smith, N. Almendro, C. Langa, L.M. Botella, D.A. Marchuk, C.P. Vary, C. Bernabeu, Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1, *Blood* 92 (12) (1998) 4677–4690.
- [99] G. Gambarotta, C. Boccaccio, S. Giordano, M. Ando, M.C. Stella, P.M. Comogho, Ets up-regulates MET transcription, *Oncogene* 13 (9) (1996) 1911–1917.
- [100] F. Shirasaki, H.A. Makhluif, C. LeRoy, D.K. Watson, M. Trojanowska, Ets transcription factors cooperate with Sp1 to activate the human tenascin-C promoter, *Oncogene* 18 (54) (1999) 7755–7764.
- [101] M. Zhang, O. Volpert, Y.H. Shi, N. Bouck, Maspin is an angiogenesis inhibitor, *Nat. Med.* 6 (2) (2000) 196–199.
- [102] G. Buttice, M. Kurkinen, A polyoma enhancer A-binding protein-3 site and Ets-2 protein have a major role in the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate response of the human stromelysin gene, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 7196–7204.
- [103] C. Wasylyk, A. Gutman, R. Nicholson, B. Wasylyk, c-ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins, *The EMBO J.* 10 (1991) 1127–1134.
- [104] C. Nerlov, D. De Cesare, F. Pergola, A. Caracciolo, F. Blasi, M. Johnsen, P. Verde, A regulatory element that mediates co-operation between a PEA3-AP-1 element and an AP-1 site is required for phorbol ester induction of urokinase enhancer activity in HepG2 hepatoma cells, *EMBO J.* 11 (1992) 4573–4582.
- [105] S.K. Logan, M.J. Garabedian, C.E. Campbell, Z. Werb, Synergistic transcriptional activation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter via functional interaction of AP-1 and Ets-1 transcription factors, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 774–782.
- [106] S. Yan, I.M. Berquin, B.R. Troen, B.F. Sloane, Transcription of human cathepsin B is mediated by Sp1 and Ets family factors in glioma, *DNA Cell Biol.* 19 (2) (2000) 79–91.
- [107] E. Lelièvre, V. Mattot, P. Huber, B. Vandebunder, F. Soncin, Ets1 lowers capillary endothelial cell density at confluence and induces the expression of VE-cadherin, *Oncogene* 19 (2000) 2438–2446.
- [108] E.P. Bottinger, C.S. Shelley, O.C. Farokhzad, M.A. Arnaout, The human beta 2 integrin CD 18 promoter consists of two inverted Ets cis elements, *Mol. Cell. Biol.* 14 (4) (1994) 2604–2615.
- [109] G.D. Rosen, J.L. Barks, M.F. Iademarco, R.J. Fisher, D.C. Dean, 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 (22) (1994) 15652–15660.
- [110] Y. de Launoit, M. Audette, H. Pelczar, S. Plaza, J.L. Baert, The transcription of the intercellular adhesion molecule-1 is regulated by Ets transcription factors, *Oncogene* 16 (16) (1998) 2065–2073.
- [111] J.L. Schwachtgen, N. Janel, L. Barek, M. Duterque-Coquillaud, J. Ghysdael, D. Meyer, N.D. Kerbirou, Ets transcription factors bind and transactivate the core promoter of the von Willebrand factor gene, *Oncogene* 15 (25) (1997) 3091–3102.
- [112] C. Albanese, J. Johnson, G. Watanabe, N. Ekiund, D. Vu, A. Arnold, R.G. Pestell, Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions, *J. Biol. Chem.* 270 (40) (1995) 23589–23597.
- [113] F. Karantzoulis-Fegaras, H. Antoniou, S.L. Lai, G. Kulkami, C. Dabreo, G.K. Wong, T.L. Miller, Y. Chan, J. Atkins, Y. Wang, P.A. Marsden, Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter, *J. Biol. Chem.* 274 (5) (1999) 3076–3093.
- [114] B.M. Deramaudt, P. Remy, N.G. Abraham, Upregulation of human heme oxygenase gene expression by Ets-family proteins, *J. Cell. Biochem.* 72 (3) (1999) 311–321.
- [115] H.D. Orzechowski, A. Gunther, S. Menzel, K.H. Funke, M. Richter, H. Bohnemeier, M. Paul, Endothelial expression of endothelin-converting enzyme-1 beta mRNA is regulated by the transcription factor Ets-1, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* (1998) S55–57.
- [116] A. Kappel, T.M. Schlaeger, I. Flamme, S.H. Orkin, W. Risau, G. Breier, Role of SCL/Tal-1, GATA, and ets transcription factor binding sites for the regulation of Flk-1 expression during murine vascular development, *Blood* 96 (2000) 3078–3085.

Rôle des facteurs de transcription ETS dans le contrôle de la spécificité d'expression endothéliale et l'angiogenèse

Role of the ETS transcription factors in the control of endothelial-specific gene expression and in angiogenesis

Étienne LELIÈVRE*
Frédéric LIONNETON*
Fabrice SONCIN*

* CNRS UMR8526, Institut de biologie, 1, rue Calmette, 59021 Lille Cedex. <fabrice.soncin@it.fr>

Résumé – Les facteurs de transcription de la famille ETS sont impliqués dans le contrôle de l'expression spécifique dans les cellules endothéliales de gènes importants pour la mise en place des vaisseaux sanguins. L'analyse du patron d'expression de *ets1*, l'inactivation des gènes *tel* et *fli1*, l'analyse *in vitro* des gènes cibles potentiels des facteurs ETS dans les cellules endothéliales et celles des régions promotrices de gènes spécifiquement exprimés dans ces cellules sont autant d'observations expérimentales qui montrent que les facteurs ETS ont un rôle à jouer dans cette spécificité. Cependant, le rôle distinct de chacun des facteurs ETS dans le contrôle de l'identité de la cellule endothéliale comme dans l'angiogenèse reste difficile à définir *in vivo*. ▲

Mots clés : angiogenèse, endothélium, vaisseaux sanguins, facteurs ETS, transcription.

Abstract – The transcription factors of the ETS family are involved in the control of the endothelial-specific expression of genes that are important for the formation of new blood vessels. The analysis of the expression pattern of *ets1*, the gene inactivation of *tel* and *fli1*, the *in vitro* analysis of potential target genes of ETS factors in endothelial cells, the *in vivo* studies of the promoter regions of endothelial-specific genes all demonstrate a role for ETS factors in this specificity. However, the precise role of individual ETS factors in the endothelial identity and in angiogenesis in general remains difficult to understand *in vivo*. ▲

Key words: angiogenesis, endothelium, blood vessels, ETS factors, gene transcription.

Manuscrit reçu le 10 juillet 2000,
accepté le 23 novembre 2000.

Tirés à part : F. Soncin.

La mise en place de vaisseaux sanguins est un phénomène essentiel au développement embryonnaire, au remodelage tissulaire et au développement tumoral chez l'adulte. Les molécules impliquées dans ce processus sont nombreuses, depuis les facteurs de croissance des cellules endothéliales et ceux impliqués dans la maturation vasculaire jusqu'aux effecteurs de l'inflammation et de la coagulation [1] ; pourtant, les mécanismes contrôlant l'expression de leurs gènes au cours de l'angiogenèse sont encore peu connus. Les cellules endothéliales forment les nouveaux capillaires à l'origine des futurs vaisseaux sanguins. Elles expriment un répertoire spécifique de marqueurs qui leur donne une identité « endothéliale ». Dans les gènes de certains de ces marqueurs ont été identifiées des zones de régulation responsables de l'expression spécifique dans les cellules endothéliales. Certains facteurs de transcription de la famille ETS participent à la détermination de cette spécificité d'expression et aussi à la régulation basale de ces gènes.

La famille ETS

Les gènes des premiers facteurs de transcription ETS connus ont été identifiés lors d'études de la transformation induite par les rétrovirus. Le gène *v-ets* est présent dans le génome du rétrovirus aviaire E26 qui induit des leucémies mixtes

myéloïdes-érythrocytaires chez le poulet [2-4]. *v-ets* est lui-même nécessaire à l'activité transformante du rétrovirus E26. L'équivalent cellulaire de *v-ets*, le gène *c-ets1*, est aussi un site d'insertion du provirus MoMuLV responsable de lymphomes chez le rat. D'autres gènes de facteurs ETS ont été identifiés comme sites d'insertions rétrovirales ; le gène du facteur Spi1/PU.1 est un site préférentiel d'insertion du provirus SFFV, responsable de l'érythroleucémie de Friend chez la souris, et serait impliqué dans l'activité transformante du virus. En effet, la surexpression de Spi1/PU.1 induite par cette insertion inhibe la différenciation terminale érythrocytaire. Le gène *fli1* a été identifié comme site d'insertion préférentiel du provirus F-MuLV, virus *helper* du SFFV, également responsable de leucémies érythrocytaires chez la souris. Chez l'homme, l'étude des translocations chromosomiques fréquentes dans les sarcomes d'Ewing a permis de montrer que certaines translocations entraînaient la fusion d'une partie du gène *ews* avec celui des gènes des facteurs ETS *fli1* ou *erg* et conduisaient à la production de protéines chimères à activité transformante. La translocation du gène *tel*, un autre membre de la famille ETS, et la production consécutive de protéines chimères sont également observées dans nombre de leucémies humaines [5].

La famille des facteurs ETS est composée de plusieurs dizaines de molécules qui ont en commun un domaine de fixation à l'ADN appelé ETS. Ce domaine est composé d'environ 85 acides aminés et forme une « hélice-boucle-hélice » qui

permet la reconnaissance d'une séquence d'ADN dont le motif central est GGAA/T, nommé *Ets-binding site* (EBS). Les régions situées de part et d'autre de ce motif sont importantes pour la spécificité d'interaction des facteurs ETS avec l'ADN. Certains facteurs ETS partagent d'autres régions d'homologie comme les facteurs des groupes ETS, GAPB, ERG, TEL, YAN et ESE qui ont en commun un domaine dénommé *pointed* [6]. La plupart des membres de la famille ETS activent la transcription, sauf Erf, Net et Tel qui la répriment. Cette activité transcriptionnelle est régulée à plusieurs niveaux ; au niveau intramoléculaire, la région située directement en amont du domaine ETS de Ets1 interagit avec ce domaine et avec la région C-terminale du facteur en l'absence d'ADN. Cette association cesserait pour permettre un réarrangement moléculaire et une meilleure fixation en présence d'ADN. L'activité des facteurs Ets1, Ets2, Elk1 et PEA3 peut aussi être régulée par la phosphorylation. Dans Ets1, le domaine codé par l'exon VII, impliqué dans l'inhibition de la fixation à l'ADN, contient quatre sérines qui sont phosphorylées de façon dépendante du calcium. La phosphorylation de ces sérines inhibe la fixation à l'ADN de Ets1 et semble importante pour le réarrangement moléculaire du facteur. L'activité transactivatrice de Ets1 et Ets2 est aussi contrôlée par la phosphorylation d'une thréonine conservée (Thr38 et Thr72, respectivement), localisée dans le domaine *pointed*. Différentes voies métaboliques peuvent participer à cette régulation par phosphorylation. Ainsi, la protéine ETS PEA3 est activée par le récepteur à tyrosine kinase HER2/Neu à la fois par la voie des kinases Ras-dépendante Erk et par la voie des kinases JNK/SAPK. De telles régulations ont été également décrites pour Elk1, Sap1a et Net/Sap2, facteurs ETS impliqués dans la formation des *ternary complex factor*. Ces travaux ont montré en particulier que, selon les stimuli, des kinases différentes sont capables d'activer le même facteur de transcription sur des domaines distincts [7, 8]. Pour l'instant, il n'y a pas eu de description de la formation de tels complexes dans les cellules endothéliales, mais il est très probable que des régulations similaires existent. L'activité transactivatrice des membres de la famille ETS est également dépendante de leur interaction directe ou indirecte avec d'autres facteurs de transcription partenaires tels le *core binding factor* $\alpha 2$ [9], le complexe AP1 [10, 11], MafB, une protéine apparentée à AP1 [12], CBP/P300 [13] ou la protéine EAP1/Daxx [14] pour Ets1. Enfin, certaines protéines ETS interagissent entre elles ; la protéine Tel forme des homodimères, la dimérisation est nécessaire à l'activité répressive de Tel sur les membres de la famille ETS [15]. Tel est également capable d'interagir avec Fli1 et d'inhiber son activité transactivatrice sur le promoteur des gènes mégacaryocytaires GPIIb α et GPIX [16].

Les propriétés liées à l'activité transcriptionnelle des facteurs ETS connus sont bien décrites ; en revanche, peu d'informations sont disponibles sur les fonctions de ces facteurs *in vivo*. Une fonction pour certains facteurs ETS dans la mise en place et le développement vasculaire a été suggérée suite aux études de leur expression pendant le développement normal et tumoral. En revanche, l'analyse de l'inactivation de gène par recombinaison homologue ne permet pas de conclure quant au rôle de ces mêmes facteurs dans l'angiogenèse. Des études de recherche de gènes cibles *in vitro* confirmées par transgénèse *in vivo* ont montré que certains des gènes importants pour l'angiogenèse pouvaient être effectivement régulés par des facteurs ETS. De ces études, il ressort que quatre membres de la famille ETS, Ets1, Fli1, Tel et Erg, sont particulièrement intéressants dans le cadre de l'étude de l'angiogenèse.

Expression des facteurs ETS pendant l'angiogenèse

L'expression de *ets1* correspond en particulier, mais pas exclusivement, aux zones de formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans l'embryon et chez l'adulte. Pendant le développement embryonnaire du poulet, les ARNm *ets1* sont exprimés dans les cellules de l'aire opaque qui forment les îlots sanguins extra-embryonnaires. Quand des cellules endothéliales se différencient à la périphérie de ces îlots, les transcrits *ets1* sont alors restreints à ces cellules [17, 18]. Par la suite et tout au long du développement de l'embryon de poulet et de souris, les transcrits *ets1* sont détectés dans les cellules endothéliales pendant la formation des nouveaux vaisseaux sanguins et cette expression décroît quand les néovaisseaux se différencient en vaisseaux matures [19, 20]. Pendant l'implantation et la placentation chez la souris, *ets1* est également exprimé dans le réseau vasculaire nouvellement formé de l'endomètre [21]. Chez l'adulte, l'expression de *ets1* n'est pas détectée dans les gros vaisseaux ou les capillaires, mais elle est réinduite dans l'endothélium de l'aorte après dénudation [22] ou lors de l'angiogenèse induite pendant la cicatrisation et le développement tumoral [23]. Les patrons d'expression de *erg* et *fli1* sont indiscernables de celui de *ets1* dans les îlots sanguins extra-embryonnaires immatures au début du développement embryonnaire [24]. L'expression de *fli1* est également retrouvée dans les cellules endothéliales de la décidue maternelle et de l'embryon mais pas dans les cellules endothéliales de l'adulte [24]. L'expression de *ets2* qui a été étudiée en parallèle à celle de *ets1* chez la souris montre un patron très différent ; *ets2* n'est pas exprimé par les cellules endothéliales dans les vaisseaux en formation [20].

In vitro, les observations montrent de même que l'expression de *ets1* est corrélée à l'activation de l'endothélium ; *ets1* est exprimé dans les cellules endothéliales qui prolifèrent [23] et qui migrent [22], mais pas après que ces cellules ont atteint la confluence [23]. Cette expression est augmentée dans les cellules endothéliales stimulées par différents facteurs angiogéniques [23, 25, 26], mais aussi dans les cellules musculaires lisses stimulées par l'endothéline 1 et le PDGF-BB [27]. L'expression de *tel* est détectée dans les cellules endothéliales pendant la formation de tubes et il semblerait que le VEGF l'inhibe [28].

Analyses de l'inactivation de gènes ETS

Tel

Tel et *fli1* sont les deux seuls membres de la famille ETS dont l'inactivation du gène induit un phénotype de défaut des vaisseaux sanguins. L'expression de *tel* est détectée dans divers tissus et dans le sac vitellin de l'embryon de E7.0. Sa perte résulte en une mort embryonnaire entre E10.5 et E11.5. À E9.5, les deux tiers des embryons *tel*^{-/-} ont un sac vitellin sans branchement des vaisseaux qui forment plutôt un réseau de sinusoides interconnectées en nid-d'abeilles. Les cellules endothéliales sont présentes dans ce réseau et, dans l'embryon, l'aorte dorsale, les vaisseaux intersomitiques et les veines de la tête sont apparemment normaux. À E10.5, tous les mutants sont clairement anormaux avec un manque de vaisseaux vitellins. À ce stade, la majorité des embryons est retardée et le reste montre la même structure vasculaire en nid-d'abeilles qu'à E9.5. L'analyse histo-

logique montre également la présence de plusieurs zones d'apoptose, particulièrement dans le tube neural et les tissus mésenchymateux [29]. Ces résultats suggèrent que *tel* n'est pas nécessaire à la formation de cellules endothéliales ou à la vasculogénèse, mais est indispensable au maintien du réseau vasculaire formé.

Erg et Fli1

L'expression ectopique de XI^{Erg} ou XI^{Fli1} chez le xénope induit des défauts de développement multiples, comme des anomalies dans les polarités antéropostérieures et dorsoventrales ou des défauts dans le développement de l'œil. Quand les ARNm de Erg sont injectés ventralement, les embryons montrent une différenciation ectopique de cellules endothéliales [30]. La micro-injection d'ARNm de XI^{Fli1} induit des défauts de développement du cœur avec un épaississement de la gelée cardiaque et une accumulation anarchique de cellules endothéliales bordant la cavité ventriculaire [31]. Ces résultats plaident donc en faveur d'un rôle de Erg et de Fli1 dans la différenciation endothéliale. En revanche, les souris transgéniques qui surexpriment Fli1 développent un défaut immunologique rénal létal sans autre anomalie histologique [32].

Deux études d'inactivation complète du gène *fli1* chez la souris récemment menées [33, 34] montrent que la mutation est létale, les embryons *fli1*^{-/-} meurent à E11 ou E11.5. Les deux études rapportent un phénotype comparable d'hémorragies au niveau du tube neural, dues à une perte d'intégrité des vaisseaux sanguins du neuroépithélium. À ce stade, *fli1* s'exprime dans les cellules endothéliales des vaisseaux concernés. Les cellules endothéliales sont vraisemblablement affectées dans leurs propriétés d'adhérence intercellulaire et dans des expériences d'embryons chimères, elles ne sont plus capables de participer à l'élaboration de vaisseaux sanguins après E10.5. Comme la vasculogénèse et l'angiogénèse avant ce stade sont apparemment normales, *fli1* semble donc spécifiquement nécessaire à la mise en place des cellules endothéliales des vaisseaux cérébraux après E10.5. L'expression des gènes *flk1*, *tie1* n'est pas modifiée dans les embryons *fli1*^{-/-} à E11.5, en revanche, celle de *tie2* est fortement réduite [33].

Ets1

Aucun défaut de développement vasculaire n'a été rapporté suite à l'inactivation du gène *ets1* chez la souris. Les souris *ets1*^{-/-} sont viables et fertiles, mais la mort périnatale est importante ; environ 50 % des souris meurent avant sevrage, quatre semaines après la naissance. Le défaut principal est une réduction du nombre de cellules NK [35]. Les raisons de la mort précoce de la moitié des souriceaux ne sont pas connues. L'existence de souris *ets1*^{-/-} viables suggère que Ets1 n'est pas nécessaire pour le développement vasculaire et hématopoïétique de l'embryon.

Pourtant, des oligonucléotides antisens d'*ets1* qui permettent d'inhiber l'expression de Ets1 dans les cellules endothéliales en culture [25] ont également un effet *in vivo* sur la membrane chorioallantoïdienne d'embryon de poulet ; la transfection de ces antisens à 5 jours de développement induit spécifiquement une inhibition dose-dépendante de l'angiogénèse, avec une réduction à la fois du diamètre et du nombre de vaisseaux [36]. Ces derniers résultats suggèrent que Ets1 a effectivement une part à jouer dans la mise en place des vaisseaux sanguins dans l'embryon de poulet.

Ets2

L'ARNm d'*ets2* n'est pas exprimé dans les cellules endothéliales, mais son expression a été détectée dans les cellules trophoblastiques qui, par bien des aspects, ressemblent aux cellules endothéliales [37]. Les embryons dont le gène *ets2* a été muté (*ets2*^{ab/ab}) ont des problèmes d'implantation probablement dus à la migration anormale des cellules trophoblastiques et à des défauts de connexion avec la circulation maternelle. L'expression de PECAM-1 est fortement diminuée dans ces cellules et l'absence d'expression de MMP9 chez ces souris pourrait expliquer le manque de remodelage de la matrice extracellulaire. Quand des embryons mutants viables sont produits par agrégation avec des cellules d'embryons de souris tétraploïdes qui fournissent des tissus extra-embryonnaires, le développement se déroule normalement, les souris *ets2*^{ab/ab} sont alors viables et fertiles [37].

L'analyse de l'inactivation des gènes de membres de la famille ETS est donc jusqu'à présent plutôt décevante du point de vue de l'angiogénèse, mise à part celle des gènes *tel* et *fli1*. Il est possible que la redondance d'activité [5] et d'expression de facteurs ETS dans ces cellules permette de pallier le manque d'un seul de ces facteurs pendant le développement embryonnaire ; cette hypothèse n'est cependant pas démontrée *in vivo*. La recherche de gènes cibles *in vitro* et *in vivo* a permis de montrer que d'autres facteurs ETS pouvaient participer à la régulation de gènes importants dans l'angiogénèse.

Études des fonctions des facteurs ETS dans les cellules endothéliales *in vitro*

In vitro, les facteurs ETS sont capables de transactiver les gènes codant des enzymes de dégradation de la matrice et des molécules impliquées dans les interactions cellules-matrice et cellule-cellule, intégrines, cadhérines et molécules d'adhérence intercellulaire. Plusieurs études sur les effets de différents mutants de membres de la famille ETS ont montré que ces facteurs pouvaient être impliqués dans la régulation de l'adhérence cellulaire, de l'étalement et de la migration. La surexpression du domaine de fixation à l'ADN de PU.1, Ets1 et Ets2 inhibe la transformation de cellules 3T3 par Ras. Ces cellules deviennent plus grosses et plus plates et adhèrent mieux à leur substrat [38]. Des oligonucléotides antisens de *ets1* inhibent la migration de cellules endothéliales humaines induite par l'EGF, le FGF1 [25] et l'invasion induite par le VEGF [26], alors que la surexpression de Ets1 dans des cellules endothéliales dérivées de rates de souriceaux nouveau-nés augmente leurs propriétés invasives à travers le matrigel, un gel de matrice extracellulaire reconstitué [39]. L'expression d'un mutant dominant négatif des membres de la famille ETS composé du domaine de fixation à l'ADN de Ets1 induit une augmentation de l'étalement et l'adhérence de cellules endothéliales capillaires de cerveau sur divers substrats matriciels, ainsi qu'une réorganisation de leur cytosquelette. La capacité des cellules endothéliales à former des structures branchées dans un test d'angiogénèse réalisé *in vitro* sur gel de matrigel est également grandement augmentée par l'expression de ce mutant [40]. En revanche, l'utilisation d'un mutant dominant négatif similaire dans d'autres cellules endothéliales semble réduire la capacité des clones produits à proliférer, à migrer et à former des structures en tube sur gel de collagène en réponse au bFGF et, de façon intéressante, le mutant inhibe l'angiogénèse induite par le bFGF *in vivo* [41]. Nous avons d'autre part observé que la sur-

expression de Ets1 dans des cellules endothéliales capillaires de cerveau abaissait leur densité à confluence et induisait l'expression de la VE-cadhérine, une molécule essentielle à l'intégrité de l'endothélium [42]. Ets1 inhibe également la capacité de ces cellules endothéliales à former des branchements sur gel de matrigel *in vitro* [F. Soncin, communication personnelle].

Identification de gènes cibles dans les cellules endothéliales

Le site EBS est un site de complexité relativement modeste fréquemment trouvé dans le génome. Il est pratiquement impossible d'identifier un gène cible des facteurs ETS sur la base de la présence d'EBS dans sa région promotrice au sens large. Il est également difficile d'affirmer qu'un gène est cible d'un membre de la famille ETS par l'observation de la réponse de son promoteur dans des expériences de transactivation *in vitro* tant cette réponse est sujette à variation des conditions expérimentales. Cependant, de nombreux gènes cibles putatifs des membres de la famille ETS sont exprimés dans les cellules endothéliales et leur promoteur activé par ces facteurs. C'est le cas en particulier du promoteur du gène du facteur Von Willebrand, du PDGF-BB, de l'endogline, du PF4, de l'uPA ou de la sous-unité $\alpha 4$ des intégrines.

In fine, c'est la convergence d'observations *in vitro* et *in vivo* qui permet de conclure à l'identification de gènes cibles des facteurs ETS et plusieurs gènes importants pour l'identité de la cellule endothéliale sont ainsi en partie régulés par des membres de la famille ETS *in vitro* et *in vivo*.

Les gènes *tie*

Les gènes *tie1* et *tie2* codent des récepteurs à tyrosine kinase exprimés dans l'endothélium des vaisseaux sanguins pendant le développement embryonnaire et chez l'adulte. L'inactivation de l'un ou l'autre induit des défauts sévères dans le développement vasculaire [43, 44]. Des approches transgéniques utilisant des fragments de promoteur du gène *tie* souris (735 bp) et humain (5 kb) placés au contrôle d'un gène rapporteur ont montré que chaque fragment de promoteur était capable de diriger une expression spécifique des cellules endothéliales pendant le développement embryonnaire. La comparaison des séquences de ces régions chez les deux espèces a révélé la présence de plusieurs EBS conservés [45]. Deux régions contenant des doubles EBS sont critiques pour l'activité basale du promoteur *tie1* *in vitro*, au moins une de ces régions l'est également *in vivo*. *In vitro*, des expériences de transfection transitoire montrent que Nerf2, un membre de la famille ETS exprimé dans les cellules endothéliales en culture [46], Ets1 et Ets2 sont capables de transactiver ce promoteur, alors que Tel, Sap, Nerf1 ou Elk n'ont pas cette activité [47].

Une approche transgénique a également été menée avec des fragments du promoteur du gène de *tie2* de différentes longueurs. Un fragment de 1,2 kb est capable de donner une expression spécifique dans les cellules endothéliales du gène rapporteur utilisé ; cependant, l'activité transgénique de ce rapporteur est restreinte à la première moitié du développement embryonnaire et n'est plus détectée chez l'adulte [48]. En revanche, en complément de cette région, un fragment de 10 kb de la première moitié du premier intron permet l'expression uniforme et forte du gène rapporteur dans toutes les cellules endo-

théliales des embryons et des souris transgéniques adultes. Un fragment de 303 bp contenu dans cette séquence intronique est capable d'induire *in vitro* l'activité spécifique dans les cellules endothéliales du promoteur thymidine kinase (tk) qui est normalement ubiquitaire. L'analyse de la séquence de ce fragment révèle la présence de plusieurs sites de fixation putatifs pour des facteurs de transcription généraux et tissu-spécifiques, y compris Ets1 et PEA3 et la mutation du site Ets1 ou de la région contenant le site PEA3 inactive complètement l'*enhancer in vivo* [49]. Les facteurs ETS sont donc nécessaires à l'activité de l'*enhancer* du promoteur de *tie2*. Parmi ces facteurs, Nerf2 est un activateur puissant du promoteur de *tie2*. Des analyses par délétion montrent qu'une région proximale de 250 bp du promoteur transmet l'effet transactivateur majeur de Nerf2, majoritairement par deux des cinq EBS présents dans cette région. Au contraire de Nerf2, Ets1 n'active pratiquement pas ce promoteur mais, de façon intéressante, il est, dans les mêmes expériences [46], un activateur du promoteur des gènes de l'uPA et de Flt1 plus puissant que Nerf2. Cela suggère en particulier que l'hypothèse de la redondance d'activité des facteurs ETS proposée lors de l'analyse des expériences d'inactivation de gènes n'est pas systématiquement applicable.

Le gène *VE-cadhérine*

La VE-cadhérine est une protéine transmembranaire qui permet l'adhérence intercellulaire homophile et dépendante du calcium ; elle est spécifiquement exprimée par les cellules endothéliales *in vivo* [50]. L'inactivation du gène *VE-cadhérine* entraîne une mort embryonnaire avec une absence de différenciation des îlots sanguins en réseau vasculaire primaire dans le sac vitellin [51, 52].

L'analyse du promoteur de la VE-cadhérine montre que la région d'approximativement 2,5 kb placée immédiatement en amont du site d'initiation de la transcription suffit pour permettre l'expression d'un transgène rapporteur dans l'endothélium d'embryons et de souris adultes similaire à celle du gène de la VE-cadhérine endogène [51]. L'analyse d'une région très proximale de ce promoteur révèle la présence de deux EBS essentiels à l'expression basale du gène puisque leur mutation réduit fortement l'activité du promoteur. Un rôle du facteur Erg dans le contrôle du gène de la VE-cadhérine a été proposé [53] et la surexpression de Ets1 dans les cellules endothéliales et fibroblastes de souris induit également une surexpression de la VE-cadhérine *in vitro*. Des expériences de transactivation utilisant le fragment de 2,5 kb du promoteur et ses versions mutées ont révélé que Ets1 augmentait l'activité du promoteur par les deux EBS précédemment localisés dans la région proximale [42].

Ces données suggèrent que Ets1 pourrait être impliqué dans le contrôle de l'expression du gène de la VE-cadhérine *in vivo*, d'autant plus que les patrons d'expression des deux gènes sont très semblables au début du développement. Cependant, à la différence de Ets1, l'expression de la VE-cadhérine est maintenue dans l'endothélium quiescent, suggérant que d'autres facteurs de transcription sont requis pour le maintien de cette expression après la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

Les gènes *flt1* et *flk1*

Flt1 et Flk1 sont deux récepteurs du VEGF dont l'expression est pratiquement restreinte aux cellules endothéliales vasculaires.

L'inactivation du gène de l'un ou l'autre de ces récepteurs entraîne un développement vasculaire anormal [54-56].

L'analyse du promoteur du gène *flt1* a permis d'identifier un fragment d'environ 1 kb (-748/+284) qui porte une forte activité transcriptionnelle *in vitro* et qui s'exprime spécifiquement dans les cellules endothéliales après infection par adénovirus. La délétion de la région proximale du promoteur contenant des sites conservés de réponse à l'AMPc (CRE) et EBS réduit fortement l'activité basale de ce promoteur, le site CRE est nécessaire à cette activité basale [57]. Un EBS localisé dans la région de 90bp située en amont du site d'initiation de transcription est également nécessaire pour l'activité du promoteur. Ets1, Ets2 et Erg sont capables de stimuler l'activité transcriptionnelle de cette région du gène *flt1* [58]. Dans une autre étude, la région -229/+8, qui contient ces sites, apparaît également essentielle pour une expression spécifique des cellules endothéliales du gène *flt1* [59]. Enfin, une corrélation significative entre l'expression des protéines Ets1 et Flt1 dans les cellules endothéliales microvasculaires de gliomes humains a été observée [60], suggérant que Ets1 pourrait effectivement réguler la transcription du gène *flt1* *in vivo*.

Malgré une activité non négligeable du promoteur du gène *flk1* dans les cellules endothéliales en culture, les séquences s'étendant jusqu'à -4,1 kb du site d'initiation de la transcription ne sont pas suffisantes pour permettre une expression transgénique reproductible et correcte du gène rapporteur. En revanche, en association avec un fragment de 939 bp du promoteur de *flk1*, un fragment de 2,3 kb du premier intron du gène permet une expression spécifique dans les cellules endothéliales *in vitro*. Le patron d'expression d'un transgène produit avec cette construction ressemble alors de près à celui du gène *flk1* endogène tout au long du développement. Ce fragment intronique de 2,3 kb est également capable de conférer une expression spécifique des cellules endothéliales au promoteur *tk* [61]. Une zone de 430 bp de cet *enhancer* qui contient plusieurs sites de fixation pour les facteurs des familles ETS, GATA et Scl/Tal est suffisante pour conférer l'expression spécifique des cellules endothéliales. Ces sites de fixation sont indispensables à l'expression du gène dans l'embryon : les sites Scl/Tal sont nécessaires pour une expression endothéliale forte et la mutation du site GATA rend l'*enhancer* totalement inactif *in vivo*. Enfin, un des deux sites EBS identifiés est nécessaire à l'expression endothéliale-spécifique du gène [62].

Conclusion

Les propriétés *in vitro* et *in vivo* des différents facteurs ETS évoqués suggèrent qu'ils jouent un rôle dans le contrôle de l'expression spécifique de gènes importants pour l'angiogenèse dans les cellules endothéliales. Cependant, la multiplicité des facteurs ETS peut rendre les interprétations des rôles distincts de chaque facteur délicates. Au-delà de la famille ETS, il est encore difficile de comprendre comment la spécificité d'expression endothéliale est régulée au niveau transcriptionnel. Il n'y a pas d'élément de réponse « spécifique des cellules endothéliales » identifié et il est probable que cette spécificité d'expression se construise à la fois par l'action de différents facteurs de transcription sur un même promoteur et par l'interaction moléculaire directe entre facteurs de transcription dans la cellule endothéliale. L'intégration des facteurs de la famille ETS à un modèle théorique du contrôle transcriptionnel des gènes de la cellule endothéliale au cours de l'angiogenèse reste encore difficile. ▼

Remerciements

E. Lelièvre reçoit une allocation de recherche du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et de l'Association pour la recherche sur le cancer. F. Lionneton reçoit une allocation de la Ligue nationale contre le cancer. F. Soncin est chargé de recherches à l'Institut national de la santé et de la recherche médicale.

RÉFÉRENCES

1. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Med* 2000 ; 6 : 389-95.
2. Ivanov X, Mladenov Z, Nedyalkov S, Todorov TG. Experimental investigations into avian leukosis. I. Transmission experiments of certain diseases of the avian leukosis complex, found in Bulgaria. *Bull Inst Pathol Comp Anim Domest* 1962 ; 9 : 5-36.
3. Leprince D, Gegonne A, Coll J, de Taisne C, Schneeberger A, Lagrou C, et al. A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 1983 ; 306 : 395-7.
4. Nunn MF, Seeburg PH, Moscovici C, Duesberg PH. Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* 1983 ; 306 : 391-5.
5. Ghysdael J, Boureux A. The ETS family of transcriptional regulators. In : *Progress in gene expression*. Edited by M. Karin. Basel : Birkhäuser Verlag, 1997 : 29-89.
6. Laudet V, Hanni C, Stehelin D, Duterque-Coquillaud M. Molecular phylogeny of the ETS gene family. *Oncogene* 1999 ; 18 : 1351-9.
7. Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 1996 ; 8 : 205-15.
8. Yang S, Whitmarsh A, Davis R, Sharrocks A. Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J* 1998 ; 17 : 1740-9.
9. Kim WY, Sieweke M, Ogawa E, Wee HJ, Englmeier U, Graf T, et al. Mutual activation of Ets1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains. *EMBO J* 1999 ; 18 : 1609-20.
10. Wasyluk B, Wasyluk C, Flores P, Begue A, Leprince D, Stehelin D. The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-fos and c-jun for transcriptional activation. *Nature* 1990 ; 346 : 191-3.
11. Basuyaux JP, Ferreira E, Stehelin D, Buttrick G. 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* 1997 ; 272 : 26188-95.
12. Sieweke MH, Tekotte H, Frampton J, Graf T. MafB is an interaction partner and repressor of Ets1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell* 1996 ; 85 : 49-60.
13. Yang C, Shapiro LH, Rivera M, Kumar A, Brindle PK. A role for CREB binding protein and p300 transcriptional coactivators in Ets1 transactivation functions. *Mol Cell Biol* 1998 ; 18 : 2218-29.
14. Li R, Pei H, Watson DK, Pappas TS. EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS1 target genes. *Oncogene* 2000 ; 19 : 745-53.
15. Lopez RG, Carron C, Oury C, Gardellin P, Bernard O, Ghysdael J. TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 30132-8.
16. Kwiatkowski BA, Bastian LS, Bauer TR, Tsai S, Zielinska-Kwiatkowska AG, Hickstein DD. The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 17525-30.
17. Pardanaud L, Dieterlen-Lièvre F. Expression of C-ETS1 in early chick embryo mesoderm : relationship to the hemangioblastic lineage. *Cell Adhesion Communication* 1993 ; 1 : 151-60.
18. Quéva C, Leprince D, Stehelin D, Vandenbunder B. 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* 1993 ; 8 : 2511-20.
19. Vandenbunder B, Pardanaud L, Jaffredo T, Mirabel MA, Stehelin D. Complementary patterns of expression of c-ets1, c-myc and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo. *Development* 1989 ; 106 : 265-74.

20. Maroulakou IG, Papas TS, Green JE. Differential expression of *ets1* and *ets2* proto-oncogenes during murine embryogenesis. *Oncogene* 1994; 9: 1551-65.
21. Grevin D, Chen JH, Raes MB, Stehelin D, Vandembunder B, Desbiens X. Involvement of the proto-oncogene *c-ets1* and the urokinase plasminogen activator during mouse implantation and placentation. *Int J Dev Biol* 1993; 37: 519-29.
22. Tanaka K, Oda N, Iwasaka C, Abe M, Sato Y. Induction of Ets1 in endothelial cells during reendothelialization after denuding injury. *J Cell Physiol* 1998; 176: 235-44.
23. Wernert N, Raes MB, Lassalle P, Dehouck MP, Gosselin B, Vandembunder B, et al. *c-ets1* proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans. *Am J Pathology* 1992; 140: 119-27.
24. Melet F, Motro B, Rossi DJ, Zhang L, Bernstein A. Generation of a novel Flt-1 protein by gene targeting leads to a defect in thymus development and a delay in Friend virus-induced erythroleukemia. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 2708-18.
25. Iwasaka C, Tanaka K, Abe M, Sato Y. Ets1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 1996; 169: 522-31.
26. Chen ZQ, Fisher RJ, Riggs CW, Rhim JS, Lautenberger JA. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by ETS1 antisense oligonucleotides. *Cancer Res* 1997; 57: 2013-9.
27. Naito S, Shimizu S, Maeda S, Wang J, Paul R, Fagin JA. Ets1 is an early response gene activated by ET-1 and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998; 274: C472-80.
28. Edel MJ. The ETS-related factor TEL is regulated by angiogenic growth factor VEGF in HUVE-cells. *Anticancer Res* 1998; 18: 4505-9.
29. Wang LC, Kuo F, Fujiwara Y, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH. Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *EMBO J* 1997; 16: 4374-83.
30. Baltzinger M, Mager-Heckel AM, Remy P. XI erg: expression pattern and overexpression during development plead for a role in endothelial cell differentiation. *Dev Dyn* 1999; 216: 420-33.
31. Remy P, Senan F, Meyer D, Mager AM, Hindelang C. Overexpression of the Xenopus XI-1 gene during early embryogenesis leads to anomalies in head and heart development and erythroid differentiation. *Int J Dev Biol* 1996; 40: 577-89.
32. Zhang L, Eddy A, Teng YT, Fritzler M, Kluppel M, Melet F, et al. An immunological renal disease in transgenic mice that overexpress Flt-1, a member of the *ets* family of transcription factor genes. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 6961-70.
33. Hart A, Melet F, Grossfeld P, Chien K, Jones C, Tunnacliffe A, et al. Flt1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygotously deleted in patients with thrombocytopenia. *Immunity* 2000; 13: 167-77.
34. Spyropoulos DD, Pharr PN, Lavenburg KR, Jackers P, Papas TS, Ogawa M, et al. Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Flt1 transcription factor. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 5643-52.
35. Barton K, Muthusamy N, Fischer C, Ting CN, Walunas TL, Lanier LL, et al. The Ets1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity* 1998; 9: 555-63.
36. Wernert N, Stanjek A, Kiriakidis S, Hügel A, Chandra H, Mazitschek R, et al. Inhibition of angiogenesis *in vivo* by *ets1* antisense oligonucleotides - inhibition of Ets1 transcription factor expression by the antibiotic fumagillin. *Angew Chem Int Ed* 1999; 38: 3228-31.
37. Yamamoto H, Flannery ML, Kupriyanov S, Pearce J, McKercher SR, Henkel GW, et al. Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2. *Genes Dev* 1998; 12: 1315-26.
38. Wasylyk C, Maira SM, Sobieszczuk P, Wasylyk B. Reversion of Ras transformed cells by Ets transdominant mutants. *Oncogene* 1994; 9: 3665-73.
39. Oda N, Abe M, Sato Y. ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin $\beta 3$. *J Cell Physiol* 1999; 178: 121-32.
40. Mattor V, Vercaemer C, Soncin F, Calmels T, Huguot C, Fafeur V, et al. Constitutive expression of the DNA-binding domain of Ets1 increases endothelial cell adhesion and stimulates their organization into capillary-like structures. *Oncogene* 2000; 19: 762-72.
41. Nakano T, Abe M, Tanaka K, Shineha R, Satomi S, Sato Y. Angiogenesis inhibition by transdominant mutant Ets1. *J Cell Physiol* 2000; 184: 255-62.
42. Lelièvre E, Mattor V, Huber P, Vandembunder B, Soncin F. Ets1 lowers capillary endothelial cell density at confluence and induces the expression of VE-cadherin. *Oncogene* 2000; 19: 2438-46.
43. Puri MC, Rossant J, Alitalo K, Bernstein A, Partanen J. The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J* 1995; 14: 5884-91.
44. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995; 376: 70-4.
45. Korhonen J, Lahtinen I, Halmekyto M, Alhonen L, Janne J, Dumont D, et al. Endothelial-specific gene expression directed by the tie gene promoter *in vivo*. *Blood* 1995; 86: 1828-35.
46. Dube A, Akbarali Y, Sato TN, Libermann TA, Oertgen P. Role of the Ets transcription factors in the regulation of the vascular-specific Tie2 gene. *Circ Res* 1999; 84: 1177-85.
47. Iljin K, Dube A, Kontusaari S, Korhonen J, Lahtinen I, Oertgen P, Alitalo K. Role of Ets factors in the activity and endothelial cell specificity of the mouse Tie gene promoter. *FASEB J* 1999; 13: 377-86.
48. Schlaeger TM, Qin Y, Fujiwara Y, Magram J, Sato TN. Vascular endothelial cell lineage-specific promoter in transgenic mice. *Development* 1995; 121: 1089-98.
49. Schlaeger TM, Bartunkova S, Lawitts JA, Teichmann G, Risau W, Deutsch U, et al. Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3058-63.
50. Breier G, Breviario F, Caveda L, Berthier R, Schnürch H, Gotsch U, et al. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood* 1996; 87: 630-41.
51. Gory S, Vernet M, Laurent M, Dejane E, Dalmon J, Huber P. The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice. *Blood* 1999; 93: 184-92.
52. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 1999; 98: 147-57.
53. Gory S, Dalmon J, Prandini MH, Kortulewski T, de Launoit Y, Huber P. Requirement of a GT box (Sp1 site) and two Ets binding sites for vascular endothelial cadherin gene transcription. *J Biol Chem* 1998; 273: 6750-5.
54. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66-70.
55. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* 1999; 126: 3015-25.
56. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62-6.
57. Morishita K, Johnson DE, Williams LT. A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (flt-1) that confers endothelial-specific gene expression. *J Biol Chem* 1995; 270: 27948-53.
58. Wakiya K, Begue A, Stehelin D, Shibuya M. A cAMP response element and an Ets motif are involved in the transcriptional regulation of flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor 1) gene. *J Biol Chem* 1996; 271: 30823-8.
59. Ikeda T, Wakiya K, Shibuya M. Characterization of the promoter region for flt-1 tyrosine kinase gene, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Growth Factors* 1996; 13: 151-62.
60. Valter MM, Hugel A, Huang HJ, Cavenee WK, Wiestler OD, Pietsch T, et al. Expression of the Ets1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis. *Cancer Res* 1999; 59: 5608-14.
61. Kappel A, Ronicke V, Damert A, Flamme I, Risau W, Breier G. Identification of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences sufficient for angioblast and endothelial cell-specific transcription in transgenic mice. *Blood* 1999; 93: 4284-92.
62. Kappel A, Schlaeger TM, Flamme I, Orkin SH, Risau W, Breier G. Role of SCL/Tal-1, GATA, and Ets transcription factor binding sites for the regulation of Flk-1 expression during murine vascular development. *Blood* 2000; 96: 3078-85.

