

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Institut de Biologie de Lille, UMR 8161

THESE DE DOCTORAT

Biologie-Santé

Présentée par

Virginie FIRLEJ

Facteurs de transcription du groupe PEA3 et cancérogenèse mammaire : modèles d'inhibition de l'expression, études phénotypiques et recherche de gènes cibles

Soutenue en public le 24 novembre 2006

Jury :

Président :	Pr Jean-Pierre VILAIN	Université Lille 1
Rapporteurs :	Pr Philippe BIREMBAUT	Université de Reims
	Dr Rosita WINKLER	Université de Liège
Examineurs :	Dr Guillemette HUET	Université de Lille 2
	Pr Philippe DELANNOY	Université de Lille 1
	Pr Xavier DESBIENS	Université de Lille 1
Co-encadrante :	Dr Anne CHOTTEAU-LELIEVRE	Université de Lille 1
Directeur de thèse :	Pr Yvan DE LAUNOIT	Institut de Biologie de Lille

Avant-propos

Mon travail de thèse s'est déroulé sur deux laboratoires de recherche, le laboratoire de Biologie du Développement à l'université de Lille1 et l'unité CNRS UMR 8161 Institut de Biologie de Lille (ex UMR 8117) au sein de l'Institut Pasteur de Lille.

Je tiens à remercier :

Les professeurs **Xavier Desbiens** et **Hubert Hondermarck** qui se sont succédés en tant que directeurs du laboratoire de Biologie du Développement et le professeur **Yvan de Launoit**, en tant que directeur de l'UMR 8161 de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire.

Anne, même si vous êtes trop jeune pour être ma mère, vous avez réellement été ma maman scientifique et même plus encore. Vous m'avez accordé toute votre confiance, et m'avait permis d'avancer sereinement dans ma thèse. Je ne saurai jamais assez vous remercier pour tout mais aussi de m'avoir accepté telle que j'étais avec mes doutes et mes stress. J'ai trouvé en vous quelqu'un avec qui j'ai aimé discuter que ce soit scientifiquement ou de tout autre chose (dont la grande aventure du jardinage), pendant parfois des heures... Je n'oublie pas que je vous dois toujours beaucoup de paquets de fraises Tagada.

Xavier, merci pour ton soutien et ta confiance tout au long de ma thèse, d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse pendant les 4 ans de ma thèse, mais aussi les bonbons qui venaient marquer toutes nos réussites. Je te souhaite un bon rétablissement et de pouvoir profiter maintenant de toute ta famille.

Yvan, merci de m'avoir accepté dans ton équipe et pour le soutien que tu as accordé à ma thèse. Je suis heureuse que aujourd'hui tu puisses faire parti de mon jury de thèse. Je te remercie d'avoir accepté de prendre la place de directeur de thèse pour ma soutenance.

Je souhaite remercier vivement les membres du jury pour l'honneur qu'ils me font :

Les Pr Phillippe Birembaut et **Dr Rosita Winkler**, qui ont accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Les Dr Guillemette Huet, **Pr Phillippe Delannoy** et **Pr Jean-Pierre Vilain**, qui ont bien voulu examiner ce travail.

Je remercie également :

Isabelle, pour son aide précieuse, pour sa bonne humeur, les discussions anti-stress et sa gentillesse au quotidien. Sans toi, jamais ma thèse n'aurait aussi bien avancée.

Arndt Benecke, pour sa collaboration dans le projet de micro-array. Je te remercie d'avoir cru en ce projet, mais aussi de m'avoir accordé de ton temps, pour m'apprendre cette technique, répondre à mes nombreuses questions, en discuter et m'aider dans leur analyse.

Corine Glineur, qui m'a permis d'accéder au matériel de PCR quantitative mais aussi a eu la gentillesse de m'y initier et a toujours pris le temps de répondre à toutes mes questions

Patrick et Nathalie, merci pour toutes les manipulations sur les souris pour lesquelles vous m'avez apporté votre aide indispensable. Un petit mot particulier pour Nathalie pour m'avoir si souvent avec humour rappelé la couleur de mes cheveux et pour ses cafés « retrouve sourire ».

Mes années de thèse n'auraient pas été pareilles sans tous mes camarades de thèse ou de post-doc qui m'ont accompagnés au long de ces 5 ans (of course in the pocket):

Nathalie, ma grande sœur, tu as été là à tous les moments que ce soit de bonheur ou de déprime. Merci pour tout, pour toutes ces discussions scientifiques ou non autour d'un thé, d'un verre, ect..., de tous ces moments où l'on a refait le monde. Tu es une des plus belles rencontres que j'ai faite dans ma vie. Profites bien de ton bout de chou, je te souhaite plein de bonheur. J'espère ne jamais te perdre de vue et que cette amitié durera longtemps.

Alessandro, mon colocataire de « cagibi » qui m'a tout appris en matière de blagues nulles, grâce à qui mes digestions enzymatiques n'ont plus eu la même saveur et avec qui j'ai revécu tant de matchs de foot. Merci aussi d'avoir toujours eu un bonbon pour me sauver la vie...

Mes amies « les filles de la nouvelle star », **Emma, Elsa et Steph**, pour toutes nos discussions de filles plus ou moins sérieuses autour d'un thé, d'une bière (et de mon jus de tomate), les fous rires et toutes nos soirées de soutien à Christophe. On remet ça l'année prochaine avec deux groupes, les parisiennes et les lilloises, et des rencontres fréquentes je l'espère.

Chann, toutes mes semaines ont été rythmées grâce à toi par un cendrier et un hippopotame, Rick Hunter ou la patrouille des éléphants... merci pour cette super ambiance auquel tu as participé par ta gentillesse et ton humour.

Samuel, mon réalisateur préféré, pour toutes les discussions sous une hotte de culture, tous ces délires, et tes supers bons gâteaux...

Cindy, merci pour ton soutien dans ces derniers moments de ma thèse, les discussions de filles et nos TP communs...

Merci à vous tous pour votre gentillesse, votre présence tout au long de ma thèse et votre aide.

Mais aussi, tous les autres, pour tous ces moments partagés : **Valérie, Béné, Yohann, Kathye, Julien, Dana, Rodrigue, Nicolas, Béné, Fred, Seb, Catherine, Virginie**. A tous, je vous souhaite plein de réussite pour la suite et merci pour tout.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui ont fait partie de mes deux laboratoires d'accueil, pour leur aide à un moment ou à un autre, **Albin, Christophe, David, Didier, Elisabeth, Eric, Ikram, Isabelle, Jean-Jacques, Jean-luc, Johann, Laurent, Mathilde, Xuefen, Zoulika**, mais aussi toutes les personnes de la dent 1 et 2 de l'IBL.

Loïc et Gilles, pour leur aide avec photoshop et le chemidoc.

Merci à **Franck**, le garçon dans un bureau de filles. Puisses tu trouver autant de plaisir dans ce sujet que j'en ai moi-même trouvé. Je te souhaite bonne chance pour cette année de master.

Je ne peux pas finir ces remerciements sans parler de ma petite **Maud**, pour m'avoir apportée une aide précieuse vers la fin de ma thèse, pour sa bonne humeur, pour toutes les discussions dans le bureau. J'espère que tu réussiras dans ton avenir, tu le mérites.

Je tiens aussi à faire ici un clin d'œil à mon amie de 10 ans, qui m'a suivie jusqu'ici avec une amitié sans faille, **Frédérique**, merci d'avoir toujours été prête à m'écouter et à m'accueillir dans ton coin paumé.

Enfin, je voudrai remercier tous ceux qui ont été dans l'ombre de cette thèse, mais qui m'ont tout le temps soutenue, **mes parents, mon petit frère** et mes amis. Tout ça n'aurait pas été possible sans vous...

Sommaire

AVANT-PROPOS	3
SOMMAIRE	7
SOMMAIRE DES FIGURES	11
SOMMAIRE DES TABLEAUX.....	15
<i>Résumé</i>	17
<i>Introduction</i>	21
I- <i>Glande mammaire : morphogenèse et tumorigenèse</i>	23
1- Morphogenèse de la glande mammaire : un exemple de morphogenèse de branchement	23
2- La tumorigenèse mammaire.....	28
II- <i>Mécanismes de la tumorigenèse</i>	31
III- <i>Les membres de la famille ETS</i>	41
1- Présentation générale	41
2- Rôle des facteurs de la famille ETS	44
3- La famille ETS et cancer.....	46
4- Gènes cibles de ces facteurs de transcription pouvant avoir un rapport au cancer..	51
IV- <i>Les membres du groupe PEA3</i>	55
1- Présentation	55
2- Modulation de l'activité des facteurs du groupe PEA3	56
3- Les voies de signalisation impliquant les facteurs du groupe PEA3	59
4- La régulation transcriptionnelle des facteurs PEA3.....	61
5- L'expression des facteurs du groupe PEA3	61
6- Les facteurs du groupe PEA3 et la morphogenèse de branchement	62
7- Le facteur Erm et la spermatogenèse	63
8- Les membres du groupe PEA3 et les neurones.....	64
9- Les membres du groupe PEA3 et cancer	68
10- Les gènes cibles des facteurs du groupe PEA3.....	74
V- <i>Les mécanismes d'ARN interférence</i>	83
<i>Matériels et méthodes</i>	87
I- <i>Oligonucléotides utilisés</i>	89
II- <i>Culture cellulaire</i>	90
III- <i>Transfection transitoire</i>	91
1- Vecteurs plasmidiques	91
2- Transfection des cellules.....	95
3- Dosage des activités rapportrices et normalisatrices.....	97
4- Infection des cellules par des rétrovirus.....	97

<i>IV- Etude de l'expression des ARN</i>	98
1- Extraction des ARN	98
2- Analyse des ARN par migration électrophorétique des ARN et transfert sur membrane selon la technique de Northern blot.....	98
3- Hybridation moléculaire	99
4- Rétrotranscription des ARN et PCR	100
<i>V- Mutagenèse dirigée</i>	101
<i>VI- Analyse des protéines par la technique de Western blot</i>	102
1- Extraction des protéines	102
2- Préparation et migration des échantillons	102
3- Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose.....	102
4- Révélation immunologique	102
5- Immunoprécipitation	103
<i>VII- Retard sur gel</i>	103
1- Traduction <i>in vitro</i> en lysat de réticulocytes.....	103
2- Purification d'extraits nucléaires	103
3- Retard sur gel	104
<i>VIII- Puces à ADN</i>	104
<i>IX- Etude phénotypique</i>	106
1- Analyse de la prolifération cellulaire	106
2- Migration cellulaire à travers une membrane microporée	106
3- Culture tridimensionnelle.....	107
4- Injection en souris immunodéficientes	108
<i>X- Solutions et tampons</i>	108

Résultats..... 111

<i>I- Contexte de la thèse</i>	113
<i>II- Présentation des différents modèles cellulaires utiles à nos études</i>	115
<i>III- Choix des séquences ARN interférentes</i>	117
1- Détermination des séquences	117
2- Séquences shRNA.....	118
3- Séquences siRNA.....	118
<i>IV- Mise au point de modèles cellulaires de répression de l'expression des facteurs Erm et Pea3</i>	121
1- Mise en évidence de la répression de l'expression des facteurs Erm et Pea3 par l'utilisation de séquences shRNA	121
2- Mise en évidence d'une répression de l'expression des facteurs Erm et Pea3 par l'utilisation d'oligonucléotides siRNA.....	133
<i>V- Etude du rôle des facteurs du groupe PEA3 sur le phénotype des cellules mammaires</i>	137
1- Facteurs du groupe Pea3 et prolifération cellulaire	137
2- Facteurs du groupe PEA3 et migration cellulaire	139
3- Facteurs du groupe PEA3 et potentiel invasif.....	142
4- Mise en évidence <i>in vivo</i> du rôle des facteurs du groupe PEA3 dans la tumorigenèse mammaire.....	148
<i>VI- Mise en évidence de nouveaux gènes cibles des facteurs du groupe PEA3</i>	150
1- Contexte de l'étude	152
2- Un nouveau gène régulé par les facteurs de transcription du groupe PEA3 : le gène <i>bax</i>	153

3- Etude de la régulation des gènes <i>cycline D2</i> et <i>p55^{cdc}</i> par les facteurs de transcription du groupe PEA3	179
4- Mise en évidence de nouvelles cibles des facteurs Erm et Pea3 par la technique de puces à ADN (Mouse Genome Survey Microarray, Applied Biosystems).....	198
<i>Discussion et conclusion</i>	209
<i>I- De nouveaux modèles d'étude de l'implication des facteurs du groupe PEA3 dans la morphogenèse et la tumorigenèse</i>	211
<i>II- Rôles potentiels des facteurs du groupe PEA3 dans les cellules mammaires cancéreuses</i>	214
1- Les facteurs de transcription Pea3 et Erm ont un effet pro-prolifératif	214
2- Les facteurs de transcription Pea3 et Erm ont un effet pro-migratoire et pro-invasif	216
3- Les facteurs de transcription Pea3 et Erm influencent la formation de tumeurs <i>in vivo</i>	220
<i>III- Mise en évidence de nouveaux gènes cibles des facteurs du groupe PEA3</i>	222
1- Le gène <i>bax</i>	222
2- Les gènes <i>cycline D2</i> et <i>p55^{cdc}</i>	225
3- Trois promoteurs et trois liaisons à l'ADN proximales des facteurs PEA3	229
4- De nouveaux gènes cibles pour les facteurs du groupe PEA3 mis en évidence par une étude de puces à ADN	230
<i>IV- Conclusions et perspectives</i>	235
<i>Valorisation des compétences un nouveau chapitre de la thèse</i>	237
<i>I- Présentation de la thèse</i> :	239
1- Présentation générale	239
2- Contexte de ma thèse :	239
3- Ma place dans la thèse :	240
<i>II- Déroulement, gestion et coût du projet</i>	241
1- Préparation et cadre du projet	241
2- Conduite du projet.....	242
3- Evaluation et prise en charge du coût du projet.....	242
<i>III- Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles</i>	244
1- Expertise scientifique.....	244
2- Expérience technique et appliquée.....	244
3- Compétences acquises	244
<i>IV- Résultats et impacts de la thèse</i>	246
<i>Bibliographie</i>	249
<i>Annexes</i>	273
REVUE (DE LAUNOIT ET AL., 2006) :	275
ABBREVIATIONS	287

Sommaire des figures

Figure 1 : Position des cinq paires de glandes mammaires chez la souris.	23
Figure 2 : Les différents stades de l'embryogenèse de la glande mammaire chez la souris. ...	24
Figure 3 : Différents stades dans le cas d'un cancer canalaire du sein.	30
Figure 4 : Représentation schématique des modifications génétiques, épigénétiques et phénotypiques du développement d'un cancer épithélial.	31
Figure 5 : Les cyclines et les Cdk régulent la transition G1/S.	33
Figure 6 : Transduction du signal de l'apoptose.	35
Figure 7 : Mécanismes de l'angiogenèse induite par les cellules tumorales.	37
Figure 8 : Evolution d'une tumeur vers la métastase.	38
Figure 9 : Représentation schématique des membres de la famille ETS.	43
Figure 10 : Gènes cibles des facteurs ETS pouvant être impliqués dans le processus cancéreux.	51
Figure 11 : Domaines régulateurs au sein de la protéine Pea3 murine.	56
Figure 12 : Phénotype observé pour les souris invalidées par recombinaison homologue pour le GDNF, Pea3 ou Er81.	64
Figure 13 : Interrelation entre le GDNF, l'HGF et le facteur Pea3 dans la spécification des motoneurones.	65
Figure 14 : Diagramme récapitulant le mécanisme de boucle de régulation dans la mise en place des neurones corticaux.	66
Figure 15 : Mécanismes de l'ARN interférence.	84
Figure 16 : Représentation d'une construction shRNA.	85
Figure 17 : Voie de synthèse des miRNA chez l'homme.	86
Figure 18 : Représentation graphique du vecteur pG14b cd2 625.	92
Figure 19 : Représentation graphique du vecteur pG13b p55 576.	93
Figure 20 : Représentation graphique du vecteur pG14b p55 511 murin.	94
Figure 21 : Représentation graphique des vecteurs pSuper et pRetroSuper.	95
Figure 22 : Processus d'amplification et de marquage des ARN (Applied Biosystems).	105
Figure 23 : Schéma classique d'inserts possédant une membrane microporée.	107
Figure 24 : La surexpression du facteur Erm dans les cellules TAC permet aux cellules de faire de la morphogenèse spontanée.	114
Figure 25 : Positionnement des séquences shRNA et siRNA sur la séquence de l'ADNc du gène <i>pea3</i> murin.	119
Figure 26 : Positionnement des séquences shRNA et siRNA sur la séquence de l'ADNc du gène <i>erm</i> murin.	120
Figure 27 : Validation de la fonctionnalité des séquences ARN interférentes dirigées contre <i>pea3</i> par western blot, RT-PCR semi-quantitative et test de transactivation.	122
Figure 28 : Validation de la fonctionnalité des séquences ARN interférentes dirigées contre le gène <i>erm</i> par western blot, RT-PCR quantitative et test de transactivation.	126
Figure 29 : Caractérisation de l'expression de <i>pea3</i> et <i>erm</i> dans les lignées TAC Rs, TAC RNAi <i>pea3</i> A et B, TAC RNAi <i>erm</i> C.	128
Figure 30 : Caractérisation de l'expression de <i>pea3</i> dans les cellules MMT Rs, RNAi <i>GFP</i> , RNAi <i>pea3</i> A et B.	130
Figure 31 : Caractérisation de l'expression de <i>erm</i> dans les lignées MMT Rs et MMT RNAi <i>erm</i> C.	131