VI.1 Mises à Jour

Depuis la publication de ces revues, de nouvelles données ont été publiées sur l'implication des membres de la famille ETS dans l'angiogenèse.

VI.1.1 Ets-1

La sur-expression de Ets-1 dans des HUVEC induit l'apoptose en condition de privation de sérum. Des expériences de *DNA array* montrent que Ets-1 active l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que le cytochrome p450, p27, p21 et réprime des gènes anti-apoptotiques comme DAD-1, AXL, Cox-2 (Teruyama et al., 2001a). La même équipe a recherché par la technique *cDNA microarray* quels sont les gènes régulés par Ets-1 dans les cellules HUVEC. Pour cela, les cellules endothéliales ont été infectées par un adénovirus vide ou contenant l'ADNc de Ets-1. L'analyse de l'expression des ARNm a montré que la neuropiline-1 est un gène cible de Ets-1 (Teruyama et al., 2001b). La neuropiline-1 a été initialement identifiée comme une protéine membranaire exprimée à la surface des neurones. Plus récemment, la neuropiline-1 a été décrite chez les cellules endothéliales fonctionnant comme un co-récepteur pour le VEGF₁₆₅. Au cours du développement, la neuropiline-1 est impliquée dans la mise en place du système nerveux mais également dans la formation des vaisseaux sanguins (Kawasaki et al., 2002).

Ets-1 interagit physiquement et fonctionnellement avec Sp100 ce qui a pour effet de modifier la morphologie des corps nucléaires et d'augmenter l'activité transcriptionnelle de Ets-1 (Wasylyk et al., 2002). Ets-1 et Pit-1/GHF-1 coopèrent lors de l'activation du gène de la prolactine. L'état de phosphorylation de Pit-1 régule l'interaction avec Ets-1 (Augustijn et al., 2002; Bradford et al., 2000). L'expression de Ets-1 est induite par un stimulus hypoxique. Cette induction diminue fortement lorsque la région du promoteur de Ets1, située entre -424 et -279, est délétée (Oikawa et al., 2001).

Une étude récente réalisée sur le promoteur a montré que HIF-2 α et contrairement à HIF-1 α est capable d'activer le promoteur du récepteur 2 au VEGF (Flk-1). Par analyse de séquences, deux éléments de réponse à l'hypoxie putatifs ont été localisés à proximité d'EBS. Lors d'une étude précédente, ces deux EBS ont été décrits comme étant fonctionnels *in vitro* (Kappel et al., 2000). *In vitro*, HIF-2 α est capable de fixer les deux HRE lors d'expériences de retard sur gel et d'empreinte à la Dnase. Des tests de co-transfection ont mis en évidence

que HIF-2 α et Ets-1 coopèrent à l'activation du promoteur de Flk1. *In vitro*, Ets-1 interagit physiquement avec HIF-2 α par l'intermédiaire de l'exon VII. (Elvert et al., 2003)

VI.1.2 Elf-1

Afin de déterminer quels sont les facteurs de transcription de la famille ETS exprimés au cours de la formation des vaisseaux sanguins chez le poulet, des RT-PCR ont été réalisées à partir d'ARN des vaisseaux de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) micro-disséqués. Les amorces utilisées pour cette expérience sont des oligonucléotides dégénérés correspondant au domaine conservé ETS. Ce produit de PCR est utilisé pour cribler une banque d'ADNc réalisée à partir du sac vitellin de poulet. Par cette technique, l'ADNc de cElf-1 a été isolé. L'hybridation *in situ* chez le poulet montre que *celf-1* est exprimé dans la CAM au niveau des gros vaisseaux et des petits vaisseaux branchés. Au niveau de l'embryon proprement dit, *celf-1* est exprimé dans les cellules endothéliales de l'aorte dorsale, dans les vaisseaux intersomitiques, dans le cœur, dans l'endocarde ainsi qu'à la surface du péricarde. cElf-1 se fixe sur les EBS conservés des promoteurs de Tie1 et Tie2 et les transactives (Dube et al., 2001).

VI.1.3 Net

Net est un répresseur transcriptionnel de la sous famille ETS des facteurs de transcription appelés TCF (*Ternary Complex Factors*). Ces facteurs régulent l'expression des gènes « *immediate early* » tels que *c-fos*, *egr-1*, *Jun-B* contenant des éléments de réponse au sérum (SRE) en formant un complexe ternaire avec le SRF (*Serum Response Factor*). *net* est exprimé au stade E7.5-8.5 dans les vaisseaux de l'allantoïde, l'endocarde cardiaque et l'aorte dorsale. L'expression dans les cellules endothéliales persiste tout au long du développement. Au delà du stade E10.5, son expression s'étend au niveau des arcs branchiaux et des zones où se développe le cartilage. L'expression de *net* est corrélée avec la vasculogénèse, l'angiogénèse et la formation du cartilage durant le développement embryonnaire (Ayadi et al., 2001a).

L'expression au cours du développement embryonnaire d'une protéine Net tronquée au niveau du domaine ETS entraîne des défauts de vascularisation et une sur-expression du gène *egr-1*. Quelques jours après leur naissance, les souris *net* ^{$\delta\delta$} meurent d'insuffisance

respiratoire due au remplissage de l'espace pleural entraînant la compression des poumons. En analyse histologique, des vaisseaux très dilatés sont observés dès le stade E16.5 au niveau du thorax. Ce sont des vaisseaux lymphatiques composés d'une fine couche de cellules endothéliales qui ne présentent pas d'érythrocytes dans leur lumière. Cette dilatation n'est pas observée dans les vaisseaux du péricarde et de la peau. Au stade E16.5, l'expression du gène *egr-1* est augmentée au niveau de l'atrium des souris mutantes. Au stade E18.5, *egr-1* retrouve une expression normale dans le cœur mais est sur-exprimé au niveau des artères pulmonaires des embryons mutants. Après la naissance, cette sur-expression s'étend aux vaisseaux pulmonaires. Le promoteur du gène *egr-1* contient 5 SRE putatifs. Des études réalisées *in vitro* montrent que Net régule négativement ce promoteur par l'intermédiaire du SRE situé le plus en 5' (Ayadi et al., 2001b).

VII La VE-cadhérine

La VE-cadhérine est une protéine structurale de la famille des cadhérines, spécifiquement exprimée dans l'endothélium et essentielle à la formation des jonctions adhérentes. Ces jonctions intercellulaires jouent un rôle déterminant dans la cohésion de l'endothélium, dans la régulation de la diapédèse des leucocytes et lors de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

VII.1 Les cadhérines

Les cadhérines réalisent des interactions homophiliques dépendantes du calcium avec les cadhérines des cellules voisines. Ce sont des glycoprotéines trans-membranaires dont le poids moléculaire varie de 120 à 130 kDa. Le domaine cytoplasmique est fortement conservé, le domaine extracellulaire, plus variable, contient un motif de 110 acides aminés répété 5 fois.

Le domaine extracellulaire fixe le calcium indispensable à la réalisation de liaisons homophiliques. Cette liaison confère à ce domaine une résistance aux protéases extracellulaires. Les études cristallographiques de la E- et de la N-cadhérine ont permis de mieux définir les différentes structures qui interviennent lors des interactions homophiliques (Shapiro et al., 1995; Tamura et al., 1998). La reconnaissance entre deux cadhérines se réalise par l'intermédiaire d'un motif tripeptidique HAV pour la E-, N-, P- cadhérine ou d'un motif VIV pour la VE-cadhérine.

En résumé, le domaine cytoplasmique interagit avec des molécules de caténines (α -caténine, β -caténine, γ -caténine également appelée plakoglobine). Le complexe ainsi formé contient la VE-cadhérine qui interagit avec la β -caténine ou avec la plakoglobine qui interagit avec l' α -caténine qui à son tour interagit avec les filaments d'actine du cytosquelette. Cette organisation de la VE-cadhérine aux jonctions intercellulaires est dépendante du calcium extracellulaire. Une diminution de la concentration Ca^{2+} entraîne un changement de localisation de la plakoglobine, de l' α -caténine, de la β -caténine et de la VE-cadhérine. Lorsqu'une monocouche de cellules endothéliales est exposée à un chélateur d'ions calciques, la VE-cadhérine et les différentes caténines disparaissent des points de contacts intercellulaires presque immédiatement. Cet effet est réversible au bout de 5 min d'exposition à un taux physiologique de calcium (Lampugnani et al., 1995).

VII.2 Rôles de la VE-cadhérine

La VE-cadhérine n'est pas seulement impliquée dans la cohésion cellulaire mais intervient également dans de nombreux autres processus tels que la formation et le maintien des capillaires sanguins, le contrôle de la perméabilité de l'endothélium, l'inhibition de la prolifération.

VII.2.1 Formation et maintien des capillaires sanguins

La VE-cadhérine joue un rôle essentiel dans l'organisation et la mise en place des structures endothéliales mais également dans leur maintien. Les cellules ES permettent d'étudier *in vitro* certaines étapes de différenciation qui se déroulent au cours du développement embryonnaire. Sous certaines conditions de culture, ces cellules se différencient spontanément en corps embryonnaires. Pendant le développement de ces corps embryonnaires, de nombreuses structures vasculaires se forment. Les cellules ES dont le gène de la *VE-cadhérine* a été inactivé, se développent en corps embryonnaires mais les cellules endothéliales qui en dérivent ont perdu la capacité à s'organiser et à se développer en structures vasculaires (Vittet et al., 1997).

De même, l'application d'anticorps anti-VE-cadhérine dirigés contre le domaine extracellulaire entraîne une désorganisation des structures déjà formées par les cellules

HUVEC. En effet, ces cellules forment des capillaires lorsqu'elles sont cultivées entre deux couches de gel de fibrine (Bach et al., 1998).

VII.2.2 La perméabilité

La VE-cadhérine intervient dans le contrôle de la perméabilité aux molécules et dans le mécanisme de transmigration. L'expression ectopique de la VE-cadhérine dans des cellules CHO (*Chinese hamster ovary cell*) a pour effet d'augmenter la cohésion intercellulaire et de diminuer fortement (40 à 50%) la perméabilité des molécules de haut poids moléculaire à travers la monocouche cellulaire. Cet effet est totalement supprimé lorsque les cellules sont cultivées en basse concentration de calcium (Breviario et al., 1995).

Des études réalisées chez des souris adultes montrent que la VE-cadhérine joue un rôle dans la diapédèse des leucocytes au cours de la réponse inflammatoire. L'injection systématique par voie intraveineuse d'anticorps bloquant l'activité de la VE-cadhérine accélère le recrutement et la transmigration des leucocytes chez les souris où une réaction inflammatoire est provoquée (Gotsch et al., 1997). Récemment, une étude dynamique a permis de suivre les jonctions formées par la VE-cadhérine et par PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), une autre protéine d'adhésion, également exprimée dans les cellules endothéliales. Ces expériences ont été réalisées *in vitro* sur des cellules HUVEC. Au premier stade de la diapédèse des leucocytes, l'ensemble des complexes VE-cadhérine situés au niveau du site de transmigration se déplace et crée une zone sans VE-cadhérine. A la suite du passage des leucocytes, la VE-cadhérine se repositionne afin de reconstituer un contact inter-endothéliale efficace. Contrairement à la VE-cadhérine, les complexes PECAM-1 se dissocient pendant la transmigration et se reforment après le passage des leucocytes (Su et al., 2002).

VII.2.3 Inhibition de la prolifération

La transfection de l'ADNc de la VE-cadhérine dans les cellules CHO et L929 entraîne une inhibition de prolifération cellulaire *in vitro*. Des expériences similaires ont été réalisées avec la VE-cadhérine tronquée au niveau de sa région intracellulaire d'interaction avec les caténines. Elles ont montré que cette protéine tronquée conserve son activité adhésive mais n'est plus capable d'inhiber la croissance cellulaire (Caveda et al., 1996). Ces résultats

suggèrent qu'après contact, la VE-cadhérine transfère des signaux d'inhibition de croissance *via* les caténines ou d'autres molécules cytoplasmiques.

VII.3 Expression de la *VE-cadhérine* au cours du développement

L'étude de l'expression de la *VE-cadhérine* chez la souris par hybridation *in situ* à différents stades du développement embryonnaire révèle que l'ARNm de la VE-cadhérine est détecté très tôt (E7.5) dans les cellules mésodermiques du sac vitellin. Au stade E9.5, le transcrite VE-cadhérine est détecté dans les feuillets périphériques des îlots sanguins du sac vitellin. Ces structures vont donner naissance aux cellules endothéliales et aux cellules de la lignée hématopoïétique. L'apparition d'un feuillet périphérique et d'une agrégation de cellules au centre des îlots est le premier signe de ségrégation des précurseurs endothéliaux et hématopoïétiques. La *VE-cadhérine*, comme *ets-1*, n'est pas exprimée dans les précurseurs hématopoïétiques alors que les précurseurs endothéliaux périphériques l'expriment. Au stade E11.5, le transcrite de la VE-cadhérine est détecté dans toutes les structures vasculaires des organes qui se développent. A E17.5, son expression est corrélée à la présence de cellules endothéliales (Breier et al., 1996).

VII.4 L'inactivation du gène de la *VE-cadhérine* :

Afin de mieux appréhender le rôle de la VE-cadhérine au cours du développement embryonnaire, des embryons avec le gène de la *VE-cadhérine* inactivé ont été générés. Les embryons *VE-cadhérine*^{-/-} ne sont pas viables et meurent à mi-gestation de défauts sévères de vascularisation. Au stade E8.5, un marquage de l'embryon total par un anticorps anti-PECAM-1 révèle un retard du développement vasculaire. Les aortes dorsales sont visibles dans la région caudale mais ne sont pas complètement formées. Le sinus veineux est présent mais les veines cardinales postérieures ne sont pas visibles. L'endocarde est présent mais les cellules endothéliales ne forment pas de lumière. Au stade E9.25, le réseau vasculaire se résume à un plexus primitif et désorganisé, les vaisseaux intersomitiques sont très limités. Dans la partie caudale, l'aorte dorsale et les artères ombilicales se sont développées mais présentent des dilatations anormales. A mi-gestation, les embryons meurent puis se nécrosent avant d'être éliminés. Au stade E10.5, l'observation macroscopique *in toto* de ces embryons *VE-cadhérine*^{-/-} montrent un retard de croissance ainsi qu'une réduction du nombre de

somites. A ce stade, les embryons -/- sont pâles et fragiles, présentent une dilatation au niveau du péricarde et ne possèdent pas plus de 20 somites, alors que les embryons sauvages en possèdent 35. L'ensemble de ces observations montre que la VE-cadhérine est un acteur incontournable dans la morphogenèse de l'arbre vasculaire (Gory-Fauré et al., 1999). Une seconde étude consistant en l'inactivation du gène de la *VE-cadhérine* ou en la création d'une VE-cadhérine mutante tronquée au niveau de son domaine d'interaction avec la β -caténine a été réalisée. Dans cette étude, les souris mutantes développent un plexus vasculaire relativement normal. Les défauts vasculaires commencent à apparaître vers le stade E8.75-E9.0 lorsque le réseau vasculaire primitif se ré-organise. A ce stade, les cellules endothéliales s'individualisent, elles sont incapables de former de nouvelles structures vasculaires ce qui entraîne la régression du système vasculaire. Une analyse plus fine révèle que certaines cellules endothéliales sont apoptotiques. La mise en culture des cellules endothéliales exprimant la VE-cadhérine tronquée présente un fort taux d'apoptose en absence de sérum. Cette augmentation de la mort cellulaire serait due à l'impossibilité des cellules exprimant la VE-cadhérine tronquée à répondre aux signaux de survie du VEGF-A. En effet, le VEGF-A est connu pour induire la survie des cellules endothéliales en se fixant sur le récepteur VEGFR-2. Cette fixation a pour effet d'activer la PI3-kinase, Akt et à terme d'augmenter le niveau de protéine anti-apoptotique tel que Bcl2. Le complexe VE-cadhérine/ β -caténine permettrait donc de transmettre le signal de survie du VEGF-1 (Carmeliet et al., 1999).

VII.5 Etude du promoteur de la *VE-cadhérine* :

Le gène murin de la *VE-cadhérine* est composé de 12 exons qui s'étendent sur plus de 36kbp. Il est localisé sur le chromosome 8 où se trouve également les gènes de la *E-cadhérine*, de la *P-cadhérine* et de la *M-cadhérine*. Ce regroupement de gènes pourrait résulter de la duplication et de la divergence d'un seul gène ancestral. La région située en 5' du site d'initiation de la transcription de la *VE-cadhérine* ne contient pas de séquences consensus de recrutement de la machinerie transcriptionnelle telles que des boîtes TATA ou CAAT (Huber et al., 1996). Des tests de transactivation ont été réalisés avec différents mutants de délétion dans des cellules endothéliales BAECs et dans des fibroblastes murins NIH3T3 n'exprimant pas de VE-cadhérine. Ils ont permis d'identifier la région -130/+24 responsable de l'activité promotrice basale. Au cours de ces travaux, deux régions capables d'inhiber l'activité du promoteur dans les fibroblastes ont été cartographiées en -140/-289 et -

1190/-2226. En test de transactivation, le fragment -2226/+24 est suffisant pour permettre une expression du promoteur du gène de la *VE-cadhérine* spécifiquement dans les cellules endothéliales. Afin de confirmer ces résultats *in vivo*, des expériences de transgénèse chez la souris ont été réalisées en utilisant le fragment -2486/+24. L'analyse des souris transgéniques montre que ce fragment s'avère suffisant pour permettre l'expression endothéliale du transgène (Gory et al., 1999). L'analyse de séquence du fragment -139/+24 révèle l'existence de six éléments susceptibles d'être responsable de l'activité constitutive de cette partie de promoteur : une boîte GT reconnue par les membres de la famille Sp1 et cinq éléments de réponse aux facteurs de transcription de la famille ETS (EBS) (figure 7). Afin d'identifier les facteurs capables de se fixer sur la boîte GT du promoteur, des expériences de retard sur gel ont été réalisées en utilisant des extraits nucléaires provenant de différentes lignées cellulaires (fibroblastique et endothéliale). Les complexes retardés obtenus sont identiques quelle que soit la lignée cellulaire utilisée, ce qui suggère que les facteurs impliqués sont ubiquitaires. L'identification de ces facteurs montre que Sp1 et Sp3 sont capables de se fixer sur la boîte GT. La mutation de cette boîte entraîne une réduction de 80% de l'activité du fragment du promoteur -139/+24 dans les cellules endothéliales BAECs et dans les fibroblastes NIH3T3. Le facteur de transcription Ets-1, à travers deux EBS présent dans la partie -139/+24 est également impliqué dans le contrôle de l'expression du gène de la *VE-cadhérine*. Sur les cinq EBS putatifs contenus dans le fragment -130/+24, seul l'EBS2 et l'EBS4 sont capables de fixer des protéines nucléaires de cellules endothéliales. Lors d'expériences de retard sur gel, l'EBS2 forme un complexe retardé unique alors que l'EBS4 forme deux complexes dont l'intensité de la bande supérieure est plus importante. L'EBS4 est capable de rentrer en compétition avec l'EBS2 lors de la formation de complexes avec les extraits nucléaires. Cela suggère que les protéines nucléaires qui se fixent sur ces deux EBS sont identiques. De plus, des profils similaires sont obtenus avec des extraits nucléaires de cellules endothéliales et non endothéliales, suggérant que les facteurs impliqués n'ont pas une spécificité endothéliale. La mutation de l'EBS2 ou de l'EBS4 entraîne une diminution respectivement de 78% et 88% de l'activité promotrice dans les cellules endothéliales et de 60% et 70% dans les fibroblastes (Gory et al., 1998). Une approche utilisant un rétrovirus de type Moloney contenant l'ADNc de Ets-1 étiqueté avec un épitope de l'hémagglutinine du virus de la grippe a montré que Ets-1 induit l'expression de la *VE-cadhérine* dans les cellules endothéliales et les fibroblastes. La protéine Ets-1 recombinante se fixe sur l'EBS2 et l'EBS4 lors d'expériences de retard sur gel. En test de transactivation, Ets-1 est capable d'activer le promoteur -2486/+24 de 2,8 fois. La

(Matsushita et al., 1993). L'ARNT est un membre de la famille des protéines à domaine bHLH-PAS capable également de se dimériser avec les facteurs HIF-1 α , HIF-2 α .

L'inactivation de ce gène dans les cellules ES a pour effet d'inhiber la réponse à l'hypoxie et à l'hypoglycémie. Dans les cellules ES *ARNT*^{-/-} cultivées en 1,5% O₂ ou en basse concentration de glucose, les ARNm des gènes cibles de l'hypoxie et de la glycolyse ne sont plus sur-exprimés. Les embryons *ARNT*^{-/-} ne sont pas viables et meurent au stade E10.5. Ces embryons présentent des défauts de vascularisation au niveau du sac vitellin. Au stade E8.5, aucune différence morphologique n'est observée entre les embryons *ARNT*^{+/+}, *ARNT*^{+/-} et *ARNT*^{-/-}. A partir du stade E9.5, les embryons *ARNT*^{-/-} présentent un retard de croissance. Une analyse microscopique révèle qu'à ce stade, le sac vitellin contient des îlots sanguins normaux mais un système vasculaire anormal. Peu de capillaires fusionnent entre eux ce qui a pour effet d'engendrer un plexus vasculaire irrégulier. Ce phénotype est également observé chez les embryons *VEGF*^{+/-} et *TF*^{-/-} (facteur tissulaire). Le cœur, le système vasculaire et plus particulièrement l'aorte dorsale et les vaisseaux intersomitiques apparaissent être normaux. L'analyse de l'expression du VEGF montre que son taux est bas dans le sac vitellin des embryons *ARNT*^{-/-} alors qu'il est plus élevé dans l'embryon proprement dit. L'ARNT2, un homologue de l'ARNT, a été détecté dans le tube neural des embryons par hybridation *in situ*. L'ARNT2 pourrait donc palier au défaut d'expression du VEGF chez les embryons *ARNT*^{-/-} et assurer le développement normal de l'aorte dorsale et des vaisseaux intersomitiques. Néanmoins, les défauts observés au cours du développement des embryons *ARNT*^{-/-} sont difficiles à interpréter car l'ARNT peut se dimériser avec de multiples partenaires (Maltepe et al., 1997).

VIII.2 HIF-1 α

HIF-1 a été décrit pour la première fois comme un facteur de transcription capable de se fixer sur le promoteur de l'érythropoïétine (EPO) et de l'activer en condition d'hypoxie. L'hypoxie a pour effet d'induire l'expression de l'ARNm de l'érythropoïétine. L'EPO est une glycoprotéine qui intervient dans la production d'érythrocytes chez les mammifères. La séquence responsable de la réponse à l'hypoxie a été localisée dans le promoteur. Des expériences d'empreinte à la DNase I et de retard sur gel ont permis d'identifier le facteur HIF-1 capable de se fixer à cette séquence en hypoxie. HIF-1 est exprimé de façon ubiquitaire et a une demi-vie inférieure à 5 min en normoxie (Wang and Semenza, 1993).

Afin de comprendre le rôle joué par le facteur HIF-1 α au cours du développement, des études d'inactivation de ce gène ont été réalisées chez la souris. Des études préliminaires réalisées sur les cellules ES montrent que les ES *HIF-1 α ^{-/-}* sont incapables de réguler les gènes cibles de HIF-1 α en hypoxie (*VEGF*, *Glut-1*, *aldolase*) (Ryan et al., 1998). L'expression de l'ARNm du VEGF est induite par de faibles concentrations de glucose indépendamment de HIF-1 α . Les cellules ES ont la capacité de former des tératocarcinomes lorsqu'elles sont injectées chez la souris. Les cellules ES *HIF-1 α ^{-/-}* ont fortement perdu la capacité à former des tumeurs. Durant les 9 premiers jours suivant l'injection, les tumeurs ont une croissance similaire à celle induite par les ES sauvages. Après 3 semaines de croissance, les tumeurs *HIF-1 α ^{-/-}* présentent une taille 75% inférieure à celle des tumeurs sauvages (Ryan et al., 1998). Des résultats différents ont été trouvés par le groupe de Peter Carmeliet. En effet, il a été montré que le taux de croissance des tumeurs induites par des cellules ES sauvage ou *HIF-1 α ^{-/-}* est identique pendant les trois premières semaines suivant l'injection. Au-delà de cette période, les tumeurs *HIF-1 α ^{-/-}* poussent beaucoup plus rapidement que les tumeurs *HIF-1 α ^{+/+}*. Malgré ces différences, les deux équipes décrivent des défauts de vascularisation des tumeurs *HIF-1 α ^{-/-}* qui se traduisent par la présence de zones avasculaires ainsi que par une densité et une morphologie de vaisseaux fortement altérés. Ces résultats indiquent que HIF-1 α joue un rôle important dans la vascularisation tumorale (Carmeliet et al., 1998).

Les embryons *HIF-1 α ^{-/-}* ne sont pas viables et meurent au stade E10.5-E11. La vascularisation du sac vitellin de ces embryons est complètement désorganisée. Malgré la présence de nombreux vaisseaux dans le sac vitellin, aucune connexion n'est visible. Ces embryons présentent un retard de croissance caractérisé par une réduction du nombre de somites. Aux stades précoces du développement (E8.5-E8.75), aucune différence n'est observée entre les embryons *HIF-1 α ^{+/+}* et *HIF-1 α ^{-/-}*. A partir du stade E9.25, de nombreuses anomalies du système vasculaire sont visibles chez les embryons *HIF-1 α ^{-/-}*. La tête de ces embryons n'est irriguée que par un réseau clairsemé de petits vaisseaux anormalement dilatés. Au niveau du développement cardio-vasculaire, les embryons *HIF-1 α ^{-/-}* présentent une hyperplasie du myocarde présomptif ainsi qu'une obstruction des ventricules. De plus, les arcs branchiaux des embryons mutants sont hypoplasiques voire absents. L'aorte dorsale est présente mais quelques régions anormalement dilatées sont observées. Le tube neural n'est pas fermé et présente des anomalies au niveau des jonctions neuro-somatiques. Un fort taux d'apoptose est observé au niveau des cellules du mésenchyme céphalique (Iyer et al., 1998; Kotch et al., 1999; Ryan et al., 1998).

Chez les embryons dont le gène du VEGF est invalidé, des structures vasculaires anormalement dilatées comparables à celles observées chez les embryons *HIF-1 α ^{-/-}* apparaissent à partir du stade E9.5. Ces phénotypes similaires ainsi que l'absence d'induction de l'ARNm du VEGF par l'hypoxie chez les cellules ES *HIF-1 α ^{-/-}* suggèrent que ces anomalies vasculaires pourraient être dues à une concentration trop faible de VEGF. Cependant, les embryons *HIF-1 α ^{-/-}* possèdent un taux d'ARNm du VEGF plus important que les embryons *HIF-1 α ^{+/+}*. L'explication de ce phénomène pourrait venir du fait que dès le stade E9.25 les embryons *HIF-1 α ^{-/-}* présentent des malformations cardiaques et vasculaires empêchant le système vasculaire d'être fonctionnel. L'absence de perfusion des tissus engendre une diminution du taux de glucose et d'oxygène. Cette privation de glucose induit une augmentation du taux d'ARNm du VEGF indépendamment de HIF-1 α . Le défaut de vascularisation proviendrait de l'apoptose massive des cellules du mésenchyme qui se produit antérieurement à l'apparition des défauts vasculaires suggérant que la régression du réseau de capillaires pourrait être due à la mort des péricytes (Kotch et al., 1999). En effet, le recrutement des péricytes n'est pas nécessaire pour initier la formation de capillaires mais est indispensable pour leur maintien. Des expériences de dissociation des cellules endothéliales et des péricytes engendrent une forte régression des capillaires.

VIII.3 HIF-2 α /EPAS1

En 1997, un nouveau facteur de transcription à domaine PAS a été isolé par 4 équipes différentes (Ema et al., 1999; Flamme et al., 1997; Hogenesch et al., 1997; Tian et al., 1997). Ce facteur nommé HIF-2 α , EPAS-1 (endothéliale PAS), ou encore MOPs-2 (*Member Of the Pas Superfamily*) présente 48% d'homologie de séquences avec HIF-1 α et se fixe à l'ADN complexé à l'ARNT. L'analyse du patron d'expression d'EPAS1 par hybridation *in situ* révèle qu'il est exprimé presque exclusivement dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins intersomitiques, de la chambre atriale et ventriculaire du cœur, de l'aorte dorsale, des membranes extra-embryonnaires (par exemple le sac vitellin). Au cours du développement du cerveau, les cellules endothéliales composant les vaisseaux du plexus choroïde expriment des niveaux importants d'ARNm d'EPAS1. Chez l'adulte, l'ARNm d'EPAS1 est également détecté dans les cellules endothéliales mais également à des niveaux moins importants dans d'autres types cellulaires tels que les cellules de la décidue du placenta et les tissus parenchymateux du poumon (Tian et al., 1997). Comme pour HIF-1 α , l'activité

transactivatrice de EPAS1 est activée lors d'un stimulus hypoxique. Néanmoins, des données récentes montrent que EPAS1 est impliqué dans la survie cellulaire en condition d'hypoglycémie mais pas lors de l'hypoxie. EPAS1 serait donc un facteur de transcription actif en condition de normoxie (Brusselmans et al., 2001). Contrairement à HIF-1 α , EPAS1 est capable d'activer le promoteur du récepteur à l'angiopoïétine Tie2.

EPAS1 joue un rôle clé dans la post-vasculogénèse lors de la réorganisation du réseau vasculaire primaire en un réseau mature. L'inactivation de EPAS1 chez la souris montre que un tiers des souris *EPAS1*^{-/-} naissent mais ont une petite taille et ne vivent pas plus de quelques semaines. Les deux tiers restants meurent *in utero* avant le stade E13.5 avec un pic de mortalité au stade E11.5. Dans de nombreux cas, des zones hémorragiques sont détectées au niveau du sac vitellin et de l'embryon proprement dit. Au stade E8.5, la vascularisation des embryons mutants ne présente pas de différence avec celle des embryons sauvages. A partir du stade E9.5, bien que la vasculogénèse apparaisse normale, les embryons *EPAS1*^{-/-} présentent des zones hémorragiques au niveau desquelles l'endothélium n'est pas complètement solidaire. Au stade E11.5, une analyse histologique révèle que les cellules endothéliales du sac vitellin ne s'organisent pas en structures tubulaires mais forment des structures en feuillets au niveau desquelles ont lieu des épanchements sanguins. Néanmoins certains embryons meurent sans présenter d'hémorragie. Afin d'obtenir des embryons avec le même fond génétique, des cellules ES (sauvage ou *EPAS1*^{-/-}) sont agrégées *in vitro* avec des embryons tétraploïdes au stade morula. Les cellules tétraploïdes ne participent pas à la formation de l'embryon et des structures mésodermiques dérivant des annexes embryonnaires. L'analyse des embryons *EPAS1*^{-/-} obtenus, montre que 20% développent de sévères malformations vasculaires au stade E9.5. Aux stades ultérieures, les vaisseaux adjacents fusionnent les uns avec les autres pour former de grandes cavités bordées de feuillets de cellules endothéliales. A partir du stade E11.5, certains embryons *EPAS1*^{-/-} sont morts, d'autres sont encore vivants mais présentent quelques zones hémorragiques. Par exemple, les petits vaisseaux sanguins de la vésicule optique et des tissus céphaliques sont incapables de s'organiser pour former des vaisseaux plus importants. Néanmoins, certains vaisseaux tels que l'artère dorsale et les artères intersomitiques apparaissent normales. Le système vasculaire du sac vitellin est désorganisé. A E12.5, l'ensemble des embryons mutants meurt par défaut de vascularisation (Peng et al., 2000).

VIII.4 Les différents mécanismes régulant l'activité des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α

Les cellules sont capables de percevoir les changements qui interviennent dans leur micro-environnement (acidité, hypoglycémie, hypoxie) et d'engendrer une réponse adaptée. La famille des facteurs de transcription à domaine bHLH-PAS est composée chez les mammifères du AhR, du translocateur nucléaire du récepteur aryl hydrocarbure et des facteurs inductibles par l'hypoxie HIF-1 α et HIF-2 α . HIF-1 α et HIF-2 α se fixent sur les éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) sous forme d'hétérodimères constitués d'une sous-unité HIF- α et d'une sous-unité HIF- β (ARNT). Les éléments de réponse se présentent sous la forme d'une séquence conservée dont le motif est RCGTG. Ils ont été identifiés dans un certain nombre de promoteurs de gènes régulés par la pression partielle en oxygène dont celui du VEGF, de l'érythropoïétine (EPO), de la NO synthase inductible (iNOS), de la transferrine, de l'hème oxygénase-1 (HO-1), de l'énolase-1, du transporteur du glucose (GLUT-1), des enzymes de la glycolyse telles que l'aldolase, la phosphofructinase-L, la phosphoglycérate kinase-1 (PGK-1). D'après la littérature, il semble que les mécanismes qui régulent la stabilité et l'activité des sous unités HIF-1 α et HIF-2 α soient semblables. En condition de normoxie, les sous-unités HIF-1 α et HIF-2 α sont rapidement ubiquitinées et dégradées par le protéasome (Salceda and Caro, 1997). Sous hypoxie, l'ubiquitination est fortement réduite et la quantité de protéines HIF-1 α et HIF-2 α augmente rapidement. Les sous-unités HIF-1 α et HIF-2 α sont alors transloquées dans le noyau où elles se dimérisent avec l'HIF- β . Le dimère HIF-1 α / HIF- β ou HIF-2 α / HIF- β va interagir avec des co-activateurs tel que CBP/p300 afin de transactiver les gènes cibles de l'hypoxie. Peu de choses sont connues sur le mécanisme par lequel les cellules perçoivent les variations de concentration d'oxygène. L'activation des facteurs HIF par des chélateurs de fer ou les ions cobalt suggère que le senseur d'oxygène est une ferro-protéine.

Des données récentes permettent de mieux comprendre quels sont les mécanismes impliqués dans la régulation de l'activité et la dégradation des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α . La régulation de la dégradation de HIF-1 α est dépendante d'un domaine central d'environ 200 acides aminés appelé domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODD) (Huang et al., 1998). Lorsque ce domaine est absent, HIF-1 α n'est plus sensible à la dégradation par le protéasome en condition de normoxie, il se dimérise avec l'ARNT, se fixe à l'ADN et transactive les gènes cibles. Une étude réalisée sur des cellules de carcinome rénal (RCC4) n'exprimant pas la protéine de von Hippel-Lindau (pVHL) montrent que HIF-1 α et HIF-2 α

sont stabilisées en normoxie. Récemment, pVHL a été décrit comme étant un composant du complexe ligase-ubiquitine E3 (Lisztwan et al., 1999). Des expériences de transfection transitoire réalisées sur ces cellules avec un vecteur exprimant la protéine pVHL conduisent à une dégradation rapide de HIF-1 α et HIF-2 α . En condition de normoxie, pVHL se fixe au domaine ODD entraînant l'ubiquitination rapide et la dégradation par le protéasome de HIF-1 α et HIF-2 α (Cockman et al., 2000; Maxwell et al., 1999; Tanimoto et al., 2000). Cette interaction est régulée par l'hydroxylation d'une proline localisée dans le domaine ODD (Pro564 pour HIF-1 α et Pro530 pour HIF-2 α). En condition de normoxie, ces prolines sont hydroxylées et peuvent interagir avec pVHL entraînant la dégradation rapide de HIF-1 α et HIF-2 α . En hypoxie, la proline hydroxylase perd son activité, pVHL n'interagit plus avec le domaine ODD et les sous-unités HIF-1 α et HIF-2 α échappent ainsi à la protéolyse (Lando et al., 2002; Yu et al., 2001) (figure 8).

Deux domaines de transactivation indépendants nommés NAD (*N-terminal transactivation domain*) et CAD (*C-terminal transactivation domain*) ont été localisés dans les sous-unités HIF-1 α (Pugh et al., 1997). Ces domaines sont fortement conservés entre HIF-1 α et HIF-2 α . Des expériences d'immuno-blot réalisées sur des cellules HELA transfectées avec des protéines de fusion montrent que le niveau de protéines NAD est fortement augmenté sous hypoxie alors que le niveau de protéine CAD reste constant indépendamment des conditions. Les domaines NAD et ODD sont localisés dans la même région et sont en partie chevauchants. NAD, est de ce fait, sujet au même mécanisme de régulation que ODD (voir paragraphe ci-dessus). Des expériences de double hybride montrent que les deux domaines CAD et NAD peuvent interagir avec le co-activateur CBP/p300. Néanmoins, NAD possède une activité transactivatrice intrinsèque qui n'est pas augmenté en présence de CBP/p300. Contrairement à NAD, CAD ne possède pas d'activité transactivatrice intrinsèque. CAD active les promoteurs cibles seulement lorsqu'il est co-transfecté avec un vecteur exprimant CBP/p300. Récemment, une asparagine conservée chez HIF-1 α (Asn803) et chez HIF-2 α (Asn851) a été identifiée dans le domaine CAD comme jouant un rôle clé dans la régulation de l'interaction avec CBP/p300. L'utilisation d'inhibiteurs de la Fe(II)- et de la dioxygénase 2-oxoglutarate dépendant empêche l'hydroxylation de l'asparagine ce qui a pour effet d'augmenter l'interaction avec le co-activateur CBP/p300. Sous hypoxie, l'asparagine n'est plus hydroxylée, les sous unités HIF-1 α et HIF-2 α peuvent interagir avec le co-facteur CBP/p300 et transactiver les gènes cibles (Ema et al., 1999; Lando et al., 2002) (figure 8).

En résumé, deux mécanismes majeurs sont impliqués dans l'induction des protéines HIF sous hypoxie. (i) L'inhibition de l'hydroxylation du résidu proline situé dans le domaine ODD empêche l'interaction de HIF- α avec la protéine pVHL ce qui évite la dégradation par le protéasome. (ii) L'inhibition de l'hydroxylation de l'asparagine située dans le domaine CAD favorise l'interaction de HIF- α avec CBP/p300 ce qui a pour effet d'augmenter l'activité transactivatrice de HIF-1 α / HIF-2 α . Toutefois, il n'est pas à exclure l'existence de mécanismes de régulation propres à chaque sous-unité HIF- α .

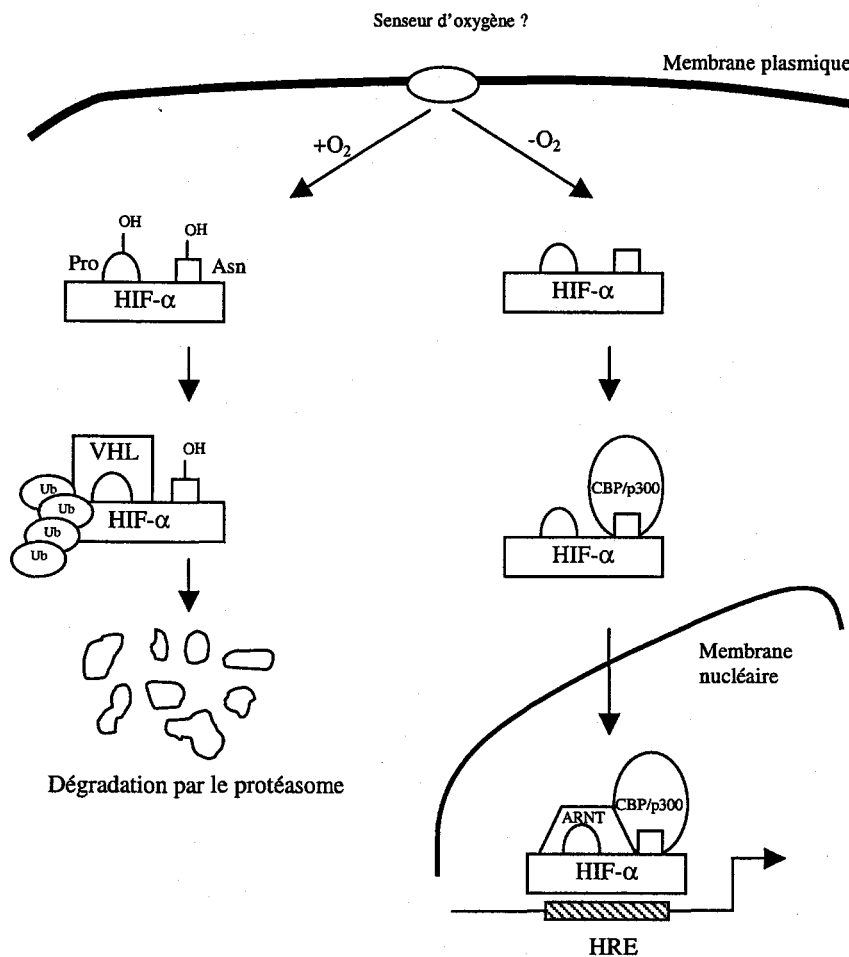


Figure 8. Modèle de régulation de la dégradation et de l'activation des facteurs HIF- α en fonction du taux d'oxygène.

Résultats

I Expression et purification du facteur de transcription recombinant Ets-1 de souris

Le but de ce travail était de mettre au point une technique de purification de la protéine Ets-1 afin d'obtenir des quantités de protéines recombinantes suffisantes pour réaliser son analyse structurale en cristallographie. L'analyse des séquences promotrices de nombreux gènes, révèle la présence d'EBS putatifs. Au cours de l'étude des promoteurs des gènes cibles de Ets-1, nous avons également besoin de la protéine Ets-1 afin de réaliser des expériences de retard sur gel et d'empreinte à la DNase.

Nous avons dans un premier temps amplifié l'ADNc du facteur Ets-1 murin à l'aide de l'ADN polymérase *Pfu*. Le produit d'amplification obtenu, d'une taille apparente de 1,3 kbp, a été cloné dans un vecteur d'expression procaryote pET22b et séquencé dans son intégralité. Afin de produire la protéine recombinante, nous avons transformé des bactéries BL21(DE3) avec le vecteur pET22b-Ets-1. L'induction de l'expression de Ets-1 se fait par l'ajout d'IPTG dans le milieu de culture des bactéries. Après 3h d'induction, les bactéries sont centrifugées, reprises dans un tampon phosphate de potassium/KCl et lysées à la presse de French en présence d'inhibiteurs de protéases. Des expériences préliminaires nous avaient appris que la protéine Ets-1 recombinante se retrouve en grande partie dans les corps d'inclusions des bactéries induites. Afin de récupérer le maximum de protéine, les bactéries sont lysées à l'aide de la presse de French en présence d'urée.

La première étape de purification consiste à passer le lysat bactérien sur une colonne d'héparine-Sépharose. L'élution des protéines se fait par augmentation progressive de la salinité du tampon. La protéine Ets-1 recombinante s'élue en un pic majoritaire. Les différentes fractions contenant la protéine sont diluées et passées sur une colonne échangeuse d'ions. Comme précédemment, l'élution s'effectue par augmentation de la salinité du tampon. La protéine recombinante Ets-1 s'élue en une seule fraction.

Une première estimation du degré de pureté est faite en déposant l'échantillon purifié sur la colonne échangeuse d'ions sur un gel d'électrophorèse coloré au bleu de Coomassie. Cette technique ayant un seuil de détection limité, les échantillons sont également passés sur une colonne d'HPLC C18. Les résultats montrent que dans les échantillons obtenus la protéine recombinante Ets-1 est majoritaire et qu'ils ne contiennent pas de protéines contaminant. L'identité de la protéine purifiée a été confirmée par immunoblot anti-Ets-1,

séquençage en N-terminal et spectrométrie de masse. Afin de tester si cette technique de purification altère la capacité de fixation à l'ADN, nous avons réalisé une expérience de retard sur gel en utilisant comme sonde l'EBS contenu dans le MSV-LTR. Les résultats obtenus montrent que la protéine Ets-1 recombinante ainsi purifiée est capable de fixer l'ADN de manière spécifique.

I.1 Article 1

Frédéric Lionneton, Hervé Drobecq and Fabrice Soncin

Expression and purification of recombinant mouse Ets-1 transcription factor

Protein Expr Purif. 2001 Apr;21(3):492-9



Expression and Purification of Recombinant Mouse Ets-1 Transcription Factor

Frédéric Lionneton,* Hervé Drobecq,† and Fabrice Soncin*,¹

*CNRS EP560, *CNRS UMR8526, and †CNRS UMR8525, Institut de Biologie de Lille, 59021 Lille, France

Received November 28, 2000, and in revised form January 17, 2001

Ets-1 is a transcription factor which belongs to the ETS family. Its mRNA is expressed in the embryo during normal development and also in tumors. In order to sort out functional Ets-1-binding sites among those present in gene promoters, we constructed an expression vector and designed a purification protocol for the production of the 440-amino-acid form of mouse Ets-1, based on heparin–Sepharose affinity and anion-exchange chromatographies. This protocol allows the purification of large amounts of pure recombinant protein as assessed by SDS–PAGE, C18 reverse-phase HPLC, amino-terminal sequencing, and mass spectrometry. The purified protein is recognized by specific anti-Ets-1 antibodies and binds to DNA ETS-binding sites. © 2001 Academic Press

c-ets-1 is the cellular progenitor of the viral *v-ets* gene present in the genome of the E26 virus which causes leukemia in birds (1–3). The *ets-1* gene is expressed during normal embryonic development in birds and mice (4–6) as well as in human tumors (7; 8). The Ets-1 protein shares a winged helix–turn–helix DNA-binding domain with other members of the ETS family, named the ETS domain which binds to double-stranded DNA containing a GGAA/T sequence (Ets-binding site or EBS) (9). Ets-1 transactivates the promoter of several genes, including its own (10), and those of other transcription factors, such as Egr-1 (11), GATA-1 (12), myc (13), or jun-B (14). Several other target genes of Ets-1 have been identified *in vitro* (15 for review).

The DNA motif recognized by Ets-1 is slightly larger

than the four-base sequence that defines an EBS (15); however, the prediction for finding a functional Ets-1 target gene based on the presence of this Ets-1-binding signature is still uncertain. Therefore, the steps toward identifying functional Ets-1-binding sites in a gene promoter are, first, to analyze the transactivation activity of promoter fragments of interest placed in front of a reporter gene, second, to analyze protein binding to the various EBS located in such a restricted region in order to sort out those that truly bind Ets-1 from the others. The second part of such analysis requires sufficient amounts of recombinant Ets-1 (rEts-1).² We therefore cloned the mouse Ets-1 cDNA in an expression vector and designed a purification protocol in order to obtain the rEts-1 protein without additional amino acids. The protocol described here allowed us to sort out functional Ets-1-binding sites among five potential EBS that were present in the proximal promoter of the mouse VE-cadherin gene (16).

MATERIALS AND METHODS

Materials

Enzymes and reagents for cloning were from Life Technologies SARL (Cergy Pontoise, France) and New England Biolabs-Ozyme (St Quentin en Yvelines, France). pET22b plasmid and Novablue host strains were from Novagen-Tebu (Le Perray en Yvelines, France). All other chemicals were from Sigma–Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). The heparin–Sepharose CL-4B medium and Resource-Q column were from Amersham–Pharmacia Biotech (Courtaboeuf,

¹To whom correspondence should be addressed at CNRS UMR8526, Institut de Biologie de Lille, 1, rue Calmette, 59021 Lille, France. Fax: 33 3 20 87 11 11. E-mail: fabrice.soncin@ibl.fr.

²Abbreviations used: rEts-1, recombinant Ets-1; DTT, dithiothreitol; LB, Luria–Bertani; IPTG, isopropyl β -D-thiogalactopyranoside; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; BCA, bicinchoninic acid; TFA, trifluoroacetic acid.

France). The S HyperD column was from Beckman France-BioSeptra.

DNA Sequencing

Sequences of the original plasmid and of the cloned vector were performed using a PCR-based protocol using the Dyanamic ET terminator cycle sequencing kit and an automated DNA sequencer (ABI prism, Perkin-Elmer).

SDS-PAGE and Western Blotting

Samples were analyzed by SDS-PAGE (10%) (17) and blotted onto a nitrocellulose membrane (Scheicher & Schuell) overnight at 4°C and the membranes were incubated in PBS, 0.05% Tween 20, 5% nonfat dry milk, and a specific rabbit anti-Ets-1 polyclonal antibody (c-20, 1/1000 dilution, Santa Cruz) for 1 h at room temperature; washed four times 10 min in PBS, 0.05% Tween 20; and then incubated with a secondary mouse anti-rabbit IgG antibody coupled to horseradish peroxidase (1/10,000 dilution, NEN) for 45 min at room temperature and washed as above. Detection of the immune complexes was performed using the Renaissance kit (NEN) and Hyperfilm MP (Amersham-Pharmacia) autoradiography films. Stained SDS-PAGE were analyzed with a FluorS multiimager (Bio-Rad).

Electromobility Shift Assay

Double-stranded oligonucleotide probes (250 ng) corresponding to the MSV-LTR sequence (9) or a mutated version were labeled by incubation with 10 U T_4 polynucleotide kinase (Life Technologies), 25 μ Ci [γ - 32 P]ATP (3000 Ci/mmol) in forward reaction buffer (10 μ l total volume) for 1 h at 37°C followed by a desalting step using Biospin-30 columns (Bio-Rad). The probes (approx. 4.5 ng) were mixed in 10 mM Hepes, pH 7.9, 30 mM KCl, 0.25 mM EDTA, 63 μ M EGTA, 1 mM DTT, 10% glycerol (w/v), poly[dI-dC]·poly[dI-dC] (Amersham-Pharmacia) with rEts-1 (approx. 10 ng), 0.1 or 0.4 μ g of nonlabeled double-stranded normal and mutated probe, respectively, or 250 ng of anti-Ets-1 antibody (Transduction Laboratories) as indicated. Samples were incubated for 30 min at room temperature and analyzed by electrophoresis on a 6% bisacrylamide gel in 22.3 mM Tris, 22.3 mM boric acid, 0.5 mM EDTA performed at 10 V/cm until the bromophenol blue marker had migrated two-thirds the length of the gel. Gels were dried and autoradiographed.

RESULTS AND DISCUSSION

Cloning

The murine Ets-1 cDNA cloned into a pBlueScript plasmid (500 ng) was amplified by PCR using the oligonucleotide primers 5'-TCC GGG CCA TAT GAA GGC

GG and 5'-GCG CGT CTG TCG ACG ACT AGT CAG (Biosynthesis Inc., Lewisville, TX) in order to create *Nde*I and *Sal*I restriction sites at the start and stop codon, respectively. The amplification reaction was performed in a final volume of 100 μ l in the presence of 200 ng of each oligonucleotide, 0.1 mM dNTP, and 5 U of *Pfu* DNA polymerase in the supplier's buffer. After a heat step at 94°C for 5 min, 30 amplification cycles consisting of 94°C for 45 s, 58°C for 45 s, and 72°C for 4 min were performed. A final incubation at 72°C for 10 min completed the polymerization. The PCR reaction yielded a unique product with an apparent size of 1.3 kb which was gel purified and digested first with *Nde*I and then with *Sal*I. The resulting products were ligated with pET22b vector that had been digested in similar conditions. Competent Novablue cells (approx. 5×10^6 cells) were transformed with the ligation mix and selected by overnight growth on LB-agarose plates containing 70 μ g/ml ampicillin. Positive clones were detected by incubation of a nylon replicate of the bacterial culture with a radiolabeled *Cla*I fragment of the chicken Ets-1 cDNA. Two positive clones were picked and amplified and the plasmid was purified by the alkaline lysis method (18). Sequences starting from the cloning sites and spanning the entire Ets-1 coding region of both clones were determined on both strands. No modifications were seen when the obtained sequences were compared to the published mouse Ets-1 cDNA sequence (9). One clone (pET-Ets-1) was arbitrarily chosen for production of the protein (Fig. 1).

For routine purification, BL21(DE3) cells transformed with pET-Ets-1 were grown overnight at 37°C on a rotating table (250 rpm) in 50 ml LB medium (18) containing 50 μ g/ml ampicillin and used to inoculate 1 liter of fresh LB medium the next morning. When the OD₆₀₀ of the bacterial broth reached 0.6–0.8, 1 mM

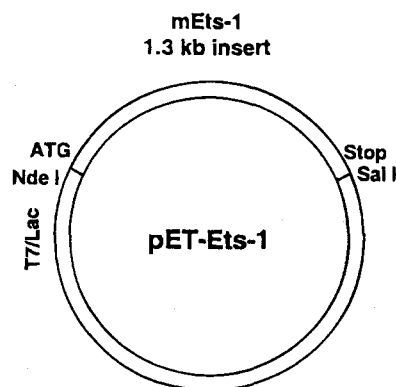


FIG. 1. Schematic representation of the pET-Ets-1 vector. The cDNA of mouse Ets-1 was amplified using oligonucleotides which created *Nde*I and *Sal*I sites at the start and stop codon, respectively. The cDNA was inserted into the pET22b plasmid in order to create the pET-Ets-1 expression vector. This plasmid was designed for bacteria production of the recombinant murine Ets-1 protein with no additional amino acids.

isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added and the cells were cultured for an additional 3 h. Incubation for longer periods did not result in a higher yield of protein expression (not shown). The bacteria were collected by centrifugation at 5000g for 10 min and pellets (corresponding to 250 to 330 ml of bacteria culture) were either frozen at -20°C until purification or directly resuspended in 50 ml of 50 mM potassium phosphate, pH 7.4, 20 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 2 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin A, 5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 1 mM PMSF, with or without 6 M urea (see comments). Our initial observations showed that the recombinant protein was present both in the bacterial cytoplasm and as inclusion bodies. In order to recover most of the produced material, the bacterial pellet was lysed twice using a French press (1000 PSI, SLM Aminco, Chamarande, France). When the alternative protocol using urea was chosen (see comments), the bacteria extract was incubated at 4°C overnight on a rotating wheel for better solubilization of the components. The lysed bacterial extract was centrifuged at 3200g for 30 min at 4°C in order to pellet cellular debris; the supernatant was collected and used for purification.

Affinity Chromatography

It has long been known that DNA-binding proteins bind heparin, presumably because heparin mimics double-stranded DNA helices, a property that allows it to displace transcription factors from DNA (19). We have previously shown that recombinant heat-shock transcription factor-1 was able to bind heparin-Sepharose (20) and we tested whether rEts-1 could be retained on the same medium. Chromatography was performed using a 40-ml bed vol heparin-Sepharose CL-6B (Amersham-Pharmacia) self-packed column equilibrated in 50 mM potassium phosphate, pH 7.4, 20 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA (buffer A-H). The bacterial extract was loaded on the column and eluted by gravity. Buffer A-H was passed through the column until A_{280} of the flowthrough reached a stable value. Initial experiments showed that rEts-1 indeed bound to the matrix and eluted with approximately 0.2 M KCl. For routine purification, a step elution with 50 mM KPO_4 , pH 7.4, 0.3 M KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA was performed and 10-ml fractions were collected. Aliquots of each fraction were taken, and the bulk of material was snap-frozen in N_2 and stored at -20°C until SDS-PAGE analysis and Coomassie blue staining. Fractions containing rEts-1 were pooled (usually 3 fractions, 30 ml) and diluted in 10 volumes of ice-cold 1 mM DTT just prior to ion-exchange chromatography. This dilution step was preferred over dialysis (see comments).

Anion-Exchange Chromatography

Since the calculated pI of mouse Ets-1 is 4.88 (Protein software V4.05, DNASTAR Inc), anion-exchange chromatography was indicated as the next step of purification. The diluted material was loaded onto an anion-exchange Uno-Q-1 column (1.3 ml bed vol, Bio-Rad) equilibrated in 15 mM KPO_4 , pH 7.4, 3 mM KCl, 1 mM DTT (buffer A-Q) at a 4 ml/min flow rate. Buffer A-Q was flowed through the column until A_{280} returned to buffer value and a 200-ml gradient of 0–100% 15 mM KPO_4 , pH 7.4, 0.5 M KCl, 1 mM DTT (buffer B-Q) in buffer A-Q was applied; 4-ml fractions were collected. rEts-1 eluted as a single peak preceded by a small shoulder, at a KCl concentration of 0.25 M (Fig. 2). Aliquots of each fraction analyzed by SDS-PAGE showed that pure rEts-1 was present in the fractions corresponding to the major elution peak. These were pooled and either immediately frozen and stored or dialyzed against buffer A-Q containing 0.005% Tween 20, 10% glycerol (125 vol) at 4°C overnight. Aliquots were frozen in liquid N_2 and stored at -80°C .

A SDS-PAGE analysis of representative samples of each purification step obtained from a 250-ml bacterial culture is presented Fig. 3. Yields were estimated by determination of protein content using the BCA assay (Pierce) and bovine serum albumin as standard (Table 1). An estimated 5 to 6 mg of rEts-1 per liter of bacteria may be expected when using this protocol. Care should however be taken when purifying such large amounts of rEts-1 since the protein tends to aggregate at high

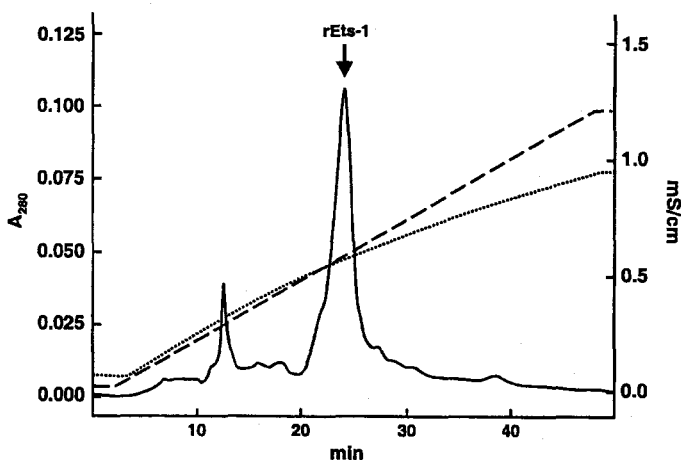


FIG. 2. Ion-exchange chromatography. Material eluted from the heparin-Sepharose column that contained rEts-1 was pooled, diluted, and loaded onto an Uno-Q anion-exchange column. A 200-ml linear gradient of 0–100% buffer B was applied (dashed line), and 4-ml fractions were collected. A_{280} (—) and conductivity (· · ·) were continuously monitored. rEts-1 eluted as a single peak with a minor early shoulder at a KCl concentration of 0.25 M. Due to the large volume of loaded material (approx. 300 ml), only the gradient part of the run is shown.

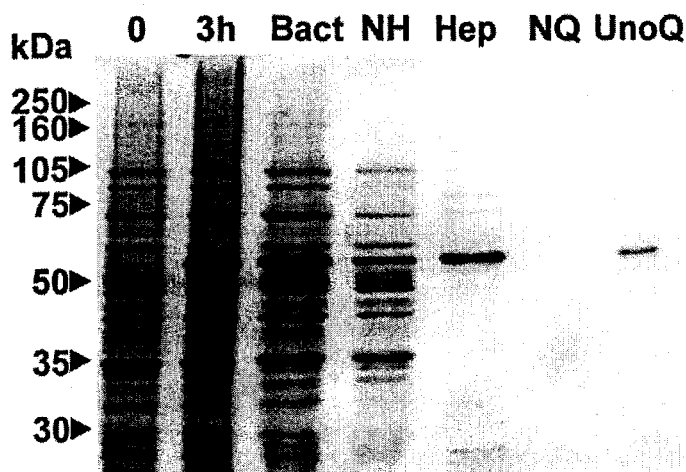


FIG. 3. SDS-PAGE analysis of purified products. Proteins were analyzed on 10% SDS-PAGE and Coomassie blue stained. Bacteria were collected before (0) or after incubation in the presence of 1 mM IPTG for 3 h. rEts-1 is the main protein produced in these conditions. Bact, bacterial protein extract prior to affinity chromatography; NH, heparin-Sepharose unretained material; Hep, heparin-Sepharose eluted material; NQ, anion-exchange unretained material; UnoQ, anion-exchange eluted material. Numbers and arrowheads indicate the location of the molecular weight standards analyzed on the same gel.

concentrations, resulting in lower yields of purification (see comments).

Estimation of rEts-1 Purity

The first indication on the purity of the Uno-Q-eluted material was obtained after SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Staining revealed one major band migrating at the expected range for rEts-1 with no extraneous bands (Fig. 3). Western blot analysis confirmed that this material contained rEts-1 as it was stained with a polyclonal antibody directed against the C-terminal region of human Ets-1, which is identical to mouse Ets-1 (Fig. 4).

In order to assess whether the Uno-Q-purified material contained only rEts-1 by more sensitive methods, rEts-1 (4.25 μ g) was loaded onto a 4.6 \times 50-mm C18

TABLE 1
Yield of Purification

Sample	Volume (ml)	Concentration (mg/ml)	Total protein (mg)
Bacterial extract	45	2.26	101.7
Eluted from heparin-Sepharose	30	0.38	11.4
Eluted from Uno-Q	8	0.18	1.4

Note. Typical purification yields obtained from 250 ml overnight bacterial culture (approx. 14.5 g wet wt). Protein concentration was assessed by the BCA method (Pierce).

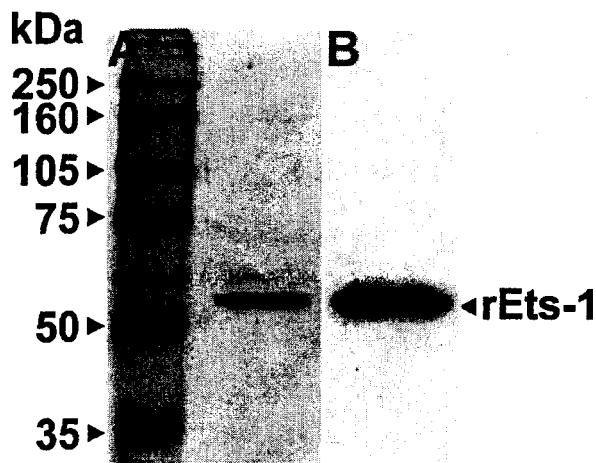


FIG. 4. Identification of purified rEts-1. (A) Uno-Q-purified rEts-1 (0.4 μ g, right lane) and molecular weight standards (left lane) were analyzed by 10% SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining. rEts-1 (right lane) was resolved as a unique band migrating at the apparent molecular weight of 56 kDa, slightly above its expected size. (B) Western blot analysis of 4.25 ng of purified material using an antibody directed against the C-terminal region of the human protein revealed the presence of the protein at the expected location (rEts-1).

reverse-phase HPLC column (XTera, Waters) equilibrated in [water, 0.05% TFA] at 1.5 ml/min flow rate and a 10-min linear gradient from 0 to 80% of [water:acetonitrile (2:8), 0.05%TFA] in equilibration buffer was applied. Absorbance was continuously monitored at 215 nm using a multiwavelength diode detector (Gold 168, Beckman). The Uno-Q-purified material contained one major peak that eluted at 6.55 min (Fig. 5). The

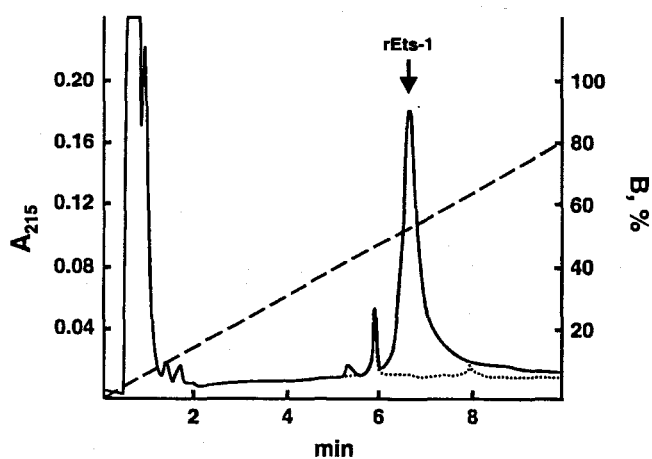


FIG. 5. C18 reverse-phase analysis of purified rEts-1. rEts-1 (4.25 μ g) purified from the Uno-Q column was loaded onto a C18 reverse-phase HPLC column equilibrated in [water, 0.05% TFA] at 1.5 ml/min flow rate. A 10-min linear gradient from 0 to 80% [water:acetonitrile (2:8), 0.05% TFA] in equilibration buffer was applied (dashed line). rEts-1 eluted as a single peak at 6.55 min (rEts-1) under these conditions. rEts-1 storage buffer was analyzed under similar conditions (dotted line).

minor peak detected at 5.82 min corresponded to buffer material as it was also present in the blank run.

The N-terminal sequence of the major peak eluted from the C18 column was determined by analysis of 10 Edman degradation cycles using a Procise 492 system (Applied Biosystems, Foster City, CA). The resulting sequence, MKAAVDLKPT, corresponds to the expected sequence of the ten first amino acids of mouse Ets-1, thus confirming that rEts-1 was the major product in the peak.

In order to further characterize the purity of the material, rEts-1 (approx. 1 μg), was subjected to in-gel tryptic digestion, products were recovered and mass spectrometry analysis was performed on a fraction (0.5 μl) of the digest using a Voyager DESTR mass spectrometer (Applied Biosystems). Spectra of 200 laser shots (20-kV accelerating voltage, grid voltage 62%, 125 ns delay time) were cumulated for final analysis. Another analysis was performed after desalting the digested products by reverse-phase adsorption (21). Although smaller peptides were lost during this desalting step, overall analysis of the remaining peptides was better than before desalting (Fig. 6). Twenty-eight peptides were resolved from the two analysis. Comparison of the peptide masses with the NCBI nr database (2000/10/06, 0- to 100-kDa range) using the ProFound software (version 4.10.5, Rockefeller University) identified mouse Ets-1 with a probability of 1.0 (estimated Z: 2.21) on the basis of 15 of 28 peptides (Table 2). Five of the remaining masses corresponded to trypsin fragments (Fig. 6).

Binding of Recombinant Ets-1 to DNA

rEts-1 was considered to be pure and was assayed for DNA-binding activity. Electromobility shift assays were performed by incubating rEts-1 with a radiolabeled double-stranded DNA probe which corresponds to part of the MSV-LTR and which is known to bind Ets-1 (9). rEts-1 bound to the probe and retarded its migration in the gel (Fig. 7). The interaction was specific since it was competed for by the presence of an excess of unlabeled probe but not by an excess of probe that contained a mutated version of the EBS which does not allow binding. In addition, an anti-Ets-1 antibody further retarded the Ets-1-probe complex migration, confirming that Ets-1 and the probe were bound to each other in the former complex. These results indicate that the purified rEts-1 is able to bind DNA in a specific manner.

Comments

The present protocol was routinely used for purification of sufficient amounts of rEts-1 which was used for DNA-binding studies (16). Modifications of this protocol which do not profoundly affect purity or yields were occasionally made: in some cases, purity could not be achieved after a single anion-exchange step, most probably due to variations of the exchange capacity of the affinity or anion-exchange resins after several large-scale preparations. A 'polishing' step consisting of a second anion-exchange chromatography was then performed, with the only difference that 1-ml fractions,

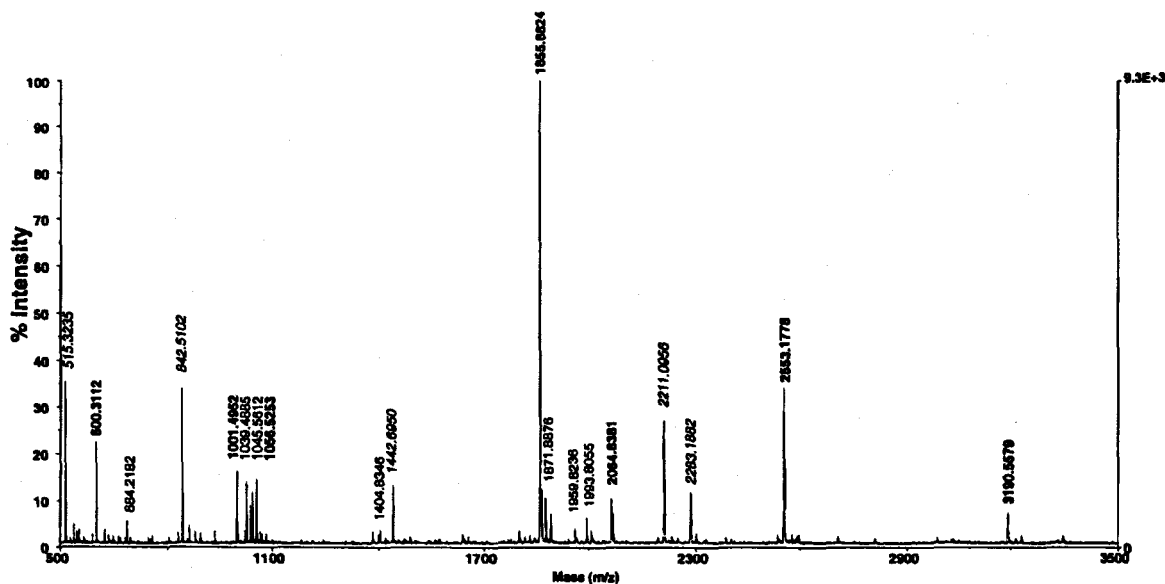


FIG. 6. Mass spectrum analysis of rEts-1 tryptic digest. rEts-1 (approx. 1 μg) was subjected to trypsin digestion, and products were desalted and analyzed by mass spectrometry. The data result from the analysis of 200 laser shots of the reverse-phase treated tryptic digest. Data for eight of the smaller peptides were obtained from the direct analysis of the digest products (not shown). Masses are indicated above the peaks. rEts-1 peptides are shown in boldface; trypsin peptides are in italics.

TABLE 2
Database Match of rEts-1 Peptides

Measured mass	Computed mass	Error (ppm)	Sequence
599.303	599.307	-5	YVYR
613.377	613.391	-22	KNKPK
699.297	699.289	11	MNYEK
750.331	750.322	12	YYDDK
755.395	755.408	-16	RYVYR
830.438	830.424	17	DRADLNK
857.433	857.428	6	ATFSCFTK
894.539	894.528	12	LGIPKDPR
968.441	968.430	11	EMMSQALK
1000.487	1000.482	5	LSDPDEVAR
1055.517	1055.506	10	MNYEKLSR
1055.517	1055.514	3	QWETHVR
1854.875	1854.885	-6	LTQSWSSQSSFNSLQR
2063.830	2063.837	-3	LGGQDSFESVESYDSCDR
2552.170	2552.185	-6	VPSYDSFDYEDYPAALPNHKPK
3189.550	3189.538	4	YENDYPSVILQDPLQDTLQTDYFAIK

Note. Comparison between measured monoisotopic and software computed masses. Two rEts-1 peptides are expected to match the 1055.517 measured mass. Proton mass (1.0078) was subtracted from peak values during database search.

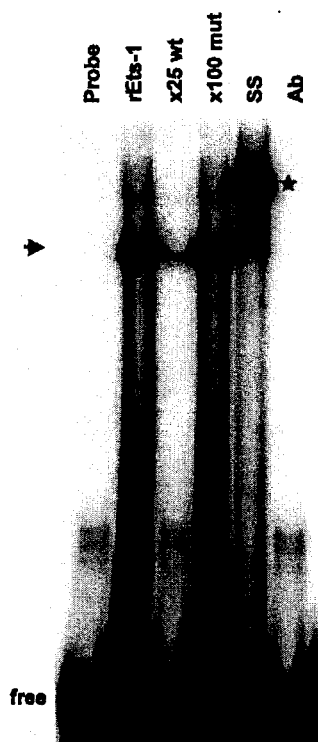


FIG. 7. Electromobility shift analysis of rEts-1 bound to specific DNA sequences. rEts1 (approx. 10 ng) was incubated with a ^{32}P -labeled double-stranded GATCCGCGCCTTCCGCTCTCCGA DNA probe (4.5 ng) that corresponds to the MSV-LTR sequence. rEts-1 bound to the probe and slowed its migration in the gel (arrow). Binding was competed for by addition of a 25-fold excess of unlabelled probe ($\times 25$ wt) but not by addition of a 100-fold excess of a mutated probe that contained a TTTT sequence instead of TTCC ($\times 100$ mut). The complexes were super-shifted (*) in the presence of 250 ng of anti-Ets1 antibody (SS). The antibody had no effect on the migration of the probe (Ab). Free, free probe.

instead of 4 ml, were collected as rEts-1 eluted from the column. This generally solved the purity problem with minor effects on yields. Anion-exchange chromatography was also performed using a Resource-Q column (1 ml bed vol, Amersham-Pharmacia) instead of the Uno-Q column. Although the chromatography profiles were comparable, the Resource-Q column allowed a better resolution at the polishing step, while the Uno-Q column was best for the first anion-exchange chromatography.

The calculated pI of Ets-1 is close to 5 but we noticed that the primary sequence contained a C-terminal basic region which could be polycationic at pH 7.4. We therefore attempted to purify the protein by using cation-exchange chromatography. A S HyperD 10 column (1.7 ml bed vol, Beckman) was equilibrated in 15% buffer B-Q in buffer A-Q at a 1 ml/min flow rate and the sample was diluted as above was loaded on the column. After elution of the unbound material, a 50-ml linear gradient of 0–75% buffer B-Q in buffer A-Q was applied, followed by a 5-ml linear gradient from 75 to 100% buffer B-Q in buffer A-Q. An example of such chromatography is shown in Fig. 8. rEts-1 indeed bound to the column and eluted when KCl concentration reached 0.2 M. SDS-PAGE analysis of the eluted material showed that the major peak corresponded to rEts-1. The possibility to reverse the ion-exchange chromatography strategy while keeping Ets-1 at optimal pH may prove to be convenient for large-scale purifications. Optimization of this step might however be indicated in order to achieve a better resolution than that obtained with the S HyperD column.

A major problem addressed during this work was the tendency of the protein to spontaneously aggregate in

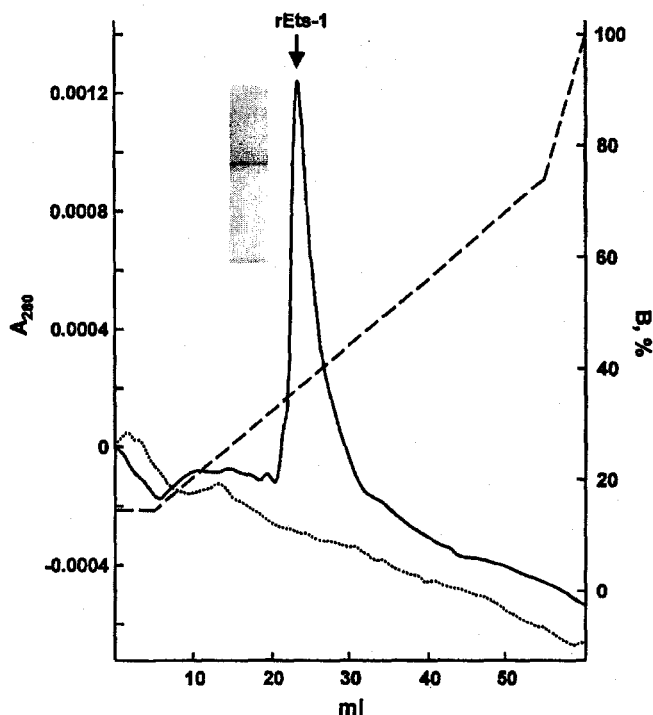


FIG. 8. Cation-exchange chromatography of rEts-1. Uno-Q-purified rEts-1 was applied on a S HyperD cation-exchange chromatography column and eluted with a 50-ml linear gradient ranging from 15 to 75% buffer B-Q in buffer A-Q, followed by a rapid 5-ml gradient to 100% buffer B-Q. rEts-1 eluted as a single entity at 23.1 ml, corresponding to 0.2 M KCl. A sample of the purified material analyzed by SDS-PAGE is presented (inset).

salt solutions. rEts-1 aggregates during the purification steps that end up with high protein concentration and this is the main reason that made us chose dilution over dialysis before ion-exchange chromatographies. In order to minimize or to avoid aggregation, purifications were also done in similar buffers but in the presence of 6 M urea. In addition to providing a better overall chromatographic behavior, urea allowed the recovery of the fraction of expressed protein that was associated with the inclusion bodies which was otherwise eliminated with the bacterial debris at the first centrifugation step. When using this protocol, urea was added to all buffers except to the final dialysis solution. rEts-1 which was purified using urea was identically as pure and active as the protein isolated using the first protocol. However, aggregation became a problem again at the final dialysis step, which was performed principally to remove urea and which resulted in aggregation as soon as the urea concentration dropped. This was especially true when purifying a variant form of Ets-1 which is prone to aggregation in concentrated solutions. In order to circumvent this problem, we tested various nonionic detergents that could prevent protein aggregation in the absence of urea but still allow specific DNA binding. Among the products tested (Triton X-100,

Igepal CA-630, and Tween 20), Tween 20 was chosen because it efficiently prevented aggregation when used at low concentrations (0.005%) in the dialysis buffer and did not interfere with DNA binding. The detergent was therefore added to the concentrated rEts-1 stocks.

Using this protocol, rEts-1 could be purified in one or 2 days, depending on the use of urea or not. It was also successfully used for the purification of the variant form of Ets-1 which required urea throughout the purification. It should also prove useful for further studies which require large quantities of active material such as X-ray crystallography.

ACKNOWLEDGMENTS

The main part of this work was performed in the CNRS EP560. The work was funded by Association pour la Recherche sur le Cancer, Ligue Nationale contre le Cancer, Fondation pour la Recherche Médicale, Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer. We thank A. Bègue and A. Masse for providing the *Clal* fragment of chicken Ets1, K. Pethe for bacteria production, Dr. S. K. Calderwood (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA) for oligonucleotides, E. Lelièvre for careful reading of the manuscript, and Dr. B. Vandebunder for support. F.L. has been granted a Ph.D. fellowship from 'Ligue Nationale contre le Cancer.' F.S. is 'Chargé de Recherche de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.'

REFERENCES

- 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. Anim. Domest.* 9, 5-36.
- Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C., and Stéhelin, D. (1983) A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 306, 395-397.
- Nunn, M. F., Seeburg, P. H., Moscovici, C., and Duesberg, P. H. (1983) Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* 306, 391-395.
- Vandebunder, B., Pardanaud, L., Jaffredo, T., Mirabel, M. A., and Stehelin, D. (1989) Complementary patterns of expression of c-ets1, c-myc and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo. *Development* 106, 265-274.
- Pardanaud, L., and Ieterlen-Lièvre, F. (1993) Expression of C-ETS1 in early chick embryo mesoderm: Relationship to the hemangioblastic lineage. *Cell Adhes. Commun.* 1, 151-160.
- Maroulakou, I. G., Papas, T. S., and Green, J. E. (1994) Differential expression of *ets-1* and *ets-2* proto-oncogenes during murine embryogenesis. *Oncogene* 9, 1551-1565.
- Wernert, N., Raes, M. B., Lassalle, P., Dehouck, M. P., Gosselin, B., Vandebunder, 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.* 140, 119-127.
- Vandebunder, B., Queva, C., Desbiens, X., Wernert, N., and Stehelin, D. (1994) Expression of the transcription factor c-Ets1 correlates with the occurrence of invasive processes during normal and pathological development. *Invasion Metastasis* 14, 198-209.
- Gunther, C. V., Nye, J. A., Bryner, R. S., and Graves, B. J. (1990) Sequence-specific DNA binding of the proto-oncoprotein ets-1

- defines a transcriptional activator sequence within the long terminal repeat of the Moloney murine sarcoma virus. *Genes Dev.* 4, 667-679.
10. Seth, A., and Papas, T. S. (1990) The *c-ets-1* proto-oncogene has oncogenic activity and is positively autoregulated. *Oncogene* 5, 1761-1767.
 11. Robinson, L., Panayiotakis, A., Papas, T. S., Kola, I., and Seth, A. (1997) Ets target genes: Identification of *Egr1* as a target by RNA differential display and whole genome PCR techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7170-7175.
 12. Seth, A., Robinson, L., Thompson, D. M., Watson, D. K., and Papas, T. S. (1993) Transactivation of GATA-1 promoter with ETS1, ETS2 and ERGB/Hu-FLI-1 proteins: Stabilization of the ETS1 protein binding on GATA-1 promoter sequences by monoclonal antibody. *Oncogene* 8, 1783-1790.
 13. Roussel, M. F., Davis, J. N., Cleveland, J. L., Ghysdael, J., and Hiebert, S. W. (1994) Dual control of *myc* expression through a single DNA binding site targeted by *ets* family proteins and E2F-1. *Oncogene* 9, 405-415.
 14. Coffey, P., De Jonge, M., Mettouchi, A., Binetruy, B., Ghysdael, J., and Kruijer, W. (1994) *junB* promoter regulation: Ras mediated transactivation by *c-Ets-1* and *c-Ets-2*. *Oncogene* 9, 911-921.
 15. Ghysdael, J., and Boureux, A. (1997) The ETS family of transcriptional regulators. In "Progress in Gene Expression" (Karin, M., Ed.), Vol. 1, pp. 29-89, Birkhäuser Verlag, Basel.
 16. Lelièvre, E., Mattot, V., Huber, P., Vandebunder, B., and Soncin, F. (2000) Ets1 lowers capillary endothelial cell density at confluence and induces the expression of VE-cadherin. *Oncogene* 19, 2438-2446.
 17. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
 18. Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 19. Gadgil, H., and Jarrett, H. W. (1999) Heparin elution of transcription factors from DNA-Sepharose columns. *J. Chromatogr. A* 848, 131-138.
 20. Soncin, F., Prevelige, R., and Calderwood, S. K. (1997) Expression and purification of human heat-shock transcription factor 1. *Protein Express. Purif.* 9, 27-32.
 21. Rusconi, F., Schmitter, J.-M., Rossier, J., and Le Maire, M. (1998) Chromatographic separation and sample preparation in one step for MALDI mass spectrometric analysis of subpicomole amounts of heterogeneous protein samples. *Anal. Chem.* 70, 3046-3052.

I.2 Discussion

Avant mon arrivée en thèse, l'équipe recherchait les gènes cibles de Ets-1 dans les cellules endothéliales. Afin d'étudier par la suite les promoteurs des gènes cibles identifiés, nous avons choisi de mettre au point une technique de production et de purification de la protéine recombinante Ets-1 native car aucune technique de purification de Ets-1 n'avait été décrite auparavant. En se basant sur des protocoles de purification décrits pour d'autres facteurs de transcription, comme par exemple celui du facteur de transcription du choc thermique (Soncin et al., 1997), nous avons développé et optimisé un protocole de purification de Ets-1 en utilisant des techniques de biochimie classique. Durant la mise au point de cette technique, nous avons été confrontés à divers problèmes. Au cours de la production de Ets-1 dans les bactéries BL21, la protéine se retrouve en grande partie dans les corps d'inclusion. Elle est alors éliminée avec les débris cellulaires au cours de la première centrifugation. Pour palier à ce problème, nous avons choisi de lyser les bactéries à l'aide de la presse de French et d'incuber le lysat bactérien dans un tampon contenant 6M d'urée afin de récupérer le maximum de protéines contenues dans les corps d'inclusion. Le second problème résidait dans le fait que la protéine Ets-1 s'agrège spontanément. Ceci nous a amené à réaliser l'ensemble de la purification en présence d'urée. Pour éliminer l'urée et éviter l'agrégation pendant la dialyse finale, nous avons testé plusieurs types détergents à différentes concentrations. Les meilleurs résultats ont été obtenus en dialysant nos échantillons en présence de Tween 20 à une concentration de 0,005% et dont la présence à ces concentrations n'affecte pas la capacité de fixation de la protéine Ets-1 purifiée.

II Caractérisation de l'isoforme p42Ets-1 chez la souris

Au cours d'études précédentes, nous avons identifié par RT-PCR un transcrite de Ets-1 dont la taille apparente était inférieure d'environ 300bp au transcrite classique. Nous avons isolé ce produit d'amplification, puis par séquençage, nous avons montré que ce transcrite correspondait au transcrite classique épissé de 261bp correspondant à l'exon VII. Ce transcrite code pour une protéine Ets-1 de 40.5kDa, correspondant à la forme p42Ets-1 humaine, jamais décrit chez la souris. Le transcrite de la forme murine a été détectée par RT-PCR dans l'embryon de souris ainsi que dans des lignées de cellules endothéliales et de fibroblastes de souris. Dans tous les cas, le niveau d'expression du transcrite p42Ets-1 reste minoritaire par rapport au transcrite codant pour p51Ets-1. A partir d'ARN totaux d'embryon de souris, nous

avons cloné l'ADNc correspondant au variant p42Ets-1, puis sous cloné dans des vecteurs d'expression permettant de le produire dans des bactéries ou dans des cellules eucaryotes. Nous avons produit et purifié la protéine p42Ets-1 recombinante en utilisant le protocole décrit dans l'article 1.