Figure 32 : Caractérisation de l'expression de <i>pea3</i> et <i>erm</i> dans les cellules MMT Rs/Rs et MMT RNAi <i>pea3</i> A/ <i>erm</i> C.	132
Figure 33 : Caractérisation de l'expression de <i>pea3</i> et <i>erm</i> dans les cellules TAC transfectées par des siRNA dirigés contre <i>pea3</i> et <i>erm</i>	134
Figure 34 : Caractérisation de l'expression de <i>pea3</i> et <i>erm</i> dans les cellules transfectées MMT par des siRNA dirigés contre <i>pea3</i> et <i>erm</i>	136
Figure 35 : Analyse de la prolifération cellulaire des cellules MMT transfectées par les siRNA dirigés contre <i>erm</i> et <i>pea3</i> par comptage des cellules.	138
Figure 36 : Analyse de la prolifération cellulaire des lignées MMT RNAi <i>pea3</i> A et B par comptage des cellules.	139
Figure 37 : Analyse de la capacité de migration à travers une membrane microporée des cellules MMT transfectées par les siRNA dirigés contre <i>pea3</i> et <i>erm</i>	141
Figure 38 : Analyse de la capacité de migration à travers une membrane microporée des lignées MMT RNAi <i>pea3</i> A et B.	142
Figure 39 : Etude du comportement morphogénétique des cellules MMT transfectées par des siRNA dirigés contre <i>erm</i> et <i>pea3</i> et cultivées en Matrigel®.	146
Figure 40 : Etude du comportement morphogénétique des cellules MMT transfectées par des siRNA dirigés contre <i>erm</i> et <i>pea3</i> et cultivées en gel de collagène.	147
Figure 41 : Etude de l'évolution tumorale des lignées de cellules MMT réprimant l'expression des facteurs Erm et Pea3 injectées à des souris immunodéficientes.	149
Figure 42 : Analyse de l'expression des transcrits <i>erm</i> et <i>pea3</i> et du facteur Pea3 dans les cellules TAC, TAC/pc7, TAC/erm1, TAC/pea3 8.	151
Figure 43 : Test de la liaison des facteurs du groupe PEA3 sur le promoteur minimal du gène <i>bax</i>	168
Figure 44 : Test de l'activité des facteurs Pea3 et USF-1 sur les constructions promotrices PMBax5Sp1 et PMBax3Sp1.	169
Figure 45 : Effet des différentes constructions pSuper RNAi <i>pea3</i> et <i>erm</i> sur l'activité du promoteur PMBaxKpnI.	171
Figure 46 : Etude de l'activité du facteur Erm suite à la transfection du shRNA RNAi <i>erm</i> C sur les constructions promotrices PMBaxSacI et PMBaxSp1dl.	172
Figure 47 : Retard sur gel à partir d'extraits nucléaires de cellules TAC et de la sonde <i>bax</i> wt.	173
Figure 48 : Test de coimmunoprécipitation des facteur Pea3 et USF-1 dans les cellules TAC.	174
Figure 49 : Mise en évidence de la liaison sur la sonde <i>bax</i> wt des facteurs USF-1, -2a et du dominant négatif TD-USF-1.	175
Figure 50 : Etude de l'activité des autres membres de la famille ETS, du facteur p53 et du cofacteur p300 sur le promoteur minimal du gène <i>bax</i>	176
Figure 51 : Caractérisation de l'expression des transcrits <i>cycline D2</i> dans des cellules TAC ou MMT dont l'expression de Erm ou Pea3 est modifiée.	180
Figure 52 : Séquence du fragment de 625pb du promoteur du gène <i>cycline D2</i> clonée dans le vecteur rapporteur pGL4b.	181
Figure 53 : Représentation des différents fragments du promoteur du gène <i>cycline D2</i> clonés dans le vecteur rapporteur pGL4b.	181
Figure 54 : Etude de l'activité des membres du groupe PEA3 au niveau du fragment pleine longueur et les différents fragments de délétion du promoteur du gène <i>cycline D2</i>	183
Figure 55 : Effet de mutations au niveau de séquences EBS au sein du promoteur du gène <i>cycline D2</i>	185
Figure 56 : L'expression du gène <i>p55^{cdc}</i> est augmentée dans des cellules TAC dans lesquels le facteur Erm est surexprimé.	186

Figure 57 : Caractérisation de l'expression du gène <i>p55^{cdc}</i> dans les cellules TAC ou MMT pour lesquelles l'expression des facteurs du groupe PEA3 est modulée.	187
Figure 58 : Séquence du fragment de 576 du promoteur du gène <i>p55^{cdc}</i> de rat cloné dans le vecteur rapporteur pGL3b.	188
Figure 59 : Représentation des différents fragments du promoteur du gène de <i>p55^{cdc}</i> de rat cloné dans le vecteur rapporteur pGL3b.	189
Figure 60 : Etude de l'activité transactivatrice des membres du groupe PEA3 sur le promoteur du gène <i>p55^{cdc}</i> et les différents fragments de délétion	190
Figure 61 : Effet de shRNA dirigés contre <i>erm</i> et <i>pea3</i> sur l'activité basale du promoteur proximal du gène <i>p55^{cdc}</i>	192
Figure 62 : Etude de l'activité des facteurs du groupe PEA3 sur la forme mutée du fragment minimal du promoteur de <i>p55^{cdc}</i>	193
Figure 63 : Séquence du fragment 420 du promoteur du gène <i>p55^{cdc}</i> de souris cloné dans le pGL4b.....	194
Figure 64 : Alignement des séquences du promoteur <i>p55^{cdc}</i> de rat, souris et humain.	195
Figure 65 : Représentation schématique des différents fragments du promoteur du gène <i>p55^{cdc}</i> murin cloné dans le pGL4b.	196
Figure 66 : Etude de l'activité transactivatrice des membres du groupe PEA3 sur le promoteur du gène <i>p55^{cdc}</i> murin et les différents fragments de délétion.	197
Figure 67 : Profil d'expression des différents gènes sélectionnés suite à l'expérience de puces à ADN avec les cellules MMT transfectées par les siRNA <i>pea3</i>	205
Figure 68 : Profil d'expression des différents gènes sélectionnés suite à l'expérience de puces à ADN avec les cellules MMT transfectées par les siRNA <i>erm</i>	206
Figure 69 : Profil d'expression des différents gènes sélectionnés suite à l'expérience de puces à ADN avec les cellules MMT transfectées par les siRNA <i>erm</i> et <i>pea3</i>	207
Figure 70 : Structure d'un shRNA ^{mir} comparée au miRNA primaire.	213
Figure 71 : Mécanisme de régulation de la transcription du gène <i>bax</i> par les facteurs du groupe PEA3.	223

Sommaire des tableaux

Tableau 1 : Régulateurs de la morphogenèse mammaire, agonistes, antagonistes, et rôles. ...	26
Tableau 2 : Nomenclature des différents cancers selon leur origine.....	29
Tableau 3: Marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse.	39
Tableau 4 : Nomenclature des membres de la famille ETS et leurs différentes appellations chez l'homme et la souris.....	42
Tableau 5 : Expression tissulaire des principaux facteurs de la famille ETS.....	42
Tableau 6 : Effets de perte de fonction par recombinaison homologue des membres de la famille ETS.	45
Tableau 7 : Expression des facteurs ETS dans différents types de tumeurs.	46
Tableau 8 : Corrélations dans différents types de cancers entre l'expression des facteurs du groupe PEA3 et les gènes cibles potentiels.	76
Tableau 9 : Gènes cibles des facteurs du groupe PEA3.....	81
Tableau 10 : Séquences de liaison des facteurs du groupe PEA3 des promoteurs de ses gènes cibles.....	82
Tableau 11 : Consensus de fixation des facteurs du groupe PEA3.....	83
Tableau 12 : Listes des oligonucléotides utilisés en PCR.....	90
Tableau 13 : Séquence des shRNA utilisés dans notre étude.....	118
Tableau 14 : Séquence des siRNA utilisés dans notre étude.....	119
Tableau 15 : Gènes cibles potentiels des membres du groupe PEA3 mis en évidence par l'utilisation d'une puce à ADN Atlas TM Mouse cDNA Expression Arrays, par comparaison du transcriptome des cellules TAC/pc7 versus TAC/erm1.	152
Tableau 16 : Liste des gènes dont l'expression est modulée dans des cellules MMT transfectées par un siRNA dirigé contre <i>pea3</i> par rapport à des cellules MMT transfectées par un siRNA contrôle.....	202
Tableau 17 : Liste des gènes dont l'expression est modulée dans des cellules MMT transfectées par un siRNA dirigé contre <i>erm</i> par rapport à des cellules MMT transfectées par un siRNA contrôle.....	204
Tableau 18 : Liste des gènes dont l'expression est modulée par <i>pea3</i> et <i>erm</i>	204
Tableau 19 : Gènes régulés dans les cellules modulées pour l'expression de <i>pea3</i> et <i>erm</i> et surexprimés dans des cancers solides.....	231
Tableau 20 : Rôle potentiel des gènes dont l'expression est régulée par <i>erm</i> ou <i>pea3</i> dans la croissance cellulaire et l'apoptose.....	233
Tableau 21 : Rôle potentiel des gènes dont l'expression est augmentée suite à la transfection par un siRNA dirigé contre <i>erm</i> ou <i>pea3</i> , dans la croissance cellulaire et l'apoptose... ..	234

Résumé

Résumé

Les facteurs de transcription du groupe PEA3, Erm, Er81 et Pea3 (appartenant à la famille ETS) sont exprimés dès les stades d'embryogenèse précoce dans un grand nombre de tissus et organes. Leur surexpression est souvent corrélée au statut tumorigène des cellules et à l'évolution métastatique, notamment dans le modèle mammaire. Des cellules mammaires murines à caractère « normal » surexprimant les facteurs Erm et Pea3 présentent la capacité de faire spontanément de la morphogenèse et des propriétés invasives *in vitro*. Ces modèles ont permis la mise en évidence de nouvelles cibles moléculaires de ces facteurs : les gènes *bax*, *cycline D2* et *p55^{cdc}*. Le travail de thèse s'est orienté autour de deux axes : la mise au point de modèles cellulaires mammaires d'inhibition de l'expression des facteurs Erm et Pea3 et l'étude de la régulation des gènes cibles *bax*, *cycline D2* et *p55^{cdc}*.

Nous avons pour cela utilisé deux lignées de cellules mammaires murines, une lignée de cellules à caractère « normal », les TAC (comme modèle cellulaire de morphogenèse) et une lignée cancéreuse, les MMT (comme modèle cellulaire de tumorigenèse), et le processus d'ARN interférence pour réprimer l'expression des facteurs Erm et Pea3.

L'étude des modifications morphogénétiques des cellules MMT dont l'expression du facteur Erm comme celle du facteur Pea3 est inhibée, montre que ces cellules présentent une perte de leur capacité de prolifération, de migration et d'invasion *in vitro*. Injectées en sous-cutané à des souris immunodéficientes, ces cellules induisent la formation de tumeurs de taille réduite par rapport aux cellules contrôles, confirmant l'implication des facteurs du groupe PEA3 dans les événements conduisant à la cancérogenèse.

La caractérisation de la régulation du gène *bax* par les facteurs du groupe PEA3 a permis de mettre en évidence un nouveau mode de régulation non encore décrit pour ces facteurs, impliquant une interaction avec le facteur USF-1 sans liaison directe des facteurs PEA3 à l'ADN. Celle des deux autres gènes cibles *cycline D2* et *p55^{cdc}* est en cours. La modulation de leur expression a été confirmée dans les modèles cellulaires de répression de l'expression des facteurs Erm et Pea3. L'étude de leur région promotrice a permis de définir des sites de régulation dont la caractérisation reste à affiner.

La mise au point des différents modèles dans lesquels l'expression des membres du groupe PEA3 est modulée nous a conduit à initier une recherche plus complète des cibles moléculaires des facteurs Erm et Pea3 par utilisation de puces à ADN (Applied Biosystems) avec pour but la corrélation avec les modifications phénotypiques liées à la modulation de l'expression des facteurs du groupe PEA3.

Introduction

I- Glande mammaire : morphogenèse et tumorigenèse

1- Morphogenèse de la glande mammaire : un exemple de morphogenèse de branchement

a- Les différentes étapes de la morphogenèse mammaire

La glande mammaire est un organe à morphogenèse de branchement, mais qui au contraire des autres organes « branchés » se développe durant l'adolescence plutôt que pendant le développement fœtal.

Chez la souris, on retrouve cinq paires de glandes mammaires le long de l'axe antéropostérieur (Figure 1).

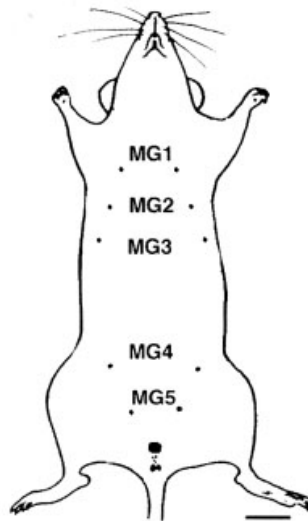


Figure 1 : Position des cinq paires de glandes mammaires chez la souris.

D'après (Veltmaat et al., 2003) (E10,5 jours).

Le développement embryonnaire de la glande mammaire débute à 10,5 jours après la fécondation par la formation, le long de l'axe antéropostérieur, de deux crêtes mammaires.

A E11,5, cinq paires de placodes se forment le long des crêtes à partir de l'ectoderme. On pense que ces placodes proviennent de la migration des cellules à partir des crêtes mammaires (Figure 2).

Introduction

Le troisième stade consiste en l'invagination des cellules de la placode dans le mésenchyme sous-jacent pour former les bourgeons mammaires, indépendants de l'épiderme sur-jacent. A E12,5-13, ces bourgeons épithéliaux sont visibles. Si chez les femelles, le développement va être temporairement arrêté, chez le mâle, les bourgeons dégénèrent entre E13,5 et E15,5. A E15,5, chez les femelles, le développement reprend quand chaque bourgeon s'allonge pour former un cordon qui envahit le précurseur du « fat pad ». Le « fat pad » correspond au stroma entourant les tubes épithéliaux mammaires. Chaque cordon forme une lumière qui s'ouvre sur la surface à l'endroit où le mamelon se formera. A E16, les premières ramifications apparaissent et à E18,5 les cordons se sont développés en petits arbres. A la naissance, la glande mammaire sera constituée d'un arbre rudimentaire formé d'un conduit principal et de 15 à 20 branches secondaires et d'une faible partie du « fat pad » (Hens and Wysolmerski, 2005; Veltmaat et al., 2003).

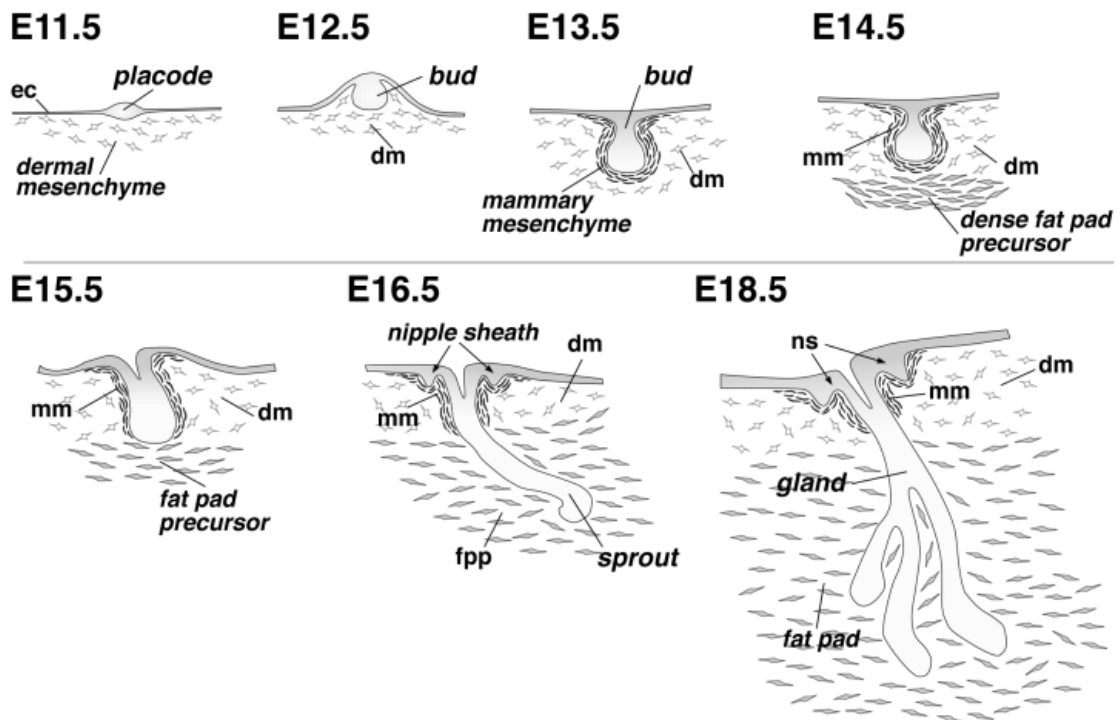


Figure 2 : Les différents stades de l'embryogenèse de la glande mammaire chez la souris.

D'après (Veltmaat et al., 2003).

A E11,5, les placodes se forment puis vont s'invaginer dans le mésenchyme sous-jacent pour former les bourgeons épithéliaux (E12,5-13,5). A E15,5, le bourgeon s'allonge dans le futur « fat pad », s'ouvre au niveau du futur mamelon (E16,5) et commence à se brancher à E18,5. Au final, on obtient un arbre rudimentaire à la naissance.

ec : ectoderme ; dm : mésenchyme dermique ; mm : mésenchyme mammaire, ns : ébauche du mamelon.