Dans un premier temps, nous avons vérifié par retard sur gel que p42Ets-1 était bien capable de reconnaître, comme p51Ets-1, l'EBS présent dans le MSV-LTR. Les différents travaux réalisés sur le variant humain indiquaient que p42Ets-1 était capable d'activer des gènes différents de p51Ets-1. Nous avons alors recherché, par la technique de *Target Detection Assay* (TDA), les différentes séquences susceptibles d'être reconnues par p51Ets-1 et p42Ets-1. Cette technique consiste à sélectionner, à partir d'une banque d'oligonucléotides doubles brins aléatoires, les séquences optimales reconnues par les protéines recombinantes. Une première TDA a été réalisée avec un oligonucléotide contenant un motif central GGA et 5 bases aléatoires de part et d'autre de ce motif. L'analyse des résultats montre que p51Ets-1 reconnaît presque exclusivement la séquence ACCGGAA/TGTG, nommée Opt. L'isoforme p42Ets-1 reconnaît la séquence Opt mais est également capable de fixer des séquences plus diversifiées. Les principales variations sont observées au niveau des bases situées en -1 et en +3 du motif GGA. Une seconde TDA réalisée avec un oligonucléotide contenant 15 bases aléatoires nous a permis de montrer que p42Ets-1 est capable, tout comme p51Ets-1, de reconnaître le motif central GGAA/T. A partir de ces résultats, nous avons réalisé des expériences de retard sur gel en utilisant comme sonde les différents oligonucléotides trouvés en TDA. Les résultats confirment que les deux isoformes sont capables de fixer de manière équivalente la sonde Opt. Le changement de la base C située en -1 en T (Opt[C₋₁T]) ou G (Opt[C₋₁G]) affecte la capacité de p51Ets-1 à fixer l'ADN. Ces variations ont un effet moindre sur la fixation de p42Ets-1. Concernant la seconde variation observée en TDA, le changement de la base G +3 en C n'induit pas de différence de fixation entre les deux protéines. L'identité de la base située en -1 apparaît jouer un rôle prépondérant dans le contrôle de la spécificité de fixation à l'ADN de p51Ets-1 et p42Ets-1.

A l'aide du système Biacore[®], nous avons quantifié les différences de fixation des deux facteurs sur les sondes Opt et Opt[C₋₁G]. Les résultats révèlent qu'avec la sonde Opt, les constantes d'association et de dissociation de p51Ets-1 et de p42Ets-1 sont équivalentes. Les expériences similaires réalisées avec l'oligonucléotide Opt[C₋₁G] montrent que p51Ets-1, à cette concentration est incapable de s'associer avec cette sonde, alors que les constantes obtenues pour p42Ets-1 sont équivalentes à celles obtenues avec Opt. La seule différence observée est que la quantité de p42Ets-1 fixant Opt[C₋₁G] est inférieure à celle fixant Opt.

Le domaine codé par l'exon VII est localisé entre les acides aminés Gly244 et Thr330, en amont du domaine ETS. Il contient deux hélices inhibitrices (HI1 et HI2) ainsi que quatre sérines dont la phosphorylation a pour effet de stabiliser le complexe d'inhibition. Les résultats que nous avons obtenus lors de la TDA suggèrent que p42Ets-1 reconnaît un nombre d'EBS plus variés que p51Ets-1. Nous avons cherché à savoir si cette différence de spécificité de reconnaissance observée entre p51Ets-1 et p42Ets-1 était causée par la présence d'une région de l'exon VII. Plusieurs séries de résultats de la littérature montrent qu'une protéine Ets-1 tronquée au niveau de sa partie amino-terminale et dont le premier acide aminé correspond à la Gly₂₄₄ (Δ N244) ou à la Val₂₈₀ (Δ N280) interagit avec un EBS de la même manière que la protéine pleine longueur p51Ets-1. Nous avons réalisé une série de délétions en N-terminal afin de créer une protéine Ets-1 dont le début de la traduction commence, soit juste avant l'hélice HI1 (Δ N303), avant l'hélice HI2 (Δ N312), avant le domaine ETS (Δ N334) ou après l'hélice HI1 (Δ N348). Toutes ces constructions ont été produites *in vitro* et leur capacité à fixer les oligonucléotides Opt et Opt[C₁G] ont été testées par retard sur gel. Les résultats obtenus révèlent que la région comprise entre les acides aminés Val₂₈₀ et Glu₃₀₂ est responsable de la spécificité de reconnaissance de p51Ets-1. Cette région se trouve en amont des hélices inhibitrices HI1 et HI2 et n'est pas impliquée dans le complexe d'inhibition. De plus, la spécificité de reconnaissance de p51Ets-1 est indépendante du mécanisme d'inhibition de fixation à l'ADN. En effet, le mutant Δ C415 qui est toujours capable de discriminer les séquences Opt et Opt[C₁G] malgré un complexe d'inhibition déstructuré.

Les résultats obtenus *in vitro* peuvent-ils être confirmés lors d'expériences de co-transfection réalisées avec un promoteur naturel contenant des EBS ? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le modèle du promoteur de la *VE-cadhérine*. En effet, l'équipe avait démontré que p51Ets-1 était capable de réguler l'expression du promoteur de la *VE-cadhérine* par l'intermédiaire de deux EBS nommés EBS2 et EBS4. Ce modèle s'avère intéressant car l'EBS2 a une séquence proche de Opt[C₁G] et l'EBS4 a une séquence proche de Opt[C₁A]. Nous avons montré auparavant que Opt[C₁G] et Opt[C₁A] était reconnu différemment par p51Ets-1 et p42Ets-1. Le promoteur de la *VE-cadhérine* constitue donc un modèle naturel pour étudier les relations qui existe entre la fixation et l'activité des deux isoformes de Ets-1. Les expériences de retards sur gel montrent que p51Ets-1 se fixe majoritairement à l'EBS4 et peu à l'EBS2 alors que p42Ets-1 reconnaît les deux EBS de manière équivalente. Des tests de transactivation réalisés sur des fibroblastes de souris

(NIH3T3) révèlent que l'activité transactivatrice de p51Ets-1 passe majoritairement par l'EBS4 alors que celle de p42Ets-1 passe de manière équivalente par l'EBS2 et l'EBS4. Ces résultats montrent d'une part que les résultats obtenus *in vitro* sont confirmés *in vivo* et d'autre part que p42Ets-1 est capable de réguler l'expression de gènes différemment de p51Ets-1.

II.1 Article 2

Frédéric Lionneton, Etienne Lelièvre, David Baillat, Dominique Stéhelin and Fabrice Soncin
The mouse p42Ets-1 isoform recognizes more various ETS-binding sites than p51Ets-1 and differentially activates gene transcription.

Soumis

TITLE

The mouse p42Ets-1 isoform recognizes more various ETS-binding sites than p51Ets-1 and differentially activates gene transcription.

AUTHORS

Frédéric LIONNETON, Etienne LELIEVRE[§], David BAILLAT, Dominique STEHELIN and Fabrice SONCIN*

ADDRESS

CNRS UMR 8526 – Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, 59021 Lille Cedex, France

[§]Present address: Center for Vascular Biology, Department of Physiology, University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut, USA

*to whom all correspondence about the manuscript, including proofs, should be sent:

Dr Fabrice SONCIN

CNRS UMR8526 - Institut de Biologie de Lille

1, rue Calmette - 59021 Lille Cedex

France

Tel: 33 3 20 87 11 20

FAX: 33 3 20 87 11 11

email: fabrice.soncin@ibl.fr

RUNNING TITLE

Identification of the mouse p42Ets-1 isoform

SUMMARY

We have identified the mouse exon VII splice variant of the transcript coding for the Ets-1 transcription factor. This spliced transcript is expressed in all the cell lines which express ets-1, although at much lower levels, it is also expressed in the mouse embryo *in vivo*. The corresponding protein, named p42Ets-1, acts as a transcription factor; it is able to bind to specific DNA sequences and to transactivate a *bona fide* ETS target gene. A comparison of optimal DNA-binding sites shows that p42Ets-1 binds to more various DNA sequences than p51Ets-1. p42Ets-1 recognizes the same optimal consensus sequence than p51Ets-1, but also many variations of it, mainly at base -1 which is located just prior to the GGAA/T core sequence. These binding differences were confirmed by electromobility-shift assays and quantified by surface plasmon resonance analyses. The protein region responsible for the differences in DNA sequence recognition was located in the Val₂₈₀-Glu₃₀₂ fragment, which is encoded by exon VII. The specific DNA binding properties of each isoform translated into clear differences in transactivation, as p42Ets-1 was shown to transactivate the natural *VE-cadherin* gene promoter over EBS2 and EBS4 whereas p51Ets-1 is mainly active through EBS4.

Altogether, our data suggest that p42Ets-1 may act as a distinct transcription factor from p51Ets-1 depending on cellular conditions.

INTRODUCTION

The ETS family is composed of several transcription factors which share a conserved sequence of 85 amino acids, named the ETS domain, generally located at the C-terminus of the proteins. The ETS domain recognizes a consensus DNA sequence centred on the core GGAA/T motif, named the ETS-binding site (EBS, reviewed in (1)). Several structure studies have shown that the ETS domain folds into a winged helix-turn-helix motif, composed of three α helices packed against a four-stranded, anti-parallel β -sheet, helix H3 contacts the DNA major groove over the EBS (2-4). In the Ets-1 transcription factor (p51Ets-1), two inhibitory regions located on each side of the ETS domain associate together and regulate p51Ets-1 affinity for DNA by an auto-inhibition mechanism; in the absence of DNA, the N-terminal domain of this region, which is encoded by exon VII, adopts a conformational structure which allows it to interact with the ETS domain and with the C-terminal inhibitory region. On the other hand, when p51Ets-1 is bound to DNA, the inhibitory α helix 1 (HI1) is unfolded, the inhibitory module unpacked, and this status correlates with a higher affinity of the factor for DNA (5-7). In p51Ets-1, the domain encoded by exon VII which is involved in this auto-inhibition mechanism contains four serines that are phosphorylated upon Ca^{++} activation (8). This phosphorylation inhibits p51Ets-1 binding to DNA by reinforcing the auto-inhibition (8,9). Thus, the domain encoded by exon-VII plays a central role in p51Ets-1 activities, as it is directly involved in the regulation of DNA-binding of the factor by participating to auto-inhibition and is the target of second messenger pathways which also regulate DNA-binding. Interestingly, in human and rat, another Ets-1 form has been identified and found to correspond to the exon VII-splice variant (p42Ets-1, (10-12). This variant displays specific properties which are not shared by the full-length protein; it misses the essential serines and is therefore not subject to Ca^{++} -dependent phosphorylation and inhibition of DNA-binding anymore (8,9,13). p42Ets-1 induces

colon cancer cell apoptosis (14) and over-expression of caspase-1/ICE in these cells (15), p51Ets-1 does not have these activities.

Aside from these reports, the role of the p42Ets-1 variant has not been extensively studied and several fundamental questions concerning its functions remain: is p42Ets-1 a transcription factor ? if yes, does it regulate different target genes than p51Ets-1, such as caspase-1/ICE, by a direct activation of specific EBS on their promoters or by an indirect mechanism ?

During our studies on the role of Ets-1 in the regulation of the endothelial cell genes *VE-cadherin* (16) and *fli-1* (17), we have repeatedly observed the expression of an ets-1-related transcript that we have identified here. This product is the mouse equivalent of the human and rat ets-1 exon VII splice variant, which had never been described. We show that the mouse p42Ets-1 is a functional transcription factor with a DNA recognition sequence quite different from that of p51Ets-1. p42Ets-1 binds more various EBS than p51Ets-1 and these differences correlate with a different capacity to regulate the natural promoter of the *VE-cadherin* gene. We have identified the p51Ets-1 region which mediates this DNA-sequence specificity of recognition. Overall, our data show that p42Ets-1 is a distinct transcription factor from p51Ets-1.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Material

The -2486/+24-Luc, -2486EBS2M, -2486EBS4M, and -2486EBS2/4M reporter vectors were described in (16).

Cell Culture.

Mouse heart (H5V) and EOMA endothelioma, brain capillary (MBE) and aortic (MAE) normal endothelial cells, lung endothelial line 1G11, 3T3 and L929 (ATCC) fibroblasts, were cultured following standard conditions in a humidified 5%CO₂/95% air atmosphere.

Cloning and plasmid constructions

The ets-1- δ VII cDNA was cloned by PCR reaction using reverse transcribed mouse brain capillary endothelial cell total RNA (16), the TCC GGG CCA TAT GAA GGC GG and GCG CGT CTG TCG ACG ACT AGT CAG oligonucleotides in High Fidelity PCR Master Mix (Roche). The amplification reaction consisted in 2 min at 94°C then 40 cycles of 30 sec/94°C, 45 sec/57.3°C, 1 min/72°C followed by a final elongation step of 7 min/72°C. The PCR products were cloned into the pCR2.1 vector (Invitrogen) and the ets-1- δ VII cDNA subcloned into the Nde I and Sal I sites of the pET22b expression vector (Novagen, (18)). For expression in mammalian cells, the pTag-p51Ets-1 and pTag-p42Ets-1 vectors were constructed by cloning the coding sequence of the hemagglutinin influenza epitope ahead of and in frame with the ets-1 or the ets-1- δ VII cDNA into the pcDNA3.1 vector (Invitrogen), respectively.

The truncated variants Δ N244, Δ N280, Δ N303, Δ 312, Δ 334, and Δ 348 were constructed by amplification of the pTag-p51Ets-1 vector using High Fidelity PCR Master Mix and the oligonucleotides

TAGGTACCATGGTCCCCTCCTATGACAG,	TAGGTACCATGGGTAAACTCGGGGGCCA,
TAGGTACCATGGCTGACCTCAACAAGGA,	TAGGTACCATGACCTTCAAGGACTATGT,
TAGGTACCATGAAGTCTTGTCAGTCCTT,	TAGGTACCATGCCGATCCAGCTGTGGCA,

respectively, and the reverse primer

GCGCGTCTGTCGACGACTAGTCAG. The Δ C415 construct sequence was amplified using the oligonucleotides TAGGTACCATGGGTAAACTCGGGGGCCA and GATCGTCGACGACTACACAAAGCGGTA under similar conditions. The PCR reaction were 2 min/94°C, then 25 cycles of 30 sec/94°C, 30 sec/55°C, 1 min/72°C and a final extension step of 7 min/72°C. The PCR products were purified, digested with Sal I and Kpn I and cloned into the Xho I and Kpn I sites of the pcDNA3.1. All constructions were verified by direct sequencing.

RT-PCR analysis

Tissue samples were homogenized in 1ml TRIzol reagent (Invitrogen) using a Ultrathurax equipped with a 8 mm probe (IKA) and total RNA purified as recommended. Cell cultures were rinsed three times in PBS and lysed in TRIzol reagent. Reverse transcription reactions were performed as in (16). Ets-1 amplification was performed in PCR buffer II containing 150 μ M each dNTP, 2mM MgCl₂, 1.25U of AmpliTaq Gold polymerase (Perkin Elmer) and 1 μ M of TGTGTTCCCTCCCTCAGAGTTCT and CTGACAAGACTTATCAGTGAGTAAT oligonucleotides in a final volume of 50 μ l. PCR steps were 5 min/95°C, then 35 cycles of 1 min/94°C, 1 min/55.8°C and 1 min/72°C. The PCR products were analyzed by agarose gels electrophoresis.

SDS-PAGE and Western blot analysis.

Recombinant Ets-1 proteins were analyzed by SDS-PAGE 10% followed either by Coomassie blue staining or by blotting on nitrocellulose (Schleicher and Schuell). The membrane was blocked in PBS, Tween-20 0.05%, non-fat dry milk 5% and incubated in the presence of a rabbit polyclonal anti-Ets-1 antibody (1/1000 dilution, C-20, Santa Cruz), washed and the complexes detected using an anti-rabbit antibody coupled to horseradish peroxidase (1/10000 dilution, NEM) and revealed with the Renaissance kit (NEM).

Electromobility Shift Assays (EMSA)

Recombinant Ets-1 proteins (Figure 4, Figure 7) or protein fragments produced *in vitro* using the TNT coupled reticulocyte lysate system (Figure 6, Promega) were used. Double-stranded oligonucleotide probes corresponding to Opt; ACGT**ACCGGAAGTGTGCA**, or to the mutated Opt sequence (mutation is indicated in brackets) Opt[C₋₁A]; ACGTACAGGAAGTGTGCA, Opt[G₊₃C]; ACGTACCGGAAGTCTGCA, Opt[C₋₁G]; ACGTACGGGAAGTGTGCA, Opt[C₋₁T]; ACGTACTGGAAGTGTGCA, Opt[A₀T]; ACGTACCGGATGTGTGCA were ³²P-radio-labeled using T4 polynucleotide kinase and EMSA performed as described in (16,18).

Transactivation assays

3T3 cells (150,000 cells/well) were seeded in 10 cm² culture dishes and transfected 16 hr later with 2.4 fmoles of pTag-p51Ets-1 or pTag-p42Ets-1, 55,2 fmoles of reporter vector and 22.6 fmoles of pCH110 normalization vector (Amersham-Pharmacia) using Exgen500 (Euromedex). Total amount of DNA were adjusted to 1.5µg/well with pUC19. Two days later, cell extracts were prepared in Reporter Lysis buffer (Promega) and luciferase and β-galactosidase activities measured using a Lumat luminometer (Berthold).

Target Detection Assay (TDA)

Two TDA were performed, using either the CTCGAGTAGCATGCACANNNNNTCCNNNNNTTGGCCGTCGACTGAGCTC and GCGGAGCTCAGTCGACG (TDA-1) or the CTCGAGTAGCATGCATGNNNNNNNNNNNNNNNCAGGCCGTCGACTGAGCTC (TDA-2) oligonucleotide pairs which were annealed together, labeled using DNA polymerase I Klenow fragment and α-[³²P]-dCTP and purified on Biospin-30 columns (Biorad). The labeled probes were incubated with recombinant p51Ets-1 or p42Ets-1 and separated under EMSA conditions. After a brief auto-radiography of the gel, the DNA-protein complexes were purified by electro-

elution and ethanol precipitated. The recovered DNA was mixed with PCR buffer II, 1,5mM MgCl₂, 150μM of each dNTP, 1.25U AmpliTaq Gold polymerase in a final volume of 50μl and 2 μM of GCGCTCGAGTAGCATGCA and GCGGAGCTCAGTCGACG oligonucleotides and amplified by PCR (5 min/95°C, then 35 cycles of 20 sec/95°C, 30 sec/55°C, 20 sec/72°C and a final step of 3 min/72°C). The PCR products were chloroform-extracted, separated by acrylamide 6%/agarose 0.25% gel electrophoresis in 45 mM Tris-HCl, 45 mM boric acid, 0.5 mM EDTA and purified by electro-elution. The purified DNA was end-labeled using T₄ polynucleotide kinase and [³²P]ATP followed by a desalting step with Biospin 30 (Biorad) and used for the second round of TDA. These steps were repeated two or three times and the final PCR products digested with Xho I and Sac I, cloned in the corresponding sites of pBlueScript SK II and used to transform Novablue bacteria (Novagen). TDA-1 yielded 46 and 57 different clones with p51Ets-1 and p42Ets-1, respectively. The TDA-2 sequence analysis was limited to 18 different clones for each Ets-1 variant.

Surface Plasmon Resonance (SPR) kinetic assay

SPR measurements were carried out using a BIAcore 2000 apparatus (Biacore®).

Double-stranded biotinylated oligonucleotides (Opt; AGTCAGTCACGTACCGGAAGTGTGCAGTC, Opt[C₋₁G]; AGTCAGTCACGTACGGGAAGTGTGCAGTC, and their respective counterparts where the GGAA core binding motif was mutated in AAAA in order to serve as blanks for non-specific interactions with DNA were immobilized on a streptavidin-coupled CM5 sensor chip (19). Kinetics experiments were carried out at 10°C at a 30 μl/min flow rate in K₃PO₄ 15 mM, pH 7.4, KCl 50 mM, Tween-20 0.005 %, 0.1 mg/ml BSA. Ets-1 isoforms (1, 2, 5 and 10 nM) were injected using the KINJECT procedure during 120 s, dissociation of the complexes was then monitored for 240 s before regeneration with a 60 s injection of 0.03% SDS in distilled water. Each injection was done twice in order to obtain a complete data set of eight curves. Raw data

were corrected by subtracting the blank curve obtained with the mutated, non-binding, oligonucleotides. Each data set was globally fitted with Biaeval3.1® software using the pre-established 1:1 binding with mass transfer model. The kinetic parameters and the maximum binding capacity of the immobilized ligand were considered as global parameters for a given data set.

RESULTS

Identification of the mouse ets-1- δ VII splice variant.

The mouse ets-1- δ VII transcript was initially detected as a specific but minor RT-PCR product when checking the levels of expression of endogenous ets-1 in response to an induced over-expression of the 50 kDa full length Ets-1 (named here p51Ets-1 in correspondence to the human form) in endothelial cells and fibroblasts (not shown in (16)). The product was isolated, sequenced and found to be the ets-1 exon-VII splice variant (ets-1- δ VII). The splicing results in the removal of 261 bp from the mouse ets-1 transcript and the 87 corresponding amino-acids (9.8 kDa) from p51Ets-1, giving rise to a 40.5 kDa protein (named here p42Ets-1 in correspondence to the human form). Analysis of ets-1- δ VII expression in various samples *in vivo* and *in vitro* showed that this transcript was expressed in mouse tissues and in endothelial as well as non-endothelial cell lines (Figure 1). Expression is consistently lower than that of ets-1 and shows no regulation depending on endothelial cell growth (not shown). The entire coding sequence contained in ets-1- δ VII was isolated from mouse embryonic total RNA and cloned into a bacterial expression vector in order to produce the p42Ets-1 protein. The recombinant p42Ets-1 and p51Ets-1 proteins were produced and purified according to the protocol that we had originally designed for p51Ets-1 (18) with minor modifications. Both proteins appear pure by SDS-PAGE analysis and are recognized by an anti-Ets-1 antibody raised against the C-terminus of Ets-1, which is common to both variants (Figure 2).

p42Ets-1 binds to DNA and recognizes more various EBS than p51Ets-1.

The ets-1 exon VII codes for a protein region located right before the ETS domain in p51Ets-1, p42Ets-1 was therefore expected to bind to DNA and found to recognize the classical, double-stranded MSV-LTR probe (20) using electromobility-shift assay (EMSA, Figure 3). Two TDA experiments were performed in order to identify the specific DNA sequences that correspond to the optimal binding sites of either protein out of a set of random

double-stranded oligomers. The first TDA was performed using DNA probes which contained a GGA core sequence flanked by 5 randomly picked bases whereas a second set was performed using DNA probes which contained 15 randomly picked bases, mainly in order to ascertain the fact that p42Ets-1 recognized the same GGAA/T EBS core sequence than p51Ets-1. The results obtained using either probe were similar, they showed that p51Ets-1 and p42Ets-1 have quite significantly different DNA recognition capabilities: p51Ets-1 showed a strong preference for the ACCGGAA/TGTG sequence (Opt), with very limited variations. This Opt sequence was also favored by p42Ets-1, but other sequences were also frequently pulled-out by this variant (Table 1). The most significant variations were observed at base -1, which was either a C (67%) or an A (33%, Table 1), and at base +3 (C, 37% or G, 28%). Base -3 presented some variations as well, T ranking second to A at this position (21% and 54%, respectively).

The observed differences in DNA sequence recognition were conceptually important because they suggested that p42Ets-1 might control certain genes via the same EBS as p51Ets-1 provided that they correspond to the Opt sequence, while it may be able to control alternative EBS, which are not or poorly recognized by the full length protein, therefore regulating a much diverse set of target genes than p51Ets-1.

EMSA were performed using p51Ets-1 or p42Ets-1 and a set of probes that corresponded to the variations suggested by the TDA results. This approach confirmed that p51Ets-1 and p42Ets-1 bound equally to Opt (Figure 4), whereas changing a single base of this optimal sequence resulted in mild to severe losses of binding of p51Ets-1: changing base -1 from a C to an A, as in Opt[C₋₁A], had a mild effect on the binding of p51Ets-1 while changing this base to G as in Opt[C₋₁G] strongly affected p51Ets-1 binding. Neither variation had an effect on p42Ets-1 recognition (Figure 4, see also below). The strongest difference was observed when base -1 was changed to a T (Opt[C₋₁T]), which induced a total loss of binding of p51Ets-1, although in this case, binding of p42Ets-1 was affected too (Figure 4).

The other variations that were suggested from the TDA resulted in less obvious differences in binding capacities when assessed by EMSA: when base +3 was changed from G to C, as shown with Opt[G₊₃C], no noticeable difference in binding was observed although this change was statistically the most common for p42Ets-1 in TDA. Changing the EBS core GGAA to GGAT, which was slightly favored by p42Ets-1 in TDA, had no apparent effect on binding either (Opt[A₀T], Figure 4).

Quantification of p51Ets-1 and p42Ets-1 binding to DNA by SPR.

The characteristics of p51Ets-1 and p42Ets-1 binding to Opt and Opt[C₋₁G] and the kinetics of association and release were quantified by SPR. Opt[C₋₁G] was used because in EMSA p42Ets-1 displayed no apparent differences in binding to Opt[C₋₁G] when compared to Opt while a significant loss of binding of p51Ets-1 to Opt[C₋₁G] was observed.

As expected, binding characteristics of p51Ets-1 and p42Ets-1 to Opt were found to be quantitatively similar; the association and dissociation curves at low protein concentration were almost equivalent (Figure 5A) and the calculated K_d within the same range (1.29 nM ± 0.08 vs 0.56 nM ± 0.02 for p51Ets-1 and p42Ets-1, respectively, (Table 2). At the highest concentration used (10 nM, Figure 5B) after reaching equilibrium, the total amount of p51Ets-1 and p42Ets-1 protein bound to the probe were also equivalent (0.109 fmole/mm² vs 0.105 fmole/mm² respectively at the end of the injection estimated with the empirical correlation that 1000 RU correspond to 0.1 ng/mm²).

On the other hand, striking differences were observed when analysing the binding of the proteins to Opt[C₋₁G]: p51Ets-1 showed very weak association to this probe at low concentrations (Figure 5A) and the total of bound protein at equilibrium using higher concentrations reached only 26% of the total amount bound to Opt in similar conditions (Figure 5B). As expected from this, the K_d value dropped to 30.1 nM ± 4.5 (

Table 2). These differences were not observed with p42Ets-1, as its rate of association to Opt[C₁G] was more comparable to that observed with Opt (Figure 5A). The only difference was that p42Ets-1 showed a greater dissociation rate, resulting in a 29% decrease of maximal amount of protein bound to Opt[C₁G] at 10nM when compared to Opt. Nevertheless, the K_d value for p42Ets-1 was still within the range of that obtained with Opt (Table 2).

These results confirmed the fact that p51Ets-1 and p42Ets-1 could indeed specifically prefer different EBS, depending on the target DNA sequence. We next analyzed which part of the exon VII-coded region was responsible for these differences.

The Val₂₈₀-Glu₃₀₂ region is responsible for the sequence-specific differences in binding to DNA.

In p42Ets-1, the residues encoded by exon VII are lacking (Gly₂₄₄ to Thr₃₃₀ in p51Ets-1). This region is critical for the auto-inhibited, compacted, state of Ets-1 when not bound to DNA (5). In this inhibited form, two exon VII-coded inhibitory helices, named HI1 and HI2 (Figure 1A), interact with helix H1 of the ETS domain and helix H4 of the carboxy-terminal part of the molecule (2,21). This packed module unfolds when Ets-1 is bound to DNA, together with a noteworthy de-structuration of helix HI1 (7). We analyzed the possible involvement of various parts of the Gly₂₄₄-Thr₃₃₀ region, as well as of the C-terminus part of p51Ets-1 in the differences in relative affinity of the protein for the Opt and Opt[C₁G] DNA sequence by producing various p51Ets-1 fragments and testing their relative binding affinity to the probes. The longer fragment used, ΔN244, contained the protein region Gly₂₄₄ to Thr₄₄₀ corresponding to the entire sequence coded by exon VII, the ETS domain and the C-terminal part of the Ets-1 (Figure 6A), it encompassed the Val₂₈₀-Asp₄₄₀ (ΔN280) fragment, which had been shown to display binding properties that were comparable to that of the full length protein (5,6,21). The other variants corresponded to successive N-terminal deletions of the exon-VII coded region which matched either sides of the HI1 and HI2 boundaries (Figure 6A). In EMSA analysis, ΔN244 displayed

similar differences in binding to the Opt and Opt[C₁G] probes than the p51Ets-1 protein (Figure 6), confirming that the regions responsible for the selection of specific DNA sequences were located in this part of the p51Ets-1 protein. Similar differences in binding were also observed with Δ N280, which corresponded to the removal of approximately 40% of the N-terminal part of the exon VII-coded region. On the other hand, Δ N303, which starts right at helix HI1, displayed much less differences in recognition of the Opt vs Opt[C₁G] probes, and further deletions, of HI1 (Δ N312) and of HI2 (Δ N334) abolished the differences in binding to Opt vs Opt[C₁G]. The deletion of helix H1 in Δ N348 abolished binding to both probes, as expected from this major disruption of the ETS domain.

Thus, part of the domain mediating the specific selection of DNA sequences between p51Ets-1 and p42Ets-1 is located within the Val₂₈₀-Gly₃₀₂ region. This region is located ahead of helices HI1 and HI2, it is not involved in the auto-inhibition mechanism as the Ets Δ 300 mutant, where most of this region has been deleted, is still auto-inhibited (7). This suggested that auto-inhibition was an independent phenomenon from the selection of specific DNA sequences. We therefore tested a variant in which the C-terminal fragment of the protein had been removed while keeping the exon VII-coded region intact (Δ C415 in Figure 6), thus creating a mutation known to release the auto-inhibition state of Ets-1 (5,22). This Δ C415 variant displayed similar differences in binding to the Opt and Opt[C₁G] DNA probes than the p51Ets-1, confirming that auto-inhibition and selection of specific DNA sequences were separate aspects in Ets-1.

Transcriptional activities of p51Ets-1 and of p42Ets-1 on the VE-cadherin promoter.

All together, the results obtained by TDA, EMSA and SPR analyses suggested the existence of at least that one specific EBS sequence is well recognized by p42Ets-1 and poorly by p51Ets-1. Such a sequence, when present in a natural gene promoter, is expected to be specifically regulated by p42Ets-1 and not by p51Ets-1. The promoter of the *VE-cadherin* gene contains two EBS, named EBS2 and EBS4, which are necessary for the basal transcription of

the gene (23). We have shown earlier that p51Ets-1 binds to EBS2 and EBS4 and that both EBSs are transcriptionally activated by p51Ets-1, EBS4 being the most important element in response to the factor (16). Although neither *VE-cadherin* EBS2 nor EBS4 sequence exactly correspond to the Opt or Opt[C₁G], EBS2 (**AGGGGAAGTG**) closely resembles the Opt[C₁G] sequence, while EBS4 (**ACAGGAAACC**) is closer to the Opt[C₁A] sequence which showed little differences in binding to p51Ets-1 when compared to p42Ets-1 (Figure 4). The *VE-cadherin* gene thus provides a natural model for testing and comparing the transcriptional activities of p51Ets-1 and p42Ets-1 in relation to the differences in DNA binding.

First, we compared the binding of p51Ets-1 and p42Ets-1 to the various *VE-cadherin* EBSs and found that both proteins bound similarly to EBS4 while binding of p42Ets-1 to EBS2 was much better than that of p51Ets-1 (Figure 7A). Binding of p42Ets-1 to the other EBSs was extremely weak (EBS5) or not detected, as already observed with p51Ets-1 (Figure 7A and (16)). These results were in accordance with our hypothesis and prompted us to test the transcriptional response of the *VE-cadherin* promoter in response to p51Ets-1 or to p42Ets-1. We found that the natural -2486/+24 fragment of *VE-cadherin* promoter was activated by p51Ets-1 and p42Ets-1 (thus showing that p42Ets-1 is an active transcription factor, Figure 7B). Activation by p42Ets-1 was almost twice of that observed with p51Ets-1 and mutation of both EBS abolished the promoter response to p42Ets-1 (-2486EBS2/4M, Figure 7B), as already observed with p51Ets-1 (16). Interestingly and in correlation with the EMSA results, inactivation of EBS4 reduced transactivation of the promoter with both factors by half (-2486EBS4M). However, when EBS2 was inactivated, only the transactivation activity of p42Ets-1 was affected by half whereas transactivation by p51Ets-1 was reduced by only 11.6% (Figure 7B), confirming that, in cells, p51Ets-1 and p42Ets-1 can differently distinguish and activate EBSs present in gene promoters based on their flanking sequence.

All together, our results show that the two Ets-1 variants are able to act as distinct transcription factors and differentially modulate the response of target genes depending on the nature of the EBS present in that gene promoter.

DISCUSSION

We have characterized the mouse p42Ets-1 isoform, which corresponds to the splicing variant known in human (10,11) and suspected in rat (12). The existence of this variant in several species suggested a potentially interesting role for the protein, particularly since the description of the specific properties of the human form: human p42Ets-1 binds better than p51Ets-1 to synthetic DNA sequences containing an EBS and p42Ets-1 is not subject to Ca⁺⁺-dependent phosphorylation (8,13) which affects p51Ets-1 DNA-binding (9). Functional studies showed that human p42Ets-1 induces colon cancer cell apoptosis (14) and interleukin-1/caspase 1 over-expression (15), whereas p51Ets-1 does not. These remarkable observations suggested that, aside from a possible different regulation by protein partners, p42Ets-1 could have a different DNA recognition site and transcriptional activity compared to p51Ets-1. Such aspects had never been studied. Analysis of the DNA-binding sequences for the mouse Ets-1 variants was first a validation of our TDA approach as, overall, the optimal ACCGGAA/TGTG binding sequence found for p51Ets-1 matched that found by others (24-26), aside from an absence of a clear preference for a A over T at base 0. Regarding the p42Ets-1 protein, aside from the similar Opt binding site, the main difference in the DNA recognition sequence with p51Ets-1 was found at base -1, where p51Ets-1 strongly favors a C, whereas p42Ets-1 is able to bind with either base (though to a lesser extent with a T). Interestingly, the binding differences of p51Ets-1 observed here are consistent with those observed using the human protein, which showed a lower binding to a GCAGGAAGTT probe (almost corresponding to Opt[C₋₁A] here) than to a GCCGGAAGTT probe (almost corresponding to Opt here) in (24). Besides, the Opt[C₋₁G] sequence recognized by p42Ets-1 closely resembles the Spi-1/PU.1 DNA recognition site (27), suggesting that p42Ets-1 may regulate Spi-1/PU.1 target genes that would not or barely be affected by p51Ets-1. Extending this idea further and combining our target detection assay results with the calculated binding parameters, our observations show

that p51Ets-1 and p42Ets-1 are able to regulate similar target genes through Opt-containing EBS. In such situation and assuming that both proteins have the same half-life, it is expected that the relative amounts of p51Ets-1 and p42Ets-1 will be in favor of a control of the EBS by p51Ets-1 because the amounts of ets-1 transcripts are much greater than those of ets-1 δ VII in all the tissue samples and cell types that we have analyzed. On the other hand, on Opt[C₁G]-containing natural EBS, the relative amounts of both proteins are not relevant anymore since p51Ets-1 would not (or barely) be able to bind to these sequences. p42Ets-1 would take control of the EBS no matter how much p51Ets-1 is present. These observations might be of major importance for the regulation of gene promoters which are sensitive to calcium regulation since, as mentioned above, the presence of the exon VII-coded protein sequence confers a strong calcium-dependent phosphorylation sensitivity to p51Ets-1 (8) and represses DNA-binding (9). This property does not exist in p42Ets-1 as the phosphorylated serine residues are missing in this variant. Thus, it is expected that the Ca⁺⁺-regulated expression of Ets-1 target genes will switch between p51Ets-1 and p42Ets-1 depending on the Ca⁺⁺ status in the cell. This is most probably what happens in the regulation of the GM-CSF promoter/enhancer, which was recently shown to be directly dependent on the phosphorylation state of serines located in the exon VII-coded region of Ets-1; the p51Ets-1 form in which these serines are phosphorylated acts as a repressor of the transcriptional activity of the promoter, whereas mutations of the serines increase the transcriptional activity of the transcription factor on the same promoter. (28). The authors suggested that p51Ets-1 might therefore act as a dominant inhibitory factor that would repress the transactivation properties of a related active factor, such as p42Ets-1. This type of regulation could also be involved in the regulation of expression of the tumor necrosis factor-related *light* gene, which is also Ca⁺⁺-sensitive and which contains identified Ets-1 binding sites (29). Unfortunately, the link between the Ca⁺⁺ stimulation and Ets-1-dependent activation of this gene has not been investigated yet, but these examples provide

strong evidence that a Ca^{++} -negative regulation of Ets-1 could play a key role in the switch of regulation of common target genes by the two forms of the factor, p42Ets-1 being a Ca^{++} -independent activator of such genes whereas p51Ets-1 activity would be Ca^{++} -repressed.

Besides, p42Ets-1 could also participate to the regulation of ETS-controlled promoters which have been shown to be finely tuned by various ETS members. The *fli-1* gene promoter is such an example as it is differently regulated by Spi-1, Ets-1 or Fli-1 itself, depending on the responding EBS (17,30). Several EBS are present in this gene promoter that display nuclear protein binding of yet unidentified ETS members (17), some of these EBS could definitely be regulated by p42Ets-1, independently from p51Ets-1.

The structure of the ETS domain and the role of the exon VII-coded region in the auto-inhibitory mechanism of p51Ets-1 have been extensively described: the ETS domain forms a winged-helix-turn-helix motif composed of helices H1, H2 and H3 which pack against a four-stranded, anti-parallel β -sheet, helix H3 contacts DNA major groove and centers over the GGAA EBS core (2-4). The exon VII-coded region contains helices HI1 and HI2 which are critical for the auto-inhibited structure when p51Ets-1 is not bound to DNA; in the inhibited, non DNA-bound form, residues Thr₃₀₃-Asp₃₁₃ form helix HI1 which packs with HI-2, with the first helix (H1) of the ETS domain and with helices H4 and H5 which lies in the carboxy-terminal region located after the ETS domain (4,7,21). When p51Ets-1 is bound to DNA, HI1 is de-structured and the interaction with the carboxy-terminal region of the protein is released, thus favoring the association of the protein with DNA (5-7). Although several studies precisely addressed the structure of the C-terminal part of the exon VII-coded region, the structure of the region located ahead of HI1 is not determined yet, it seems to be poorly structured when assessed by NMR analysis (21) and X-ray crystallography (7). This is where the Val₂₈₀-Glu₃₀₂ region involved in the selection of DNA sequence by p51Ets-1 and p42Ets-1 is located. According to the actual structure data, the involvement of Val₂₈₀-Glu₃₀₂ in a direct DNA-

recognition of base -1 seems improbable, although it cannot be excluded (4,31). The variability in DNA recognition sequences seen in the p42Ets-1 is more probably due to a major change in protein structure induced by the elimination of the exon VII-coded region. However, since the removed exon VII-coded fragment is very large and since the structure of the C-terminal two-third of it is not known, a prediction of the effects of this splicing event on the folding of the p42Ets-1 protein compared to p51Ets-1 is impossible to calculate. Precise X-ray or NMR structure studies specifically addressing p42Ets-1 bound to the Opt and Opt[C₁G] DNA sequences should answer these questions.

All our data together show that p42Ets-1 acts as transcription factor distinct from but complementary to p51Ets-1. Ets-1 variants can differentially regulate the *VE-cadherin* promoter, other reports demonstrated that p42Ets-1 was also able to induce particular cellular responses and specific gene expression (14,15), however, the role of this variant *in vivo* remains unclear. The expression of the *ets-1* gene has been associated with several aspects of the embryonic development, including vasculogenesis and angiogenesis (32-35), epithelial to mesenchyme transitions (34,36), and implantation (37). In the adult, *ets-1* is expressed in the granulation tissue during wound healing, but also in endothelial cells of solid tumors (38,39) and in the tissue stroma in reaction to tumors (40,41). *ets-1* is also expressed in haematopoietic cells (36), during the lymphoid differentiation (42) and seems to play an important role in T-cell survival (43) and the establishment of NK cells (44). In all these reports, the full length Ets-1 molecule was commonly considered to be the active form of the factor, and the role of the *ets-1*- δ VII splice variant has understandably not been addressed. It seems now definitely interesting to specifically assess the contribution of this isoform to the observed results, particularly during the embryonic development, in tumors, and also in the several analyses of the role of Ets-1 in the control of gene promoters (45,46) for reviews) which have not addressed the potential involvement of p42Ets-1.

REFERENCES

1. Ghysdael, J., and Boureux, A. (1997) in *Progress in gene expression* (Karin, M., ed) Vol. 1, pp. 29-89, 2 vols., Birkhäuser Verlag, Basel
2. Donaldson, L. W., Petersen, J. M., Graves, B. J., and McIntosh, L. P. (1996) *Embo J* **15**, 125-134.
3. Mo, Y., Vaessen, B., Johnston, K., and Marmorstein, R. (2000) *Nat Struct Biol* **7**, 292-297
4. Garvie, C. W., Hagman, J., and Wolberger, C. (2001) *Mol Cell* **8**, 1267-1276
5. Jonsen, M. D., Petersen, J. M., Xu, Q. P., and Graves, B. J. (1996) *Mol Cell Biol* **16**, 2065-2073
6. Petersen, J. M., Skalicky, J. J., Donaldson, L. W., McIntosh, L. P., Alber, T., and Graves, B. J. (1995) *Science* **269**, 1866-1869
7. Garvie, C. W., Pufall, M. A., Graves, B. J., and Wolberger, C. (2002) *J Biol Chem* **277**, 45529-45536
8. Rabault, B., and Ghysdael, J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 28143-28151
9. Cowley, D. O., and Graves, B. J. (2000) *Genes & Development* **14**, 366-376
10. Jorcyk, C. L., Watson, D. K., Mavrothalassitis, G. J., and Papas, T. S. (1991) *Oncogene* **6**, 523-532
11. Koizumi, S., Fisher, R. J., Fujiwara, S., Jorcyk, C., Bhat, N. K., Seth, A., and Papas, T. S. (1990) *Oncogene* **5**, 675-681
12. Bellacosa, A., Datta, K., Bear, S. E., Patriotis, C., Lazo, P. A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Tsichlis, P. N. (1994) *J Virol* **68**, 2320-2330
13. Fisher, R. J., Fivash, M., Casas-Finet, J., Erickson, J. W., Kondoh, A., Bladen, S. V., Fisher, C., Watson, D. K., and Papas, T. (1994) *Protein Sci* **3**, 257-266
14. Huang, C.-C., Papas, T. S., and Bhat, N. K. (1997) *Oncogene* **15**, 851-856
15. Li, R., Pei, H., and Papas, T. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3876-3881
16. Lelièvre, E., Mattot, V., Huber, P., Vandebunder, B., and Soncin, F. (2000) *Oncogene* **19**, 2438-2446
17. Lelièvre, E., Lionneton, F., Mattot, V., Spruyt, N., and Soncin, F. (2002) *J Biol Chem* **277**, 25143-25151.
18. Lionneton, F., Drobecq, H., and Soncin, F. (2001) *Protein Expr Purif* **21**, 492-499.
19. Baillat, D., Begue, A., Stehelin, D., and Aumercier, M. (2002) *J Biol Chem* **277**, 29386-29398
20. Gunther, C. V., Nye, J. A., Bryner, R. S., and Graves, B. J. (1990) *Genes Dev* **4**, 667-679
21. Skalicky, J. J., Donaldson, L. W., Petersen, J. M., Graves, B. J., and McIntosh, L. P. (1996) *Protein Sci* **5**, 296-309.
22. Lim, F., Kraut, N., Frampton, J., and Graf, T. (1992) *EMBO J.* **11**, 643-652
23. Gory, S., Dalmon, J., Prandini, M.-H., Kortulewski, T., de Launoit, Y., and Huber, P. (1998) *J Biol Chem* **273**, 6750-6755
24. Fisher, R. J., Mavrothalassitis, G., Kondoh, A., and Papas, T. S. (1991) *Oncogene* **6**, 2249-2254
25. Nye, J. A., Petersen, J. M., Gunther, C. V., Jonsen, M. D., and Graves, B. J. (1992) *Genes Dev* **6**, 975-990
26. Woods, D. B., Ghysdael, J., and Owen, M. J. (1992) *Nucl Acids Res* **20**, 699-704
27. Ray-Gallet, D., Mao, C., Tavitian, A., and Moreau-Gachelin, F. (1995) *Oncogene* **11**, 303-313
28. Liu, H., and Grundstrom, T. (2002) *Mol Biol Cell* **13**, 4497-4507

29. Castellano, R., Van Lint, C., Peri, V., Veithen, E., Morel, Y., Costello, R., Olive, D., and Collette, Y. (2002) *J Biol Chem* **277**, 42841-42851
30. Starck, J., Doubeikovski, A., Sarrazin, S., Gonnet, C., Rao, G., Skoultchi, A., Godet, J., Dusanter-Fourt, I., and Morle, F. (1999) *Mol Cell Biol* **19**, 121-135
31. Werner, M. H., Clore, G. M., Fisher, C. L., Fisher, R. J., Trinh, L., Shiloach, J., and Gronenborn, A. M. (1997) *J Biomol NMR* **10**, 317-328.
32. Vandebunder, B., Pardanaud, L., Jaffredo, T., Mirabel, M. A., and Stehelin, D. (1989) *Development* **106**, 265-274
33. Pardanaud, L., and Dieterlen-Lièvre, F. (1993) *Cell Adhesion and Communication*. **1**, 151-160
34. Quéva, C., Leprince, D., Stéhelin, D., and Vandebunder, B. (1993) *Oncogene* **8**, 2511-2520
35. Maroulakou, I. G., Papas, T. S., and Green, J. E. (1994) *Oncogene* **9**, 1551-1565
36. Kola, I., Brookes, S., Green, A. R., Garber, R., Tymms, M., Papas, T. S., and Seth, A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7588-7592
37. Grevin, D., Chen, J. H., Raes, M. B., Stehelin, D., Vandebunder, B., and Desbiens, X. (1993) *Int J Dev Biol* **37**, 519-529
38. Wernert, N., Raes, M. B., Lassalle, P., Dehouck, M. P., Gosselin, B., Vandebunder, B., and Stehelin, D. (1992) *Am J Pathology* **140**, 119-127
39. Vandebunder, B., Queva, C., Desbiens, X., Wernert, N., and Stehelin, D. (1994) *Invasion and Metastasis* **14**, 198-209
40. Wernert, N., Gilles, F., Fafeur, V., Bouali, F., Raes, M. B., Pyke, C., Dupressoir, T., Seitz, G., Vandebunder, B., and Stehelin, D. (1994) *Cancer Res* **54**, 5683-5688
41. Calmels, T. P. G., Mattot, V., Wernert, N., Vandebunder, B., and Stehelin, D. (1995) *Biol Cell* **84**, 53-61
42. Anderson, M. K., Hernandez-Hoyos, G., Diamond, R. A., and Rothenberg, E. V. (1999) *Development* **126**, 3131-3148
43. Bories, J. C., Willerford, D. M., Grévin, D., Davidson, L., Camus, A., Martin, P., Stéhelin, D., and Alt, F. W. (1995) *Nature* **377**, 635-638
44. Barton, K., Muthusamy, N., Fischer, C., Ting, C.-N., Walunas, T. L., Lanier, L. L., and Leiden, J. M. (1998) *Immunity* **9**, 555-563
45. Lelièvre, E., Lionneton, F., Soncin, F., and Vandebunder, B. (2001) *Int J Biochem Cell Biol* **33**, 391-407.
46. Oikawa, T., and Yamada, T. (2003) *Gene* **303**, 11-34

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs Philippe Huber (CEA-Grenoble, Grenoble, France) for 3T3 cells, Robert Auerbach (Univ Madison, Madison, WI) and Marco Presta (Univ Brescia, Brescia, Italy) for the MBE, MAE and EOMA cells, Annunciata Vecchi (Inst Mario Negri, Milano, Italy) for the 1G11 cells, Marc Aumercier for discussions on surface plasmon resonance and Vincent Vatin for DNA sequencing. This work was funded by the 'Association pour la Recherche sur le Cancer'. F.L. is supported by the 'Ligue Nationale contre le Cancer', F.S. is 'Chargé de Recherche de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale'.

ABBREVIATIONS

EBS; ETS binding site, EMSA; ElectroMobility-Shift Assay, RT; Reverse Transcription, PCR; Polymerase Chain Reaction, SPR; Surface Plasmon Resonance, TDA; Target Detection Assay.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Identification of the *ets-1- δ VII* transcript.

A. Top: Schematic representation of Ets-1 domains. The exon VII-coded region translates into the region (gray) located immediately ahead of the DNA binding ETS domain (black). **Bottom:** The dashed lines illustrate the splicing event. Phosphorylated serines involved in DNA-binding inhibition (8) are indicated by S. Helices (boxes) H11 and H12 located into the exon VII-coded region participate to the auto-inhibition mechanism. The first two-thirds of the exon VII-coded region have not been analyzed structure-wise. The ETS domain contains three helices (H1-H3) and four beta-stands (arrows). Helices H4 and H5 located in the C-terminal region, after the ETS domain, also participate to the auto-inhibition mechanism. Numbers indicate amino acid positions.

B. Total RNA (1 μ g) from mouse E10.5 embryo (E10.5), 3-day old pup heart and from various endothelial and fibroblast cell lines were reverse-transcribed and the cDNA (representing 62.5 ng of starting total RNA) was amplified by PCR using a set of oligonucleotides which flanked exon VII. The amplified products were analyzed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. The upper and lower products (arrows) corresponds to the *ets-1* and *ets-1- δ VII* transcripts, respectively. Numbers indicate product size in bp.

Figure 2. Expression and purification of recombinant Ets-1 variants.

Recombinant p42Ets-1 and p51Ets-1 were produced in a bacterial expression system and purified (18). **Left.** Coomassie blue staining of the purified proteins analyzed in 10% SDS-PAGE. **Right.** Proteins were detected by Western-blotting using a specific anti-Ets-1 antibody.

Figure 3. EMSA analysis of p42Ets-1 binding to DNA.

EMSA was performed using recombinant p42Ets-1 and a specific ^{32}P -labeled double-stranded MSV-LTR DNA probe. Binding of p42Ets-1 (arrowhead) was specific as it was competed for in the presence of a 25-fold molar excess of unlabelled probe (wt) and not by a 100-fold molar excess of mutated probe (mt). p42Ets-1 was super-shifted in the presence of anti-Ets-1 antibody (SS). The antibody had no effect on the migration of the probe in the absence of p42Ets-1 (Ab). f; free probe.

Figure 4. Comparative binding of p51Ets-1 and p42Ets-1 to various DNA sequences.

p51Ets-1 and p42Ets-1 (82 pmoles) were mixed with approx 2 ng of ^{32}P -labeled EBS probes corresponding to Opt (top panel) or various mutations of it, as indicated, and analyzed by EMSA. Both proteins bound equally well to the Opt probe whereas p42Ets-1 (*) bound much better to the Opt[C₋₁G] and to Opt[C₋₁T] than p51Ets-1 (arrowhead). -; no Ets-1 protein added.

Figure 5. SPR analysis of p51Ets-1 and p42Ets-1 binding to Opt and Opt[C₋₁G].

A. Low concentration (2 nM) injection of p51Ets-1 (thin line) and p42Ets-1 (thick line) over a sensor chip functionalised with Opt and Opt[C₋₁G] oligonucleotides, was performed during 120 s, followed by a 240 s buffer injection (start indicated by arrow) to monitor the complex dissociation. Only the first 120 s of dissociation are displayed, mutated oligonucleotides were used as reference for non-specific binding.

B. Higher concentrations (10 nM) of p51Ets-1 (thin line) and p42Ets-1 (thick line) were injected over the same sensor chip and under the same running conditions as in A.

Figure 6. Analysis of the protein region involved in DNA sequence recognition.

A. Schematic representation of the various p51Ets-1 truncated mutants used in B.

B. EMSA analysis of the binding of the p51Ets-1 mutants to the Opt and Opt[C₋₁G] probes. Equivalent amounts of proteins were incubated with either ^{32}P -labeled Opt or Opt[C₋₁G] probe and analyzed for binding in EMSA conditions. The $\Delta\text{N}244$ and $\Delta\text{N}280$ mutants display the

same differences in binding to the Opt compared to Opt[C₁G] probes than p51Ets-1, whereas the Δ N303 and Δ N312 and Δ N334 mutants behave progressively like p42Ets-1. Δ N348 has lost its DNA binding capabilities as a result of the removal of helix H1 of the ETS domain. The Δ C415 mutant displays the same differences in binding as the p51Ets-1, confirming that auto-inhibition and selection of specific DNA sequences are separate functions.

Figure 7. Binding to and transactivation of the *VE-cadherin* gene promoter.

A. EMSA analysis of binding of p51Ets-1 and p42Ets-1 to the various EBS of the *VE-cadherin* promoter. Recombinant Ets-1 proteins (82 pmoles) were incubated with ³²P-oligonucleotide probes corresponding to the five identified EBS present in the proximal promoter of the *VE-cadherin* gene and the complexes separated by native PAGE. Binding to EBS2 is comparable for both proteins whereas p42Ets-1 (arrowhead) binds much better to EBS4 than p51Ets-1 (star). Binding to the other EBS is weak or not detected.

B. 3T3 cells were transfected with 2.4 fmoles pcDNA3 control vector (Ctrl, empty bars), pTag-p51Ets-1 (gray bars), or pTagp42Ets-1 (black bars), with 55.2 fmoles of wild-type *VE-cadherin* reporter vector (-2486/+24), or mutated version on EBS2 (-2486EBS2M), on EBS4 (-2486EBS4M), or on both (-2486EBS2/4M), and together with 22.6 fmoles of pCH110 normalization vector. Two days later, the cells were lysed and the luciferase and β -galactosidase activities measured.

Table 1. TDA analysis of p51Ets-1 (top) and p42Ets-1 (bottom) DNA binding sites.

		p51Ets-1									
	-3	-2	-1	G	G	A	0	+1	+2	+3	
G	3	0	0				0	36	3	29	
A	38	2	4				20	7	2	8	
T	2	3	3				26	2	37	5	
C	3	41	39				0	1	4	4	
	A	C	C	G	G	A	A/T	G	T	G	

		p42Ets-1									
	-3	-2	-1	G	G	A	C	+1	+2	+3	
G	8	4	0				0	41	6	16	
A	31	2	19				24	11	2	11	
T	12	1	0				33	1	36	9	
C	6	50	38				0	4	13	21	
	A	C	C/a	G	G	A	A/T	G	T	C/G	

Numbers in boldface correspond to the base position respective to the GGA EBS core.

The results of both TDA have been combined. The deduced consensus sequence is shown at the bottom.

Table 2. Kinetic parameters of the interaction of Ets-1 proteins with Opt and Opt[C₁G].

Analyte	Ligand	k_a ($\times 10^4$) $\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$	k_d ($\times 10^2$) s^{-1}	k_t ($\times 10^3$)	K_D nM	χ^2
p51 Ets-1	Opt	1260 ± 55	1.62 ± 0.07	1.83 ± 0.03	1.29 ± 0.08	3.13
	Opt[C ₁ G]	535 ± 55	16.1 ± 0.13	1.13 ± 0.05	30.1 ± 4.5	0.778
p42 Ets-1	Opt	1380 ± 41	0.77 ± 0.02	1.88 ± 0.03	0.56 ± 0.02	1.59
	Opt[C ₁ G]	1960 ± 111	4.88 ± 0.28	1.67 ± 0.03	2.49 ± 0.20	0.671

The SPR data set composed of two curves for each concentration (1, 2, 5 and 10 nM) were fitted with Biaeval3.1® software using the pre-established 1:1 binding with mass transfer model. k_a , kinetic association constant, k_d kinetic dissociation constant, k_t mass transfer parameter, K_D equilibrium dissociation constant ($K_D = k_d/k_a$), χ^2 standard statistical measure of the closeness of the fit.

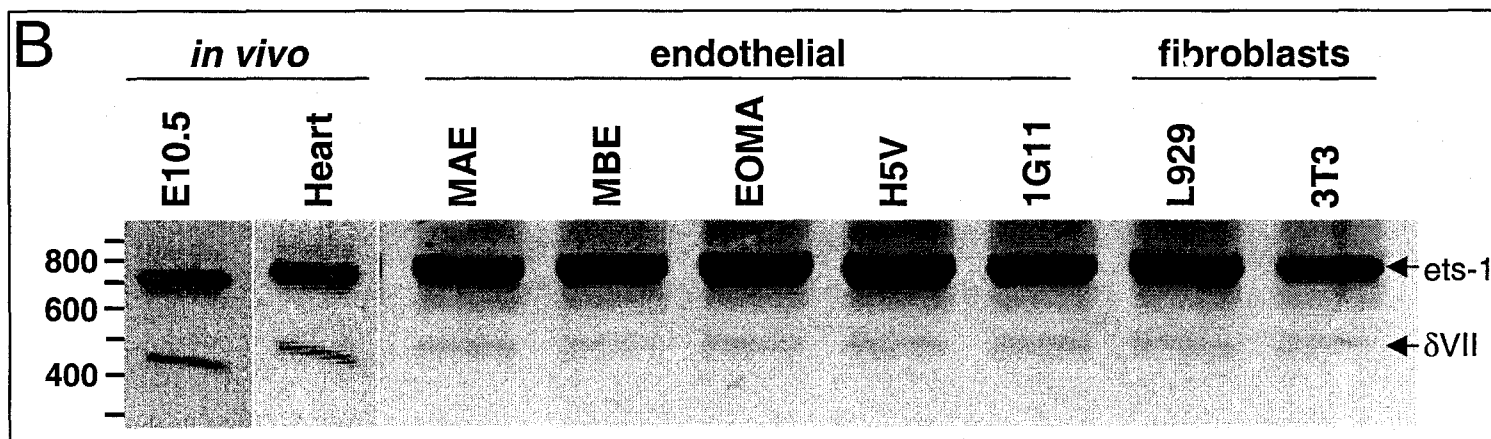
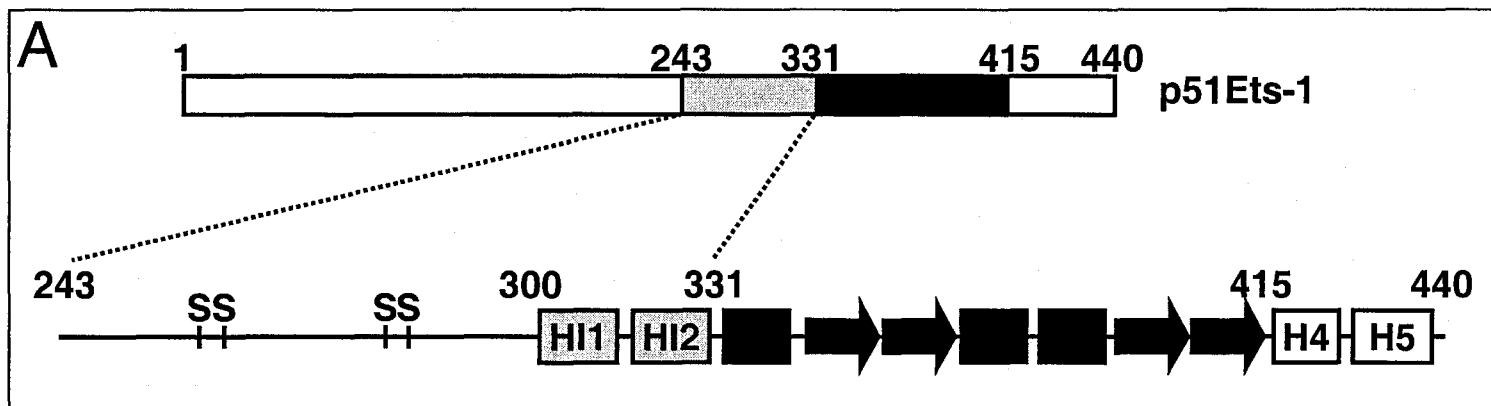


Figure 1
Lionneton et al.

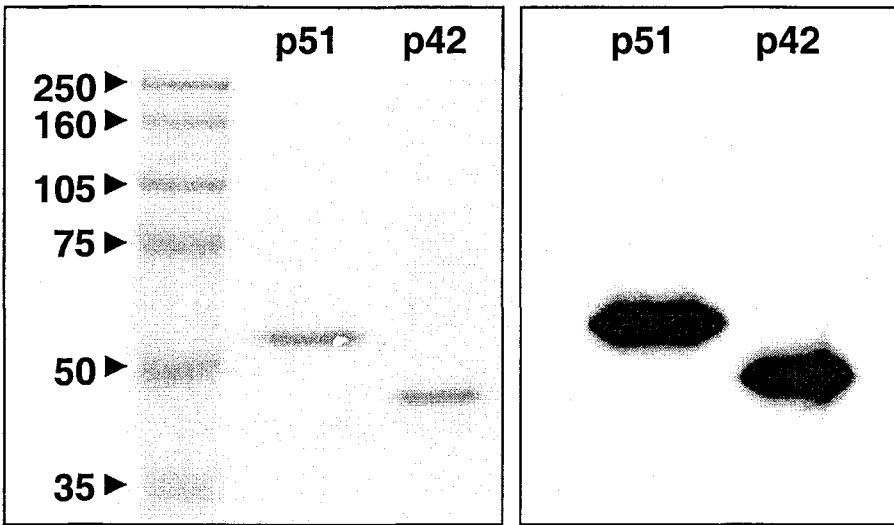


Figure 2
Lionneton et al.

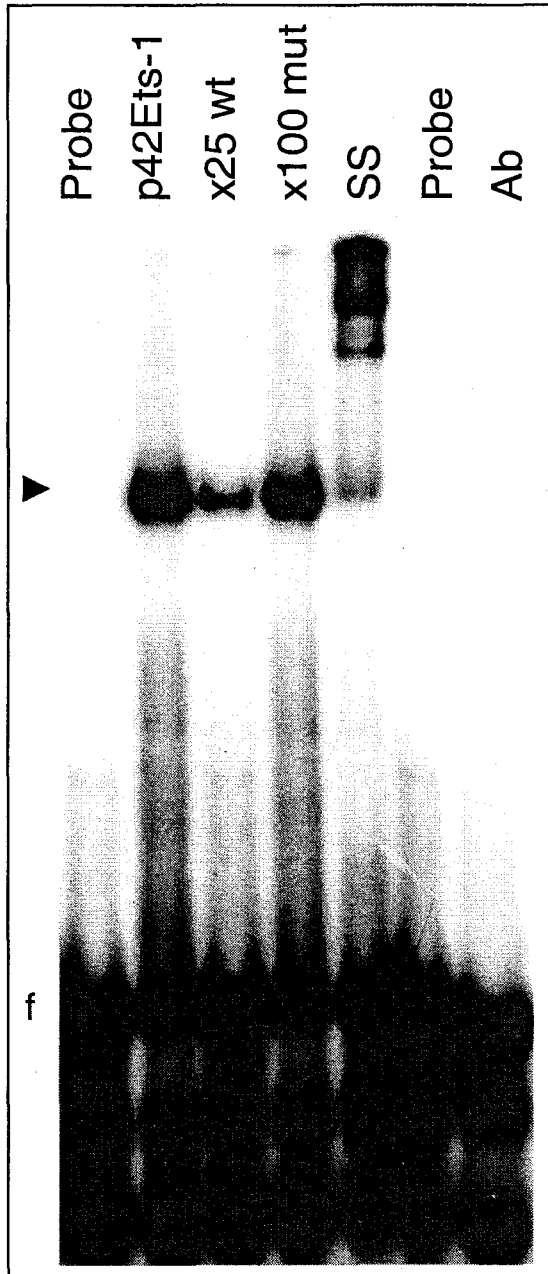


Figure 3
Lionneton et al.

	-				+		
	3	2	1	0	1	2	3
Opt	A	C	C	GGAA	G	T	G

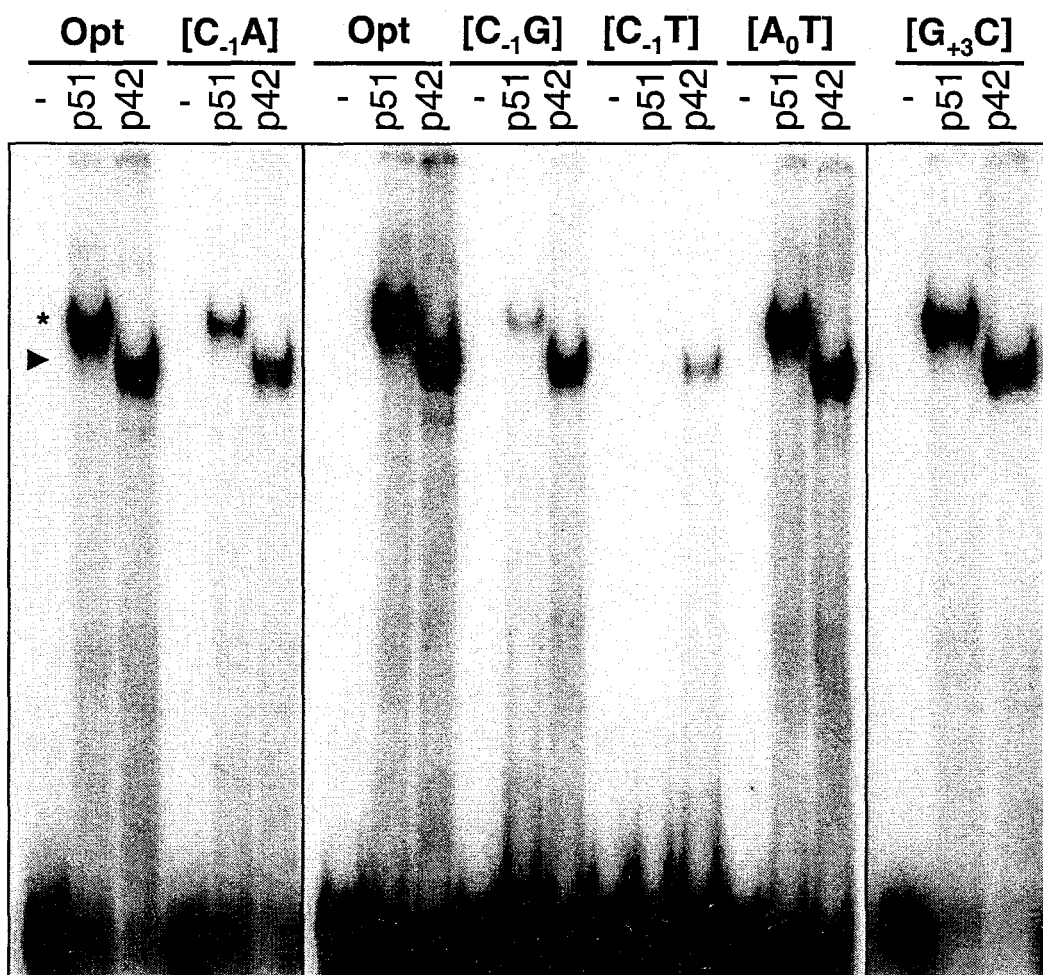


Figure 4
Lionneton et al.

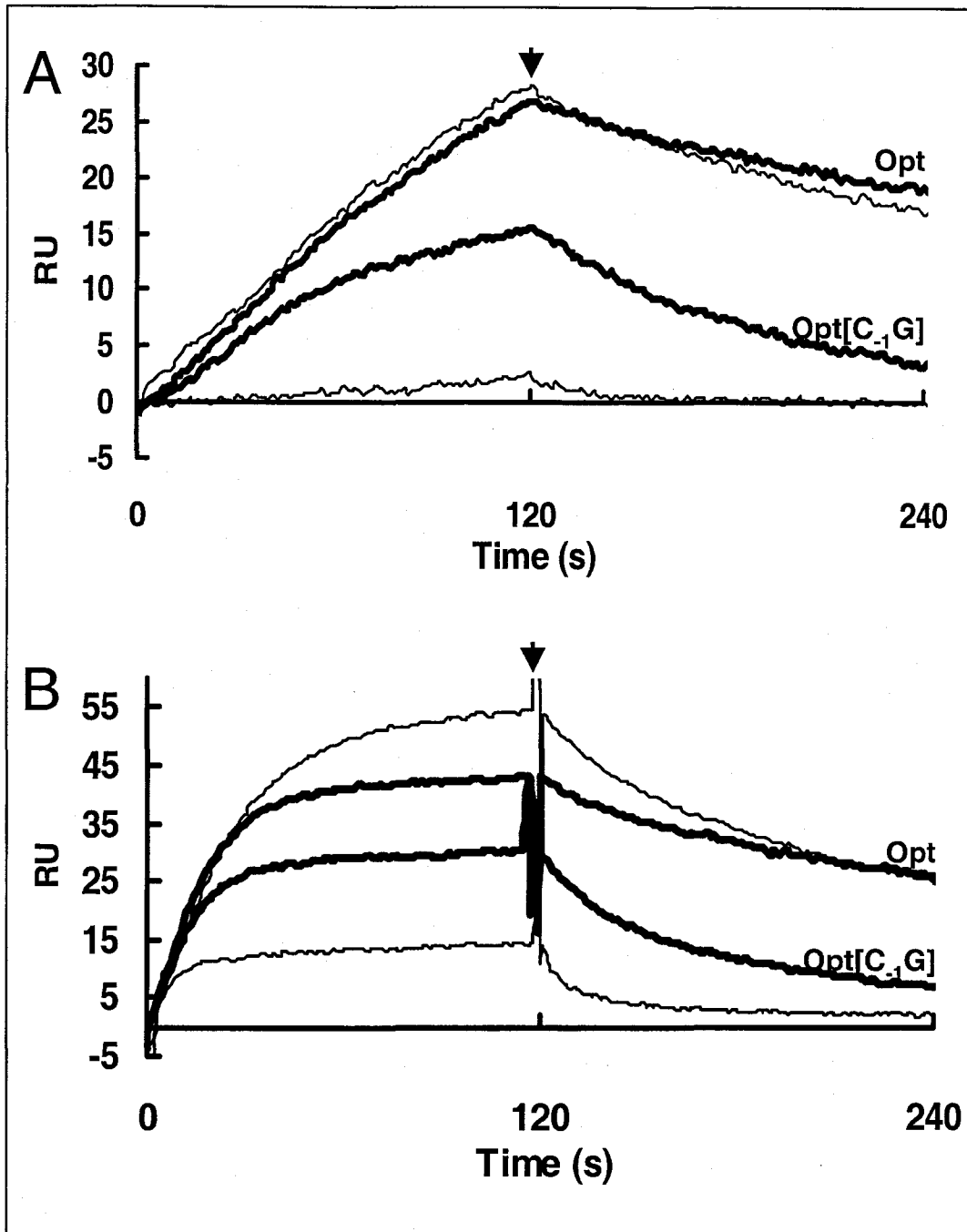
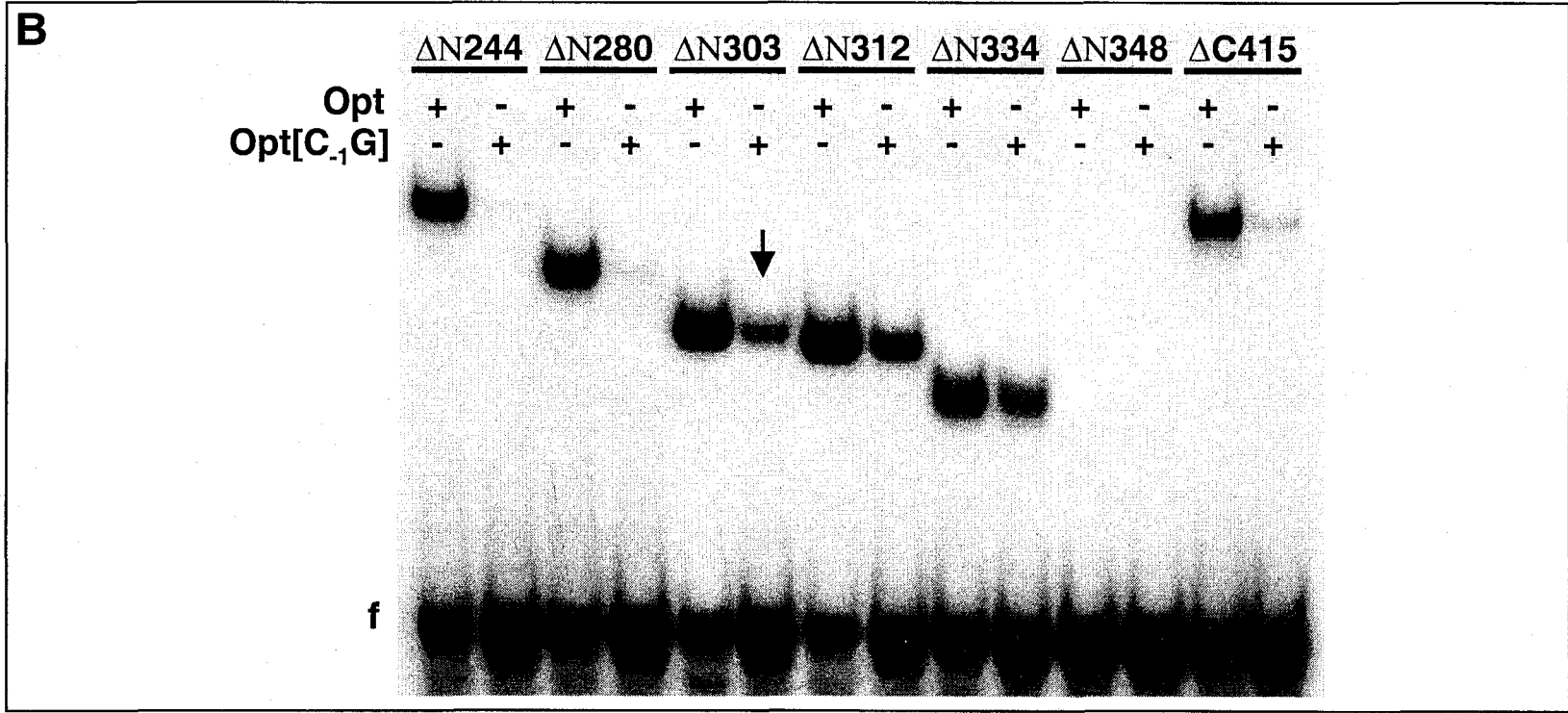
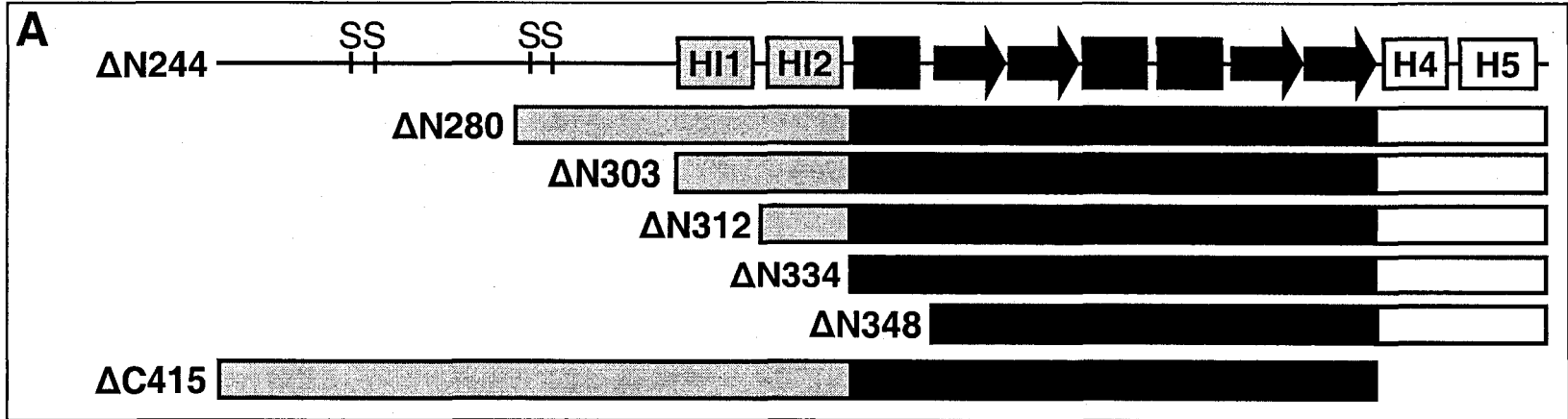


Figure 5
Lionneton et al.

Figure 6
Lionneton et al.



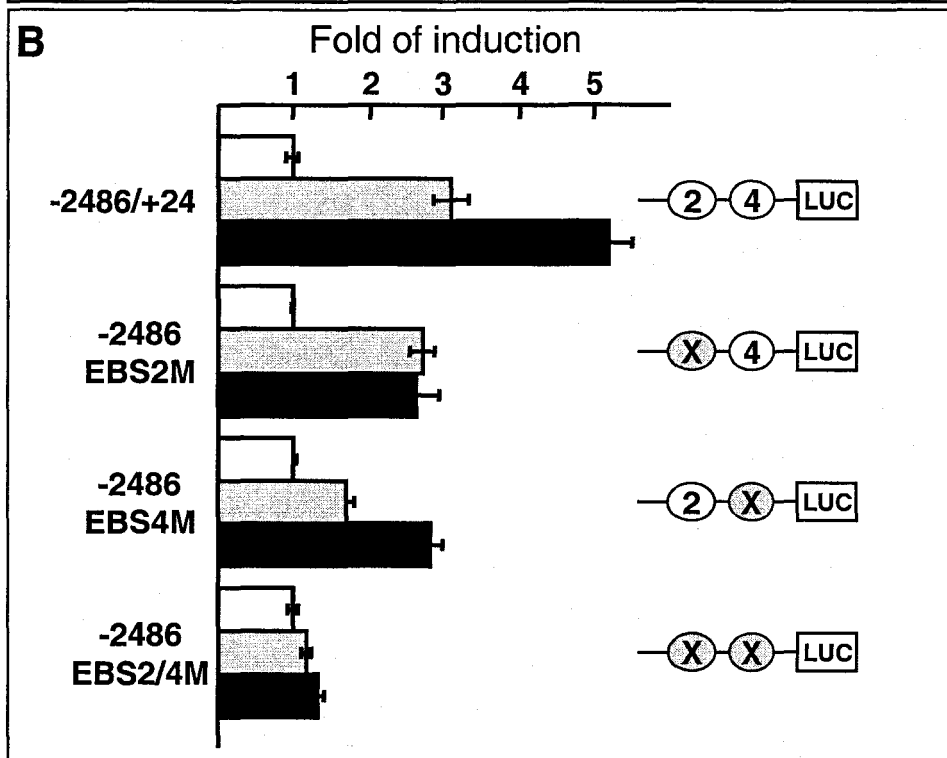
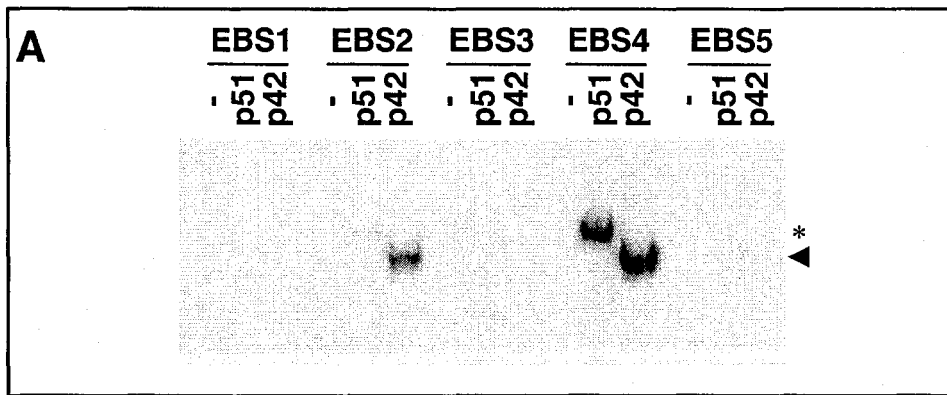


Figure 7
Lionneton et al.

II.2 Discussion

Ces résultats présentent un intérêt particulier puisqu'ils suggèrent que p42Ets-1 est un facteur de transcription à part entière, susceptible de transactiver des gènes cibles différents de p51Ets-1 et donc de jouer son propre rôle dans les différents mécanismes cellulaires. L'activité de p42Ets-1 n'étant plus régulée par la phosphorylation dépendante du calcium, cette isoforme de Ets-1 pourrait jouer un rôle important dans la régulation de gènes dont l'expression est dépendante de la concentration de calcium intracellulaire. Le calcium est un second messager dont la variation de concentration a pour effet d'activer ou de réprimer l'expression de certains gènes. Cette hypothèse est étayée par des données récentes rapportant que l'activité du promoteur/enhancer GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) est régulée par la concentration de Ca^{++} intracellulaire. L'augmentation de calcium intracellulaire a pour effet d'activer le promoteur/enhancer GM-CSF. Dans ce modèle, la mutation des sérines présentes dans l'exon VII de Ets-1 a pour effet de favoriser la transactivation de ce promoteur/enhancer. p51Ets-1 pourrait agir comme un dominant négatif et ainsi réprimer l'activité de p42Ets-1 (Liu and Grundstrom, 2002). Actuellement, le contrôle de l'activité de p42Ets-1 n'est pas encore connu. Cette isoforme ne possède donc pas de complexe d'inhibition fonctionnel et n'est plus régulée par la phosphorylation dépendante du calcium. Nous pouvons donc nous demander par quels mécanismes le contrôle de son activité s'effectue. Nous pouvons penser que la régulation de son activité se fait par l'intermédiaire du domaine *Pointed* ou du domaine ETS par des interactions protéine-protéine.

Lors de ce travail, la région responsable de la différence de reconnaissance de l'ADN observée entre p42Ets-1 et p51Ets-1 a été cartographiée. Cette région est localisée en amont de l'hélice HI-1 entre la Val₂₈₀ et la Glu₃₀₂. Des études structurales ont montré que cette région ne présente pas de structure secondaire particulière. Ceci suggère que ce fragment n'agit pas directement dans la reconnaissance de l'ADN mais que son absence pourrait entraîner une restructuration du domaine de fixation à l'ADN. La nouvelle conformation adoptée par le domaine ETS pourrait donc lui permettre d'être moins sélectif lors de sa fixation à l'ADN. Il est intéressant de noter que le complexe d'inhibition ne joue en rien un rôle dans la spécificité de reconnaissance de p51Ets-1. En effet, la présence d'un complexe d'inhibition non fonctionnel ne permet pas au mutant de Ets-1 de reconnaître des EBS plus variés. Nous avons également montré qu'il existait une relation entre la capacité de fixation de

ces deux isoformes et leur capacité à activer le promoteur du gène de la *VE-cadhérine*. p42Ets-1 régule l'activité du promoteur de la *VE-cadhérine* différemment de p51Ets-1.

III HIF-2 α régule l'activité du promoteur de la *VE-cadhérine* en hypoxie

De nombreux éléments de réponse à l'hypoxie (HRE putatifs) sont présents dans le fragment -2486/+24 du promoteur de la *VE-cadhérine*. Afin d'évaluer la relation qui existe entre la présence de ces HRE et l'activation éventuelle du gène de la *VE-cadhérine* par l'hypoxie, nous avons analysé les variations d'expression de la *VE-cadhérine* en conditions d'hypoxie dans les cellules endothéliales H5V et les fibroblastes NIH3T3. L'expression du gène de la *VE-cadhérine* est effectivement induite par le manque d'oxygène (figure 1), comme le *VEGF*, dont l'analyse des variations d'expression nous a permis de vérifier l'efficacité de notre modèle expérimental d'hypoxie.

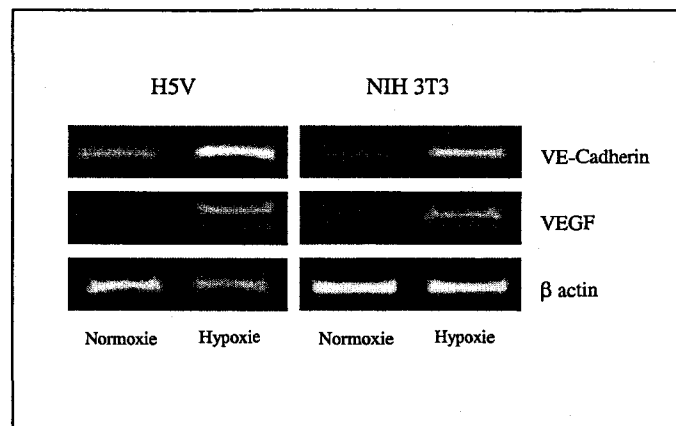


Figure 1. Analyse par RT-PCR de l'expression de la *VE-cadhérine* dans les H5V ou les NIH3T3 cultivées en normoxie ou en hypoxie. L'analyse de l'expression de la *VE-cadhérine*, de la β -actine et du *VEGF* a été réalisée à partir d'ARN totaux extraits à partir des cellules cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant 16 heures.

Afin d'évaluer le rôle de HIF-1 α et HIF-2 α dans ce contrôle d'expression de la *VE-cadhérine*, nous avons réalisé des expériences de co-transfection de fibroblastes NIH3T3 avec des doses croissantes (de 10 à 250ng) de vecteur d'expression HIF-1 α ou HIF-2 α et d'un vecteur rapporteur dont l'expression de la luciférase est sous contrôle de la région promotrice -2486/+24 du gène de la *VE-cadhérine*. HIF-2 α transactive la zone promotrice -2486/+24 du gène de la *VE-cadhérine* de manière dose dépendante (figure 2B) alors qu'aucune variation d'activité n'est détectée en présence de HIF-1 α utilisé à des doses équivalentes (figure 2A).