Introduction

Le reste du développement se fait après la naissance. Chez la souris, jusqu'à la puberté, la glande mammaire, à l'état rudimentaire, croît en parallèle de la croissance normale du corps. A la puberté, le branchement commence de façon hormono-dépendante. A cette étape, les bourgeons terminaux se forment à l'extrémité des tubes et pénètrent dans le « fat pad » au fur et à mesure que les tubes épithéliaux s'allongent. Ces bourgeons terminaux contiennent les cellules précurseurs des cellules épithéliales de la lumière et des cellules myoépithéliales. De nouveaux tubes primaires se forment par bifurcation des bourgeons terminaux et des branches secondaires se forment latéralement à ces tubes. La morphogenèse de branchement se fait par des étapes successives de prolifération cellulaire et apoptose au niveau des bourgeons terminaux, pour avoir la formation des tubes et des lumières. Plus tard, un troisième système de tubes va se former en réponse aux hormones ovariennes pour arriver à un arbre final. Des structures lobulo-alvéolaires vont alors pouvoir se former pendant la grossesse aux extrémités des branches tertiaires (Sternlicht, 2006).

b- Les molécules impliquées dans la morphogenèse de branchement

Le branchement pendant l'embryogenèse et la puberté est régulé par différentes voies hormonales et de signalisation. L'embryogenèse mammaire est hormono-indépendante, tandis que le branchement à la puberté est régulé par les œstrogènes et leurs récepteurs. Le branchement tertiaire nécessite lui l'activation par la progestérone et son récepteur (Sternlicht, 2006). La morphogenèse est de plus coordonnée par un dialogue entre l'épithélium des branches en formation et les cellules stromales environnantes.

Les données sur les molécules connues à l'heure actuelle comme pouvant intervenir dans le branchement de la glande mammaire et la formation de tubes sont résumées dans le tableau 1.

Introduction

Régulateur	Agonistes	Antagonistes	Cibles	Effet
GH-R (st)	GH (pit)		IGF-1 (st)	Général
IGF-1R (ep)	IGF-1 (st)	IGFBPs (st)	Inconnu	Général
ER α (st/ep)	E1/E2 (ov)		Amphiréguline	Général
PR-B	ER, P (ov)		Wnt4, RANKL	Branchement tertiaire
EGFR (st)	Amphiréguline (ep)	Sprouty ?	MMPs, FGFs	Général
Amphiréguline (ep)	ER, ADAM17 (ep)	HSPGs	EGFR	Général
ADAM17 (ep)	PPCs	TIMP3	Amphiréguline	Général
MMP-14 (st)	EGFR, PPCs	TIMPs2-4	MMP-2, collI	Général
MMP-2 (st ?)	TGF β , ER, MMP-14	TIMPs1-4	CollI	Allongement
MMP-3 (st)	Epimorphine	TGF β , TIMPs	Inconnu	Branchement secondaire
met (ep)	HGF/SF		MMPs, intégrines...	Général
FGFR2 (ep)	FGFs (st)	Sprouty2	Inconnu	TEB
ErbB2 (ep)	Inconnu	Inconnu	Inconnu	TEB
Epimorphine (st/me)	Métalloprotéases	Inconnu	C/EBP β , MMPs	Branchement
TGF β 1 (ep)	ER, MMP, plasmine	LAP	MMPs, TGF β RI/II	Espacement
CSF-1R (m Φ)	CSF-1 (ep)		Recrutement des macrophages	TEB
CCR-3 (eos)	Eotaxine		Recrutement des éosinophiles	Branchement
Intégrine α 1 β 2 (ep)	Lamines, collagènes			TEB, tubes
DDR1 (ep)	collagènes			TEB, tubes

Tableau 1 : Régulateurs de la morphogenèse mammaire, agonistes, antagonistes, et rôles.

D'après (Sternlicht, 2006).

TEB = bourgeon épithélial terminal, ep = épithélium, st = stroma, m Φ = macrophages, eos = éosinophiles, pit = glande pituitaire.

Les premiers éléments de régulation sont les hormones et les facteurs de croissance. Les hormones ovariennes comme celles de la glande pituitaire sont essentielles au développement de la glande mammaire post-pubertaire : GH, IGF-1, ER α et leurs récepteurs sont indispensables à la mise en place de la glande mammaire (Sternlicht, 2006; Visvader and Lindeman, 2003). La progestérone n'est pas indispensable pour le branchement primaire ou secondaire, mais elle est nécessaire pour le branchement latéral. Néanmoins les mécanismes impliqués ne sont pas encore bien connus (Sternlicht, 2006).

L'EGFR est aussi très important pour la morphogenèse de branchement qu'il va promouvoir par l'intermédiaire de plusieurs de ses ligands dont l'amphiréguline. Les

Introduction

événements en aval de l'EGFR ne sont pas encore bien connus, mais on sait que l'EGFR va stimuler l'activation des métalloprotéases comme la MMP-2 et la MT-1-MMP ou encore le FGF. Enfin, un dernier partenaire potentiel de la voie de l'EGFR est Erb2, récepteur tyrosine kinase (Sternlicht, 2006). ErbB2 est impliqué dans le développement canalaire durant la puberté et l'adolescence (Jackson-Fisher et al., 2004).

D'autres molécules et voies sont impliquées dans le développement de la glande mammaire dont :

- le facteur de transcription MSX2, qui en plus de son rôle dans le développement embryonnaire a un rôle dans le branchement à l'adolescence (Hens and Wysolmerski, 2005; Visvader and Lindeman, 2003),
- PTHrP et son récepteur, requis pour le maintien du bourgeon épithélial terminal et pour la formation de l'arbre épithélial rudimentaire lors de l'embryogenèse (Dunbar et al., 2001; Hens and Wysolmerski, 2005),
- les facteurs LEF-1 et β caténine qui font partie de la voie de signalisation Wnt, impliqués dans le développement des tubes épithéliaux et du maintien de l'identité des cellules alvéolaires (Hens and Wysolmerski, 2005; Visvader and Lindeman, 2003),
- les voies de signalisation Hedgehog peuvent affecter différentes voies de signalisation qui régulent le branchement mammaire, incluant les voies Wnt, Notch, TGF β et PTHrP (Sternlicht, 2006),
- l'HGF/SF, son récepteur c-Met et son adaptateur Gab1 sont importants pour la tubulogenèse au cours de la morphogenèse mammaire (Rosario and Birchmeier, 2003),
- l'épimorphine va stimuler l'expression de molécules requises pour la morphogenèse de branchement et la morphogenèse mammaire (Radisky et al., 2003, Visvader and Lindeman, 2003),
- les macrophages et les éosinophiles collaborent pour influencer la morphogenèse des tubes épithéliaux (Gouon-Evans et al., 2002).

La matrice extracellulaire, les récepteurs de la matrice extracellulaire et les enzymes de dégradation de la matrice sont aussi des régulateurs importants de la morphogenèse de branchement. Les Intégrines α et β , la DDR1, la Galectine ou la β -1,4 Galactosyltransférase font partie de ces molécules ayant un rôle direct dans la morphogenèse mammaire. En plus de ceux-ci, d'autres composants de la matrice extracellulaire vont pouvoir lier et séquestrer des molécules importantes pour le branchement. Les enzymes de la matrice extracellulaire vont

pouvoir enlever des barrières physiques, révéler des structures cachées et permettent le relargage de molécules de signalisation (Fata et al., 2004; Sternlicht, 2006).

Enfin, chacune des molécules précédemment citées a des inhibiteurs spécifiques dont certains, s'ils sont perdus, vont accélérer le processus de morphogenèse. En plus de ces inhibiteurs propres, le TGF β 1 agit comme un régulateur négatif de la morphogenèse de branchement (allongement canalaire et branchement latéral) (Hinck and Silberstein, 2005; Sternlicht, 2006).

2- La tumorigenèse mammaire

Un cancer se déclare en plusieurs étapes :

- la transformation cancéreuse d'une cellule,
- l'expansion clonale de la cellule,
- la croissance de la masse tumorale, qui va envahir progressivement les tissus adjacents au niveau local,
- la dissémination des cellules cancéreuses.

Différentes formes de cancers sont décrits :

- l'hyperplasie : lors de l'initiation, une cellule est génétiquement modifiée, elle reste normale mais se multiplie trop vite,
- la dysplasie : les cellules vont se dédifférencier. Les cellules continuent à proliférer de manière anarchique et présentent en plus des modifications structurales et fonctionnelles. Ce stade n'existe qu'au niveau épithélial (dysplasie et hyperplasie sont notées comme des lésions pré-cancéreuses)
- le cancer *in situ* : les cellules épithéliales prolifèrent uniquement au niveau local. Par exemple, lors d'un carcinome, les cellules épithéliales prolifèrent au niveau de l'épithélium, mais ne franchissent pas la membrane basale (ce stade existe que dans les cancers épithéliaux),
- le cancer invasif : les cellules vont dépasser le niveau local. Les cellules tumorales envahissent le tissu conjonctif selon un processus actif et complexe lié à l'acquisition de nouvelles propriétés biologiques (Figure 3).

Introduction

Différentes nomenclatures sont utilisées pour les différents types de cancer selon leur origine et leur localisation. Celles-ci sont résumées dans le tableau 2.

Origine du cancer	Nomenclature
Epithélial	Carcinome
Mésenchymateux	Sarcome
Lympho-hématopoïétique	Lymphome (si tumeur solide) ou leucémie
Système nerveux central	Variable selon l'origine (ex : astrocytome)
Endocrinien	Variable selon l'origine et l'histologie (ex : cancer du poumon à petites cellules)

Tableau 2 : Nomenclature des différents cancers selon leur origine.

On trouve des cancers bénins dont la terminologie est différente. Pour les tissus épithéliaux, on décrit les adénomes ou papillomes, bénins et les carcinomes, malins. Pour les tissus d'origine mésenchymateuse, les tumeurs bénignes sont décrites par le nom du tissu d'origine + ome (ex : lipome, fibrome ...), les tumeurs malignes sont décrites par le nom d'origine + sarcome (ex : liposarcome, fibrosarcome ...).

Les cancers malins du sein sont de deux types :

- les carcinomes *in situ* : canalaire (CCIS) ou lobulaire (CLIS). La prolifération épithéliale maligne est dans la lumière soit du canal galactophorique (carcinome canalaire), soit des acini situés dans les lobules (carcinome lobulaire). Dans tous les cas, les membranes basales restent intactes,
- les carcinomes infiltrants : ce sont des cancers envahissant le tissu mammaire, évoluant localement puis essaimant (le premier relais est constitué par les ganglions axillaires). Ces carcinomes sont le plus souvent canaux (75%), ou lobulaires (4 à 11%). Il existe d'autres formes plus rares de carcinomes infiltrants : tubuleux, mucineux, kystique, apocrine, médullaire ou la maladie de Paget.

Les cancers du sein peuvent également donner des métastases à distance notamment au niveau des os, du foie, des poumons, de la plèvre, de la peau et du cerveau.

Introduction

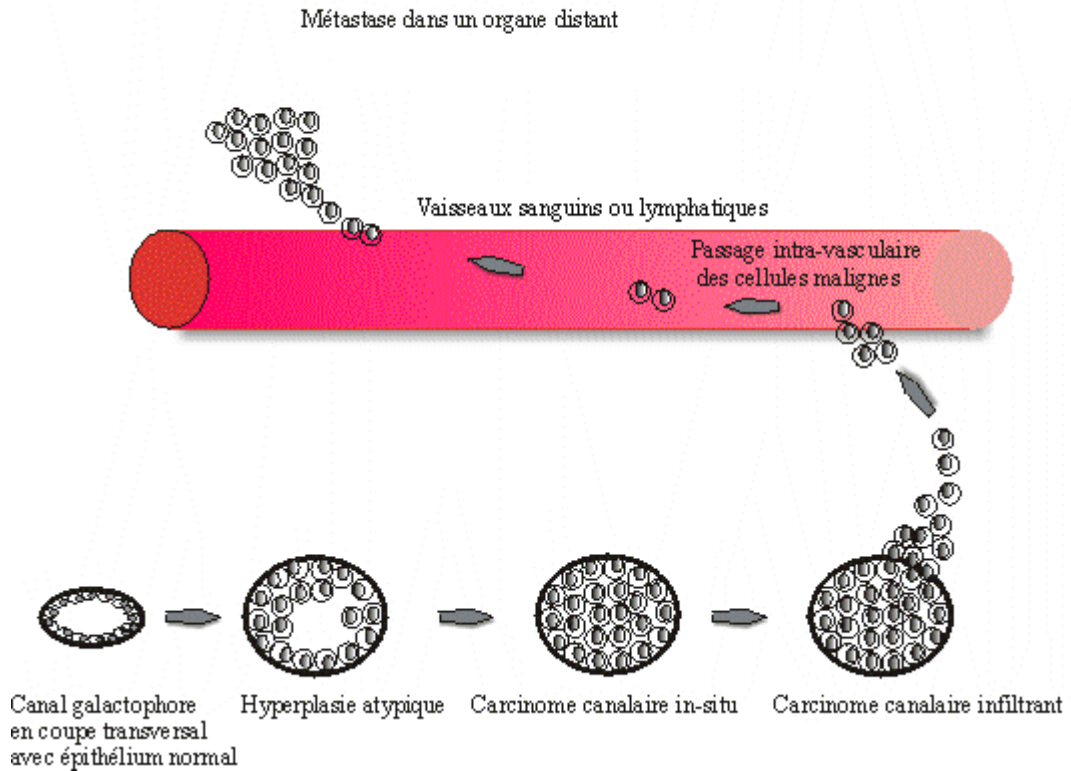


Figure 3 : Différents stades dans le cas d'un cancer canalaire du sein.

D'après <http://home.scarlet.be>

A partir d'un tube épithélial, les cellules épithéliales sous l'influence de divers signaux vont proliférer de façon anarchique jusqu'au stade de l'hyperplasie atypique. Les cellules se dédifférencient, acquièrent des modifications structurales, mais continuent de proliférer au niveau local pour donner un carcinome *in situ*. Les cellules vont ensuite grâce aux modifications phénotypiques pouvoir passer la membrane basale pour donner un cancer invasif.

II- Mécanismes de la tumorigenèse

Le génotype des cellules cancéreuses permet un classement en 6 altérations de la physiologie de la cellule :

- indépendance par rapport aux signaux de croissance cellulaire ou du cycle cellulaire,
- perte de la sensibilité par rapport aux signaux anti-prolifératifs,
- échappement à l'apoptose,
- potentiel répliatif illimité,
- conversion angiogénique,
- invasion et métastase.

On peut y ajouter l'instabilité génomique (Hanahan and Weinberg, 2000) (Figure 4).

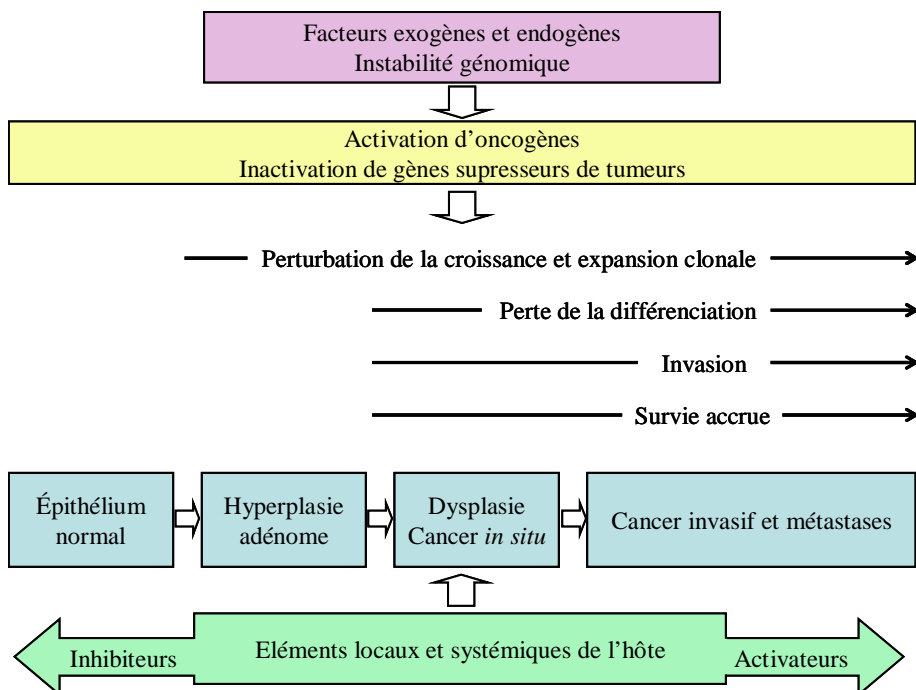


Figure 4 : Représentation schématique des modifications génétiques, épigénétiques et phénotypiques du développement d'un cancer épithélial.

Adapté de (Mareel and Leroy, 2003).

a- Indépendance aux signaux de croissance cellulaire

Les cellules normales requièrent des signaux de croissance pour passer d'un stade quiescent à un stade prolifératif. Ces signaux sont transmis par des récepteurs de surface qui peuvent lier des facteurs de croissance, des composants de la matrice extracellulaire ou des molécules d'adhérence ou d'interaction cellule-cellule.

Les cellules cancéreuses deviennent progressivement indépendantes par rapport à ces signaux. Elles acquièrent la capacité de synthétiser des facteurs de croissance auxquels elles sont sensibles, il s'agit de leur fonction autocrine (NGF, EGF, IGF...). De même, une surexpression des récepteurs de ces facteurs de croissance est observée, comme celle de HER2/Neu dans les cancers du sein. Les cellules cancéreuses vont aussi pouvoir permettre l'expression de certains récepteurs de la matrice extracellulaire comme les intégrines pour transmettre les signaux pro-prolifératifs. Elles vont aussi agir sur les cellules du stroma pour qu'elles relarguent des facteurs de croissance (Hanahan and Weinberg, 2000; Sledge and Miller, 2003).

b- Perte de sensibilité aux signaux anti-prolifératifs

Dans un tissu normal, les signaux anti-prolifératifs permettent de maintenir la quiescence cellulaire et l'homéostasie tissulaire. Les cellules cancéreuses peuvent passer outre ces signaux. Dans les cellules normales, dans de nombreux cas, ces signaux entraînent un blocage du cycle cellulaire en phase G1. Les cellules épithéliales de sein reçoivent des signaux de facteurs de croissance, hormones, cytokines, matrice extracellulaire qui convergent vers l'inactivation de la voie pRb en affectant le niveau des cyclines et des inhibiteurs des CDK, donc la transition G1/S. La protéine pRb bloque la prolifération cellulaire en séquestrant et altérant la fonction des protéines E2F qui contrôlent de nombreux gènes importants pour la progression G1/S. Le blocage de cette voie libère E2F, permet la prolifération et rend la cellule insensible aux signaux (Caldon et al., 2006; Hanahan and Weinberg, 2000).