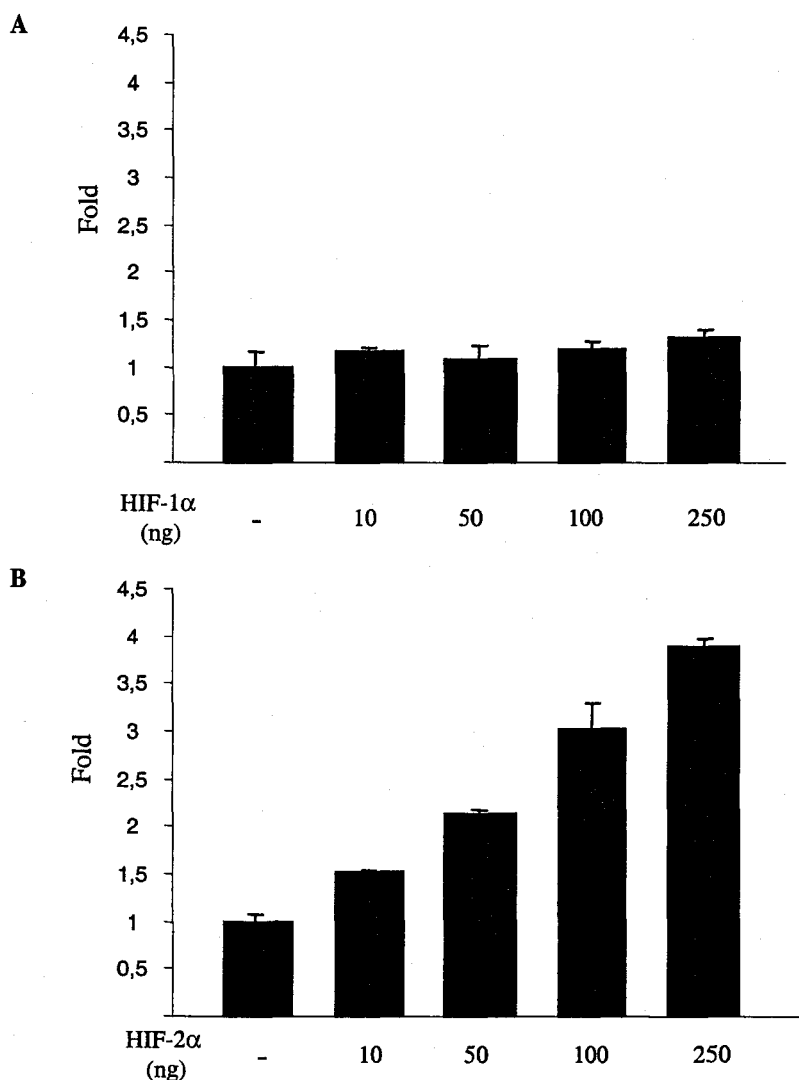


Figure 2. Activation différentielle de la partie promotrice -2486/+24 du gène de la *VE-cadhérine* par les facteurs de l'hypoxie HIF-1 α (A) et HIF-2 α (B). Les cellules NIH3T3 ont été ensemencées la veille en plaques 6 puits à une densité de 10000cellules/cm². Ces cellules ont été transfectées avec des quantités croissantes de vecteur exprimant HIF-1 α ou HIF-2 α (de 10 à 250ng), 55,2 fmol du vecteur rapporteur pGL3b Luc contenant la partie promotrice -2486/+24 du gène de la *VE-cadhérine* et 22,6 fmol de vecteur normalisateur pCH110. Les activités de la luciférase et de la β -galactosidase sont mesurées 48h après transfection.

Dans la région -2486/+24, nous avons localisé trois HRE putatifs individuels (appelés 1, 5 et 6), deux HRE 2 et 3 disposés en tête-bêche ainsi qu'une répétition de dix HRE nommés 4x10. Nous avons réalisé différentes délétions du promoteur afin de déterminer les régions promotrices impliquées dans la régulation de l'activité par HIF-2 α . Les tests de transactivation suggèrent que les zones localisées entre les positions -2486/-2113, -2113/-1729 et -1534/-833 sont nécessaires pour l'activation du promoteur de la VE-cadhérine par HIF-2 α (figure 3). Les régions -2485/-2113 et -2113/-1729 contiennent un seul élément de réponse à l'hypoxie (respectivement HRE 6 et 5) alors que la région -1534/-833 contient deux HRE 2 et 3 disposés en tête-bêche. Afin de mesurer l'importance de chaque HRE dans la réponse du promoteur à HIF-2 α nous avons muté individuellement les HRE 1, 5 et 6 et délété les deux HRE 2 et 3 ainsi que la répétition des 4x10 HRE et testé ces différentes constructions en réponse à HIF-2 α . Une diminution de 27% d'activité est observée lorsque le HRE 6 est muté et une perte d'activité de 62% se produit quand la série des 4x10 HRE est manquante (figure 4). Ces expériences laissent suggérer que HRE 6 et les 4x10 HRE jouent un rôle dans l'activation du promoteur de la VE-cadhérine par HIF-2 α . En revanche, l'analyse de l'ensemble des résultats ne nous permet pas de définir le degré d'implication des HRE 2 et 3 dans l'activation du promoteur de la VE-cadhérine.

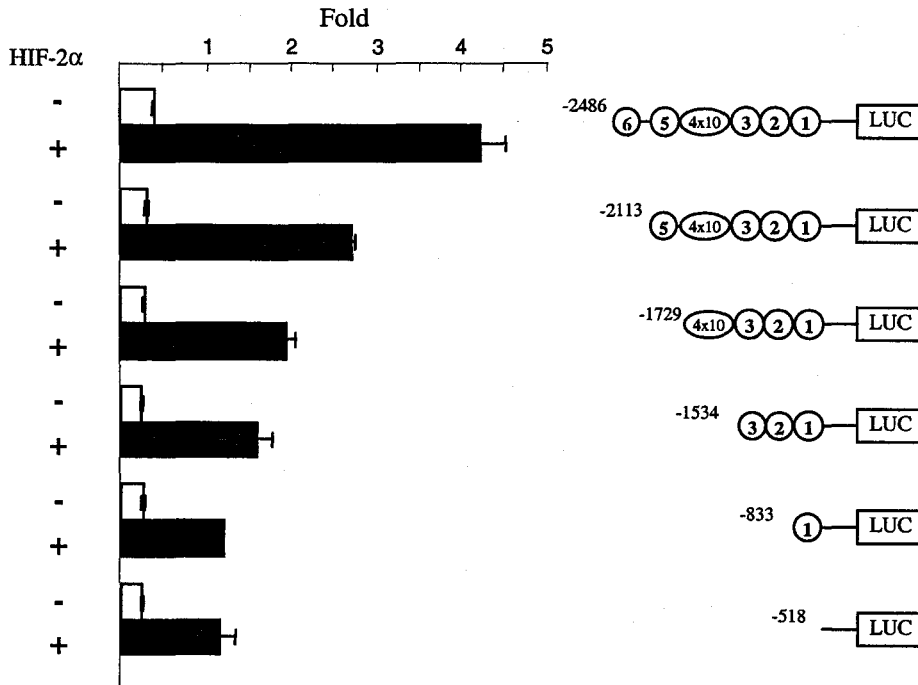


Figure 3. Des cellules NIH3T3 ont été transfectées avec (+) ou sans (-) pCDNA3 HIF-2 α 50,4 fmol, 55,2fmol des différents mutants de délétions et avec le vecteur normalisateur pCH110 (22,6 fmol). 48 heures après, les cellules sont lysées et les activités de la luciférase et de la β -galactosidase sont mesurées.

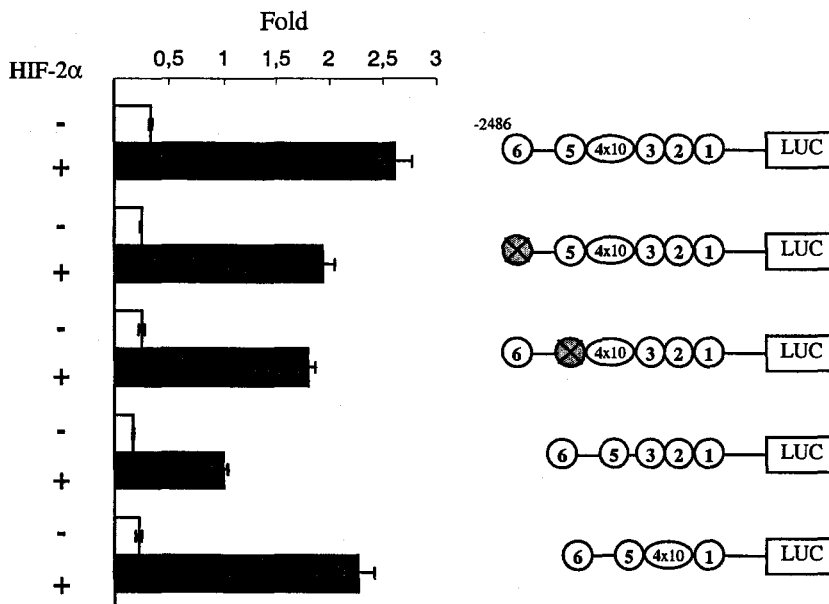


Figure 4. Les fibroblastes NIH3T3 sont transfectés avec 55,2 fmol des différents vecteurs contenant les mutations ou les délétions des différents HRE, 50,4 fmol de pCDNA3 HIF-2 α et 22,6 fmol de normalisateur pCH110. Les cellules sont lysées 2 jours après transfection et les activités de la luciférase et de la β -galactosidase sont mesurées.

III.1 Commentaires

Nous avons montré que l'expression de la VE-cadhérine est augmentée en condition d'hypoxie. Mais quand est-il de la protéine ? En réalisant des immuno-blots anti-VE-cadhérine sur des cellules cultivées en normoxie ou en hypoxie nous pourrions vérifier s'il existe bien une corrélation entre l'augmentation du niveau d'ARNm et celui de la protéine. Nous avons pu démontrer que la région promotrice -2486/+24 de la VE-cadhérine était activée par le facteur de transcription HIF-2 α et non par HIF-1 α . Comme nous avons pu le constater, il est difficile d'identifier les HRE impliqués dans l'activation du promoteur de la VE-cadhérine par HIF-2 α . Afin de déterminer les différents HRE susceptibles d'être reconnus par HIF-2 α , nous pourrions réaliser des expériences d'empreinte à la DNase et de retard sur gel. Ces différentes expériences nous permettront de définir les HRE fonctionnels intervenant dans l'activation du promoteur de la VE-cadhérine par HIF-2 α .

Il est intéressant de noter que HIF-2 α et la VE-cadhérine sont deux molécules dont l'expression est spécifiquement ou quasi spécifiquement restreinte aux cellules endothéliales. D'autre part, le fragment -2486/+24 du promoteur de la VE-cadhérine s'avère suffisant pour diriger l'expression dans l'endothélium du transgène lors d'expériences de transgénèse chez la souris (Gory et al., 1999). Ces résultats suggèrent que des facteurs de transcription dont l'expression est spécifiquement endothéliale sont capables de fixer et transactiver cette partie promotrice. HIF-2 α ayant une expression liée à l'endothélium, nous pouvons penser que ce facteur peut jouer un tel rôle dans le contrôle de la spécificité d'expression de la VE-cadhérine. Pour confirmer cela, l'utilisation de ce fragment -2486/+24 en transgénèse et la mutation des différents HRE fonctionnels, permettrait de définir l'implication de HIF-2 α dans le contrôle de l'expression de la *VE-cadhérine* dans les cellules endothéliales.

Au cours de ce travail nous avons été confrontés à quelques problèmes expérimentaux. En effet, aucun modèle d'hypoxie n'était disponible au laboratoire. Il a donc fallu mettre en place le matériel puis développer et mettre au point un protocole nous permettant de standardiser et de vérifier l'efficacité de nos conditions d'hypoxie. Nous avons ainsi cloné la partie promotrice du gène du *VEGF* contenant ou non les HRE décrits dans la littérature pour répondre aux facteurs hypoxiques (Forsythe et al., 1996; Levy et al., 1995). Ces mises aux points ont été réalisées sur des cellules HEK293 et NIH 3T3 transfectées avec le promoteur du gène du *VEGF*. En effet, les cellules HEK293 sont fréquemment utilisées lors d'études sur les facteurs de l'hypoxie et semblent donc présenter toute la machinerie nécessaire à une réponse

à l'hypoxie. Dans un premier temps, nous avons utilisé l'ion cobalt afin de mimer les conditions d'hypoxie. Comme aucune variation d'activité n'a été détectée entre les cellules traitées avec le cobalt et les non traitées, nous avons alors utilisé un caisson à hypoxie rempli avec un mélange 95% azote et 5% CO₂. Dans ce modèle, nous avons pu observer une augmentation de l'activité du promoteur du gène du *VEGF* lorsque les cellules transfectées sont cultivées en hypoxie par rapport à celles cultivées en normoxie.

Un second problème expérimental réside dans la détection des protéines HIF-1 α et HIF-2 α dans les extraits cellulaires ou nucléaires de cellules transfectées avec un vecteur exprimant ces protéines. L'utilisation d'anti-corps spécifiques dirigés contre HIF-1 α ou HIF-2 α lors d'immunoblot ne nous a pas permis de détecter ces protéines. Ce problème est toujours d'actualité et de nombreuses mises au point restent encore à effectuer.

IV Ets-1 régule l'expression du gène *fli-1* dans les cellules endothéliales

Au cours de ma thèse, j'ai participé à l'identification des gènes cibles de Ets-1 dans les cellules endothéliales. Ets-1 est un facteur de transcription de la famille ETS impliqué notamment dans l'angiogenèse. En effet, pendant le développement embryonnaire du poulet, le transcrit de *ets-1* est détecté dans les cellules de l'aire opaque qui formeront ultérieurement les îlots sanguins extra-embryonnaires. Durant la suite du développement, l'ARNm de *ets-1* est présent dans les cellules endothéliales qui forment les néo-vaisseaux sanguins et son expression diminue lorsque les vaisseaux deviennent matures. Chez la souris, *ets-1* est également observé dans les cellules endothéliales des vaisseaux nouvellement formés. Chez l'adulte, l'expression de *ets-1* est restreinte aux cellules endothéliales impliquées dans l'angiogenèse lors des processus de cicatrisation et de développement tumoral. Pour réaliser cette étude, Ets-1 a été sur-exprimé dans des cellules endothéliales et des fibroblastes de souris. Les cellules endothéliales étant réfractaires aux techniques de transfections classiques, une approche rétrovirale a été utilisée. Les cellules ont été infectées avec un rétrovirus de type Moloney dans lequel l'ADNc de Ets-1 a été cloné. A l'aide de cet outil, le groupe avait mis en évidence un nouveau gène cible de Ets-1 dont l'expression est restreinte aux cellules endothéliales, la VE-cadhérine (Lelièvre et al., 2000).

Le niveau d'expression de certains gènes endothéliaux ou intervenant dans la régulation de l'angiogenèse tels que le VEGF et ses récepteurs Flt-1 et Flk-1, les récepteurs Tie-1 et Tie-2, l'éphrine B2 et un de ses récepteurs l'EphB4, les molécules d'adhésions PECAM-1 et ICAM-2, la thrombospondine-1, l'uPA, CD13, Egr1 et les facteurs de

transcription de la famille ETS, Fli-1, Ets-2, Erg et Tel, a été analysé par RT-PCR. Sur l'ensemble de ces gènes, seule l'expression de l'ARNm codant pour fli-1 est augmentée lorsque Ets-1 est sur-exprimé. Cette augmentation est seulement observée dans les cellules endothéliales (MBE et IBE) et non dans les fibroblastes (NIH3T3). Ces résultats suggèrent que l'expression du messager de fli-1 est régulée par Ets-1 dans les cellules endothéliales et non dans les fibroblastes.

Le gène *fli-1* possède trois promoteurs distincts donnant naissance à trois types de transcrits. Deux transcrits ont leurs sites d'initiation localisés en -204 et -398 par rapport à l'ATG +1. Ces deux isoformes codent pour une protéine de 51kDa. Le troisième transcrit initié en -1842 subit un épissage de la région codant pour l'exon 1 et donne une protéine plus courte dans sa partie amino-terminale appelée Fli-1b de 48kDa. Dans les cellules endothéliales sur-exprimant Ets-1, l'analyse par RT-PCR du transcrit fli-1 détecté montre qu'il est majoritairement initié en -398. De plus, des expériences d'immuno-précipitation montre que la sur-expression de l'ARNm de fli-1 est corrélée à une augmentation du niveau de protéine Fli-1 (51kDa).

Une région du promoteur de Fli-1 d'environ 3,4kbp qui s'étend de -2437 à +954 a été clonée. Cette région répond à Ets-1 en tests de transactivation environ deux fois. Par une série de délétion réalisée depuis la partie 5', deux régions promotrices responsables de l'induction de Fli-1 par Ets-1 ont été localisées entre -986/-505 et -270/-41. Dans la zone -270/-41, deux EBS (EBS1 et EBS2) répondant au facteur de transcription Spi-1 avaient déjà été décrits (Starck et al., 1999). Malgré la mutation de ces deux EBS, une activité résiduelle est observée lors des tests de transactivation en présence de Ets-1. L'analyse des séquences de la partie promotrice -270/-41 révèle la présence de deux autres EBS putatifs (EBS3 et EBS4). Des expériences de retard sur gel montrent que seul l'EBS3 est reconnu par Ets-1. La mutation cumulée de l'EBS1, l'EBS2 et l'EBS3 inhibe complètement l'activation de Fli-1 par Ets-1.

La région -986/-505 n'a jamais été étudiée auparavant. L'analyse de séquence de ce fragment révèle la présence de trois EBS isolés nommés EBS D, E, F et d'une région de 12 EBS successifs dans laquelle trois sortes d'EBS sont distinguées, les EBS A, B, C. Les expériences d'empreinte à la Dnase I montre que la protéine recombinante Ets-1 est capable de protéger les EBS ABC, D, F et pas l'EBS E. En retard sur gel, la protéine recombinante Ets-1 n'est pas capable de fixer les EBS A et C mais reconnaît les EBS B, D, F. L'importance de ces EBS dans l'activation du promoteur de Fli-1 par Ets-1 a été testé en tests de transactivation. Les résultats obtenus révèlent que la délétion de la région contenant les 12 EBS successifs ou, celles contenant les EBS D et F entraîne respectivement une diminution de

29% et 37% de l'activation du promoteur par Ets-1, l'activité résiduelle étant due à la présence de la région -270/-41. Pour la première fois, nous avons décrit l'existence d'EBS fonctionnels dans la région promotrice de *fli-1* -986/-505.

Afin de vérifier si Ets-1 présent dans les extraits nucléaires de cellules endothéliales H5V est capable de se fixer aux EBS identifiés, des expériences de retard sur gel ont été réalisées. L'utilisation d'anticorps anti-Ets-1 et anti-Fli-1 montre que les complexes formés par Ets-1 sont légèrement déplacés alors que ceux formés avec Fli-1 le sont fortement. Fli-1 est donc capable de fixer les EBS présents dans son promoteur. Des expériences de transactivation révèlent que Fli-1 est capable d'activer son propre promoteur. La délétion de la partie -986/-505 contenant les EBS A-F entraîne une diminution de 40% de son activité. Dans la partie -270/-41, la mutation de l'EBS1 entraîne une très légère diminution de l'activité de Fli-1 alors que celle de l'EBS2 engendre une perte de 50% de l'activité. Comme pour Ets-1 la mutation de l'EBS1 et de l'EBS2 n'abolit pas totalement la réponse de Fli-1 et seule la triple mutation EBS1/2/3 entraîne la perte totale de l'activité.

IV.1 Article 3

Etienne Lelièvre, Frédéric Lionneton, Virginie Mattot, Nathalie Spruyt, and Fabrice Soncin
Ets-1 regulates fli-1 expression in endothelial cells. Identification of ETS binding sites in the fli-1 promoter

Journal of Biological Chemistry 2002 Jul 12;277(28):25143-51

Ets-1 Regulates *fli-1* Expression in Endothelial Cells

IDENTIFICATION OF ETS BINDING SITES IN THE *fli-1* GENE PROMOTER*

Received for publication, February 18, 2002, and in revised form, April 19, 2002
Published, JBC Papers in Press, May 3, 2002, DOI 10.1074/jbc.M201628200

Etienne Lelièvre, Frédéric Lionneton, Virginie Mattot, Nathalie Spruyt, and Fabrice Soncin†

From CNRS UMR 8526, Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, 59021 Lille Cedex, France

To understand the role of the Ets-1 transcription factor during angiogenesis, we have overexpressed it in endothelial cells and analyzed the levels of expression of several candidate target genes involved in angiogenesis. The transcripts levels of the ETS transcription factor *fli-1* are specifically up-regulated in endothelial cells, which overexpress Ets-1, but not in fibroblasts. Analysis of the promoter of the mouse *fli-1* gene reveals that the 1-kb region that comprises the transcription starts and part of exon 1 is responsible for the response of the promoter to Ets-1. The -270/-41 fragment contains two known Spi-1-responding Ets binding sites (EBS), which are also necessary for the activation by Ets-1. In contrast to Spi-1, a third EBS is necessary for the full response of this promoter fragment to Ets-1. The rest of the promoter activity has been located in the -986/-505 region, where three active EBSs have been identified. Furthermore, endogenous Fli-1 was found to be bound to its own gene promoter and to be able to promote the transactivation of its gene. These results suggest that Ets-1 activates an auto-regulatory loop of expression of *fli-1* in endothelial cells, a mechanism that could have significant implications for the endothelial cell fate.

Ets-1 is the founding member of the ETS family of winged helix-turn-helix transcription factors, which is defined by a conserved DNA binding domain that recognizes the DNA core sequence GGAW (ETS binding site or EBS).¹ Ets-1 is expressed in endothelial precursors during vasculogenesis and in endothelial cells during angiogenesis (reviewed in Ref. 1). Functional EBSs have been identified in numerous promoters of genes that are involved in angiogenesis, among which *Tie-1* (2), *Tie-2* (3), *uPA* (4), *Flt-1* (5), or *Flk-1* (6) are directly regulated by Ets-1. In a previous work, we reported that Ets-1 lowered endothelial cell density at confluence and regulated the expression of the endothelial specific VE-cadherin gene (7) by control-

ling two EBSs located in the proximal part of the promoter. Here, we investigated the changes in expression of several other angiogenesis-related genes in response to Ets-1 in endothelial cells and in fibroblasts. Among the analyzed genes, we found the novel Ets-1 target gene *fli-1*. The *fli-1* gene was first identified as a common site for retroviral integration in Friend virus-induced erythroleukemias (8). During mouse embryonic development, *fli-1* messengers are detected as soon as embryonic day 8.5 in the blood islands of the extra-embryonic visceral yolk sac, the structures that also express Ets-1 and give rise to the primary endothelial cells. Afterward, *fli-1* is expressed in endothelial cells throughout the embryo and in the maternal decidua (9). *fli-1* gene disruption leads to early embryonic mortality; *fli-1*^{-/-} embryos display vascular defects evidenced by hemorrhages in brain tissues and changes in the expression of the endothelial specific receptor Tie-2 (10, 11). In other vertebrates such as birds, amphibians, and fishes (12–14), *fli-1* gene homologs are also expressed by vascular endothelial cells, suggesting a conserved role for *fli-1* in vascular development. As for *ets-1*, *fli-1* expression is not strictly limited to endothelial cells as it is also associated with the hematopoietic system development. Megakaryocytes differentiation is impaired in *fli-1*^{-/-} embryos (10, 11), and mice develop erythroleukemia upon infection by the F-MuLV retrovirus wherein provirus integration results in the activation of the *fli-1* gene and in Fli-1 overexpression (8, 15). A similar Fli-1 overexpression is observed in mouse erythroleukemia resulting from SFFV retrovirus infection, which activates the *Spi-1* gene, another member of the ETS family (16, 17).

We show here that Fli-1 is an endothelial specific target gene of Ets-1. Ets-1 activation of the *fli-1* promoter is mediated by half through the region that includes the transcription start sites; the other half of the activity is a result of the interaction of Ets-1 with several EBSs located further up in the promoter. We also show that Fli-1 is a transactivator of its own promoter.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—The pGL2basic plasmid and the mouse *fli-1* gene promoter constructions corresponding to -270/-41Luc, EBS1mut-270/-41Luc, EBS2mut-270/-41Luc, and EBS1/2mut-270/-41Luc (17) were kindly provided by Dr. François Morle (Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 5534, Villeurbanne, France). The pCMV- β -galactosidase was from Dr. Didier Monte (CNRS UMR 8526, Institut de Biologie de Lille, Lille, France), mouse brain capillary (MBE) endothelial cells (18) from Dr. Robert Auerbach (University of Madison, Madison, WI) and Dr. Marco Presta (University of Brescia, Brescia, Italy), and mouse heart endothelioma (H5V) and 3T3 fibroblasts from Dr. Philippe Huber (Commissariat à l'Energie Atomique, Grenoble, France). Paired sample *t* test statistical analysis was performed using Analyze-it software.

Cell Culture—MBE, H5V endothelial, and 3T3 fibroblasts were cultured in a humidified 5% CO₂, 95% air atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's culture medium (4.5 g/liter glucose) containing 10% heat-inactivated calf serum (HyClone), 8 μ g/ml gentamycin, 50 units/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin. Sodium pyruvate (1 mM) was added

* This work was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer; by fellowships (to E. L.) from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie and by the Association pour la Recherche sur le Cancer; and by a grant (to F. L.) from the Ligue Nationale contre le Cancer. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s) AF483910.

† Chargé de Recherche de l'INSERM. To whom all correspondence should be addressed: CNRS UMR 8526, Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, 59021 Lille Cedex, France. E-mail: fabrice.soncin@ibl.fr.

¹ The abbreviations used are: EBS, ETS binding site; MBE, mouse brain capillary endothelial; rEts-1, recombinant Ets-1; RT, reverse transcription; BSA, bovine serum albumin; ESA, electrophoretic mobility shift assay; SFFV, spleen focus-forming virus; F-MuLV, Friend murine leukemia virus.

to the MBE culture medium. Endothelial cells were cultured on gelatin-coated dishes.

Plasmid Constructions—A 3.40-kb region of *fli-1* promoter and intron-1 sequence was amplified by PCR from mouse genomic DNA (Atlas, CLONTECH) using *Pfu* polymerase (Stratagene) and the AGG AAT TGG GTA CCA ATG AAG TTC GGG GA and AGC ACT CGA GCC TTT CTG AAG CGT GAC AGG G oligonucleotides. The fragment was cloned into the *KpnI* and *XhoI* sites of the pGL3basic reporter vector (Promega) and named pFli1+i-Luc. Successive 5' and intron-1 deletions of pFli1+i-Luc were performed by digestions with *KpnI/SacI* (–2437/–1397), *KpnI/EcoRI* (–2437/–986), *KpnI/PfI* (–2437/–505), and *PstI/XhoI* (–11/+954, pFli1-Luc), respectively, followed by T4 DNA polymerase blunt-ending and re-ligation. Site-directed mutagenesis of EBS3 and EBS4 on the various –270/–41-Luc constructs were performed by the PCR overlap extension method (19) using the oligonucleotides AAA GTT TCA TGG GGT TAA CT and AGT TAA CCC CAT GAA ACT TT for mutating EBS3, and CTT TTT CGA TGG GCT ACA AC and GTT GTA GCC CAT CGA AAA AG for mutating EBS4. Deletions of EBS B, and of EBS D–F were performed by PCR amplification of the pFli1-Luc vector using the oligonucleotide pairs CCT TGG TAC CTT TTT AAA AAT AGT AG and CCC ACA CCC CCT CGT CCT CTC CTC, and ACA AAC TCT TGG TAC CGC CGT CTT C and CCC ACA CCC CCT CGT CCT CTC CTC, respectively, followed by *KpnI* and *PfI* digestion of the products, which were then cloned at the corresponding sites of the pFli1-Luc vector. Control vectors corresponded to the *KpnI/EcoRI*- or *KpnI/PfI*-digested, end-filled, and re-ligated pFli1-Luc vector. The *Fli-1* cDNA was obtained by PCR amplification from H5V total RNA using *Pfu* polymerase and the primer pair CAG ACT TGG CCA TAT GGA CGG GAC TAT TAA G and TAG AGT CGA CAG ATA CCA GTA AAG TGA GAG C. The amplified fragment was cloned into the pCR-Blunt II-TOPO vector (Invitrogen) and subcloned into the *EcoRI* site of the pcDNA3 expression vector (Stratagene). All vectors and mutated regions were sequenced to detect any spurious changes.

mRNA Expression Analysis—RT-PCR analysis was performed as previously described (7). 40 cycles of amplification of the *fli-1* isoforms were performed using the following primer pairs and MgCl₂ concentrations: for *Fli-1*, ACA ATA ATA TGA ACT CTG GC and ATG GAT GTC TCT GTT GGA TG (1 mM MgCl₂, 40 cycles) or ACT TGG CCA AAT GGA CGG GAC TAT and ACT GTC GAA CGT GCT CCT GTG TC (3 mM MgCl₂); for *Fli-1b* (20), CAC CGC CAC TCC AGG TCT GG and CCC GTA GTC AGG ACT CCC CG (1.5 mM MgCl₂); for *Fli-1* –398, GAG AGT GGA GAG GGC GAG ATG AG and CCC GTA GTC AGG ACT CCC CG (2 mM MgCl₂); for *Fli-1* –398/–204, GCT CGC AGG GGC CAC TCA G and CCC GTA GTC AGG ACT CCC CG (2 mM MgCl₂).

Immunoprecipitation of *Fli-1*—Cells were washed once with Met- and Cys-free Dulbecco's modified Eagle's medium (ICN) and incubated for 4 h in the same medium in the presence of 100 μ Ci of L-[³⁵S]methionine and L-[³⁵S]cysteine mixture (>1000 Ci/mol, PerkinElmer Life Sciences). The cells were washed three times with ice-cold phosphate-buffered saline; lysed in 1 ml of phosphate-buffered saline containing 1% Igepal CA-630 (Sigma), 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, and protease inhibitors (Roche Molecular Biochemicals); and scraped using cell lifters. Cellular extracts were passed several times through a 0.45 \times 12 mm needle and centrifuged at 15,000 \times g for 20 min at 4 $^{\circ}$ C. Cell extracts (13.6 10^6 cpm) were incubated with 4 μ g of rabbit anti-mouse *Fli-1* antibody (C-19, Santa Cruz) for 12 h on a rotating wheel at 4 $^{\circ}$ C. 50% protein G-agarose slurry (20 μ l) was added and the samples incubated for 1 h at room temperature. Beads were centrifuged at 3000 \times g for 5 min at 4 $^{\circ}$ C, washed five times with phosphate-buffered saline containing 0.1% Triton X-100, and boiled in 50 μ l of reducing sample buffer. An equal cpm amount of immunoprecipitated material was separated on 10% SDS-PAGE under denaturing conditions (21). The gel was soaked in Amplify (Amersham Biosciences), dried, and autoradiographed. Control 3T3 cells (\sim 2.5 10^6 cells/78 cm²) were transfected with 30 μ g of pcDNA3-*Fli-1* vector using Exgen 500 (Euromedex) for 6 h, subsequently cultured for 18 h, and treated as above.

Transactivation Assays—3T3 cells (60,000 cells/well) were seeded in 4-cm² culture dishes and transfected 16 h later with 32 fmol of either reporter vector, 0.8 fmol of pCMV- β -galactosidase, and 32 fmol of pMFG-TagEts1 (7) where indicated, using Exgen 500. pcDNA3-*Fli-1* transfections were performed in similar conditions using 2.4 fmol/well of vector. Total amount of DNA was adjusted to 600 ng with pUC19. Luciferase and β -galactosidase activities were measured 2 days later using a Lumat luminometer (Berthold). The normalized data were calculated as follows: luciferase activity (relative light units) \times 1000/ β -galactosidase activity (relative light units).

Electromobility Shift Assays (EMSA)—EMSA were performed as de-

scribed (7) using recombinant mouse Ets-1 (22), and nuclear extracts were prepared according to Ref. 23. Double-stranded oligonucleotide probes corresponded to the following oligonucleotides: EBS1, GAG ATA GGA CTT CCT CCC CGA TCG CA; EBS1mt, GAG ATA GGA CTA CCT CCC CGA TCG CA; EBS2, AGT CAC TTC CCA AAA TTA; EBS2mt, AGT CAC TTG GCA AAA TTA; EBS3, AAA GTT TCA TCC GGT TAA CT; EBS3 mt, AAA GTT TCA TGG GGT TAA CT; EBS4, CTT TTT CGA TCC GCT ACA AC; EBS4mt, CTT TTT CGA TGG GCT ACA AC; EBS A, TTC TTT CTT TCT TCC TTC; EBS B, TCC TTC CTT CCT TCC TTC; EBS C, TCC TTC CTT TTT AAA AAT; EBS D, GAT CTG CAT CCG AAT CTC; EBS E, CCA GGT TAT CCC CTG TTC; EBS F, CAA ACT CTT CCG CCG TCT.

DNase I Footprinting—The pFli1-Luc vector was digested with *Hin*-dIII, purified, labeled using DNA polymerase I (Klenow fragment) and [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol), and further digested with *HpaI*. The resulting probe was purified by agarose gel (1.2%) electrophoresis, electro-elution, and phenol-chloroform extraction. The DNA probe (20,000 cpm) was either G/A sequenced (24) or mixed with BSA (12.7 pmol) or recombinant Ets1 (rEts-1, 18.6 pmol; Ref. 22) in 100 μ l of 10 mM HEPES, pH 7.9, 30 mM KCl, 0.25 mM EDTA, 63 μ M EGTA, 5 μ M MgCl₂, 2.5 μ M CaCl₂, 1 mM dithiothreitol, 10% glycerol (w/v), 1 μ g/ml poly(dI-dC)/poly(dI-dC) (Amersham Biosciences) and incubated for 1 h at room temperature. DNase I (1 Kunitz milliunit; Roche Molecular Biochemicals) was added and the samples further incubated for 1 min. The reaction was stopped by the addition of 30 μ l of 50 mM EDTA, 0.5 mg/ml proteinase K and incubation for 30 min at 37 $^{\circ}$ C; the samples were phenol-chloroform-extracted and analyzed by 6% PAGE-urea in 0.09 M Tris, 0.09 mM boric acid, 2 mM EDTA; and gels were dried and autoradiographed.

Chromatin Immunoprecipitation—Chromatin immunoprecipitations were performed essentially as described in Ref. 25 with minor modifications. H5V cells grown in 78-cm² dishes were treated with 1% formaldehyde in culture medium for 30 min at room temperature before quenching with 125 mM glycine. Cells were harvested and lysed, and nuclei and chromatin extracts were prepared as in Ref. 25. To immunoprecipitate endogenous *Fli-1* cross-linked to DNA, the chromatin samples were incubated with 2 μ g of anti-*Fli-1* (sc-356X, Santa Cruz) or of nonrelevant (anti-VE-cadherin, Bender) antibody, followed by immunoprecipitation with protein G-Sepharose. The protein/DNA cross-links were reversed (25), and the co-immunoprecipitated and purified genomic DNA fragments were assayed by PCR amplification using the primer pair ATC TGT GGG AAG AAA CGG AA and GTT GTA GCG GAT CGA AAA AG (40 cycles, 2 mM MgCl₂) for the EBS1–3 region and GAG ACC AGC GCT TAG ATG CA and GAA CAG GGG ATA ACC TGG (35 cycles, 2 mM MgCl₂) for the EBS A–E region of the promoter. PCR samples were analyzed in 1.5% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

RESULTS

Overexpression of *Fli-1* in *Ets-1*-overexpressing Endothelial Cells—Control and *Ets-1*-overexpressing cells were previously established following a retroviral strategy (7). Briefly, mouse brain capillary MBE endothelial cells and 3T3 fibroblasts were infected with a MFG-TagEts1 retrovirus that provides the cells with a stable expression of Ets-1 together with resistance to neomycin (MBE-Ets-1 and 3T3-Ets-1). Control cells are noninfected (3T3 and MBE) or infected with the control MFG-Neo retrovirus (MBE-Neo and 3T3-Neo). This expression strategy results in an homogenous population of infected cells, which express Ets-1 at relatively high levels (Fig. 1, top lane) (7).

When RT-PCR analysis of expression of several endothelial specific or angiogenesis-related genes was performed, the sole gene that was significantly up-regulated in response to Ets-1 among those tested was *fli-1* (Fig. 1). Moreover, and in contrast to our previous study on VE-cadherin (7), *fli-1* messenger levels increased in MBE-Ets-1 endothelial cells but not in 3T3-Ets-1 fibroblasts. The transcript levels of VEGF, VEGF-B, Flt-1, Flk-1, Tie-2, EphB4, ephrinB2, PECAM-1, and Tsp-1 and of the ETS factors Ets-2, Erg, and Tel did not vary in these cell lines (data not shown).

Identification of the *fli-1* Transcript Expressed in MBE-Ets-1 Cells—*fli-1* regulation is quite complex, as the gene gives rise to three transcripts through the use of alternative promoters and transcription start sites and to two proteins through the

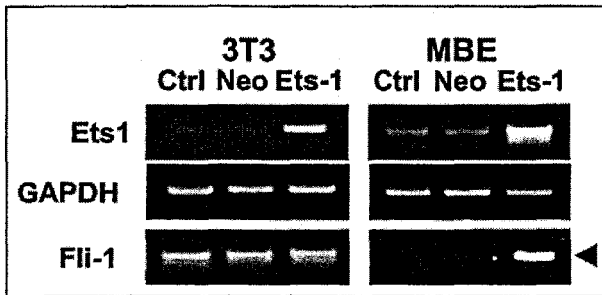


FIG. 1. RT-PCR analysis of the expression of *fli-1* in infected cells. Analysis of expression was done by semiquantitative RT-PCR performed on total RNA extracted from noninfected 3T3 fibroblasts and MBE endothelial cells (*Ctrl*), or cells that were infected with the control MFG-Neo retrovirus (*-Neo*) or the MFG-TagEts1 virus (*Ets-1*). The top lanes show the control gene transcripts *Ets-1* (positive) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*; unaffected). The *fli-1* transcripts are barely detectable in MBE and MBE-Neo cells but strongly overexpressed in MBE-Ets-1 cells (arrowhead). *fli-1* levels do not vary in non-endothelial 3T3 fibroblasts, which express detectable amounts of *fli-1*.

use of alternative translation start codons. In F-MuLV-infected cells, *fli-1* transcripts are initiated at the -398 and -204 sites relative to the ATG+1 start codon (Fig. 2A), whereas, in SFFV-infected cells and in normal spleen, *fli-1* transcripts are initiated mainly at position -204 (17). In addition, in mice, *fli-1* messengers give rise to a 51- and a 48-kDa Fli-1 protein by the use of ATG+1 and a second in-frame ATG codon located 100 bp downstream of ATG+1 (20). Another *fli-1* mRNA has been identified and named *fli-1b*. It is produced from a second promoter on the same gene and gives rise to a transcript that starts by the noncoding exon-1b and leads to the production of the 48-kDa Fli-1 protein only (26). To identify which transcripts are up-regulated in response to Ets-1 in MBE-Ets-1 endothelial cells, RT-PCR analyses were performed using oligonucleotides that specifically recognize either exon-1, to detect *fli-1*, or exon-1b, to detect *fli-1b*. MBE-Ets-1 cells clearly overexpress *fli-1*, as seen in Fig. 2A, whereas little to no *fli-1* transcript is detected in control MBE or MBE-Neo cells. On the other hand, *fli-1b* is detected neither in control nor in Ets-1-expressing cells (Fig. 2A, bottom). The form of *fli-1* transcripts initiated at the -398 site is overexpressed in MBE-Ets-1 cells as evidenced by RT-PCR (Fig. 2B, top). This -398 site appears to be the preferential transcription initiation site in MBE-Ets-1 cells, as the transcripts levels detected using oligonucleotides that allow the amplification of both the -398 and -204 transcripts are not much different from those observed when specifically amplifying the -398 transcripts (Fig. 2B). It remains possible that a minor amount of *fli-1* messengers is initiated at the -204 site.

Accordingly to the observed overexpression of the *fli-1* mRNA in MBE-Ets-1 cells, higher levels of the 51-kDa Fli-1 protein are seen in these cells after immunoprecipitation with an anti-Fli-1 antibody (Fig. 2C).

Activation of the *fli-1* Gene Promoter by Ets-1—A 3.40-kb fragment of the *fli-1* gene starting 660 bp into the *fli-1b* promoter and extending to intron-1 was isolated, cloned, and placed in front of a luciferase reporter gene. When used in transactivation experiments, this $-2437/+954$ fragment responds to Ets-1 activation by ~ 2 -fold (Fig. 3, *pFli1+i-Luc*). Successive 5' deletions show that the region activated by Ets-1 is contained in the $-986/+954$ and that removal of the $-986/-505$ fragment results in the loss of approximately half of this activity, suggesting that both the $-986/-505$ and the $-505/+954$ regions contain Ets-1-responsive elements. On the other hand, activation of the promoter by Ets-1 is strongly increased

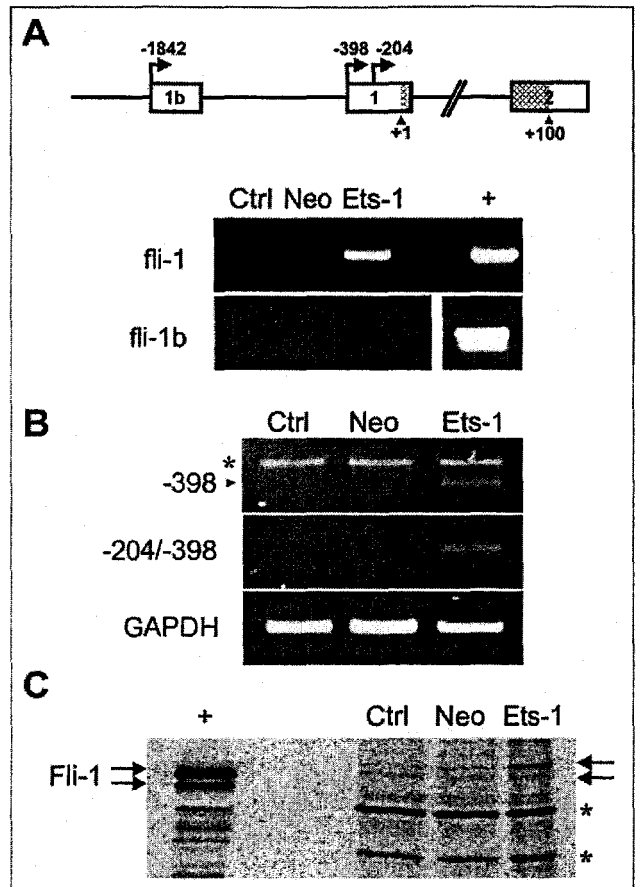


FIG. 2. Analysis of Fli-1 expression in Ets-1-overexpressing cells. A, representation of the transcription and translation starts of the *fli-1* gene. *fli-1* transcripts are initiated either at the -398 or the -204 site, in exon-1. *fli-1b* transcripts are initiated at the -1842 site, in exon-1b. Identification of the *fli-1* transcripts by RT-PCR analysis of MBE total RNA using primer pairs that specifically amplify *fli-1* (top) or *fli-1b* (bottom). Only *fli-1* transcripts are overexpressed in MBE-Ets-1 cells. +, H5V and mouse embryonic day 10.5 embryo total RNA are used as positive controls of *fli-1* and *fli-1b* amplification, respectively. B, RT-PCR analysis of the *fli-1* transcripts initiated either at the -398 or both -398 and -204 sites. The -398 form is the main transcript produced in response to Ets-1 in MBE cells. Nonspecifically amplified material is indicated by an asterisk. C, analysis of Fli-1 protein expression in MBE cells. ^{35}S -Fli-1 was immunoprecipitated from [^{35}S]Met/Cys-labeled MBE cells and analyzed on 10% SDS-PAGE. 3T3 cells transfected with a mouse Fli-1 expression vector are used as positive control (+). The characteristic doublet of 51- and 48-kDa Fli-1 proteins is detected (arrows); nonspecifically immunoprecipitated material is indicated by asterisks. *Ctrl*, control; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

when intron-1 is deleted from the construct (Fig. 3, *pFli1-Luc*), suggesting that intron-1 is involved in a negative regulation of the *fli-1* promoter.

The $-270/-41$ Region of the *fli-1* Promoter Contains Ets-1-responsive EBS—Analysis of the *fli-1* promoter was performed in two parts. First, we studied the $-505/-11$ fragment because it contains the $-270/-41$ region that has been shown to contain two essential Spi-1-responsive EBSs (17), named here EBS1 (EBS 5' in Ref. 17) and EBS2 (EBS 3' in Ref. 17). In EMSA, rEts-1 is able to specifically bind to EBS1, and, to a lower extent, to EBS2, but not to the mutated counterparts, binding to EBS1 is more efficient as unlabeled EBS2 is a less effective competitor of binding than unlabeled EBS1 (Fig. 4A). In transactivation experiments, Ets-1 induces a significant response of the corresponding $-270/-41$ promoter fragment (Fig. 4B) and

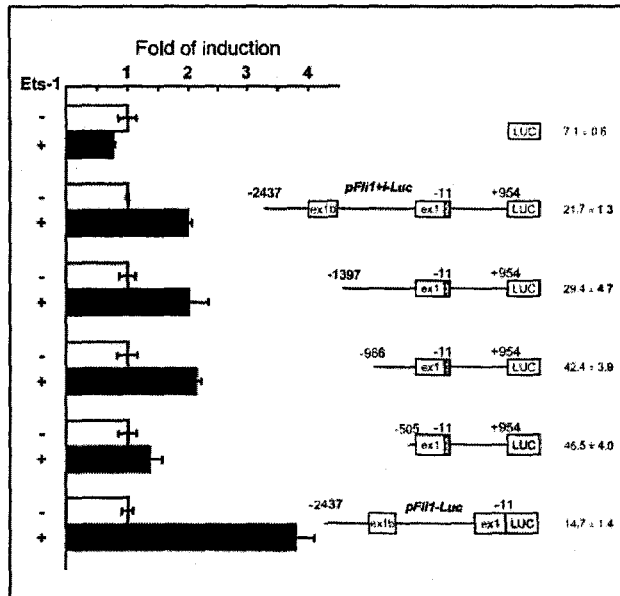


FIG. 3. Transcriptional activation of the *fli-1* promoter by Ets-1. 3T3 cells were transfected with (+) or without (-) pMFG-TagEts1 (32 fmol, Ets-1), with 32 fmol of either Luc reporter vector and with pCMV- β -galactosidase normalization vector (0.8 fmol). Removal of the -2437/-1397 or the -2437/-986 fragments does not significantly affect the promoter response to Ets-1, whereas deletion of the -2437/-505 fragment reduces the promoter response by half. On the other hand, removal of the intron-1 (*pFLi1-Luc*) results in a strong increase in the promoter response. *Luc*, pGL3 basic empty vector; *pFLi1+i-Luc*; 3.4-kb fragment of *fli-1* promoter containing intron-1. *pFLi1-Luc* corresponds to the intron-1-less promoter. Each histogram represents the average -fold of induction of normalized values \pm S.D. of triplicate points. Numbers indicate the normalized basal activity of the constructs \pm S.D. The data are representative of two experiments performed in similar conditions.

mutation of EBS1 reduces this response by 25%, whereas mutation of EBS2 has a minor effect, consistent with the observed differences in binding. In contrast to the response to Spi-1 (17), mutation of both EBS1 and EBS2 does not result in the complete loss of Ets-1 transcriptional activation of the promoter fragment (Fig. 4, *EBS1/2mt*), suggesting that other unidentified EBSs are involved in this response.

The -270/-41 fragment contains two other potential EBSs, named EBS3 and EBS4, located downstream from EBS2 (Fig. 5A). EMSA analysis shows that rEts-1 is able to specifically bind to EBS3, a property that is lost upon mutation of its GGAT core sequence (Fig. 5B); no binding of rEts-1 to EBS4 is detected. When used in transactivation experiments, mutation of EBS3 has only a minor effect on the response of the promoter to Ets-1 (Fig. 5C, *EBS3mt*). However, when the mutation of EBS3 is combined with the mutations of EBS1 and EBS2, a complete loss of response of the promoter fragment to Ets-1 is observed (Fig. 5C, *EBS1/2/3mt*). Mutation of EBS4 alone increases the responsiveness of the promoter fragment, but mutation of EBS1, EBS2, and EBS4 does not significantly alter the response from that obtained with the *EBS1/2mt* construct (Fig. 5B, *EBS1/2/4mt*). Therefore, EBS1, EBS2, and EBS3 mediate together the response of the -270/-41 promoter fragment to Ets-1.

The -986/-505 Region Contains Three Novel Active EBSs—The second half of the promoter response to Ets-1 is provided by the -986/-505 region located immediately ahead of the -505/-11 fragment (Fig. 3), a region that has not been studied before. In footprint experiments using rEts-1 and the -1032/-195 promoter fragment as probe, several regions, named EBS

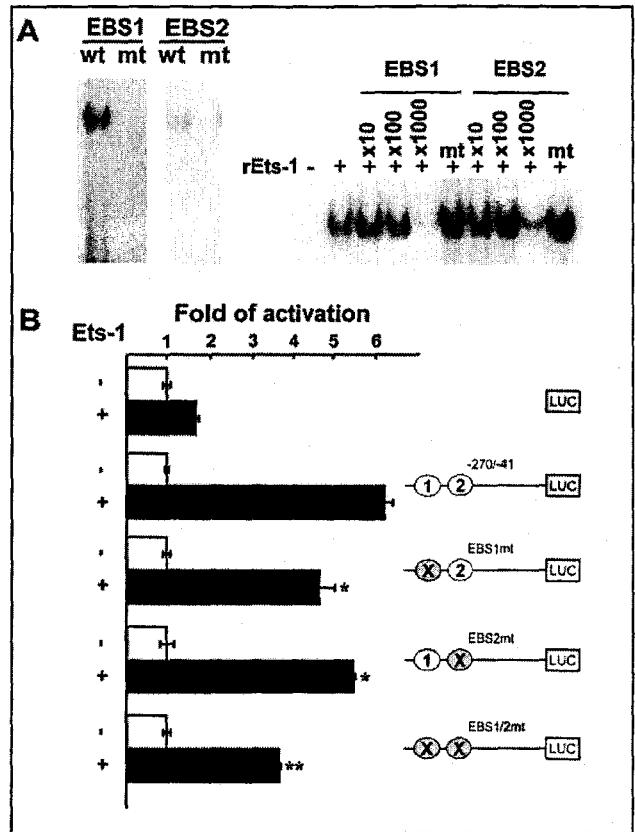


FIG. 4. Activation of the *fli-1* -270/-41 promoter fragment by Ets-1. A, electrophoretic mobility shift assays of rEts-1 (approximately 1 ng) mixed with 32 P-labeled double-stranded probes corresponding to EBS1 (2400 cpm/ng) and EBS2 (3100 cpm/ng). rEts-1 binds to the normal (wild type, *wt*) EBS1 and, to a much lower extent, to EBS2, but not to the respective 32 P-labeled mutated versions (*mt*). The complexes formed by rEts-1 and EBS1 are specific because they can be competed for by the addition of an increasing molar excess of unlabeled probe (*EBS1* $\times 10$, $\times 100$, $\times 1000$) but not by the addition of a 1000-fold molar excess of mutated probe, which rather favors rEts-1 binding to EBS1 (*EBS1mt*). In accordance with the apparent lower relative affinity of rEts-1 for EBS2, competition of rEts-1 binding to EBS1 by the addition of unlabeled EBS2 requires high amounts of unlabeled probe (*EBS2* $\times 100$, $\times 1000$), whereas EBS2 and *EBS2mt* slightly favor rEts-1 binding to EBS1 at lower concentrations; -, free probe. Only the upper part of the gel is shown. B, Ets-1 activates the -270/-41 fragment of the *fli-1* promoter. Mutation of EBS1 (*EBS1mt*) reduces the activation by 25%, whereas mutation of EBS2 (*EBS2mt*) has a moderate effect. Mutation of both EBS1 and EBS2 (*EBS1/2mt*) reduced the promoter fragment response to Ets-1 by 41.4%. Each histogram represents the average of the normalized values \pm S.D. of triplicate points. * and **, $p \leq 0.05$ and 0.01, respectively, versus -270/-41-Luc. The data are representative of a set of four experiments performed in similar conditions.

ABC, EBS D, and EBS F are protected from DNase I digestion (Fig. 6A); others such as EBS E are not. EBS D, E, and F are single sites, whereas EBS ABC is a stretch of 12 concatenated EBSs, in which we distinguish a central region (EBS B) and the most 5' and 3' EBS, named EBS A and C, respectively (Fig. 6C). EMSA analysis shows that rEts-1 is able to bind to the EBS B stretch, but not to the flanking EBS A or C. rEts1 also binds to EBS D and to EBS F but not to EBS E (Fig. 6B). Accordingly to the binding properties, the activation -fold of the -986/-11 promoter region by Ets-1 is reduced by 29% when EBS ABC is removed (Fig. 7, *-817/-11-Luc*), confirming that the EBS B stretch is important for the response of the promoter to Ets-1. Further deletion of the EBS DF leads to a 37% reduction in the -fold of activation of the *fli-1* promoter by Ets-1 (Fig.

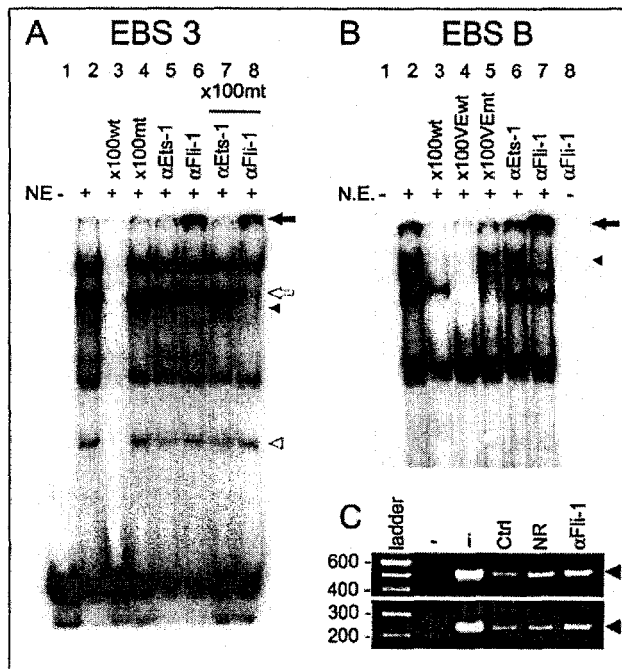


FIG. 8. Fli-1 binds to EBS 3 and EBS B and is present on the endogenous EBS1-3 and EBS A-E regions in nuclear extracts of endothelial cells. A, proteins from H5V endothelial cells nuclear extracts (NE, approximately 8 μ g) bind to 32 P-radiolabeled double-stranded EBS 3 (lane 2). Specific binding is competed for by the addition of a 100-fold excess of unlabeled wild type ($\times 100$ wt, lane 3) but not by the mutated probe ($\times 100$ mt, lane 4). Addition of 1 μ g of anti-Ets-1 antibody results in a perceptible supershift (α Ets-1, lanes 5 and 7, open arrow) of an initial complex and of a faster migrating band (open arrowhead). A strong supershift (α Fli-1, arrows, lanes 6 and 8) of a major initial band (filled arrowhead) is observed following the addition of 1 μ g of anti-Fli-1 antibody. To obtain a clearer signal than in lanes 5 and 6, nonspecific binding is displaced by the addition of 100-fold excess of mutated probe in the supershifts (lanes 7 and 8). B, binding of H5V nuclear proteins (NE) to EBS B (lane 2) in similar conditions than in panel A. Because EBS B is a concatenate of several EBSs, the specific and nonspecific signals are visualized using unlabelled EBS B (specific, $\times 100$ wt, lane 3), a VE-cadherin EBS4 probe (specific, $\times 100$ VEwt, lane 4 (Ref. 7)) or a mutated VE-cadherin EBS4 probe (nonspecific, $\times 100$ VEmt, lane 5). Fli-1 binding (lane 2, filled arrowhead) is supershifted when adding the anti-Fli-1 antibody (α Fli-1, lane 7, filled arrow). The anti-Fli-1 antibody has no effect on the migration of the probe in the absence of nuclear extracts (lane 8). C, PCR amplification of the EBS1-3 and EBS A-E regions following chromatin immunoprecipitation. H5V cell genomic DNA cross-linked to endogenous Fli-1 was co-immunoprecipitated with an anti-Fli-1 (α Fli-1) or a nonrelevant (NR) antibody, followed by de-cross-linking and PCR amplification of the purified genomic DNA fragments (arrowheads) corresponding to the EBS1-3 (top) and EBS A-E (bottom) regions of the *fli-1* gene promoter. -, no DNA; i, input 0.05% of initial chromatin; Ctrl, no antibody added.

with the complete loss of a major band from the initial complex (Fig. 8, filled arrowheads). This was rather unexpected and suggested that the activation of the *fli-1* gene by Ets-1 could induce a subsequent control of the gene by Fli-1 itself. Therefore, to check whether Fli-1 was present on its own gene promoter in endothelial cells, we immunoprecipitated the H5V endogenous Fli-1, which had been cross-linked to cellular chromatin. Subsequent amplification of the isolated DNA fragments with oligonucleotides that allow to detect either the EBS1-3 or EBS A-E promoter regions revealed specific bands for which levels were significantly higher when using an anti-Fli-1 antibody (Fig. 8C), demonstrating that, indeed, in H5V endothelial cells, endogenous Fli-1 is bound to both the EBS 1-3 and to the EBS A-E regions of its own promoter.

Fli-1 Promotes the Transactivation of Its Own Promoter— Furthermore, when used in transactivation assays, Fli-1 is able

to induce a significant response of its own promoter (Fig. 9A). Deletion of the -986/-505 fragment leads to an approximately 40% decrease of the response, because of the loss of the EBS A-E region. Removal of intron-1 results in a marked increase in the promoter response. Furthermore, Fli-1 is also active on the -270/-41 promoter region. Mutation of EBS1 has almost no effect on the promoter response to Fli-1, whereas mutation of EBS2 results in the loss of approximately half of this activity (Fig. 9B), contrasting with the fact that the activation by Ets-1 was slightly more sensitive to EBS1 than to EBS2 mutation (Fig. 4). Mutation of both EBS1 and EBS2 does not result in the complete loss of the response to Fli-1, and the remaining activity is mediated by EBS3, as evidenced by the complete loss of activity of the EBS1/2/3 mutant (Fig. 9B). EBS4 has no relevant role because the EBS1/2/4 mutant displays an activity similar to that of the EBS1/2 mutant.

DISCUSSION

This work was originally undertaken to identify novel target genes of Ets-1 in endothelial cells. It was initiated on the basis of several reports, which suggested that Ets-1 could be important in endothelial cells during angiogenesis; in the embryo, Ets-1 transcripts are expressed in endothelial precursors and in endothelial cells (27-30) and also in various situations where endothelial cells undergo capillary formation, such as during wound healing (31) or vascularization of solid tumors in the adult (31, 32). Furthermore, Ets-1 expression in endothelial cells *in vitro* is increased by angiogenic factors (31, 33). We previously showed that Ets-1 increased the expression of the endothelial specific VE-cadherin gene together with a reduction of cell density at confluence of endothelial cells, suggesting that, although Ets-1 is not an endothelial specific transcription factor, it may participate to the definition or the maintenance of the quiescent endothelial phenotype through the regulation of this specific cadherin (7). Here, analysis of the expression of other angiogenesis-related genes in Ets-1-overexpressing cells was rather deceiving because most of them showed no significant changes of expression, although many of them had been shown to contain active EBS in their promoters (see Ref. 1 for review). Our results are, however, consistent with a recent report in which the authors used an adenoviral strategy to induce Ets-1 expression in human endothelial cells. DNA array analysis of the gene profile showed that the levels of expression of Tie-1, *flt-1*, the *flk-1* human homolog KDR, EphB4, ephrinB2, or uPA genes did not vary either upon overexpression of Ets-1, whereas those of VE-cadherin, together with the VEGF receptor neuropilin-1, ephrin-A1, angiopoietin-2, the uPA receptor, or FGFR-1, increased slightly (Ref. 34; the status of *fli-1* had not been addressed in this report). From this work and ours, it can be stated that Ets-1 is probably not a master transcription factor that controls the endothelial cell phenotype but rather participates in the regulation of few genes related to a particular cell metabolism such as cell quiescence, endothelium integrity (7), or possibly apoptosis (35-37).

Checking for the expression of ETS members in the same context was also motivated by several facts; *erg* and *fli-1* are co-expressed with *ets-1* in endothelial cells of the developing embryo (12, 27, 38, 39), inactivation of the *fli-1* gene leads to hemorrhages in the neural tissue, possibly because of a disruption of the endothelium integrity (10, 11), and inactivation of *tel* in the mouse induces a lack of branching of the vitelline vessels (40). Among the ETS genes tested, *fli-1* was the only one to show a significant variation of transcript levels following Ets-1 expression. This was very interesting because the regulation of the *fli-1* gene in endothelial cells had not been studied before. In the embryonic context, this suggests that the expression of *ets-1* in early endothelial progenitors of the blood islands can

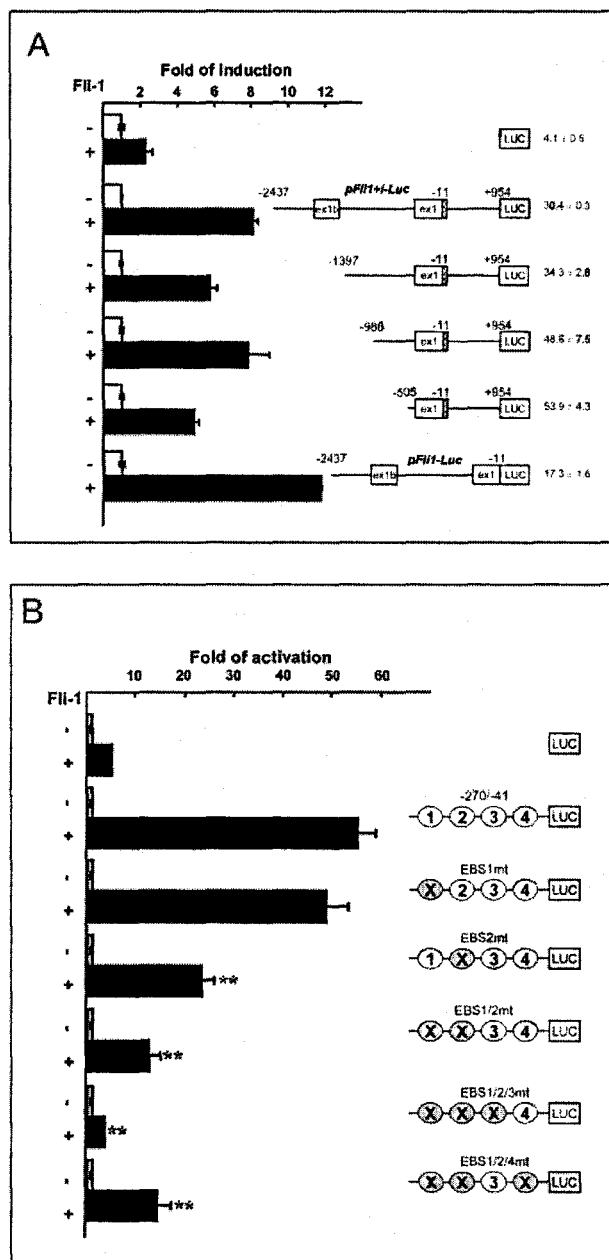


FIG. 9. Fli-1 activates its own promoter through EBS2 and EBS3. A, 3T3 cells were transfected with (+) or without (-) pcDNA3-Fli-1 (2.4 fmol, Fli-1), with pCMV- β -galactosidase normalization vector (0.8 fmol) and with 32 fmol of either reporter vector. Removal of -2437/-986 fragment does not significantly affect the promoter response to Fli-1, whereas deletion of the -2437/-505 fragment reduces the promoter response by 36%. As for Ets-1, removal of the intron-1 resulted in a strong increase in promoter response. Legends are as in Fig. 3. Each histogram represents the average fold of induction of normalized values \pm S.D. of triplicate points. Numbers indicate the normalized basal activity of the constructs \pm S.D. B, pcDNA3-Fli-1 (2.3 fmol, Fli-1) was transfected into 3T3 cells together with the -270/-41 reporter vectors as in Fig. 5. In contrast to Ets-1, mutation of EBS2 has a strong effect (58% inhibition) on the activation of the promoter fragment by Fli-1, whereas mutation of EBS1 does not. As with Ets-1, mutation of EBS3 (*EBS3mt*) has a minor effect, whereas the combined mutation of EBS1, -2, and -3 (*EBS1/2/3mt*) abolishes the promoter fragment response to Fli-1. Mutation of EBS1, -2, and -4 (*EBS1/2/4mt*) has no more effect than the combined mutation of EBS1 and -2 (*EBS1/2mt*). Each histogram represents the mean value \pm S.D. of triplicate points. * and **, $p \leq 0.05$ and 0.01, respectively, versus -270/-41-Luc. The data are from one experiment representative of a set of three experiments performed in similar conditions.

control the subsequent expression of *fli-1* in these cells. This is further strengthened by the fact that Ets-1 induces an increase of *fli-1* expression only in MBE (and IBE; data not shown) capillary endothelial cells and not in 3T3 or L929 fibroblasts (data not shown), suggesting that the *fli-1* promoter contains undocumented endothelial specific response elements placed under the control of ETS transcription factors. In an attempt to identify these elements, we have analyzed the activity of the 3.40-kb fragment of the *fli-1* promoter in endothelial (MBE) versus fibroblasts (3T3) cells by transient transfection; however, no differences in activity could be detected (data not shown), either because the region involved in the endothelial specific regulation is not contained in the 3.40-kb fragment or because the surrounding chromatin structure plays a role in the specific response, a situation that is not reproduced in transient transfection. The search for these endothelial specific response elements needs to be pursued.

The levels of activation of the -2437/+954 *fli-1* promoter region by Ets-1 (2.5-fold) correspond to the levels obtained on the VE-cadherin (7) or the GATA-1 (41) promoters. Still, this activation seems low when looking at the high levels of *fli-1* transcripts detected by RT-PCR in Ets-1-expressing cells. This is probably because of the fact that *fli-1* transcripts accumulate in response to the constitutive expression of Ets-1 in these cell lines. This also raises the question of whether the entire region of the promoter was analyzed; because the *fli-1b* promoter is located upstream of the *fli-1* promoter and because these promoter regions are independent (Fig. 2 and Ref. 26), it is most probable that the regulatory regions of *fli-1* are indeed located between exon-1b and exon-1. Nevertheless, we chose to analyze a large gene fragment (-2437/+954), which encompasses both *fli-1* and *fli-1b* regulatory regions. This fragment includes the 1.5-kb region located upstream of exon-1 (the *fli-1* promoter), plus exon-1b and 660 bp of *fli-1b* promoter, including the corresponding -410/-150 region of the *fli-1b* promoter, which was shown to control the transcription of exon-1b in human (26); this region as well as the upstream sequences are conserved in the mouse gene. Because *fli-1b* is not regulated in response to Ets-1 in endothelial cells (Fig. 2) and because the deletion of the *fli-1b* regulatory regions does not affect Ets-1 activity on the promoter fragment (Fig. 3, -1397/+954), it seems that the *fli-1b* regulatory regions are not involved in the regulation of the gene by Ets-1 or Fli-1 and that the main active regions controlling *fli-1* expression are indeed those placed after exon-1b.

The regulation of the *fli-1* gene by Ets-1 further illustrates the fact that ETS factors can specifically control the expression of other transcription factors of the same family, a situation that had been described in SFFV-infected cells where Fli-1, and not Ets-1, Ets-2, Elf-1, or GAPB α/β , is specifically overexpressed in response to Spi-1 (17). This study and ours addressed the regulation of the *fli-1* gene, making it probable that this particular gene is specifically regulated by other ETS factors depending on the cell context. On that matter, the auto-regulatory loop of Fli-1 supports that same idea. It had been suggested by two earlier reports where *fli-1* transgenic mice were found to overexpress endogenous *fli-1* (42) and Fli-1 was reportedly found to bind to EBS2 and transactivates its own promoter in SFFV cells (data not shown in Ref. 17). We now clearly show that Fli-1 is a positive regulator of its own gene transcription. Further, our observations suggest that the transcriptional mechanisms involved in the regulation of the *fli-1* gene by Spi-1, Ets-1, and Fli-1 itself are not similar; both EBS1 and EBS2 are clearly critical for the activity of Spi-1 in erythroleukemic cells (17) and for Ets-1 and Fli-1 here. However, a more dramatic effect of the mutation of EBS1 on the

response of the promoter to Ets-1 is noticed here (Fig. 4), whereas Spi-1 (17) and Fli-1 (Fig. 9B) are more sensitive to the mutation of EBS2. Furthermore, no remaining activity of the promoter in response to Spi-1 was reported when EBS1 and EBS2 were mutated (17), whereas we found that Ets-1 and Fli-1 are still active on this double mutant, leading to the identification of EBS3. Finally, Ets-1 and Fli-1 show other differences on the regulation of the *fli-1* promoter as, when normalizing to the values of the empty vector, Fli-1 and Ets-1 activate the -2437/-11 promoter region almost as well (3.5-fold (Fig. 9) and 2.5-fold (Fig. 3), respectively), but Fli-1 shows a 4-fold stronger activity than Ets-1 on the -270/-41 region (Fig. 9B), probably in relation to its stronger activity on EBS2. These differences show that the regulation of the *fli-1* gene by different ETS factors can be finely tuned through the use of the various EBSs by these factors. ETS factors are indeed quite different although they recognize a common DNA core and share a closely related DNA-binding domain; Spi-1, on the one hand, and Ets-1 and Fli-1, on the other, recognize different flanking DNA sequences around the GGAW EBS core (43). They also regulate different target genes as Spi-1 is mostly an activator of myeloid and lymphoid genes, an activity related to its restricted expression in these lineages (43), whereas Fli-1 possibly activates GP1X and Tie2 (11) but represses the expression of *Rb* (44) and Ets-1 has a much larger spectrum of known target genes (7, 34, 43, 45).

In relation to these noted differences in the transcriptional activators of the *fli-1* gene, we also found that *fli-1* mRNA transcription was mainly initiated at the -398 site in MBE-Ets-1 endothelial cells, a situation similar to that observed in F-MuLV-transformed cells, whereas in SFFV-infected cells, which overexpress Spi-1, *fli-1* transcripts are mainly initiated at the -204 site (17). Although the mechanisms responsible for the selection of the start sites are not known, these variations could be related to a different access of the transcription factors to exon-1 because this exon was shown to form an H-DNA structure (46) that may modulate transcription factor binding.

The role of the *fli-1b* RNA isoform is not clear. *fli-1b* transcripts have originally been identified in two human cDNA libraries and found to be expressed in pre-B cells (26), but other cell lines of different origin also express this transcript, although at lower levels (47). Fli-1b is absent from NIH-3T3 cells (47) as observed here (data not shown), and we found no evidence of its expression in MBE endothelial cells. The 48-kDa coded protein corresponds to an alternatively initiated protein of the original *fli-1* transcript, which conserves the transcriptional activity of Fli-1 (26). This suggests the possible existence of a (tissue?) specific regulation of the *fli-1* gene expression leading to the formation of the same protein. In that regard, the nature of the *fli-1* transcripts detected in early endothelial cells during embryonic development is not known; it remains possible that *fli-1b* mRNA account for some of the detected signals. Regarding the *fli-1b* promoter region, several potential response elements have been localized, their analysis has not been done (26), and our results suggest that this promoter is not regulated by Ets-1 or Fli-1.

During the isolation of the 3.40-kb fragment of the *fli-1* gene, restriction and sequence analysis revealed the presence of an additional 225 bp fragment (GenBank™ accession no. AF483910) starting 520 bp downstream of the intron-1 splice donor, which had not been seen earlier (46). This fragment was identified in mouse genomic DNA extracted from H5V cells, a cell line established from C57BL/6 strain, and also from Balb/c genomic DNA (CLONTECH), and from an NIH/Swiss phage library, indicating that this fragment does not derive from polymorphic variations or PCR artifacts.

In this intron-1, one EBS had been shown to bind unidentified ETS-related factors (48). These factors may well be Fli-1 and Ets-1 because we found that both were able to bind to this isolated EBS in EMSA experiments. However, despite this binding, we found no enhancer activity of the isolated intron-1 in response to Ets-1 or Fli-1; rather, we found that intron-1 had a strong inhibitory activity on the activation of the *fli-1* promoter by both factors. This inhibitory activity is reminiscent of the *fli-1* gene, where the first intron strongly represses the activity of the promoter, possibly because of the presence of a transcription arrest site (49). The *fli-1* intron-1 contains the GGC cCC Ggc GCC AGG cac taG T sequence, which is very close to the adenosine deaminase gene transcription arrest consensus (upercase letters; Ref. 50), including the essential bases (bold). Whether this site is responsible for the dramatic effect of intron-1 on the response of the *fli-1* promoter to Ets-1 and Fli-1 and whether the ETS factors detected on the intron participate in the negative regulation of the *fli-1* gene remain to be determined.

By showing that Fli-1 is a target gene of Ets-1 in endothelial cells, our work raises the question of the role of Fli-1 in these cells and in angiogenesis. We found that VE-cadherin is overexpressed in Ets-1-cells and that Fli-1 is able to activate the VE-cadherin promoter *in vitro* (data not shown). We initially thought that Ets-1 and Fli-1 could therefore act together or in cascade in endothelial cells to promote the VE-cadherin gene in this cellular context. However, the VE-cadherin levels are not noticeably different in *fli-1*^{-/-} versus *fli-1*^{+/-} embryos (11), making it less probable that Fli-1 participates to the regulation of this gene *in vivo*, safe for a rescue of the gene by other ETS members in *fli-1*^{-/-} mice. A role of Fli-1 in the reduction of cell density at confluence seen in Ets-1-overexpressing endothelial cells (7) was also possible because Fli-1 had been associated with the regulation of cell proliferation and survival (44, 51, 52). The role of Fli-1 in these processes is unfortunately not clear yet; attributing a role to this transcription factor in the phenotype observed in endothelial cells that overexpress Ets-1 is, therefore, still risky.

Acknowledgments—We thank Dr. F. Morle for the -270/-41 *fli-1* promoter constructs; A. Begue for screening and isolating a genomic phage; Dr. D. Monte for the pCMV-βgal construct and fruitful discussions; Dr. R. Auerbach, Dr. M. Presta, and Dr. P. Huber for providing us with the cell lines; and Pr. D. Stehelin and Dr. B. Vandenbunder for support.

REFERENCES

- Lelievre, E., Lionneton, F., Soncin, F., and Vandenbunder, B. (2001) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**, 391-407
- Ijini, K., Dube, A., Kontusaari, S., Korhonen, J., Lahtinen, I., Oettgen, P., and Alitalo, K. (1999) *FASEB J.* **13**, 377-386
- Dube, A., Akbarali, Y., Sato, T. N., Libermann, T. A., and Oettgen, P. (1999) *Circ. Res.* **84**, 1177-1185
- Nerlov, C., Rorth, P., Blasi, F., and Johnsen, M. (1991) *Oncogene* **6**, 1583-1592
- Wakiya, K., Begue, A., Stehelin, D., and Shibuya, M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30823-30828
- Kappel, A., Schlaeger, T. M., Flamme, I., Orkin, S. H., Risau, W., and Breier, G. (2000) *Blood* **96**, 3078-3085
- Lelievre, E., Mattot, V., Huber, P., Vandenbunder, B., and Soncin, F. (2000) *Oncogene* **19**, 2438-2446
- Ben-David, Y., Giddens, E. B., and Bernstein, A. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 1332-1336
- Melet, F., Motro, B., Rossi, D. J., Zhang, L., and Bernstein, A. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2708-2718
- Spyropoulos, D. D., Pharr, P. N., Lavenburg, K. R., Jackers, P., Pappas, T. S., Ogawa, M., and Watson, D. K. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5643-5652
- Hart, A., Melet, F., Grossfeld, P., Chien, K., Jones, C., Tunnacliffe, A., Favier, R., and Bernstein, A. (2000) *Immunity* **13**, 167-177
- Mager, A. M., Grapin-Botton, A., Ladjali, K., Meyer, D., Wolff, C. M., Stiegler, P., Bonnini, M. A., and Remy, P. (1998) *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 561-572
- Meyer, D., Stiegler, P., Hindelang, C., Mager, A. M., and Remy, P. (1995) *Int. J. Dev. Biol.* **39**, 909-919
- Brown, L. A., Rodaway, A. R., Schilling, T. F., Jowett, T., Ingham, P. W., Patient, R. K., and Sharrocks, A. D. (2000) *Mech. Dev.* **90**, 237-252
- Ben David, Y., Giddens, E. B., Letwin, K., and Bernstein, A. (1991) *Genes Dev.* **5**, 908-918
- Moreau-Gachelin, F., Tavittian, A., and Tambourin, P. (1988) *Nature* **331**, 277-280

17. Starck, J., Doubeikovski, A., Sarrazin, S., Gonnet, C., Rao, G., Skoultschi, A., Godet, J., Dusanter-Fourt, I., and Morle, F. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 121-135
18. Auerbach, R. (1991) *Int. J. Radiat. Biol.* **60**, 1-10
19. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) *Gene (Amst.)* **77**, 51-59
20. Sarrazin, S., Starck, J., Gonnet, C., Doubeikovski, A., Melet, F., and Morle, F. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2959-2969
21. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
22. Lionneton, F., Drobecq, H., and Soncin, F. (2001) *Protein Exp. Purif.* **21**, 492-499
23. Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M., and Schaffner, W. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 6419
24. Maxam, A. M., and Gilbert, W. (1980) *Methods Enzymol.* **65**, 499-560
25. Takahashi, Y., Rayman, J. B., and Dynlacht, B. D. (2000) *Genes Dev.* **14**, 804-816
26. Dhulipala, P. D., Lee, L., Rao, V. N., and Reddy, E. S. (1998) *Oncogene* **17**, 1149-1157
27. Vandebunder, B., Pardanaud, L., Jaffredo, T., Mirabel, M. A., and Stehelin, D. (1989) *Development* **106**, 265-274
28. Pardanaud, L., and Dieterien-Lievre, F. (1993) *Cell Adhesion Commun.* **1**, 151-160
29. Quéva, C., Leprince, D., Stéhelin, D., and Vandebunder, B. (1993) *Oncogene* **8**, 2511-2520
30. Maroulakou, I. G., Papas, T. S., and Green, J. E. (1994) *Oncogene* **9**, 1551-1565
31. Wernert, N., Raes, M. B., Lassalle, P., Dehouck, M. P., Gosselin, B., Vandebunder, B., and Stehelin, D. (1992) *Am. J. Pathol.* **140**, 119-127
32. Vandebunder, B., Queva, C., Desbiens, X., Wernert, N., and Stehelin, D. (1994) *Invasion Metastasis* **14**, 198-209
33. Iwasaka, C., Tanaka, K., Abe, M., and Sato, Y. (1996) *J. Cell. Physiol.* **169**, 522-531
34. Teruyama, K., Abe, M., Nakano, T., Takahashi, S., Yamada, S., and Sato, Y. (2001) *FEBS Lett.* **504**, 1-4
35. Huang, C.-C., Papas, T. S., and Bhat, N. K. (1997) *Oncogene* **15**, 851-856
36. Li, R., Pei, H., and Papas, T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3876-3881
37. Teruyama, K., Abe, M., Nakano, T., Iwasaka-Yagi, C., Takahashi, S., Yamada, S., and Sato, Y. (2001) *J. Cell. Physiol.* **188**, 243-252
38. Dhordain, P., Dewitte, F., Desbiens, X., Stehelin, D., and Duterque-Coquillaud, M. (1995) *Mech. Dev.* **50**, 17-28
39. Macias, D., Perez-Pomares, J. M., Garcia-Garrido, L., Carmona, R., and Munoz-Chapuli, R. (1998) *Anat. Embryol. (Berl.)* **198**, 307-315
40. Wang, L. C., Kuo, F., Fujiwara, Y., Gilliland, D. G., Golub, T. R., and Orkin, S. H. (1997) *EMBO J.* **16**, 4374-4383
41. Seth, A., Robinson, L., Thompson, D. M., Watson, D. K., and Papas, T. S. (1993) *Oncogene* **8**, 1783-1790
42. Zhang, L., Eddy, A., Teng, Y. T., Fritzler, M., Kluppel, M., Melet, F., and Bernstein, A. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6961-6970
43. Ghysdael, J., and Boureux, A. (1997) in *Progress in Gene Expression* (Karin, M., ed) Vol. 1, pp. 29-39, Birkhäuser Verlag, Basel
44. Tamir, A., Howard, J., Higgins, R. R., Li, Y. J., Berger, L., Zacksenhaus, E., Reis, M., and Ben-David, Y. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4452-4464
45. Oda, N., Abe, M., and Sato, Y. (1999) *J. Cell. Physiol.* **178**, 121-132
46. Barbeau, B., Bergeron, D., Beaulieu, M., Nadjem, Z., and Rassart, E. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1307**, 220-232
47. Barat, C., Barbeau, B., Delattre, O., and Rassart, E. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1517**, 164-170
48. Barbeau, B., Barat, C., Bergeron, D., and Rassart, E. (1999) *Oncogene* **18**, 5535-5545
49. Morishita, K., Johnson, D. E., and Williams, L. T. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 27948-27953
50. Kash, S. F., Innis, J. W., Jackson, A. U., and Kellems, R. E. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2718-2729
51. Yi, H., Fujimura, Y., Ouchida, M., Prasad, D. D., Rao, V. N., and Reddy, E. S. (1997) *Oncogene* **14**, 1259-1268
52. Goltzene, F., Skalski, M., Wolff, C. M., Meyer, D., Mager-Heckel, A. M., Darriber, T., and Remy, P. (2000) *Exp. Cell Res.* **260**, 233-247

IV.2 Discussion

Le but initial de ce travail était de mieux comprendre le rôle joué par le facteur de transcription Ets-1 dans les cellules endothéliales à travers l'identification de ses gènes cibles. En utilisant un rétrovirus exprimant Ets-1, l'expression par RT-PCR de différents marqueurs endothéliaux et des facteurs impliqués dans le processus angiogénique, dont certains possèdent des EBS putatifs dans leur promoteur, a été analysée. Sur l'ensemble des transcrits analysés, seul le niveau d'expression de *fli-1* augmente dans les cellules endothéliales sur-exprimant Ets-1. Ces résultats suggèrent aussi que le promoteur de *fli-1* contiendrait une zone de régulation spécifiquement endothéliale encore non définie.

L'étude de la régulation du gène *fli-1* par Ets-1 présente un intérêt tout particulier puisque ces deux facteurs présentent un patron d'expression similaire au cours du développement, tous deux liés à la mise en place de l'endothélium. De plus, l'inactivation du gène *fli-1* entraîne l'apparition de zones hémorragiques au niveau des tissus nerveux, probablement causées par la désorganisation de l'endothélium. Lors de ces travaux, nous avons montré que *fli-1* est un gène cible de Ets-1 et qu'il est également capable de réguler l'activité de son propre promoteur. Les EBS fonctionnels présents dans le promoteur de Fli-1 et responsables de son activation par Ets-1 et par lui-même ont été identifiés. Le fait que le transcrit de *ets-1* soit détecté à des stades plus précoces du développement que celui de *fli-1*, suggère un modèle de régulation selon lequel Ets-1 initierait la transcription de *fli-1* durant les stades de développement les plus précoces, puis Fli-1 prendrait le relais pour entretenir sa propre boucle d'autorégulation. Les résultats obtenus lors des expériences de retard sur gel réalisées avec les différents EBS du promoteur de *fli-1* montrent que de nombreuses protéines nucléaires, différentes de Ets-1 et Fli-1, sont capables de fixer ces éléments de réponse. Cela suggère que d'autres membres de la famille ETS sont capables de se fixer sur les EBS fonctionnels décrits. *erg* possède le même patron d'expression que *fli-1* et pourrait coopérer dans l'activation du promoteur de *fli-1*. Tel, contrairement à la majorité des autres facteurs de la famille ETS possède une activité inhibitrice. Tel a été décrit comme étant capable d'interagir avec la protéine Fli-1 et d'inhiber son activité transactivatrice (Kwiatkowski et al., 1998). De plus, l'inactivation de Tel a pour effet d'empêcher la formation des vaisseaux sanguins au niveau des arcs branchiaux (Wang et al., 1997). Tel pourrait, par exemple, inhiber la boucle d'autorégulation de Fli-1 en utilisant les mêmes EBS.