Les signaux sont ceux :

- des récepteurs tyrosine kinases (en particulier ErbB dans les cancers du sein),
- des intégrines qui transmettent l'information de la matrice cellulaire et du cytosquelette,
- de la régulation hormonale (œstrogène, progestérone),

Introduction

- de la voie du TGF β et donc de Smad. La voie du TGF β inhibe la voie G1/S par induction des inhibiteurs de CDK et modulation de l'activité des CDK (Caldon et al., 2006).

L'inhibition de la voie pRb va pouvoir se faire à tous les niveaux de ces voies, mais aussi directement au niveau du gène ou de la protéine pRb.

La figure 5 reprend les rôles des cyclines, Cdk et inhibiteurs de Cdk (p21, p27) dans la transition G1/S. La cycline D1 comme le complexe Cdk2-CycE peut phosphoryler la protéine Rb. E2F va alors pouvoir réguler l'expression de la cycline E. p21 et p27 sont régulés par ces deux complexes Cdk-cyclines, mais inhibent le complexe CycE/Cdk2 (Caldon et al., 2006).

L'expression des cyclines, Cdk, inhibiteurs de Cdk est altérée dans de nombreux cancers. La cycline D1, la cycline la plus communément exprimée dans les cancers du sein est retrouvée très tôt dans ces cancers au niveau hyperplasie atypique ou cancer canalaire *in situ*. De plus, la surexpression des cyclines et Cdk, comme la perte d'expression des inhibiteurs de Cdk est associée à un mauvais pronostic dans ces cancers (Caldon et al., 2006; Sledge and Miller, 2003).

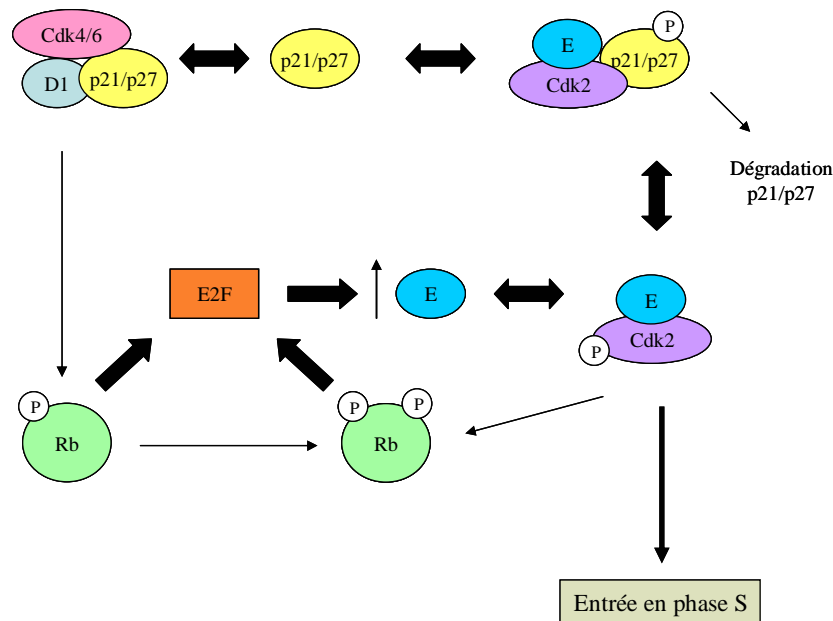


Figure 5 : Les cyclines et les Cdk régulent la transition G1/S.

Le complexe CyclineD1/Cdk4/6 permet la phosphorylation de la protéine pRb. Celle-ci va pouvoir libérer la protéine E2F et ainsi permettre la transcription de la Cycline E. La Cycline E en interagissant avec Cdk2 va pouvoir permettre l'entrée en phase S. De plus, il existe une boucle de régulation positive de ce complexe qui va permettre la phosphorylation de Rb. p21 et p27 sont nécessaires à la régulation du complexe Cdk2/Cycline E.

c- Echappement à l'apoptose

L'apoptose est la mort cellulaire programmée des cellules. L'apoptose ne nécessite pas de nouvelle transcription ou traduction, mais une activation. Les signaux induisant l'apoptose peuvent être (Figure 6) :

- extrinsèques : par activation du TNFR (par le $TNF\alpha$), de l'IGF1R (par l'IGF-1/2), IL-3 (par IL-3R), FasR (par Fas ligand), de Trail, CD95... ou des modifications des liaisons cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire.

L'activation des récepteurs de mort permet l'activation des caspases initiatrices (8 à 10), puis vont permettre l'activation des caspases effectrices.

- intrinsèques : liés aux modifications intra ou extracellulaires, comme l'hypoxie, les dommages à l'ADN, ou la privation en facteurs de croissance...

L'induction de l'apoptose se produit au niveau de la mitochondrie. Il va pouvoir alors y avoir relargage du cytochrome C. Les protéines de la famille Bcl-2 régulent l'activité au niveau de la mitochondrie. Les effecteurs terminaux sont toujours les caspases. p53 peut agir au niveau de ces deux voies.

Dans les cancers, le blocage est possible à toutes les étapes. Tout d'abord, la mutation de p53 est souvent retrouvée dans les cancers, en particulier le cancer du sein, ce qui va entraîner des altérations au niveau des gènes pro- et anti-apoptotiques et des gènes qui les régulent. Ensuite, certaines voies vont être impliquées dans les cancers, comme la voie PI3K-AKT/PKB (qui transmet des signaux de survie), les circuits des signaux de survie activés par des facteurs extracellulaires (comme l'IGF1/2 ou l'IL-3), des facteurs intracellulaires (comme Ras), la perte de pTEN qui agit sur la voie Akt ou encore l'activation de la voie NFkB (qui régule l'activation de gènes impliqués dans le contrôle de la survie) (Hanahan and Weinberg, 2000; Pommier et al., 2004; Sledge and Miller, 2003).

Introduction

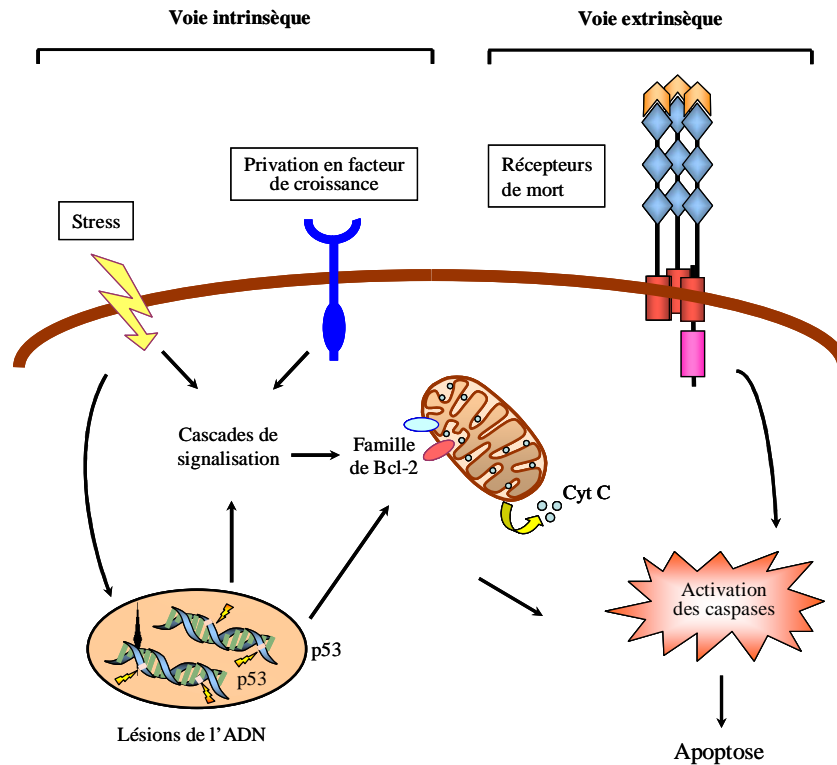


Figure 6 : Transduction du signal de l'apoptose.

Les inducteurs se répartissent en trois groupes (facteurs de mort, stress, manque de facteurs de croissance). La voie intrinsèque, liée au stress, privation en facteurs de croissance ou lésions de l'ADN, va entraîner le relargage du cytochrome C par la mitochondrie. Cet effet est médié par les facteurs pro ou anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Suite au relargage du cytochrome C, les caspases effectrices vont pouvoir être activées. La voie extrinsèque, passant par les récepteurs de mort, va entraîner l'apoptose par activation directe de la voie des caspases (activation des caspases initiatrices, qui vont par la suite activer les caspases effectrices).

d- Potentiel réplcatif illimité

La plupart des cellules tumorales en culture apparaissent immortalisées suggérant qu'elles ont un potentiel réplcatif illimité qu'elles ont acquis *in vivo* durant la progression tumorale.

Les cellules normales ont une perte progressive des télomères, séquence d'ADN de 15-20 kb de répétitions de 6 pb terminant les chromatides. A chaque cycle, les télomères deviennent plus petits entraînant soit la sénescence soit la mort cellulaire.

Dans tous les types cellulaires cancéreux, les télomères sont maintenus. Dans 85% à 90% des cas, cela est dû à la télomérase qui ajoute 6 pb au niveau des télomères. L'expression du gène *htert* codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase humaine est fréquente dans les cancers du sein dont les tumeurs pré-invasives. L'activation des télomères est

corrélée à l'invasion lymphatique et vasculaire et aux métastases ganglionnaires. Les œstrogènes, comme la progestérone augmente l'activité de la télomérase, tandis que le tamoxifène ou p53 la diminue (Dimri, 2005; Hanahan and Weinberg, 2000; Sledge and Miller, 2003).

e- Conversion angiogénique

L'invasion, comme les métastases dans différentes tumeurs, dépendent de l'angiogénèse, la formation de nouveaux vaisseaux pour nourrir la tumeur. L'angiogénèse requiert la stimulation des cellules endothéliales et donc va être une balance entre activateurs et inhibiteurs de l'angiogénèse (Figure7).

La stimulation ou le blocage de l'angiogénèse se fait par deux types de signaux :

- des molécules solubles (VEGF, FGF1/2, thrombospondine...) qui vont pouvoir être sécrétées par les cellules tumorales, et leurs récepteurs à la surface des cellules,
- les signaux venant des intégrines ou les molécules d'adhérence, à la surface des cellules endothéliales (Kerbel, 2000).

La capacité d'induire l'angiogénèse et de la faire semble être acquise après une étape discrète pendant la tumorigénèse : le « switch ». Les tumeurs induisent ce « switch » en changeant la balance inducteurs/inhibiteurs de l'angiogénèse, souvent par dérégulation de gènes (surexpression ou inhibition), mais aussi par l'action de protéases qui contrôlent l'activité des activateurs et inhibiteurs. Les protéases en dégradant la matrice extracellulaire vont permettre de libérer des facteurs pro ou anti-angiogéniques (Bergers and Benjamin, 2003; Hanahan and Weinberg, 2000; Sledge and Miller, 2003).

De nombreuses cellules du stroma interviennent dans ce mécanisme :

- les cellules endothéliales en sécrétant les facteurs angiogéniques,
- les macrophages et mastocytes qui sécrètent d'autres facteurs angiogéniques,
- les fibroblastes en sécrétant des facteurs de croissance, des cytokines, des chémokines et en modulant la matrice extracellulaire,
- des cellules du système immunitaire ou de l'homéostasie (Kopfstein and Christofori, 2006).

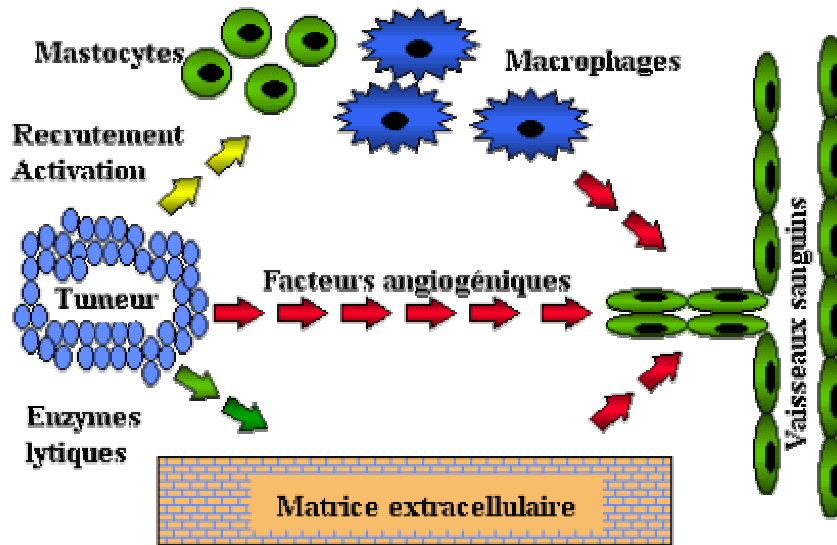


Figure 7 : Mécanismes de l'angiogenèse induite par les cellules tumorales.

Les cellules tumorales peuvent induire l'angiogenèse par l'intermédiaire de plusieurs voies, soit par le recrutement de cellules immunitaires, qui vont elles mêmes sécréter des facteurs angiogéniques, soit par la sécrétion directe de facteurs angiogéniques ou encore par l'intermédiaire de la dégradation de la matrice extracellulaire, qui va alors pouvoir libérer les facteurs angiogéniques.

En plus de l'angiogenèse, on peut aussi parler de lymphangiogenèse, la formation de néovaisseaux lymphatiques. Une des voies de dissémination métastatique emprunte en effet la circulation lymphatique pour envahir les ganglions régionaux. Le VEGF C/D et les angiopoïétines et leurs récepteurs sont les facteurs les plus importants de l'induction de la lymphangiogenèse (Alitalo et al., 2005).

f- Invasion/métastase

Ces deux dernières sont les caractéristiques des tumeurs les plus agressives. Ces événements nécessitent que les cellules perdent leurs contacts avec leurs voisines, deviennent motiles et envahissent les surfaces environnantes où elles prolifèrent et acquièrent un comportement agressif. A ce stade, les cellules épithéliales tumorales se transdifférencient en mésenchyme, c'est la transition épithélio mésenchymateuse (EMT). Au contraire des cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses ont la capacité de migrer et d'envahir la matrice extracellulaire. L'EMT est l'événement critique permettant la dissémination et la formation des cellules micrométastatiques, permettant la conversion du carcinome *in situ* en carcinome métastatique et invasif (Thiery, 2002).

Introduction

Les molécules impliquées dans l'invasion et les métastases sont :

- les molécules d'adhérence cellule-cellule (CAM et cadhérines).

L'expression de la E-Cadhérine est souvent perdue dans les cancers, soit par inactivation par mutation du gène *E-cadhérine* ou *β-caténine*, par répression transcriptionnelle ou par lyse du domaine extracellulaire des Cadhérines. On peut aussi observer un changement d'expression des cadhérines,

- les intégrines pour l'adhérence cellule-matrice extracellulaire.

Une modification de l'expression des intégrines peut être observée, c'est-à-dire qu'une va être favorisée par rapport à une autre,

- les protéases extracellulaires (produites par les tumeurs et le stroma).

De la même façon, les protéases vont être surexprimées dans les cancers et les inhibiteurs de protéases vont être réprimés. Enfin, les protéases vont pouvoir passer d'une forme zymogène inactive à une forme active (Christofori, 2006; Hanahan and Weinberg, 2000; Kopfstein and Christofori, 2006).

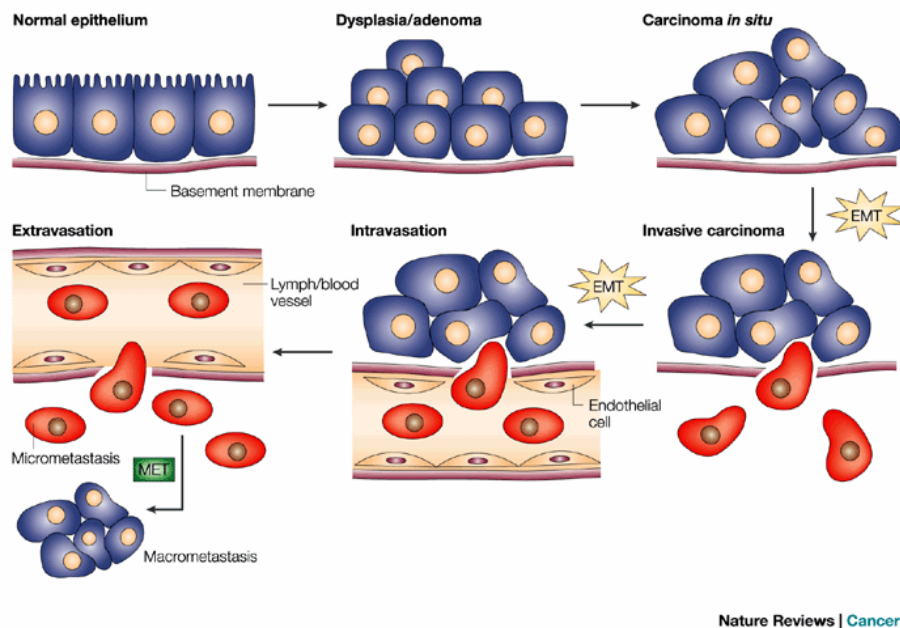


Figure 8 : Evolution d'une tumeur vers la métastase.

D'après (Thiery, 2002).

Les cellules épithéliales prolifèrent de façon plus importante pour donner un adénome. Les altérations génétiques et épigénétiques vont amener à un carcinome *in situ*, toujours limité au dessus de la membrane basale. D'autres altérations vont induire une dissémination des cellules carcinomiales, parmi lesquelles la transition épithélio-mésenchymateuse. Puis les cellules vont passer dans le sang, par extravasation, remonter le long des vaisseaux et alors extravaser pour envahir le nouvel espace.