Discussion générale

I p42Ets-1 est un facteur de transcription distinct de p51Ets-1

Nous avons mis en évidence l'existence chez la souris d'un variant d'épissage alternatif de l'exon VII de Ets-1 déjà connu chez l'homme. L'existence de ce variant chez différentes espèces (homme, rat et souris) suggère qu'il joue un rôle important dans la cellule. L'objectif premier de ma thèse était de comparer les fonctions des deux isoformes p51Ets-1 et p42Ets-1. Après avoir mis au point une technique de purification applicable à ces deux protéines recombinantes, nous avons montré que p42Ets-1 est capable de fixer des EBS plus diversifiés que p51Ets-1. En relation avec cela, nos travaux montrent que p42Ets-1 active l'expression de la *VE-cadhérine* différemment de p51Ets-1. En effet, p51Ets-1 se fixe majoritairement à l'EBS4 et peu à l'EBS2 alors que p42Ets-1 reconnaît les deux EBS de manière équivalente. De même, l'activité transactivatrice de p51Ets-1 passe majoritairement par l'EBS4 alors que celle de p42Ets-1 passe de manière équivalente par l'EBS2 et l'EBS4. Dans les cellules, p42Ets-1 est donc bien capable de réguler l'expression de gènes en se fixant sur des EBS différents de p51Ets-1. Conceptuellement, ces résultats présentent un intérêt particulier car ils suggèrent que p42Ets-1 pourrait réguler l'expression de ses propres gènes par l'intermédiaire d'EBS non reconnus par p51Ets-1. Cette hypothèse est également étayée par le fait que l'expression de p42Ets-1 humain dans des cellules de carcinome colique humain induit l'apoptose par augmentation de l'expression de la caspase 1/ICE alors que cet effet n'est pas observé avec p51Ets-1 (Li et al., 1999). Cela suggère que p42Ets-1 active soit directement soit indirectement le gène de la *caspase 1*. Au vu de ces résultats, nous avons cloné une partie du promoteur du gène de la *caspase-1* de souris et testé par co-transfection si p42Ets-1 était effectivement capable d'activer cette partie promotrice. Nous n'avons pas observé d'activation du promoteur de la *caspase-1* de souris par p42Ets-1. Dans nos conditions expérimentales, p42Ets-1 induirait donc l'expression de la *caspase-1* de façon indirecte.

Une suite à donner à ce travail serait de rechercher les gènes cibles de p42Ets-1 différents de ceux de p51Ets-1. Nous avons envisagé de mettre au point un outil rétroviral permettant d'exprimer p51Ets-1 ou p42Ets-1 sous le contrôle d'un promoteur inductible. En effet, les études précédentes ont été réalisées avec un système rétroviral constitutif ne permettant pas le contrôle de l'expression du gène d'intérêt. Avec un outil inductible, nous pourrions utiliser la technique de micro arrays afin de d'identifier les gènes activés différemment par les deux isoformes de Ets-1. D'autre part, afin de s'affranchir du facteur

Ets-1 endogène exprimé par de nombreuses lignées cellulaires, il serait également intéressant d'infecter des cellules dont le gène *ets-1* a été inactivé. Une fois les gènes cibles spécifiques de p42Ets-1 identifiés, il serait alors intéressant d'étudier leurs promoteurs afin de rechercher les séquences des EBS fonctionnels.

II Spécificité de reconnaissance à l'ADN

Nous avons montré que la différence de spécificité de reconnaissance à l'ADN observée entre les deux isoformes de Ets-1 est due à la présence de la région Val₂₈₀-Glu₃₀₂ contenue dans le domaine codé par l'exon VII. Quel mécanisme permet à p42Ets-1 de reconnaître des EBS plus variés ? Les données structurales actuelles nous apprennent que cette zone ne présente pas de structures secondaires particulières. Ceci laisse supposer que cette région n'interagit pas directement avec l'ADN mais que son absence entraîne le remaniement du domaine ETS ainsi que de son environnement. Ce serait cette différence de structure qui permettrait à p42Ets-1 de reconnaître des EBS différents de p51Ets-1. Il faut cependant noter que les analyses structurales réalisées jusqu'à présent ont été effectuées sur des protéines Ets-1 tronquées. Il reste donc possible que la région Val₂₈₀-Glu₃₀₂ interagisse avec l'ADN ou une autre partie de la protéine encore non identifiée. Seule la cristallographie comparative des deux isoformes nous permettra de répondre à ces questions. Dans cette optique, nous avons initié une collaboration avec un laboratoire de cristallographie. Actuellement, cette équipe essaye de purifier de grandes quantités de protéines mais est confrontée aux mêmes problèmes d'agrégation que nous avons rencontrés lors de la mise au point de ce protocole de purification. En attendant ces données, la mutation ponctuelle des acides aminés présents dans la région Val₂₈₀-Glu₃₀₂ permettrait de déterminer l'implication de chaque résidu dans la spécificité de reconnaissance de p51Ets-1.

III Expression et contrôle de l'activité de p42Ets-1

Nous avons pu constater que le transcrit de p42Ets-1 est moins exprimé dans les cellules que celui de p51Ets-1. Néanmoins, notre étude concernant l'expression de p42Ets-1 reste limitée et devrait être poursuivie. Aucune étude approfondie n'a été menée sur l'expression de p42Ets-1 au cours du développement embryonnaire et dans les différentes lignées cellulaires. Avec les techniques actuelles, l'étude de l'expression de p42Ets-1 au cours du développement embryonnaire reste très difficile. En effet, par hybridation *in situ*, il est

difficile de trouver une sonde capable de discriminer efficacement l'expression des différentes isoformes de Ets-1. Nous avons réalisé des expériences initiales d'hybridation *in situ* en utilisant une sonde s'hybridant sur les séquences de l'exon VI et de l'exon VIII afin de différencier les deux isoformes de Ets-1. Cependant, avec cette sonde, nous n'avons pu discriminer l'expression des deux isoformes p51Ets-1 et p42Ets-1.

Au-delà de son expression, la question de la régulation de la protéine p42Ets-1 se pose. En effet, la protéine p42Ets-1 ne possède plus les différentes structures inhibitrices que sont les hélices HI1 et HI2, ainsi que les quatre sérines susceptibles de réguler l'activité transcriptionnelle de Ets-1 en inhibant sa fixation à l'ADN. Se pose alors le problème de la régulation de l'activité de ce variant. Nous savons que la phosphorylation de la thréonine située en position 38 contrôle l'activité transcriptionnelle du facteur p51Ets-1 murin (Yang et al., 1996). Cette thréonine localisée en amont du domaine pointed se retrouve également chez le variant p42Ets-1 et doit probablement participer au contrôle de son activité transcriptionnelle. La régulation de son activité peut également s'effectuer lors d'interactions protéine-protéine qui se réalisent par l'intermédiaire du domaine ETS ou du domaine pointed.

IV Qu'en est-il de la famille ETS ?

Le problème de la spécificité de reconnaissance à l'ADN des deux isoformes de Ets-1 pose plus généralement le problème de la spécificité au niveau de la famille ETS. En effet, l'existence d'une famille de facteurs de transcription partageant un même domaine de liaison à l'ADN et reconnaissant des séquences d'ADN très proches apparaît comme étant un véritable paradoxe. Malgré le fait que l'ensemble des facteurs ETS reconnaisse une séquence d'ADN d'environ 10bp contenant un motif central GGAA/T, chaque facteur ETS possède une fonction propre. Cette spécificité fonctionnelle individuelle ne peut s'expliquer que par l'intégration de plusieurs mécanismes. En effet, certains facteurs sont tissus spécifiques, leur activité transcriptionnelle est régulée par des voies de transduction différentes, ils interagissent avec des partenaires différents et possèdent individuellement une relative spécificité de reconnaissance des séquences d'ADN. L'intégration de tous ces mécanismes de régulation permet d'expliquer que les facteurs de transcription de la famille ETS possèdent une spécificité fonctionnelle individuelle. Malgré cela, l'inactivation du gène *ets-1* donne des souris viables sans aucun phénotype angiogénique. Comment expliquer cela ? Les gènes *erg* et *fli-1* présentent un patron d'expression très similaire à celui de *ets-1* dans les cellules endothéliales au début du développement embryonnaire. Ces facteurs pourraient donc assurer

la fonction de Ets-1 lorsque son gène est invalidé. Nous pouvons ainsi penser qu'il existe une redondance fonctionnelle entre ces trois facteurs et également avec d'autres non encore identifiés lors de l'angiogenèse. Si cette redondance fonctionnelle existe, pourquoi d'autres facteurs ETS ne sont-ils pas capables de palier les défauts vasculaires causés par l'inactivation du gène *fli-1* ou de *Tel* ?

V Quel est le rôle de Ets-1 dans les cellules endothéliales ?

Le fait que *ets-1* soit exprimé dans les précurseurs endothéliaux ainsi que dans les cellules endothéliales pendant l'angiogenèse laisse à penser que ce facteur de transcription joue un rôle important dans la mise en place de l'endothélium. De nombreuses molécules, telles que CD13, Egr-1, Flt-1, Flk-1 ou uPA, intervenant dans le processus d'angiogenèse présentent dans leur promoteur des EBS fonctionnels et sont décrits comme des gènes cibles putatifs de Ets-1. Dans nos conditions expérimentales, sur l'ensemble des molécules étudiées, seul le gène *fli-1* apparaît être un gène cible de Ets-1 dans les cellules endothéliales. Ces résultats suggèrent donc que Ets-1 est vraisemblablement capable de discriminer les gènes à activer malgré la présence d'EBS actifs dans certains promoteurs de gènes étudiés. Il est intéressant de noter que *fli-1* est induit par Ets-1 uniquement dans les cellules endothéliales et non dans les fibroblastes. Cela laisse supposer que le gène *fli-1* possède une zone promotrice permettant son expression dans les cellules endothéliales. Cette zone de régulation n'est pas connue et reste encore à définir.

Au cours de cette étude, nous avons pu également mettre en évidence que Fli-1 fixe et transactive son propre promoteur. Au cours du développement embryonnaire, *ets-1* est exprimé à des stades plus précoces que *fli-1*. Nous pouvons faire l'hypothèse que Ets-1 initie l'expression de *fli-1* dans les phases les plus précoces du développement, puis dans les phases plus tardives, Fli-1 régule sa propre expression. Il n'est pas exclu que d'autres protéines ETS participent à cette régulation. En effet, les expériences de retard sur gel montrent que des protéines nucléaires de cellules endothéliales, autres que Ets-1 et Fli-1 sont capables de se fixer spécifiquement aux EBS présents dans le promoteur du gène *fli-1*. Certains facteurs ETS tels que Erg, Elf-1 et NERF2 sont également exprimés dans les cellules endothéliales lors de la formation de nouveaux vaisseaux et pourraient donc participer à la régulation de l'expression du gène *fli-1* dans les cellules endothéliales. Des travaux réalisés sur le facteur Tel nous permettent de penser que ce facteur est impliqué dans le contrôle de l'expression du gène *fli-1*. En effet, Tel interagit physiquement avec Fli-1 ce qui a pour effet d'inhiber la capacité

transactivatrice de Fli-1 (Kwiatkowski et al., 1998). De plus, Tel réprime l'activité de la partie promotrice -270/-41 de *fli-1*. Cette répression s'effectue par l'intermédiaire des EBS présents dans cette zone. Tel pourrait réprimer l'expression de *fli-1* à deux niveaux : au niveau de la boucle d'autorégulation en interagissant directement avec la protéine Fli-1, et au niveau du promoteur de *fli-1* en se fixant sur les EBS (Lopez et al., 1999).

L'étude de la régulation transcriptionnelle des gènes exprimés dans les cellules endothéliales pendant la mise en place des vaisseaux sanguins dans ces cellules permettra de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'angiogenèse. Actuellement, de nombreuses données tendent à démontrer que les facteurs de transcription de la famille ETS régulent l'expression de gènes impliqués dans ce processus.

Références

- Augustijn, K.D., D.L. Duval, R. Wechselberger, R. Kaptein, A. Gutierrez-Hartmann, and P.C. van der Vliet. 2002. Structural characterization of the PIT-1/ETS-1 interaction: PIT-1 phosphorylation regulates PIT-1/ETS-1 binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:12657-62.
- Ayadi, A., M. Suelves, P. Dolle, and B. Wasylyk. 2001a. Net, an Ets ternary complex transcription factor, is expressed in sites of vasculogenesis, angiogenesis, and chondrogenesis during mouse development. *Mech Dev.* 102:205-8.
- Ayadi, A., H. Zheng, P. Sobieszczuk, G. Buchwalter, P. Moerman, K. Alitalo, and B. Wasylyk. 2001b. Net-targeted mutant mice develop a vascular phenotype and up-regulate *egr-1*. *Embo J.* 20:5139-52.
- Bach, T.L., C. Barsigian, D.G. Chapulowicz, D. Busler, C.H. Yaen, D.S. Grant, and J. Martinez. 1998. VE-cadherin mediates endothelial cell capillary tube formation in fibrin and collagen gels. *Exp Cell Res.* 238:324-334.
- Baker, D.A., B. Mille-Baker, S.M. Wainwright, D. Ish-Horowicz, and N.J. Dibb. 2001. Mae mediates MAP kinase phosphorylation of Ets transcription factors in *Drosophila*. *Nature.* 411:330-4.
- Baltzinger, M., A.M. Mager-Heckel, and P. Remy. 1999. XI *erg*: expression pattern and overexpression during development plead for a role in endothelial cell differentiation. *Dev Dyn.* 216:420-33.
- Barat, C., B. Barbeau, O. Delattre, and E. Rassart. 2000. Presence of new alternative exons in human and mouse *Fli-1* genes. *Biochim Biophys Acta.* 1517:164-70.
- Barbeau, B., C. Barat, D. Bergeron, and E. Rassart. 1999. The GATA-1 and Spi-1 transcriptional factors bind to a GATA/EBS dual element in the *Fli-1* exon 1. *Oncogene.* 18:5535-45.
- Barbeau, B., D. Bergeron, M. Beaulieu, Z. Nadjem, and E. Rassart. 1996. Characterization of the human and mouse *Fli-1* promoter regions. *Biochim Biophys Acta.* 1307:220-32.
- Barton, K., N. Muthusamy, C. Fischer, C.-N. Ting, T.L. Walunas, L.L. Lanier, and J.M. Leiden. 1998. The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity.* 9:555-563.
- Ben David, Y., E.B. Giddens, K. Letwin, and A. Bernstein. 1991. Erythroleukemia induction by friend murine leukemia virus : insertional activation of a new member of the ets gene family, *fli-1*, closely linked to *c-ets1*. *Genes Dev.* 5:908-918.
- Ben-David, Y., E.B. Giddens, and A. Bernstein. 1990. Identification and mapping of a common proviral integration site *Fli-1* in erythroleukemia cells induced by Friend murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:1332-6.
- Bhat, N.K., C.B. Thompson, T. Lindsten, C.H. June, S. Fujiwara, S. Koizumi, R.J. Fisher, and T.S. Papas. 1990. Reciprocal expression of human *ets1* and *ets2* genes during T-cell activation : regulatory role for the proto-oncogene *ets1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:3723-3727.
- Bories, J.C., D.M. Willerford, D. Grévin, L. Davidson, A. Camus, P. Martin, D. Stéhelin, and F.W. Alt. 1995. Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. *Nature.* 377:635-638.
- Bradford, A.P., K.S. Brodsky, S.E. Diamond, L.C. Kuhn, Y. Liu, and A. Gutierrez-Hartmann. 2000. The Pit-1 homeodomain and beta-domain interact with Ets-1 and modulate synergistic activation of the rat prolactin promoter. *J Biol Chem.* 275:3100-6.
- Breier, G., F. Breviario, L. Caveda, R. Berthier, H. Schnürch, U. Gotsch, D. Vestweber, W. Risau, and E. Dejana. 1996. Molecular cloning and expression of murine vascular

- endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood*. 87:630-641.
- Breviario, F., L. Caveda, M. Corada, I. Martin-Padura, P. Navarro, J. Golay, M. Introna, D. Gulino, M.G. Lampugnani, and E. Dejana. 1995. Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 15:1229-1239.
- Brusselmans, K., F. Bono, P. Maxwell, Y. Dor, M. Dewerchin, D. Collen, J.M. Herbert, and P. Carmeliet. 2001. Hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia. *J Biol Chem*. 276:39192-6.
- Buttice, G., M. Duterque-Coquillaud, J.P. Basuyaux, S. Carrere, M. Kurkinen, and D. Stehelin. 1996. Erg, an Ets-family member, differentially regulates human collagenase1 (MMP1) and stromelysin1 (MMP3) gene expression by physically interacting with the Fos/Jun complex. *Oncogene*. 13:2297-306.
- Carmeliet, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 6:389-95.
- Carmeliet, P., Y. Dor, J.M. Herbert, D. Fukumura, K. Brusselmans, M. Dewerchin, M. Neeman, F. Bono, R. Abramovitch, P. Maxwell, C.J. Koch, P. Ratcliffe, L. Moons, R.K. Jain, D. Collen, E. Keshert, and E. Keshet. 1998. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 394:485-90.
- Carmeliet, P., M.G. Lampugnani, L. Moons, F. Breviario, V. Compernelle, F. Bono, G. Balconi, R. Spagnuolo, B. Oostuyse, M. Dewerchin, A. Zanetti, A. Angellilo, V. Mattot, D. Nuyens, E. Lutgens, F. Clotman, M.C. de Ruiter, A. Gittenberger-de Groot, R. Poelmann, F. Lupu, J.M. Herbert, D. Collen, and E. Dejana. 1999. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*. 98:147-57.
- Caveda, L., I. Martin-Padura, P. Navarro, F. Breviario, M. Corada, D. Gulino, M.G. Lampugnani, and E. Dejana. 1996. Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (Cadherin-5/VE-Cadherin). *J. Clin. Invest*. 98:886-893.
- Chen, J.H. 1985. The proto-oncogene c-ets1 is preferentially expressed in lymphoid cells. *Mol. Cell Biol*. 5:2993-3000.
- Chen, Z.-q., R.J. Fisher, C.W. Riggs, J.S. Rhim, and J.A. Lautenberger. 1997. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by ETS1 antisense oligonucleotides. *Cancer Res*. 57:2013-2019.
- Christensen, R.A., K. Fujikawa, R. Madore, P. Oettgen, and L. Varticovski. 2002. NERF2, a member of the Ets family of transcription factors, is increased in response to hypoxia and angiopoietin-1: a potential mechanism for Tie2 regulation during hypoxia. *J Cell Biochem*. 85:505-15.
- Cockman, M.E., N. Masson, D.R. Mole, P. Jaakkola, G.W. Chang, S.C. Clifford, E.R. Maher, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, and P.H. Maxwell. 2000. Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*. 275:25733-41.
- Cowley, D.O., and B.J. Graves. 2000. Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition. *Genes & Development*. 14:366-76.
- de Taisne, C., A. Gégonne, D. Stéhelin, A. Bernheim, and R. Berger. 1984. Chromosomal localization of the human proto-oncogene c-ets. *Nature*. 310:581-583.
- Dhulipala, P.D., L. Lee, V.N. Rao, and E.S. Reddy. 1998. Fli-1b is generated by usage of differential splicing and alternative promoter. *Oncogene*. 17:1149-57.
- Donaldson, L.W., J.M. Petersen, B.J. Graves, and L.P. McIntosh. 1994. Secondary structure of the ETS domain places murine Ets-1 in the superfamily of winged helix-turn-helix DNA-binding proteins. *Biochemistry*. 33:13509-16.

- Donaldson, L.W., J.M. Petersen, B.J. Graves, and L.P. McIntosh. 1996. Solution structure of the ETS domain from murine Ets-1: a winged helix-turn-helix DNA binding motif. *Embo J.* 15:125-34.
- Dube, A., Y. Akbarali, T.N. Sato, T.A. Libermann, and P. Oettgen. 1999. Role of the Ets transcription factors in the regulation of the vascular-specific Tie2 gene. *Circ Res.* 84:1177-85.
- Dube, A., S. Thai, J. Gaspar, S. Rudders, T.A. Libermann, L. Iruela-Arispe, and P. Oettgen. 2001. Elf-1 is a transcriptional regulator of the Tie2 gene during vascular development. *Circ Res.* 88:237-44.
- Duterque-Coquillaud, M., C. Niel, S. Plaza, and D. Stehelin. 1993. New human erg isoforms generated by alternative splicing are transcriptional activators. *Oncogene.* 8:1865-73.
- Elvert, G., A. Kappel, R. Heidenreich, U. Englmeier, S. Lanz, T. Acker, M. Rauter, K. Plate, M. Sieweke, G. Breier, and I. Flamme. 2003. Cooperative Interaction of Hypoxia-inducible Factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the Transcriptional Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem.* 278:7520-7530.
- Ema, M., K. Hirota, J. Mimura, H. Abe, J. Yodoi, K. Sogawa, L. Poellinger, and Y. Fujii-Kuriyama. 1999. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *Embo J.* 18:1905-14.
- Fisher, R.J., M. Fivash, J. Casas-Finet, J.W. Erickson, A. Kondoh, S.V. Bladen, C. Fisher, D.K. Watson, and T. Papas. 1994. Real-time DNA binding measurements of the ETS1 recombinant oncoproteins reveal significant kinetic differences between the p42 and p51 isoforms. *Protein Sci.* 3:257-66.
- Flamme, I., T. Frohlich, M. von Reutern, A. Kappel, A. Damert, and W. Risau. 1997. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev.* 63:51-60.
- Forsythe, J.A., B.H. Jiang, N.V. Iyer, F. Agani, S.W. Leung, R.D. Koos, and G.L. Semenza. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 16:4604-4613.
- Ganan, Y., D. Macias, M. Duterque-Coquillaud, M.A. Ros, and J.M. Hurler. 1996. Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development.* 122:2349-57.
- Garvie, C.W., M.A. Pufall, B.J. Graves, and C. Wolberger. 2002. Structural analysis of the autoinhibition of Ets-1 and its role in protein partnerships. *J Biol Chem.* 6:6.
- Garvie, C.W., and C. Wolberger. 2001. Recognition of specific DNA sequences. *Mol Cell.* 8:937-46.
- Gaspar, J., S. Thai, C. Volland, A. Dube, T.A. Libermann, M.L. Iruela-Arispe, and P. Oettgen. 2002. Opposing functions of the Ets factors NERF and ELF-1 during chicken blood vessel development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22:1106-12.
- Ghysdael, J., and A. Boureux. 1997. The ETS family of transcriptional regulators. *In Progress in gene expression.* Vol. 1. M. Karin, editor. Birkhäuser Verlag, Basel. 29-89.
- Goetz, T.L., T.L. Gu, N.A. Speck, and B.J. Graves. 2000. Auto-inhibition of Ets-1 is counteracted by DNA binding cooperativity with core-binding factor alpha2. *Mol Cell Biol.* 20:81-90.
- Golub, T.R., G.F. Barker, M. Lovett, and D.G. Gilliland. 1994. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell.* 77:307-16.

- Golub, T.R., A. Goga, G.F. Barker, D.E. Afar, J. McLaughlin, S.K. Bohlander, J.D. Rowley, O.N. Witte, and D.G. Gilliland. 1996. Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol Cell Biol.* 16:4107-16.
- Gory, S., J. Dalmon, M.-H. Prandini, T. Kortulewski, Y. de Launoit, and P. Huber. 1998. Requirement of a GT box (Sp1 site) and two Ets binding sites for vascular endothelial cadherin gene transcription. *J Biol Chem.* 273:6750-6755.
- Gory, S., M. Vernet, M. Laurent, E. Dejana, J. Dalmon, and P. Huber. 1999. The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice. *Blood.* 93:184-192.
- Gory-Fauré, S., M.H. Prandini, H. Pointu, V. Roullot, I. Pignot-Paintrand, M. Vernet, and P. Huber. 1999. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development.* 126:2093-2102.
- Gotsch, U., E. Borges, R. Bosse, E. Boggemeyer, M. Simon, H. Mossmann, and D. Vestweber. 1997. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci.* 110:583-8.
- Grevin, D., J.H. Chen, M.B. Raes, D. Stehelin, B. Vandebunder, and X. Desbiens. 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.
- Gu, T.L., T.L. Goetz, B.J. Graves, and N.A. Speck. 2000. Auto-inhibition and partner proteins, core-binding factor beta (CBFbeta) and Ets-1, modulate DNA binding by CBFalpha2 (AML1). *Mol Cell Biol.* 20:91-103.
- Gugneja, S., J.V. Virbasius, and R.C. Scarpulla. 1995. Four structurally distinct, non-DNA-binding subunits of human nuclear respiratory factor 2 share a conserved transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol.* 15:102-11.
- Hart, A., F. Melet, P. Grossfeld, K. Chien, C. Jones, A. Tunnacliffe, R. Favier, and A. Bernstein. 2000. Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygotously deleted in patients with thrombocytopenia. *Immunity.* 13:167-77.
- Hogenesch, J.B., W.K. Chan, V.H. Jackiw, R.C. Brown, Y.Z. Gu, M. Pray-Grant, G.H. Perdew, and C.A. Bradfield. 1997. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem.* 272:8581-93.
- Huang, C.-C., T.S. Papas, and N.K. Bhat. 1997. A variant form of Ets1 induces apoptosis in human colon cancer cells. *Oncogene.* 15:851-856.
- Huang, L.E., J. Gu, M. Schau, and H.F. Bunn. 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:7987-92.
- Huber, P., J. Dalmon, J. Engiles, F. Breviario, S. Gory, L.D. Siracusa, A.M. Buchberg, and E. Dejana. 1996. Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse VE-cadherin gene (Cdh5). *Genomics.* 32:21-8.
- Iwasaka, C., K. Tanaka, M. Abe, and Y. Sato. 1996. Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol.* 169:522-531.
- Iyer, N.V., L.E. Kotch, F. Agani, S.W. Leung, E. Laughner, R.H. Wenger, M. Gassmann, J.D. Gearhart, A.M. Lawler, A.Y. Yu, and G.L. Semenza. 1998. Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 12:149-62.
- Kappel, A., T.M. Schlaeger, I. Flamme, S.H. Orkin, W. Risau, and G. Breier. 2000. Role of SCL/Tal-1, GATA, and Ets transcription factor binding sites for the regulation of Flk-1 expression during murine vascular development. *Blood.* 96:3078-3085.

- Kataoka, K., K.T. Fujiwara, M. Noda, and M. Nishizawa. 1994. MafB, a new Maf family transcription activator that can associate with Maf and Fos but not with Jun. *Mol Cell Biol.* 14:7581-91.
- Kawasaki, T., Y. Bekku, F. Suto, T. Kitsukawa, M. Taniguchi, I. Nagatsu, T. Nagatsu, K. Itoh, T. Yagi, and H. Fujisawa. 2002. Requirement of neuropilin 1-mediated Sema3A signals in patterning of the sympathetic nervous system. *Development.* 129:671-80.
- Kim, C.A., M.L. Phillips, W. Kim, M. Gingery, H.H. Tran, M.A. Robinson, S. Faham, and J.U. Bowie. 2001. Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression. *Embo J.* 20:4173-82.
- Kim, W.Y., M. Sieweke, E. Ogawa, H.J. Wee, U. Englmeier, T. Graf, and Y. Ito. 1999. Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains. *EMBO J.* 18:1609-20.
- Klempnauer, K.H., G. Symonds, G.I. Evan, and J.M. Bishop. 1984. Subcellular localization of proteins encoded by oncogenes of avian myeloblastosis virus and avian leukemia virus E26 and by the chicken c-myc gene. *Cell.* 37:537-547.
- Kodandapani, R., F. Pio, C.Z. Ni, G. Piccialli, M. Klemsz, S. McKercher, R.A. Maki, and K.R. Ely. 1996. A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS- domain-DNA complex. *Nature.* 380:456-60.
- Koizumi, S., R.J. Fisher, S. Fujiwara, C. Jorcyk, N.K. Bhat, A. Seth, and T.S. Papas. 1990. Isoforms of the human ets-1 protein : generation by alternative splicing and differential phosphorylation. *Oncogene.* 5:675-681.
- Kotch, L.E., N.V. Iyer, E. Laughner, and G.L. Semenza. 1999. Defective vascularization of HIF-1 α -null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol.* 209:254-67.
- Kwiatkowski, B.A., L.S. Bastian, T.R. Bauer, Jr., S. Tsai, A.G. Zielinska-Kwiatkowska, and D.D. Hickstein. 1998. The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem.* 273:17525-30.
- LaMarco, K., C.C. Thompson, B.P. Byers, E.M. Walton, and S.L. McKnight. 1991. Identification of ets- and notch-related subunits in GA binding protein. *Science.* 253:789-792.
- Lampugnani, M.G., M. Corada, L. Caveda, F. Breviario, O. Ayalon, B. Geiger, and E. Dejana. 1995. The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, β -catenin, and α -catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J. Cell Biol.* 129:203-217.
- Lando, D., D.J. Peet, D.A. Whelan, J.J. Gorman, and M.L. Whitelaw. 2002. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science.* 295:858-61.
- Laudet, V., C. Hanni, D. Stehelin, and M. Duterrque-Coquillaud. 1999. Molecular phylogeny of the ETS gene family. *Oncogene.* 18:1351-9.
- Lelièvre, E., V. Mattot, P. Huber, B. Vandembunder, and F. Soncin. 2000. Ets1 lowers capillary endothelial cell density at confluence and induces the expression of VE-cadherin. *Oncogene.* 19:2438-2446.
- Leprince, D., A. Gegonne, J. Coll, C. de Taisne, A. Schneeberger, C. Lagrou, and D. Stéhelin. 1983. A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature.* 306:395-397.
- Levy, A.P., N.S. Levy, J. Loscalzo, A. Calderone, N. Takahashi, K.T. Yeo, G. Koren, W.S. Colucci, and M.A. Goldberg. 1995. Regulation of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *Circ Res.* 76:758-66.
- Li, R., H. Pei, and T. Papas. 1999. The p42 variant of ETS1 protein rescues defective Fas-induced apoptosis in colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:3876-81.

- Liang, H., X. Mao, E.T. Olejniczak, D.G. Nettesheim, L. Yu, R.P. Meadows, C.B. Thompson, and S.W. Fesik. 1994a. Solution structure of the ets domain of Fli-1 when bound to DNA. *Nat Struct Biol.* 1:871-5.
- Liang, H., E.T. Olejniczak, X. Mao, D.G. Nettesheim, L. Yu, C.B. Thompson, and S.W. Fesik. 1994b. The secondary structure of the ets domain of human Fli-1 resembles that of the helix-turn-helix DNA-binding motif of the Escherichia coli catabolite gene activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:11655-9.
- Lisztwan, J., G. Imbert, C. Wirbelauer, M. Gstaiger, and W. Krek. 1999. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev.* 13:1822-33.
- Liu, H., and T. Grundstrom. 2002. Calcium Regulation of GM-CSF by Calmodulin-Dependent Kinase II Phosphorylation of Ets1. *Mol Biol Cell.* 13:4497-507.
- Lopez, R.G., C. Carron, C. Oury, P. Gardellin, O. Bernard, and J. Ghysdael. 1999. TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem.* 274:30132-8.
- Macias, D., Y. Ganam, T.K. Sampath, M.E. Piedra, M.A. Ros, and J.M. Hurler. 1997. Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development.* 124:1109-17.
- Maltepe, E., J.V. Schmidt, D. Baunoch, C.A. Bradfield, and M.C. Simon. 1997. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature.* 386:403-407.
- Maroulakou, I.G., and D.B. Bowe. 2000. Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene.* 19:6432-42.
- Maroulakou, I.G., T.S. Papas, and J.E. Green. 1994. Differential expression of *ets-1* and *ets-2* proto-oncogenes during murine embryogenesis. *Oncogene.* 9:1551-1565.
- Matsushita, N., K. Sogawa, M. Ema, A. Yoshida, and Y. Fujii-Kuriyama. 1993. A factor binding to the xenobiotic responsive element (XRE) of P-450A1 gene consists of at least two helix-loop-helix proteins, Ah receptor and Arnt. *J Biol Chem.* 268:21002-6.
- Maxwell, P.H., M.S. Wiesener, G.W. Chang, S.C. Clifford, E.C. Vaux, M.E. Cockman, C.C. Wykoff, C.W. Pugh, E.R. Maher, and P.J. Ratcliffe. 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* 399:271-5.
- McLaughlin, F., V.J. Ludbrook, J. Cox, I. von Carlowitz, S. Brown, and A.M. Randi. 2001. Combined genomic and antisense analysis reveals that the transcription factor Erg is implicated in endothelial cell differentiation. *Blood.* 98:3332-9.
- McLaughlin, F., V.J. Ludbrook, I. Kola, C.J. Campbell, and A.M. Randi. 1999. Characterisation of the tumour necrosis factor (TNF)-(alpha) response elements in the human ICAM-2 promoter. *J Cell Sci.* 112:4695-703.
- Melet, F., B. Motro, D.J. Rossi, L. Zhang, and A. Bernstein. 1996. Generation of a novel Fli-1 protein by gene targeting leads to a defect in thymus development and a delay in Friend virus-induced erythroleukemia. *Mol Cell Biol.* 16:2708-18.
- Muthusamy, N., K. Barton, and J.M. Leiden. 1995. Defective activation and survival of T cells lacking the Ets-1 transcription factor. *Nature.* 377:639-642.
- Naito, S., S. Shimizu, S. Maeda, J. Wang, R. Paul, and J.A. Fagin. 1998. Ets-1 is an early response gene activated by ET-1 and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 274:C472-80.
- Nunn, M.F., P.H. Seeburg, C. Moscovici, and P.H. Duesberg. 1983. Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature.* 306:391-395.
- Oettgen, P., Y. Akbarali, J. Boltax, J. Best, C. Kunsch, and T.A. Libermann. 1996. Characterization of NERF, a novel transcription factor related to the Ets factor ELF-1. *Mol Cell Biol.* 16:5091-106.

- Oikawa, M., M. Abe, H. Kurosawa, W. Hida, K. Shirato, and Y. Sato. 2001. Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 289:39-43.
- Papadopoulos, P., S.A. Ridge, C.A. Boucher, C. Stocking, and L.M. Wiedemann. 1995. The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL. *Cancer Res.* 55:34-8.
- Pardanaud, L., and F. Dieterlen-Lièvre. 1993. Expression of C-ETS1 in early chick embryo mesoderm : relationship to the hemangioblastic lineage. *Cell Adhesion and Communication.* 1:151-160.
- Pearson, R.B., J.R. Woodgett, P. Cohen, and B.E. Kemp. 1985. Substrate specificity of a multifunctional calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 260:14471-6.
- Peng, J., L. Zhang, L. Drysdale, and G.H. Fong. 2000. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:8386-91.
- Petersen, J.M., J.J. Skalicky, L.W. Donaldson, L.P. McIntosh, T. Alber, and B.J. Graves. 1995. Modulation of transcription factor Ets-1 DNA binding: DNA-induced unfolding of an alpha helix. *Science.* 269:1866-9.
- Pio, F., R. Kodandapani, C.Z. Ni, W. Shepard, M. Klemsz, S.R. McKercher, R.A. Maki, and K.R. Ely. 1996. New insights on DNA recognition by ets proteins from the crystal structure of the PU.1 ETS domain-DNA complex. *J Biol Chem.* 271:23329-37.
- Pognonec, P., K.E. Boulukos, R. Bosselut, C. Boyer, A.M. Schmitt-Verhulst, and J. Ghysdael. 1990. Identification of a Ets1 variant protein unaffected in its chromatin and *in vitro* DNA binding capacities by T cell antigen receptor triggering and intracellular calcium rises. *Oncogene.* 5:603-610.
- Pognonec, P., K.E. Boulukos, J.C. Gesquiere, D. Stehelin, and J. Ghysdael. 1988. Mitogenic stimulation of thymocytes results in the calcium-dependent phosphorylation of c-ets-1 proteins. *Embo J.* 7:977-83.
- Poirel, H., C. Oury, C. Carron, E. Duprez, Y. Laabi, A. Tsapis, S.P. Romana, M. Mauchauffe, M. Le Coniat, R. Berger, J. Ghysdael, and O.A. Bernard. 1997. The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties. *Oncogene.* 14:349-57.
- Pugh, C.W., J.F. O'Rourke, M. Nagao, J.M. Gleadle, and P.J. Ratcliffe. 1997. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem.* 272:11205-14.
- Quéva, C., D. Leprince, D. Stéhelin, and B. Vandebunder. 1993. p54^{c-ets-1} and p68^{c-ets-1}, the two transcription factors encoded by the c-ets-1 locus, are differentially expressed during the development of the chick embryo. *Oncogene.* 8:2511-2520.
- Rabault, B., and J. Ghysdael. 1994. Calcium-induced phosphorylation of Ets1 inhibits its specific DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* 269:28143-28151.
- Rao, V.N., T.S. Papas, and E.S. Reddy. 1987. *erg*, a human ets-related gene on chromosome 21: alternative splicing, polyadenylation, and translation. *Science.* 237:635-9.
- Reddy, E.S.P., V.N. Rao, and P.T.K. and. 1987. The *erg* gene : a human gene related to the ets oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* 84:6131-6135.
- Reyes, H., S. Reisz-Porszasz, and O. Hankinson. 1992. Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science.* 256:1193-5.
- Ryan, H.E., J. Lo, and R.S. Johnson. 1998. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J.* 17:3005-15.
- Salceda, S., and J. Caro. 1997. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its

- stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem.* 272:22642-7.
- Schwachtgen, J.L., N. Janel, L. Berek, M. Duterque-Coquillaud, J. Ghysdael, D. Meyer, and D. Kerbiriou-Nabias. 1997. Ets transcription factors bind and transactivate the core promoter of the von Willebrand factor gene. *Oncogene.* 15:3091-3102.
- Shapiro, L., A.M. Fannon, P.D. Kwong, A. Thompson, M.S. Lehmann, G. Grubel, J.F. Legrand, J. Als-Nielsen, D.R. Colman, and W.A. Hendrickson. 1995. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature.* 374:327-37.
- Shimizu, K., H. Ichikawa, A. Tojo, Y. Kaneko, N. Maseki, Y. Hayashi, M. Ohira, S. Asano, and M. Ohki. 1993. An ets-related gene, ERG, is rearranged in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:10280-4.
- Sieweke, M.H., H. Tekotte, J. Frampton, and T. Graf. 1996. MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell.* 85:49-60.
- Skalicky, J.J., L.W. Donaldson, J.M. Petersen, B.J. Graves, and L.P. McIntosh. 1996. Structural coupling of the inhibitory regions flanking the ETS domain of murine Ets-1. *Protein Sci.* 5:296-309.
- Soncin, F., R. Prevelige, and S.K. Calderwood. 1997. Expression and purification of human heat-shock transcription factor 1. *Protein Expression and Purification.* 9:27-32.
- Spyropoulos, D.D., P.N. Pharr, K.R. Lavenburg, P. Jackers, T.S. Papas, M. Ogawa, and D.K. Watson. 2000. Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Mol Cell Biol.* 20:5643-52.
- Starck, J., A. Doubeikovski, S. Sarrazin, C. Gonnet, G. Rao, A. Skoultchi, J. Godet, I. Dusanter-Fourt, and F. Morle. 1999. Spi-1/PU.1 is a positive regulator of the Fli-1 gene involved in inhibition of erythroid differentiation in Friend erythroleukemic cell lines. *Mol Cell Biol.* 19:121-135.
- Su, W.H., H.I. Chen, and C.J. Jen. 2002. Differential movements of VE-cadherin and PECAM-1 during transmigration of polymorphonuclear leukocytes through human umbilical vein endothelium. *Blood.* 100:3597-603.
- Suzuki, H., V. Romano-Spica, T.S. Papas, and N.K. Bhat. 1995. ETS1 suppresses tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:4442-4446.
- Tamura, K., W.S. Shan, W.A. Hendrickson, D.R. Colman, and L. Shapiro. 1998. Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron.* 20:1153-63.
- Tanaka, K., N. Oda, C. Iwasaka, M. Abe, and Y. Sato. 1998. Induction of Ets-1 in endothelial cells during reendothelialization after denuding injury. *J Cell Physiol.* 176:235-244.
- Tanimoto, K., Y. Makino, T. Pereira, and L. Poellinger. 2000. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Embo J.* 19:4298-309.
- Teruyama, K., M. Abe, T. Nakano, C. Iwasaka-Yagi, S. Takahashi, S. Yamada, and Y. Sato. 2001a. Role of transcription factor Ets-1 in the apoptosis of human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol.* 188:243-52.
- Teruyama, K., M. Abe, T. Nakano, S. Takahashi, S. Yamada, and Y. Sato. 2001b. Neuropilin-1 is a downstream target of transcription factor Ets-1 in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Lett.* 504:1-4.
- Thompson, C.C., T.A. Brown, and S.L. McKnight. 1991. Convergence of Ets- and notch-related structural motifs in a heterodimeric DNA binding complex. *Science.* 253:762-768.

- Tian, H., S.L. McKnight, and D.W. Russell. 1997. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 11:72-82.
- Vandenbunder, B., L. Pardanaud, T. Jaffredo, M.A. Mirabel, and D. Stehelin. 1989. Complementary patterns of expression of c-ets1, c-myb and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo. *Development.* 106:265-274.
- Vittet, D., T. Buchou, A. Schweitzer, E. Dejana, and P. Huber. 1997. Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:6273-6278.
- Wang, G.L., and G.L. Semenza. 1993. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:4304-8.
- Wang, H., L.P. McIntosh, and B.J. Graves. 2002. Inhibitory module of Ets-1 allosterically regulates DNA binding through a dipole-facilitated phosphate contact. *J Biol Chem.* 277:2225-33.
- Wang, L.C., F. Kuo, Y. Fujiwara, D.G. Gilliland, T.R. Golub, and S.H. Orkin. 1997. Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *EMBO J.* 16:4374-4383.
- Wasylyk, C., S.E. Schlumberger, P. Criqui-Filipe, and B. Wasylyk. 2002. Sp100 interacts with ETS-1 and stimulates its transcriptional activity. *Mol Cell Biol.* 22:2687-702.
- Werner, M.H., G.M. Clore, C.L. Fisher, R.J. Fisher, L. Trinh, J. Shiloach, and A.M. Gronenborn. 1997. Correction of the NMR structure of the ETS1/DNA complex. *J Biomol NMR.* 10:317-28.
- Werner, M.H., M. Clore, C.L. Fisher, R.J. Fisher, L. Trinh, J. Shiloach, and A.M. Gronenborn. 1995. The solution structure of the human ETS1-DNA complex reveals a novel mode of binding and true side chain intercalation. *Cell.* 83:761-71.
- Werner, M.H., A.M. Gronenborn, and G.M. Clore. 1996. Intercalation, DNA kinking, and the control of transcription. *Science.* 271:778-784.
- Wernert, N., M.B. Raes, P. Lassalle, M.P. Dehouck, B. Gosselin, B. Vandenbunder, and D. Stehelin. 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 Pathology.* 140:119-127.
- Wernert, N., A. Stanjek, S. Kiriakidis, A. Hugel, H. Chandra Jha, R. Mazitschek, and A. Giannis. 1999. Inhibition of angiogenesis in vivo by ets-1 antisense oligonucleotides - inhibition of Ets-1 transcription factor expression by the antibiotic fumagillin. *Angew Chem Int Ed.* 38:3228-3231.
- Yang, B.S., C.A. Hauser, G. Henkel, M.S. Colman, C. Van Beveren, K.J. Stacey, D.A. Hume, R.A. Maki, and M.C. Ostrowski. 1996. Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2. *Mol. Cell. Biol.* 16:538-547.
- Yu, F., S.B. White, Q. Zhao, and F.S. Lee. 2001. HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:9630-5.
- Zucman, J., T. Melot, C. Desmaze, J. Ghysdael, B. Plougastel, M. Peter, J.M. Zucker, T.J. Triche, D. Sheer, C. Turc-Carel, and et al. 1993. Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. *Embo J.* 12:4481-7.