Introduction

Protéines augmentées en abondance	Protéines diminuées drastiquement	Protéines dont l'activité est augmentée	Protéines accumulées dans le noyau	Modifications phénotypiques
N-cadhérine Vimentine Fibronectine Snail1 Snail2 Twist Goosecoïd FOXC2 Sox10 MMP-2 MMP-3 MMP-9 Intégrine $\alpha\beta6$	E-cadhérine Desmoplakine Cytokératine Occludine	ILK GSK-3 β Rho	B-caténine Smad-2/3 NFkB Snail-1 Snail-2 Twist	- \uparrow migration - \uparrow invasion - \uparrow dispersion -allongement de la forme des cellules -résistance à l'anoïkis

Tableau 3: Marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse.

D'après (Lee et al., 2006).

La transition épithélio-mésenchymateuse marque la « transformation » des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses, liées à des altérations dans la morphologie, l'architecture cellulaire, l'adhérence et la migration (Figure 8). Un résumé des marqueurs de l'EMT est indiquée dans le tableau 3 (Lee et al., 2006).

La transition épithélio-mésenchymateuse semble être importante dans les cancers mammaires. En effet, un des marqueurs de l'EMT est la perte de l'E-cadhérine, qui est en partie contrôlée par les membres de la famille Snail. D'autres signaux de transduction sont aussi retrouvés dans des tumeurs mammaires, dans lesquelles le TGF β comme des récepteurs tyrosine kinase sont produits (ErbB, FGFR, IGFR, c-Met), signaux inducteurs de l'EMT (Christofori, 2006; Vincent-Salomon and Thiery, 2003).

Les voies de signalisation de l'HGF, Wnt, HER, IGF1R, TGF β sont très importantes dans l'invasion et dans la formation des métastases et leur migration (Christofori, 2006; Kopfstein and Christofori, 2006). L'HGF est un important médiateur de la migration et de la métastase en permettant la surexpression de protéases (uPA, MMP...), par l'activation de facteurs de transcription (Ets1 par exemple), les interactions protéiques (avec les intégrines, Erzin Radix Moesin, Plexin-1 ou CD44...). La voie de signalisation Wnt-1 va permettre l'activation ou la répression de la transcription de gènes impliqués dans la progression tumorale. ErbB promeut la motilité cellulaire, l'invasion et les métastases par de nombreuses

Introduction

voies de signalisation ou en affectant des fonctions protéiques. L'IGFR module l'adhérence cellule-matrice, la migration, l'invasion et les interactions cellule-cellule, par activation de la voie FAK, ou en modulant l'expression et la fonction de différentes protéines (Cadhérines, Caténines...). Le TGF β est lui aussi important pour l'induction de l'EMT.

Le stroma va jouer un rôle important dans l'invasion et la formation des métastases des tumeurs. On peut citer les fibroblastes qui vont permettre :

- la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire,
- le relargage de facteurs comme l'HGF ou l'IGF,
- la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires,
- la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques.

Les cellules du système immunitaire jouent aussi leur rôle dans ces mécanismes. Ces cellules ont un double rôle, la répression de la croissance tumorale par un système immunitaire adaptatif et d'un autre côté un rôle de support de la progression tumorale par le système immunitaire inné. En effet, des cellules comme les macrophages associés aux tumeurs, s'ils peuvent présenter les antigènes, donc créer une réponse anti-tumorale, peuvent aussi sécréter des cytokines, MMP, facteurs angiogéniques... qui permettent une progression tumorale (Christofori, 2006; Kopfstein and Christofori, 2006).

Dans le cas du cancer du sein, l'analyse de profil d'expression des gènes dans les métastases de l'os ou du poumon, ont pu mettre en évidence de nouveaux gènes impliqués dans les métastases. Dans le cas de l'os, on retrouve l'IL11, le CTGF, CXCR4, l'Ostéopontine (Kang et al., 2003) et dans le cas des métastases du poumon SPARC, Id1, MMP1, MMP2, VCAM1, IL-13R α , COX-2, CXCL1 (Minn et al., 2005).

g- Instabilité génomique

L'instabilité génomique peut être une cause directe du cancer, comme pour BRCA1 ou BRCA2 dans le cas du cancer du sein, mais peut aussi se développer au fur et à mesure de la progression tumorale. Dans la plupart des cas, l'instabilité génomique peut être reliée aux altérations précédentes (Sledge and Miller, 2003).

III- Les membres de la famille ETS

1 - Présentation générale

Le fondateur de la famille des gènes *ets* a été défini sur la base de son identité de séquence avec l'oncogène *v-ets* transduit par le rétrovirus aviaire E26 (Leprince et al., 1983). De nombreux homologues ont ensuite été décrits dans divers modèles aussi bien invertébrés (Hart et al., 2000b; Hsu and Schulz, 2000) que vertébrés, dont environ 30 membres identifiés chez les mammifères (25 membres chez l'homme, 26 chez la souris) (Hsu et al., 2004) (Tableau 4). Les gènes de cette famille encodent des facteurs de transcription qui fixent l'ADN par leur domaine de liaison à l'ADN, nommé le domaine ETS (Karim et al., 1990). Ce domaine, constitué d'environ 85 acides aminés, reconnaît une séquence consensus minimale : GGAA/T, appelée EBS (ETS Binding Site) (Karim et al., 1990; Nye et al., 1992). En fonction du degré de conservation au niveau de ce domaine et en fonction de la similarité au niveau de la structure de ces facteurs de transcription, treize groupes ont été décrits : ETS, ELF, ERG, GABP, ELK, SPI, PEA3, PDEF, YAN, ER71, ERF, ESE et TEL (Figure 9) (Laudet et al., 1999). On peut noter que la plupart de ces facteurs ont leur domaine ETS en C-terminal sauf la sous-famille ELK et ERF, plus le facteur FEV. En plus de ce domaine, les sous-familles ETS, ERG, ELG et TEL possèdent un domaine Pointed dans la région N terminale, qui forme une structure hélice-boucle-hélice importante pour les interactions protéines-protéines (Kim et al., 2001). Un autre domaine conservé entre plusieurs des membres de la famille ETS est le domaine acide, le plus fréquemment observé dans la région N-terminale. Ce domaine correspond au domaine de transactivation.

Le patron d'expression des facteurs ETS est très différent selon les membres et est résumé pour les principaux dans le tableau 5.

Introduction

Sous-famille	Gènes	Autres noms
PEA3	Pea3	Etv4, E1AF
	Erm	Etv5
	Er81	Etv1
ETS	Ets1	Tp11, p54, EWSR2
	Ets2	
GABP α	GABP α	E4TF1-60, E4TF1-A, NTF2, Nrf2A
ERG	Fli-1	EWSR2, Sic-1, Erg1B
	Erg	
	Fev	Pet-1
ERF	Erf	Pe-2
	Etv3	Pe-1, METQ
ELK	Elk1	Elk2
	Elk3	Erp, Net, Sap2, Etrp
	Elk-4	Sap1
ELF	Elf-1	
	Elf-2	Eu32, Nerf, Nerf-2, Nerf-1A, Nerf-1B
	Elf-4	Mef
ESE	Elf-3	Ese-1, Esx
	Ese2	Elf-5
	Ese3	Ehf
TEL	Etv6	Tel
	Tel2	Telb, tref
ER71	Etv2	Er71
SPI	Spi1	PU1, Sfp1, Dis1, Tcfu, Tfpu1
	SpiB	
	SpiC	Prf
PDEF	Pdef	Pse

Tableau 4 : Nomenclature des membres de la famille ETS et leurs différentes appellations chez l'homme et la souris.

Membres	Expression tissulaire
Ets1	Organes lymphoïdes, cerveau, cellules endothéliales
Ets2	Ubiquitaire
Erg	Cellules endothéliales, cellules hématopoïétiques, rein, tractus urinaire
Fli-1	Cellules hématopoïétiques, cellules endothéliales
GABP α	Ubiquitaire
TEL	Ubiquitaire
Elf-1	Cellules hématopoïétiques, foie, rein, intestin...
ESX	Cellules épithéliales
PU-1	Cellules B, macrophages, neutrophiles
TCF (Elk-1, Sap, Net)	Ubiquitaire
Er81/Erm	Ubiquitaire
Pea3	Glande mammaire, cerveau, épидидyme
PDEF	Prostate, glande mammaire

Tableau 5 : Expression tissulaire des principaux facteurs de la famille ETS.

D'après (Oikawa and Yamada, 2003).

Introduction

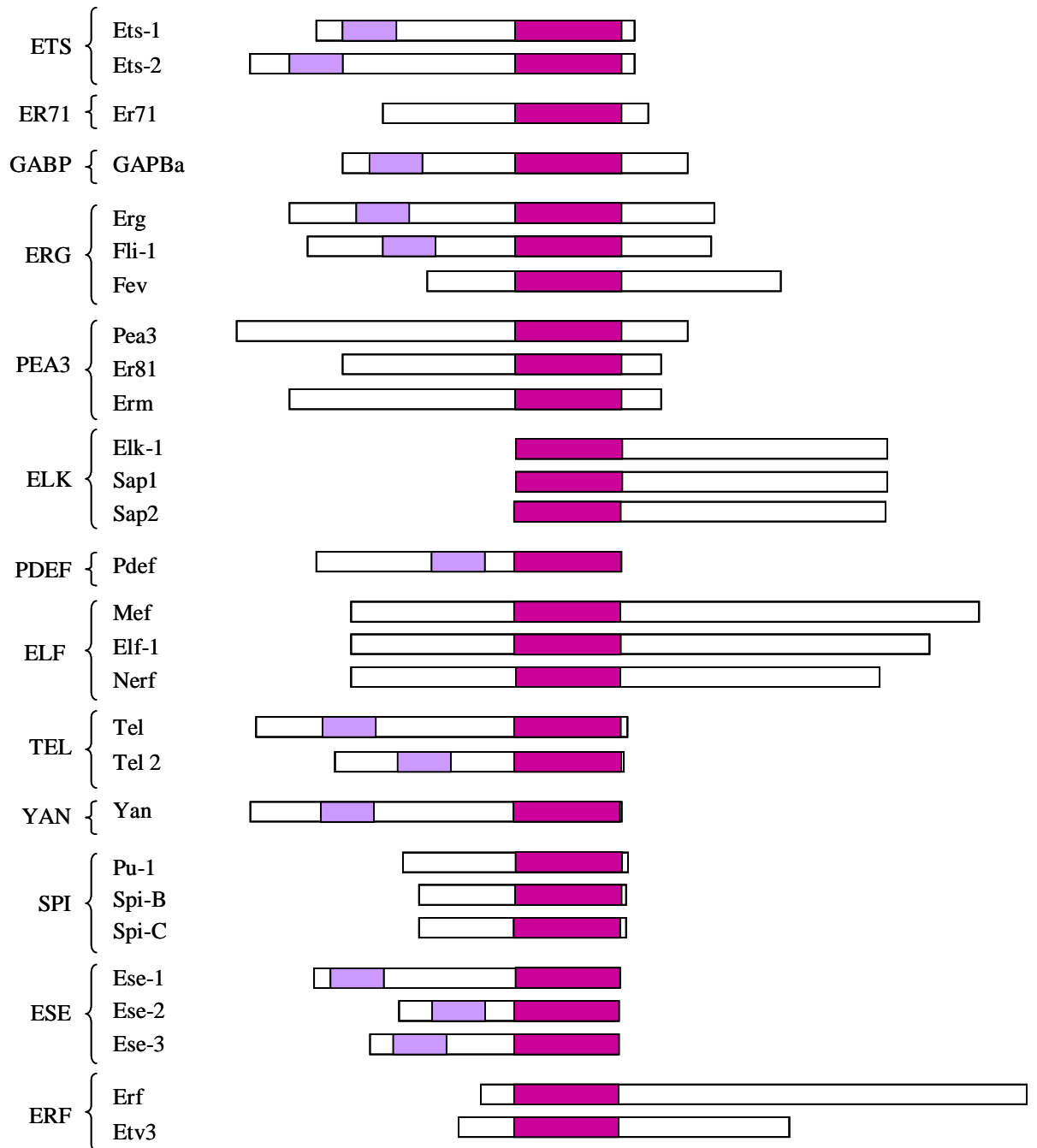


Figure 9 : Représentation schématique des membres de la famille ETS.

D'après (Laudet et al., 1999).

En rose, sont représentés les domaines ETS et en mauve, le domaine Pointed. Cette représentation respecte proportionnellement la taille des protéines.

2- Rôle des facteurs de la famille ETS

Les différents membres du groupe PEA3 comme les différentes sous-familles ont des rôles totalement différents comme en atteste les résultats des mutations de perte de fonction chez la souris (Tableau 6). A l'heure actuelle, 17 gènes de la famille ETS ont été étudiés par perte de fonction par recombinaison homologe. Dans un certain nombre de cas, le phénotype est létal, ce qui montre le caractère essentiel des facteurs ETS.

Les résultats de ces expériences indiquent que les facteurs ETS seraient impliqués dans :

- la croissance cellulaire et la régulation du cycle cellulaire (Pea3, Elk-1, Ets1, Elf-1, ESX, TCF, Tel, Ets2, PU-1, SpiB),
- l'apoptose (PU-1, SpiB, Ets2, Tel, Ets1, Fli-1),
- la différenciation hématopoïétique :
 - des cellules progénitrices (PU-1, Ets1, Fli-1, Elf-1, Tel)
 - des cellules myéloïdes (PU-1)
 - des mégacaryocytes et des cellules érythrocytaires (Fli-1, PU-1, Ets1)
 - des cellules lymphoïdes (Ets1, Ets2, Erg, Fli-1, Elf-1, GABP α , PU-1, SpiB)
- la différenciation des cellules endothéliales (Ets1, Fli-1, Erg, Tel, Nerf),
- la différenciation neuronale (Yan, Er81, Pea3, Erm, GABP α , Pet-1, Ets1, Ets2, Elk-1),
- la différenciation myogénique et ostéogénique (Pea3, Ets1, Ets2, PU-1),
- les cancers (Ets1, Ets2, Fli-1, Erg, Pea3, Erm, Er81, Elf-1, Nerf-1/2, Elf-4, Etv6, PU-1, SpiB, Pdef, Esx, Fev) (Oikawa and Yamada, 2003).

Tableau 6 : Effets de perte de fonction par recombinaison homologue des membres de la famille ETS.

Sous-famille	Gène	Sévérité	Phénotype	Références
PEA3	Pea3	Viable, les mâles sont stériles	Dysfonctionnement au niveau de l'éjaculation	(Laing et al., 2000)
	Erm	Viable, les mâles sont stériles	Perturbation de la spermatogenèse	(Chen et al., 2005)
	Er81	Létalité post-natale, à 3-5 semaines	Perte des connexions synaptiques entre les motoneurones	(Arber et al., 2000)
ETS	Ets 1	Viable et fertile, 50% de mortalité néonatale	Réduction du nombre et accroissement de l'apoptose de cellules T et B, problème d'activation du récepteur des lymphocytes T à l'activation	(Bories et al., 1995; Muthusamy et al., 1995)
	Ets-2	Létalité embryonnaire (< E8,5)	Malformation de l'ectoplacenta, perte de migration du trophoblaste, pas de formation d'amnios et du chorion, désorganisation des follicules.	(Yamamoto et al., 1998)
ERG	Fli-1	Létalité embryonnaire (< E12,5)	Réduction du nombre de cellules progénitrices euthyroïdiennes, perturbation de l'hématopoïèse	(Hart et al., 2000) (Spyropoulos et al., 2000)
	Pet-1	Viable et fertile	Blocage de la différenciation du système central à neurotransmission sérotonique, augmentation du comportement agressif, impliqué dans la modulation sérotonique du comportement	(Hendricks et al., 1999)
ELK	Elk-1	Viable	Aucun	(Cesari et al., 2004)
	Elk-3 (net)	Létalité post-natale (1-6 semaines)	Défaillance respiratoire, chylothorax congénital, dilatation des vaisseaux lymphatiques	(Ayadi et al., 2001)
	Elk-4 (SAP1)	Viable	Défaut dans la sélection positive des thymocytes	(Costello et al., 2004)
ELF	Elf-1	Viable	Pas de phénotype apparent	(Lacorazza and Nimer, 2003)
	Elf-4, MEF	Viable et fertile	Requis pour la fonction et le développement des cellules NK-T et NK	(Lacorazza et al., 2002)
GABP	GABP	Mort avant implantation		(Ristevski et al., 2004)
SP1	Sfpi1/PU1	Létalité embryonnaire (E17,5-18,5) ou post-natale (24-48h) selon la souche de souris	Blocage de la maturation érythrocytaire, défaut sans la production des lymphocytes B et T, les cellules progénitrices des monocytes et granulocytes. Pas de développement des macrophages et développement anormal des neutrophiles	(Iwama et al., 1998; McKercher et al., 1996; Scott et al., 1997; Scott et al., 1994)
	SpiB	Viable et fertile	Défaut dans la signalisation des récepteurs des lymphocytes B	(Su et al., 1997)
TEL	tel	Létalité embryonnaire (E 10,5-11,5)	Echec de la formation et du maintien des vaisseaux vitellins Apoptose des cellules mésenchymateuses et des cellules neurales	(Wang et al., 1997)
ESE	Elf-5	Létalité embryonnaire (<E7,5)	Requis pour le développement de l'épithélium alvéolaire pendant la grossesse et la lactation (pour les souris hétérozygotes)	(Zhou et al., 2005)

3- La famille ETS et cancer

Les membres de la famille ETS sont retrouvés associés dans divers cancers (Tableau 7). Les gènes de la famille ETS peuvent être :

- activés par intégration provirale au génome des tumeurs,
- impliqués dans des translocations chromosomiques dans des tumeurs humaines,
- surexprimés dans des tumeurs,
- mutés.

Sous-famille	Membres	Cancer
ETS	Ets1	Thyroïde, côlon, sein, tête, utérus, endomètre, peau, système vasculaire, gastrique, oral, prostate, pancréas, ovaire, peau, cerveau, os/cartilage, côlon, foie, poumon, tissu lymphoïde, thymus
	Ets2	Poumon, sein, œsophage, foie, côlon, thyroïde, prostate, utérus
ERG	Fli-1	Tumeurs d'Ewing, tumeurs vasculaires, cellules de Merkel, prostate
	Erg	Tumeurs d'Ewing, leucémie, prostate, utérus, ovaire
PEA3	Pea3	Sein, poumon, oral, ovaire, utérus, côlon, foie
	Erm	Tumeurs d'Ewing, sein, endomètre
	Er81	Tumeurs d'Ewing, prostate
ELF	Elf-1	Leucémie, prostate, endomètre, ovaire
	NERF-1/-2	Leucémie
	MEF, Elf-4	Leucémie
Yan	Tel, Etv6	Sein, leucémie
Spi	PU-1	Leucémie
	SpiB	Leucémie
Autres	Pdef	Sein, prostate
	Esx ; elf-3	Sein
	Fev, Pet-1	Tumeurs d'Ewing

Tableau 7 : Expression des facteurs ETS dans différents types de tumeurs.

d'après (Dittmer, 2003; Seth and Watson, 2005)

Les facteurs de la famille ETS sont surexprimés dans un certain nombre de tumeurs (Tableau 7). On peut noter que ces facteurs ETS, même s'ils ne sont pas toujours associés à un mauvais pronostic, ont toujours tendance à être exprimés dans les stades avancés de la

tumorigenèse. Les facteurs du groupe PEA3 ne sont pas repris dans ce paragraphe des facteurs ETS surexprimés dans les différents types tumoraux, mais seront décrits ci-après.

a- Les facteurs du groupe ETS

Les facteurs Ets1 et Ets2 sont exprimés dans de nombreux cas de cancers :

- dans les cancers de la thyroïde surexprimés en comparaison des tumeurs bénignes ou du tissu normal, ces deux facteurs sont importants pour la transformation des cellules de la thyroïde (de Nigris et al., 2001; Nakayama et al., 1999),
- dans les carcinomes pancréatiques par rapport au tissu normal (Ito et al., 1998; Ito et al., 2002a). Le facteur Ets2 y jouerait un rôle au niveau de la progression tumorale des adénocarcinomes pancréatiques, en particulier dans les phases tardives (Ito et al., 2002a),
- dans les étapes précoces des carcinomes hépatocellulaires (Ito et al., 2000a),
- dans les leucémies et les lymphomes pour le facteur Ets1 et dans les leucémies aiguës non lymphoblastiques et les LAM pour le facteur Ets2 (Seth and Watson, 2005),
- dans les carcinomes de la vésicule biliaire en ce qui concerne le facteur Ets1 (Ito et al., 2000b),
- dans les adénocarcinomes du côlon, mais pas dans le côlon normal, en quantité de plus en plus importante au fur et à mesure de la progression tumorale, l'expression du facteur Ets1 est associée au potentiel métastatique dans ce modèle (Ito et al., 2002b),
- dans les cancers du poumon et toujours associées aux phases tardives de la cancérogenèse. Dans une étude de comparaison entre des adénocarcinomes de poumon, des adénomes du poumon et du poumon normal, on retrouve une expression plus importante du facteur Ets2 entre adénocarcinomes et carcinomes *versus* tissu normal (Bonner et al., 2004). Le facteur Ets1 est aussi retrouvé au niveau des adénocarcinomes pulmonaires et semble être un marqueur d'un stade avancé de tumeurs (Sasaki et al., 2001; Takanami et al., 2001),
- dans les cancers du sein. Si le facteur Ets1 n'est pas exprimé au niveau de l'épithélium normal, ni au niveau de carcinomes non invasifs, son expression est retrouvée dans les carcinomes canauxiaux invasifs, les carcinomes primaires ou les fibroadénomes mais aussi dans différents types de lignées cancéreuses de sein (Buggy et al., 2004; Katayama et al., 2005). Les ARN de *ets2* sont exprimés de manière plus importante dans des carcinomes que dans le tissu normal. Les deux formes de protéines (p52 et p54) sont retrouvées en

Introduction

quantité plus importante dans les carcinomes que dans les fibroadénomes ou le tissu normal (Buggy et al., 2006). Les facteurs Ets1 comme Ets2 sont associés avec une survie sans récurrence faible et à un mauvais pronostic dans ce modèle (Myers et al., 2005; Span et al., 2002),

- dans des cancers prostatiques associés à des stades avancés. Le facteur Ets-1 est fortement exprimé dans des adénocarcinomes (Gavrilov et al., 2001), exprimé différemment entre les différents stades de tumeurs prostatiques et les tumeurs bénignes, mais sans association avec les facteurs cliniques (Alipov et al., 2005). L'inhibition de l'activité du facteur Ets2 réduit la tumorigénicité des cellules prostatiques et la formation de tumeurs en souris nues (Carbone et al., 2003; Sementchenko et al., 1998),

- dans les cancers de l'ovaire pour le facteur Ets1. Le facteur Ets1 est exprimé aussi bien au niveau des cancers primaires, des carcinomes, qu'au niveau des métastases péritonéales dérivées des cancers de l'ovaire (Davidson et al., 2001a; Davidson et al., 2001b; Fujimoto et al., 2004; Khatun et al., 2003; Takai et al., 2002). Il est défini comme un facteur de mauvais pronostic et comme un médiateur de l'angiogenèse,

- dans les cancers de l'endomètre et des carcinomes ovariens (associé à une malignité importance des tumeurs) pour le facteur Ets1 (Takai et al., 2003),

- dans les cancers de l'utérus pour le facteur Ets2 au niveau de translocations (Simpson et al., 1997).

Enfin, le facteur Ets1 est exprimé dans les tumeurs du cou et de la tête, du cerveau, de l'os et du cartilage, de la peau, du thymus, dans les tumeurs orales et gastriques (Dittmer, 2003). Le facteur Ets1 est aussi impliqué dans le processus métastatique des tumeurs du testicule et exprimé dans ces métastases (Adam et al., 2003).

b- Les facteurs du groupe ERG

- Les translocations chromosomiques

Les translocations impliquant des facteurs ERG sont retrouvées dans deux types de cancers : le cancer de la prostate et les tumeurs d'Ewing.

Introduction

Cancer de la prostate : les fusions *TMPRSS2*

Récemment, le groupe de Tomlins a montré une fusion entre *TMPRSS-2* et *erg* entraînant une surexpression de ces facteurs dans les cancers de la prostate (Tomlins et al., 2006; Tomlins et al., 2005).

Les tumeurs d'Ewing

Les tumeurs d'Ewing sont caractérisées par une translocation chromosomique impliquant *ewsr1* et un gène *ets*. La protéine de fusion obtenue composée de la partie N-terminale d'EWS et de la partie C-terminale du facteur ETS est exprimée et cause le développement de tumeurs d'Ewing. Cinq facteurs ETS ont été identifiés dans ces tumeurs : Fli-1, Erg, Er81, Pea3 et Fev. La fusion *EWS-fli-1* est la plus fréquente (environ 85% des cas), celle d'*EWS-erg* est retrouvée dans environ 10% des cas. Les trois autres fusions sont rares (moins de 1% d'incidence). Ces protéines fusionnées vont agir comme un facteur de transcription, par l'intermédiaire de leur domaine ETS et du puissant domaine de transactivation provenant de Ews. Ils vont pouvoir transactiver les mêmes cibles que les facteurs ETS avec un effet de transactivation plus important. Il existe aussi dans les tumeurs d'Ewing une autre fusion impliquant *fus* (ou TLS) et le gène *erg* (Janknecht, 2005).

• Activation du facteurs Fli-1 dans les érythroleucémies

Le complexe viral de Friend (consistant en la réplication d'un virus compétent F-MuLV et d'un virus déficient SFFV) est connu pour induire des érythroleucémies chez la souris. Dans les érythroleucémies induites par F-MuLV, le facteur Fli-1 est activé par intégration du provirus F-MuLV près de son locus (Oikawa and Yamada, 2003).

• La surexpression des membres du groupe ERG dans les cancers

En marge des phénomènes de translocation et d'activation, les membres du groupe ERG sont surexprimés dans quelques cancers :

- les facteurs Erg et Fli-1 dans les LAM (Seth and Watson, 2005)
- le facteur Fli-1 dans les adénocarcinomes de la prostate (Gavrilov et al., 2001)
- le facteur Erg dans des cellules de cancers de l'utérus (Simpson et al., 1997)

c- Le facteur PU-1

La mutation de la séquence codant un facteur ETS est documentée pour le facteur PU-1 chez des patients atteints de LAM. Les mutations sont retrouvées dans le domaine ETS (Mueller et al., 2002). La protéine mutée n'est plus capable de transactiver ses gènes cibles et d'interagir avec d'autres facteurs ETS.

Dans ces érythroleucémies, le facteur PU-1 est activé par intégration du provirus SFFV près de son locus. Dans des souris transgéniques pour le facteur PU-1, on retrouve un développement précoce de ces leucémies (Oikawa and Yamada, 2003).

d- Le facteur TEL/ETV6

Chez des patients atteints de leucémies aigües myéloblastiques, la séquence du gène codant *Etv6* est parfois muté, en particulier au niveau de son domaine ETS ou pointed. Les protéines « mutées » agissent alors comme des dominants négatifs (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al., 2005).

Le gène *etv6* est aussi souvent impliqué dans des translocations chromosomiques et se trouve juxtaposé à des gènes codant pour des tyrosines kinases, comme PDGFR β , Abl1, Abl2, Jak2, NTRK3, FGFR3, Syk. Ces fusions *Etv6*/PTK sont retrouvées dans diverses leucémies (LMMC, LAM, LAL par exemple) ou même dans des tumeurs solides. Ces fusions comprennent le domaine Pointed de *Etv6* et le domaine tyrosine kinase des autres gènes. Il existe ensuite des fusions *Etv6*/RUNX1 qui est la fusion la plus fréquente dans les leucémies aigües lymphoblastiques B de l'enfant. C'est aussi la plus fréquente fusion existante pour *Etv6*. On peut ensuite citer les fusions de *Etv6* avec *Mn1*, *Arnt*, *Mds1*, *Btl*, *Cdx2*, *Pax5*, *Hlxb9*, *Mds2*, *Stl*, *Acs2*, *Ttl* et *Per1* antisens (Bohlander, 2005). Il est intéressant de noter que le facteur *Etv6* quand il n'est ni muté ni réarrangé dans une translocation chromosomique, semble avoir un effet répresseur de tumeurs.

e- Le facteur Pdef

La surexpression du facteur Pdef est caractéristique des tumeurs agressives de cancer prostatique (Oettgen et al., 2000).

Une première étude a montré que les transcrits du facteur Pdef sont surexprimés dans les tumeurs primaires humaines et au cours de la progression tumorale (Ghadersohi and Sood,

2001; Gunawardane et al., 2005). Néanmoins deux études contradictoires ont montré la perte d'expression de ce facteur dans les cancers du sein invasifs et dans des lignées de cancer du sein invasives. L'expression du facteur Pdef dans ces cellules de cancer du sein entraîne une inhibition des capacités de migration, d'invasion et de croissance, mais aussi une inhibition de la formation tumorale (Feldman et al., 2003; Ghadersohi et al., 2006).

f- Le facteur Esx

Le facteur Esx est surexprimé dans les stades précoces du cancer du sein et dans les carcinomes canauxiaux *in situ* (Chang et al., 1997; Tymms et al., 1997). Celui-ci peut transformer les cellules épithéliales MCF-12A pour leur donner un phénotype agressif (Prescott et al., 2004; Schedin et al., 2004).

4- Gènes cibles de ces facteurs de transcription pouvant avoir un rapport au cancer

A ce jour, de nombreux gènes cibles ont été mis en évidence pour chacun des facteurs ETS, plus ou moins en rapport avec leur rôle présenté. Sera présenté ici une partie des gènes cibles mis en évidence pour les membres de la famille ETS, pouvant avoir un rôle au cours du développement ou de la tumorigenèse (Figure 10). Les gènes cibles des facteurs du groupe PEA3 seront présentés par la suite.

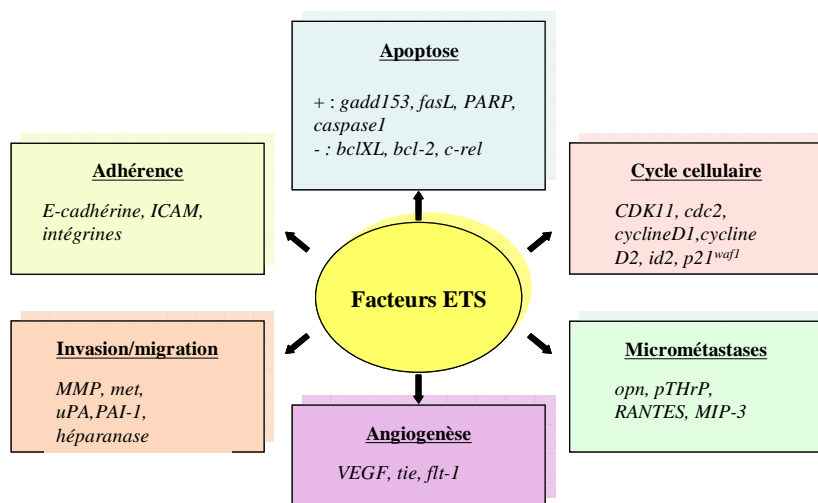


Figure 10 : Gènes cibles des facteurs ETS pouvant être impliqués dans le processus cancéreux.

a- Contrôle de la prolifération cellulaire

Plusieurs membres de la famille ETS sont impliqués dans la régulation de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, que ce soit au niveau de la transition G1/S ou G2/M.

La protéine EWS-Fli-1 lie le promoteur de *id2* (protéine agissant comme un dominant négatif de pRb), et peut le transactiver. De façon intéressante, ce facteur peut aussi lier le promoteur du gène *cycline D1*, protéine importante dans la transition G1/S (Fukuma et al., 2003). Ce promoteur avait déjà auparavant été caractérisé pour être régulé par un autre facteur ETS : le facteur Ets2 (Albanese et al., 1995). Le facteur PU-1 peut lui induire l'expression de la cycline D2 dans des cellules leucémiques (Vicari et al., 2006). Enfin, le facteur Ets2 joue un rôle dans la régulation de l'expression du gène *cdc2*, protéine impliquée dans la transition G2/M (Wen et al., 1995).

Une autre CDK est régulée par un facteur ETS : CDK11. Cette kinase dépendante des cyclines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, est encodée par deux gènes *cdc2L1* et *cdc2L2* (cell division control 2 like 2). Le facteur Ets1 se lie au promoteur des deux gènes, et ainsi permet leur transactivation (Feng et al., 2004; Kahle et al., 2005). Le facteur Ets1 transactive aussi le promoteur du gène *p21^{waf1/cip1}* (molécule inhibitrice des CDK) au niveau d'un site distal, dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux (Zhang et al., 2003). Au contraire, la protéine EWS-Fli-1 réprime la transactivation de ce promoteur dans des tumeurs d'Ewing (Nakatani et al., 2003).

b- Molécules d'adhérence

Les facteurs ETS peuvent aussi réguler les molécules d'adhérence, molécules importantes pour les interactions cellule-cellule, comme les cadhérines ou les CAM, que pour les interactions cellule-matrice extracellulaire.

Le facteur Ets1 induit l'expression de la *E-cadhérine* sans modifier l'expression de la *N-Cadhérine* en se fixant au niveau de deux EBS au niveau de son promoteur (Lelievre et al., 2000). Le promoteur du gène *icam-1* est aussi régulé au niveau d'un EBS, et régulé par le facteur Erm comme le facteur Ets2 (de Launoit et al., 1998; Roy et al., 2001). Le promoteur de *Icam-2* est lui régulé au niveau de trois sites EBS, et en particulier par le facteur Erg (McLaughlin et al., 1999).

Introduction

Les intégrines sont aussi régulées par les facteurs ETS, notamment les sous-unités α IIb (Block et al., 1996), α v (Tajima et al., 2000), α 3 (Katabami et al., 2006), α 5 (Kita et al., 2001), β 2 (Bottinger et al., 1994), β 3 (Oda et al., 1999), β 4 (Takaoka et al., 1998) et l'intégrine α 1 β 11 (Lu et al., 2006).

c- Survie cellulaire et apoptose

Les facteurs de la famille ETS sont connus pour réguler la transcription aussi bien de facteurs pro-apoptotiques que anti-apoptotiques, et donc jouent un rôle dans le processus apoptotique.

Concernant les facteurs anti-apoptotiques, les membres de la famille Bcl-2 sont régulés par les facteurs ETS : les facteurs Ets2 et PU-1 peuvent réguler le facteur anti-apoptotique Bcl-XL, mais pas Bcl-XS (Sevilla et al., 1999; Sevilla et al., 2001), tandis que le facteur Fli-1 active l'expression de *bcl-2* au niveau transcriptionnel par liaison à son promoteur (Lesault et al., 2002). De plus, les facteurs SpiB et PU-1 peuvent transactiver le promoteur de *c-rel* (membre de la famille NFkB, ayant entre autres un rôle dans l'induction de l'apoptose) (Hu et al., 2001). Enfin, le facteur Pdef est capable de réprimer l'expression de la *survivine*, un inhibiteur de l'apoptose (Ghadersohi et al., 2006).

Les facteurs ETS régulent aussi des facteurs pro-apoptotiques. En effet, les facteurs Ets1 et Fli-1 régulent l'expression de *gadd153*, qui induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose en réponse à un stress (Seth et al., 1999). Le facteur Ets1 peut aussi contrôler l'activation de FasL (ligand des récepteurs de mort) avec Sp1 (Kavurma et al., 2002) et de PARP (molécule importante pour la translocation de l'AIF) (Soldatenkov et al., 1999). Récemment, il a aussi été montré que le facteur Ets1 pouvait se fixer au promoteur du gène de la *caspase 1* et le transactiver (Pei et al., 2005).

d- Invasion et migration

De nombreuses études ont montré une co-expression entre les facteurs ETS et les métalloprotéases (MT1-MMP, MMP1, MMP2, MMP7, MMP9 et la MMP11) ou uPA, et en particulier pour le facteur Ets1 (Barrett et al., 2002; Oikawa and Yamada, 2003; Sementchenko and Watson, 2000; Seth and Watson, 2005). Par exemple, dans des tumeurs du sein, l'expression des différentes formes du facteur Ets1 est corrélée à l'expression de uPA (Buggy et al., 2004). De plus, l'utilisation d'une construction antisens de *ets1* dans des lignées

Introduction

cellulaires de mélanomes entraîne une diminution de l'expression de MMP-1, MMP-3, uPA et la β 3-intégrine (Rothhammer et al., 2004). Gravrilov et son équipe avaient déjà montré auparavant une coexpression des facteurs ETS et de l'uPA (et de son récepteur) dans les cancers de la prostate (Gavrilov et al., 2001). Récemment, une analyse des fibroblastes issus de souris *Ets1*^{-/-} a montré que le facteur *Ets1* était nécessaire pour l'induction de l'expression de métalloprotéases mais aussi de TIMP-1 (Hahne et al., 2006).

L'expression de PAI-1 et de l'Héparanase est aussi régulée par les facteurs ETS. Dans des hépatocytes, le facteur *Ets1* coopère avec le facteur *Sp1* en se liant au niveau du promoteur codant pour PAI-1 pour le réguler (Nakatsuka et al., 2006). Une corrélation entre l'expression de ces gènes avait déjà été faite dans les cas de cancer du sein (Span et al., 2002). D'autre part, les facteurs *Ets1* et *Ets2* transactivent le promoteur du gène *héparanase* (Lu et al., 2003).

Il a aussi été montré que le facteur *Ets2* pouvait réguler l'expression du gène *met* codant pour le récepteur de l'HGF (facteur impliqué dans la motilité des cellules) (Gambarotta et al., 1996; Jiang et al., 2001).

e- Micrométastases

Les facteurs de la sous-famille ETS régulent le promoteur et l'expression de deux gènes dont l'expression est retrouvée dans des tumeurs avancées : l'*ostéopontine* (Wai et al., 2006) et le *pThrP* (Cataisson et al., 2003; Lindemann et al., 2003). De plus, les facteurs ETS sont aussi des transactivateurs des récepteurs aux chémokines : RANTES (Boehlk et al., 2000) et MIP-3 α (Kwon et al., 2003).

f- Angiogenèse

L'expression des facteurs *Ets1*, *Erg* et *Fli-1* a été corrélée à l'angiogenèse aussi bien pendant le développement normal que dans des pathologies. Un certain nombre de gènes impliqués dans ce mécanisme en plus de ceux cités précédemment sont régulés par les facteurs de la famille ETS. Le facteur *Ets1* est impliqué dans la régulation du récepteur du VEGF : *Flt-1*, en parallèle, le VEGF est lui-même capable d'induire l'expression de *Ets1* (Wakiya et al., 1996; Valter et al., 1999). L'expression des facteurs *Erg* et *Fli-1* a de plus été associée à l'expression de la molécule *Tie2* (facteur impliqué dans la formation des réseaux vasculaires) (Mattot et al., 1999; Hart et al., 2000a). Enfin, les facteurs *Elf-1* et *Nerf-2*

peuvent aussi transactiver l'expression du gène *tie2* mais aussi du gène *tie1* pour Elf-1 (Dube et al., 1999; Dube et al., 2001). Le gène *ccn2* qui code un important régulateur de l'angiogenèse est lui régulé par le facteur Ets1 (activateur de la transcription) et le facteur Fli-1 (répresseur).

IV- Les membres du groupe PEA3

1 - Présentation

Le groupe PEA3 se compose de trois membres : Pea3 aussi nommé E1af ou Etv4 (Xin et al., 1992; Higashino et al., 1993), Er81 ou Etv1 (Brown and McKnight, 1992; Jeon et al., 1995; Monte et al., 1995; Roussigne and Blader, 2006), Erm ou Etv5 (Chotteau-Lelievre et al., 1997; Monte et al., 1994), qui possèdent un domaine de liaison à l'ADN (domaine ETS) conservé à 95%. Ces trois gènes ont été mis en évidence chez l'homme, la souris, le rat, le poisson zèbre, le xénope, le chimpanzé, le macaque, le coq, le taureau et le chien. Hormis ce domaine, ces trois protéines se caractérisent par deux autres régions fortement conservées, impliquées dans la régulation de la transactivation et/ou dans l'autoinhibition de la liaison à l'ADN (Brown et al., 1998; Laget et al., 1996). La première correspond à une région aminotermine de 32 acides aminés, riche en acides aminés acides. Ce domaine, conservé à plus de 80% entre les trois membres du groupe PEA3, est dénommé domaine acide. Le deuxième domaine recouvre les soixante derniers acides aminés et présente plus de 50% d'identité de séquences entre les trois facteurs. En plus de ces domaines conservés, des domaines de régulation négative de part et d'autre du domaine ETS (inhibiteurs de la liaison à l'ADN) et de part et d'autre du domaine de transactivation recouvrant le domaine acide (inhibiteurs de la transactivation) ont été mis en évidence pour la protéine Pea3 (Figure 11) (Bojovic and Hassell, 2001; Greenall et al., 2001).

L'analyse phylogénétique indique que les membres Erm et Er81 sont très proches alors que la séquence du facteur Pea3 est légèrement plus divergente (de Launoit et al., 1997). Chez l'homme et la souris, les gènes *erm*, *er81* et *pea3* sont constitués de 13 à 14 exons, s'étendant sur environ 15kb d'ADN génomique (Coutte et al., 1999; Monte et al., 1995; Monte et al., 1996). Dans le génome humain, *erm* est situé sur le chromosome 3 à la position 3q27-29, *e1af* sur le chromosome 17 à la position 17q21, et *er81* sur le chromosome 7 à la

position 7p21. Dans le génome murin, *erm* est situé sur le chromosome 16, *pea3* sur le chromosome 11 et *er81* sur le chromosome 12.

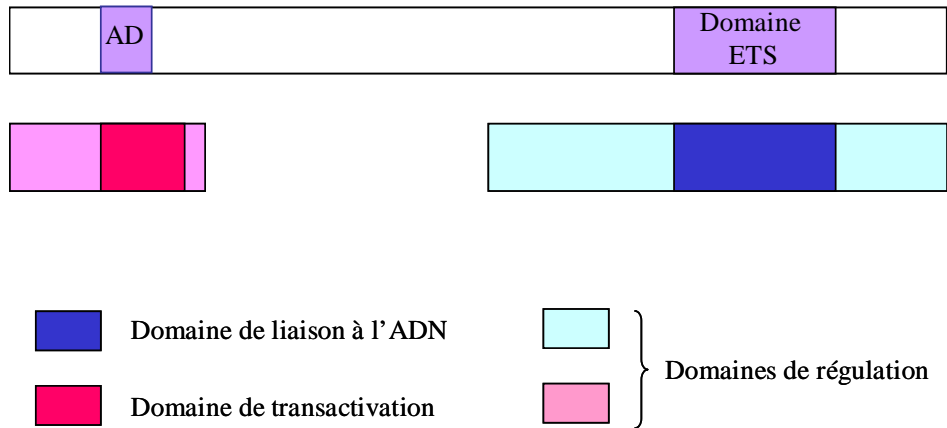


Figure 11 : Domaines régulateurs au sein de la protéine Pea3 murine.

D'après (Bojovic and Hassell, 2001).

Les domaines de part et d'autre du domaine de transactivation (en rose) régulent négativement la transactivation liée au facteur Pea3. Les domaines de part et d'autre du domaine ETS (en bleu) sont des domaines inhibiteurs de la liaison à l'ADN. Le domaine en C-terminal est aussi un domaine de transactivation.

2- Modulation de l'activité des facteurs du groupe PEA3

a- Les interactions protéiques

Comme pour les autres protéines de la famille ETS, l'interaction avec des partenaires protéiques semble importante pour la modulation de l'activité transcriptionnelle des protéines du groupe PEA3. Il a par exemple été montré que la protéine Erm interagit avec le facteur de transcription c-Jun, ce qui a pour conséquence une augmentation importante de l'activité transcriptionnelle de la protéine Erm (Nakae et al., 1995). Par ailleurs, une synergie entre le facteur de transcription c-Jun et les membres du groupe PEA3 a également été observée sur les promoteurs du gène *matrilysine* (Crawford et al., 2001), du gène *stromélysine* (Higashino et al., 1995), du gène *cox-2* (Liu et al., 2004) et du gène *ostéopontine* (El-Tanani et al., 2004). De même, la protéine Er81 interagit avec le cofacteur de transcription CBP/p300, ce qui entraîne une synergie entre ces deux facteurs pour l'activation de la transcription des gènes cibles comme le gène *MMP-1* ou un promoteur « TORU » (élément de réponse aux facteurs

ETS) (Goel and Janknecht, 2003; Goel and Janknecht, 2004; Papoutsopoulou and Janknecht, 2000). Le facteur Er81 interagit aussi avec ACTR et les membres de la famille p160, ce qui entraîne une augmentation de la transcription du gène de la *MMP-1*. Il est intéressant de noter que ACTR coopère avec le coactivateur p300 pour stimuler la fonction transactivatrice du facteur Er81 (Goel and Janknecht, 2004). CBP/p300 peut aussi interagir avec le facteur Pea3 et permettre une meilleure transactivation de ses gènes cibles comme la *cox-2* (Liu et al., 2004). Enfin, la protéine Pea3 interagit avec le facteur de transcription USF-1, ce qui requiert le domaine de liaison à l'ADN du facteur Pea3 et celui d'USF-1 (Firlej et al., 2005; Greenall et al., 2001).

Récemment, à partir d'une analyse en simple hybride, il a été montré que la protéine Pea3 interagit avec la protéine LPP, celle-ci agissant comme un co-activateur du facteur Pea3 au niveau de sa capacité de transactivation de gènes cibles comme *cox-2* ou *MMP-1* (Guo et al., 2006).

b- Les modifications post-traductionnelles

• La phosphorylation

La modulation de l'activité transactivatrice des facteurs du groupe PEA3 implique leur phosphorylation par des kinases : les MAP Kinases ERK-1 et ERK-2 activées par la voie RAS (Janknecht, 1996; Janknecht et al., 1996; O'Hagan et al., 1996). HER2/neu va pouvoir par leur intermédiaire et par la voie p38-MAPK, permettre la phosphorylation du domaine N-terminal et ainsi permettre la transactivation de ses gènes cibles *smad7* et *MMP-1* (Bosc et al., 2001; Dowdy et al., 2003).

Récemment, MSK1 et RSK-1 ont été montrés comme responsables de la phosphorylation du facteur Er81 *via* la voie p38-MAPK (MSK-1) et/ou ERK-MAPK (MSK-1/RSK-1) selon les cellules considérées (Janknecht, 2003; Wu and Janknecht, 2002). La phosphorylation des sérines par MSK-1 *via* la voie p38-MAPK, comme par RSK-1 *via* la voie ERK-MAPK, permet d'activer le potentiel transactivateur du facteur Er81. On peut noter que MSK-1, comme RSK-1 peuvent aussi stimuler cette transactivation *via* l'interaction avec CBP/p300.

De même, la cascade d'activation des kinases JNK/SAPK intervient aussi dans l'augmentation du potentiel transactivateur de la protéine Pea3 (O'Hagan et al., 1996).

Introduction

D'autre part, la protéine kinase A (PKA) est aussi capable d'activer la transactivation de la protéine Erm humaine (Baert et al., 2002; Janknecht et al., 1996), de la protéine Er81 humaine (Coutte et al., 1999; Wu and Janknecht, 2002) et de la protéine Pea3 de poisson zèbre (Brown et al., 1998). Néanmoins la phosphorylation du facteur Erm comme du facteur Er81 affecte leur capacité de liaison à l'ADN (Baert et al., 2002; Wu and Janknecht, 2002).

Récemment, une étude a montré l'interaction protéique entre LKB1 (une sérine/thréonine kinase) et le facteur Pea3. La phosphorylation du facteur Pea3 par ce facteur permet de promouvoir sa dégradation par le protéasome (Upadhyay et al., 2006).

- L'acétylation

Comme d'autres membres de la famille ETS, un des membres du groupe PEA3 est connu pour être acétylé : le facteur Er81. p300 et la protéine P/CAF permettent une acétylation directe du facteur Er81 au niveau des lysines 33 et 116. L'acétylation permet une stabilisation de la protéine, augmente sa capacité de liaison à l'ADN et stimule la transactivation dépendante du facteur Er81 (Goel and Janknecht, 2003). Dans cette étude, il est démontré que HER2/neu, Raf et Ras stimulent *in vivo* l'activité histone acétyl-transférase de p300 par phosphorylation de celle-ci et ainsi régule l'activité du facteur Er81 non seulement par phosphorylation mais aussi par acétylation.

- La sumoylation

Récemment, un nouveau mode de régulation post-traductionnel a été mis en évidence pour le facteur Erm : la sumoylation. La protéine SUMO se lie au niveau de 5 lysines sans affecter la localisation, la stabilité ni la capacité de liaison à l'ADN de la molécule Erm. Néanmoins, la sumoylation entraîne une inhibition de la capacité transactivatrice du facteur Erm (Degerny et al., 2005). Le facteur Er81 a aussi été identifié parmi 40 substrats de SUMO-1 dans une étude de dépistage de molécules sumoylées à partir d'une banque de ADNc traduits en lysat de réticulocytes et mis en présence des éléments nécessaires à la sumoylation (Gocke et al., 2005).

- L'ubiquitination

La protéine Pea3 est poly-ubiquitinilée dans sa région C-terminale, la protéine ainsi modifiée est alors relocalisée au niveau d'amas dans le noyau et sera prise en charge par le

protéasome pour être dégradée (Takahashi et al., 2005). Le facteur Erm est aussi ubiquitinilé, mais la forme majeure semble être une forme mono-ubiquitinilé. L'abolition de la polyubiquitination liée à la mutation de l'ubiquitine peut être corrélée avec l'augmentation de l'activité transcriptionnelle et l'inhibition de la voie du protéasome (Baert et al., 2006).

3- Les voies de signalisation impliquant les facteurs du groupe PEA3

a- La voie Wnt

Plusieurs données vont dans le sens d'une implication du facteur Pea3 dans la voie de signalisation de Wnt1. Cette voie est connue pour jouer un rôle aussi bien dans le développement que dans la tumorigenèse, en particulier mammaire. Le facteur Pea3, comme les facteurs Erm et Er81 semblent contribuer à la régulation de gènes cibles de la voie Wnt1/ β -caténine, comme le gène de la *matrilysine* (Crawford et al., 2001), le gène de la *cox-2* (Howe et al., 2001) ou le gène *twist* (Howe et al., 2003). De plus, le facteur Pea3 est surexprimé dans les cellules C57/Wnt1, mais aussi comme les facteurs Erm et Er81 dans les tumeurs extraites de souris transgéniques pour Wnt1 (Howe et al., 2001). Le facteur Pea3 est aussi surexprimé dans des cellules surexprimant la β -caténine (Liu et al., 2004).

b- La voie de signalisation du FGF

Différentes études ont permis d'établir un lien entre les facteurs du groupe PEA3 et la voie de signalisation du FGF dans différents organes et types cellulaires.

L'expression du facteur Er81 est induite par le bFGF et l'eFGF et bloquée par un dominant négatif du FGFR au niveau du pôle animal de la blastula de xénope et dans l'embryon de xénope (Munchberg and Steinbeisser, 1999). Chez le poisson zèbre, le patron d'expression des gènes *pea3* et *erm* recouvre ceux des gènes *fgf8* et *fgf3*. De plus, l'inhibition de la voie de signalisation du FGF entraîne une perte d'expression de *erm* et *pea3* (Raible and Brand, 2001; Roehl and Nusslein-Volhard, 2001). De même, le FGF8 est nécessaire pour l'expression des facteurs *pea3* et *erm* dans le mésenchyme du nez et la placode nasale chez le poulet (Firnberg and Neubuser, 2002). Par contre, l'expression du facteur *er81* n'est pas régulée par le FGF chez le poisson zèbre (Roussigne and Blader, 2006). Dans le sclérotome,

Introduction

l'expression du facteur de transcription *scleraxis* est régulé par la voie de signalisation du FGF par l'intermédiaire du facteur Pea3 (Brent and Tabin, 2004).

Dans le poumon, les facteurs Erm et Pea3 sont en aval de la voie de signalisation médiée par le FGF et répondant différemment aux différents FGF. Le FGF7 et le FGF10 permet l'expression de *erm* et *pea3* dans l'épithélium distal du poumon cultivé en matrigel®, mais aussi au niveau de l'endoderme du poumon entier. Le FGF2 permet aussi une induction de l'expression des deux gènes dans l'endoderme et le mésoderme. Le FGF9 lui permet une expression dans l'épithélium proximal (Liu et al., 2003).

Le facteur *pea3* est exprimé dans la rétine en développement chez le poulet et sa transcription est régulée par l'activation du récepteur au FGF et par le FGF1, en partie par la voie de signalisation des MAPK (McCabe et al., 2006).

Le FGF18 entraîne l'expression des facteurs Pea3 et Erm dans la zone ventriculaire du néocortex. Les facteurs Erm et Pea3 vont alors être en aval de la voie de signalisation du FGFR et ainsi pouvoir définir la spécification des neurones corticaux (Hasegawa et al., 2004).

Les membres du groupe PEA3 pourraient aussi être en aval de la voie de signalisation du FGFR-1 dans l'épididyme pour l'activation de la $\alpha 5$ -reductase (Fox et al., 2006).

c- La voie de signalisation de l'HGF

Dans plusieurs modèles, le facteur Pea3 a été montré comme étant en aval de la voie de signalisation de l'HGF. Tout d'abord, dans les motoneurones, l'HGF sécrété par les motoneurones en position caudale permet l'expression du gène *pea3* dans les motoneurones en position rostrale (Helmbacher et al., 2003).

Dans des cellules de carcinome squameux oral, l'expression de *pea3* est augmentée de manière dose-dépendante par l'HGF (Hanzawa et al., 2000). Dans un modèle de cellules du poumon, l'HGF/SF permet une augmentation des capacités de migration et d'invasion des cellules exprimant de manière constitutive le facteur Pea3, mais pas dans les cellules témoins. De plus, les voies sous le contrôle du facteur Pea3, comme la voie Rho/ROCK ou l'expression des MMP sont aussi contrôlées par l'HGF (Hakuma et al., 2005; Hiroumi et al., 2001).

d- Autres voies de signalisation

L'expression des membres du groupe PEA3 a été montrée sous le contrôle de deux autres voies de signalisation.

Le facteur Er81 est activé par la voie du TGF β par l'intermédiaire de TAK-1 et de la p38 MAPK pour transactiver le promoteur du gène *smad7* (Dowdy et al., 2003).

Dans des cellules tumorales colorectales, l'oxyde nitrique augmente l'expression du facteur Pea3 et les donneurs de NO permettent d'augmenter la capacité de liaison du facteur Pea3 à l'ADN (Liu et al., 2004).

4- La régulation transcriptionnelle des facteurs PEA3

A l'heure actuelle, peu de données sont disponibles en ce qui concerne la régulation transcriptionnelle des facteurs du groupe PEA3. Le promoteur humain du gène *pea3* a été cloné. C'est un promoteur sans TATA box, régulé par le récepteur aux oestrogènes (ER α et ER β) et le facteur Pea3 lui-même (Ishida et al., 2006)

En ce qui concerne le gène *erm*, sa transcription est activée par la voie du PKC dans les cellules Molt-4. La régulation se fait au niveau proximal du promoteur (-420, -115) (T'Sas et al., 2005).

5- L'expression des facteurs du groupe PEA3

Chez la souris, les gènes *erm*, *er81* et *pea3* sont exprimés à tous les stades du développement embryonnaire, depuis E6,5 jusqu'après la naissance, au niveau de nombreux organes comme le cerveau, les reins, les poumons ou le cœur. Les trois membres de ce groupe présentent un patron d'expression spécifique associé aux organogenèses mettant en jeu des interactions entre le compartiment épithélial et le mésenchyme adjacent. En règle générale, les gènes *erm* et *pea3* sont préférentiellement exprimés au niveau du feuillet épithélial, et le gène *er81* au niveau du mésenchyme (Chotteau-Lelievre et al., 1997; Chotteau-Lelievre et al., 2001). Dans les stades précoces, le gène *erm* est exprimé à partir de E6,5 dans la portion distale de l'œuf au niveau de l'ectoderme, alors que l'expression de *pea3* apparaît à partir de E7,5 dans la partie postérieure de l'embryon. Ces deux facteurs présentent un patron

Introduction

d'expression qui se recouvre en partie à tous les stades embryonnaires précoces. Au contraire, les transcrits de *er81* ne sont pas détectés avant E9,0-9,5 (Chotteau-Lelievre et al., 2001).

Chez l'adulte, que ce soit chez l'homme ou chez la souris, les gènes *erm* et *er81* présentent une expression ubiquiste, tandis que les ARNm de *pea3* sont uniquement détectés au niveau de l'épididyme, du cerveau, de la glande pituitaire, du placenta et de la glande mammaire (Brown and McKnight, 1992; Chotteau-Lelievre et al., 1997; Ishida et al., 2006; Jeon et al., 1995; Monte et al., 1994; Monte et al., 1995; Xin et al., 1992).

Au niveau neuronal, l'expression du facteur Pea3 comme du facteur Er81 est retrouvée dans les motoneurons et neurones sensoriels. Leur expression définit les ensembles de neurones (Lin et al., 1998). Plus tard, il a été montré que les trois membres sont retrouvés dans les fibres intrafusales des muscles dans les stades précoces du développement du membre et persistent après la naissance (Arber et al., 2000; Hippenmeyer et al., 2002) et dans la zone ventriculaire du néocortex dès le milieu de l'embryogenèse (Hasegawa et al., 2004). Les gènes *er81* et *pea3* sont exprimés dans les corpuscules de Pacini (Sedy et al., 2006), *er81* dans les cellules de Schwann (Parkinson et al., 2002) dans les neurones pyramidaux de la couche V du cortex et dans le thalamus (Yoneshima et al., 2006).

Récemment, une étude chez des souris gestantes a montré l'expression du facteur Erm au niveau de l'ovaire et de l'utérus au niveau du site d'implantation (épithélium et stroma), du facteur Er81 dans le stroma puis dans le mésomètre au niveau des vaisseaux en développement et du facteur Pea3 dans le stroma puis dans l'embryon lui-même (Koo et al., 2005).

6- Les facteurs du groupe PEA3 et la morphogenèse de branchement

Dans la glande mammaire à l'état embryonnaire, ces trois gènes sont fortement exprimés à E15,5 au niveau du bourgeon épithélial (Chotteau-Lelievre et al., 1997). Par hybridation *in situ*, il a pu être montré qu'au stade adulte, l'expression des ARN *pea3* et *erm* est détectée spécifiquement au cours de la puberté, et ceci uniquement au niveau des tubules épithéliaux en cours de formation. En revanche, aucun signal n'est détecté au cours de la gestation, de la lactation ou de l'involution (Chotteau-Lelievre et al., 2003).

Les membres du groupe PEA3 sont fortement exprimés durant la morphogenèse de branchement. En effet, si chacun des membres est exprimé de façon différente pendant ces

événements, leur patron d'expression est le même que l'on s'intéresse au poumon, la glande salivaire, le rein ou la glande mammaire. *erm* est exprimé dans des bourgeons épithéliaux où le branchement s'opère, *pea3* dans l'épithélium en croissance et *er81* dans les cellules mésenchymateuses (Chotteau-Lelievre et al., 2003).

Dans le modèle de la glande mammaire, l'effet de la surexpression de façon constitutive des facteurs Erm ou Pea3 a été testé dans des cellules épithéliales mammaires normales. Ces cellules épithéliales ont la capacité de former des branchements dans un gel de collagène sous stimulation par l'HGF. Les cellules surexprimant le facteur Erm, comme le facteur Pea3 ont la capacité de faire une arborescence spontanée en gel de collagène en absence d'HGF, ce dont les cellules parentales sont incapables, arborescence équivalente à celle obtenue avec les cellules parentales incubées avec de l'HGF. La surexpression des facteurs Erm et Pea3 en présence d'HGF permet d'augmenter cet effet « morphogénétique ». De plus, ces cellules acquièrent une capacité invasive en gel de collagène (Chotteau-Lelievre et al., 2003).

Au niveau du poumon, l'expression d'un transgène EngR-*erm* entraîne un blocage du développement du poumon, aussi bien dans la morphogenèse de branchement que dans la différenciation des cellules précurseurs. La différenciation se fait bien au niveau des cellules proximales pour donner les cellules ciliées et les cellules de Clara. Par contre, la différenciation des cellules distales en alvéoles matures de type I ou II n'a pas lieu (Liu et al., 2003).

7- Le facteur Erm et la spermatogénèse

Une étude récente a montré l'importance du facteur Erm dans la spermatogénèse chez la souris adulte. Des souris *erm*^{-/-} sont viables et normales, seuls les mâles sont stériles. On observe en effet un blocage de la spermatogénèse, dû à un problème de sécrétion des cellules de Sertoli (Chen et al., 2005). Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués et le rôle précis du facteur Erm ne sont pas encore élucidés. Il semble que dans les cellules de Sertoli, le facteur Erm est responsable de la production de certains facteurs qui permet le renouvellement des cellules souches pendant la puberté.

8- Les membres du groupe PEA3 et les neurones

a- Le facteur *Pea3* et les motoneurones

L'inactivation de *pea3* par recombinaison homologue a donné des résultats assez surprenants, en effet, les souris sont viables et seuls les mâles sont stériles. Après analyse, l'équipe de Hassell a pu mettre en évidence, que la stérilité provenait d'un problème d'éjaculation des mâles (Laing et al., 2000). A ce moment, cette équipe a envisagé un problème neuronal.

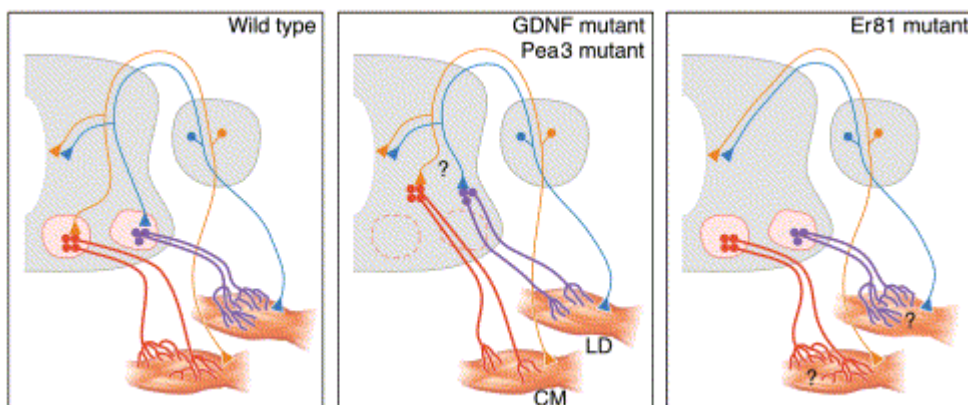


Figure 12 : Phénotype observé pour les souris invalidées par recombinaison homologue pour le GDNF, *Pea3* ou *Er81*.

d'après Koo et al (Koo and Pfaff, 2002).

pea3 et *er81* sont exprimés au niveau des neurones sensoriels (en bleu et orange) et des motoneurones (en violet et rouge). Le GDNF est exprimé au niveau des bourgeons des membres. Dans les mutants pour le GDNF et *Pea3*, l'arborisation au niveau des muscles est anormale et les corps cellulaires des motoneurones sont mal positionnés. Dans les mutants pour *Er81* les projections ventrales des neurones sensoriels afférents sont absentes.

Introduction

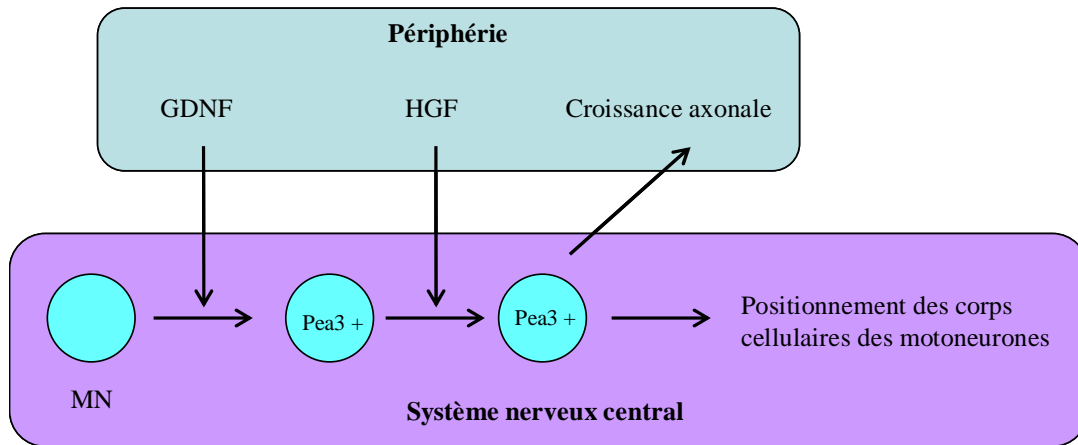


Figure 13 : Interrelation entre le GDNF, l'HGF et le facteur Pea3 dans la spécification des motoneurones.

D'après (Chauvet et al., 2004).

Le GDNF induit au niveau du système nerveux central l'expression de *pea3* dans les motoneurones en position caudale. Ensuite, sous l'action du FGF, les motoneurones en position rostrale vont être induits à exprimer *pea3*. L'expression de *pea3* va alors permettre un bon positionnement des corps cellulaires de ces motoneurones et une croissance axonale au niveau de la périphérie.

Le facteur Pea3 contrôle l'arborisation terminale et le positionnement final des corps cellulaires des motoneurones. La perte de fonction du facteur Pea3 dans des souris *pea3*^{NLZ/NLZ} résulte en une perte dramatique de l'arborisation et de l'innervation des muscles cibles des motoneurones normalement *pea3* +. Ce défaut est visible tant dans les phases précoces embryonnaires que post-natales. Les corps cellulaires des motoneurones sont eux déplacés de leur positionnement caractéristique dans la colonne motrice latérale (LMC) (Ladle and Frank, 2002; Livet et al., 2002). Par contre, l'absence du facteur Pea3 n'a pas d'influence sur les neurones sensoriels ou sur les connexions interneuronales (Figure 12) (Ladle and Frank, 2002).

Dans un mutant nul pour le GDNF (glial derived neurotrophic factor), l'expression du facteur Pea3 est absente dans la plupart des motoneurones et cela conduit au même phénotype que celui décrit dans les mutants *pea3*^{NLZ/NLZ} (Haase et al., 2002). De la même manière, la mutation du récepteur Met (*met*^{d/d}) donne un phénotype ressemblant à ceux des souris *gdnf*^{-/-} ou *pea3*^{NLZ/NLZ} et l'on observe une diminution de l'expression de *pea3* d'environ 60% au niveau des motoneurones. Il est intéressant de noter que l'expression du facteur Pea3 est requise pour l'expression du récepteur Met. Le GDNF induit l'expression de *pea3* dans les motoneurones en position caudale puis ces motoneurones, sous l'influence de l'HGF, induisent l'expression de *pea3* dans les motoneurones en position rostrale (Helmbacher et al.,

Introduction

2003). GDNF et HGF sont donc des facteurs sécrétés en périphérie qui contrôlent dans certains motoneurons l'expression du facteur *Pea3* qui à son tour, contrôle l'expression des gènes responsables de la position des corps cellulaires ainsi que du trajet des axones (Figure 13).

Dans un mutant nul pour *Radlh 2* (Rétinaldéhyde deshydrogénase), les neurones exprimant *pea3* sont mal positionnés dans la LMC, cependant le mécanisme impliqué n'est toujours pas clair (Vermot et al., 2005).

Les membres du groupe PEA3 sont aussi impliqués dans les phases médianes et tardives du développement du néocortex et en particulier dans la migration des cellules progénitrices des neurones du néocortex. Cet effet est sous contrôle du FGFR. Le FGF18 provenant des neurones corticaux précoces coordonne l'expression temporelle des membres du groupe PEA3 dans la zone ventriculaire du néocortex. Ils vont alors pouvoir médier l'effet du FGFR (Figure 14) (Hasegawa et al., 2004).

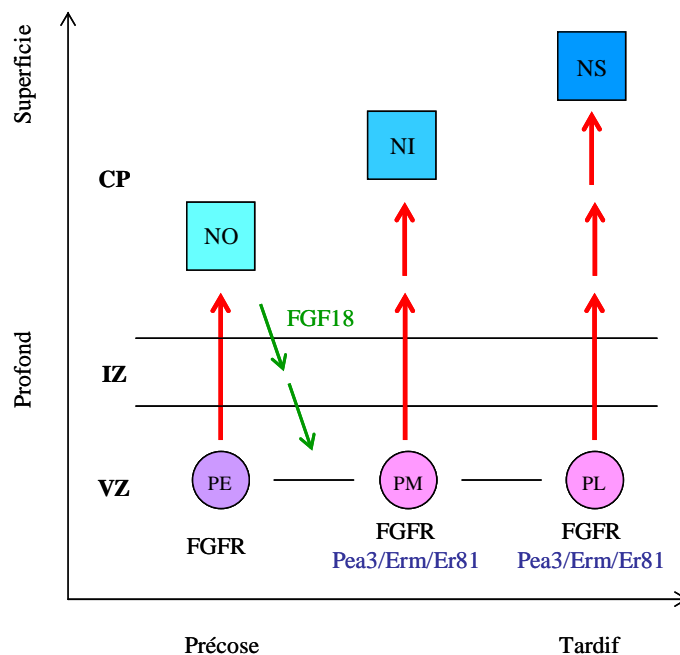


Figure 14 : Diagramme récapitulatif le mécanisme de boucle de régulation dans la mise en place des neurones corticaux.

D'après (Hasegawa et al., 2004).

CP : plaque corticale, IZ : zone intermédiaire, VZ : zone ventriculaire, PE : progéniteurs précoces, PM : Progéniteurs médiaux, PL : progéniteurs tardifs, ND : neurones corticaux de la couche profonde, NI : neurones corticaux de la couche intermédiaire, NS : neurones de la couche superficielle.

b- Er81 et neurones

Le facteur Er81 est impliqué dans la régulation de la formation des connections synaptiques entre les afférents sensoriels Ia et les motoneurones. En l'absence d'expression de *er81*, les souris sont viables à la naissance pendant 3 à 5 semaines mais présentent une ataxie des membres et une mauvaise posture de flexion/extension. Les axones des neurones sensoriels proprioceptifs sont incapables de faire une arborisation à proximité des dendrites des neurones moteurs, se terminant prématurément au niveau dorsal dans la moelle épinière (Figure 12) (Arber et al., 2000).

Les bourgeons des membres émettent un signal à destination des neurones permettant l'expression de *er81*, en effet celle-ci est diminuée par l'ablation du membre (Lin et al., 1998). La recherche de ce signal a été entreprise aussi bien dans les neurones sensoriels que moteurs et a mis en évidence une différence de régulation entre les deux types de neurones.

Un mutant *bax^{-/-}/NT3^{-/-}* a le même défaut de projection au niveau du système nerveux central que les souris *er81^{-/-}*. L'expression du facteur Er81 est en parallèle diminuée dans les neurones sensoriels des racines ganglionnaires dorsales (DRG) dans ces souris. L'expression de la Neurotrophine 3 au niveau périphérique induit en effet l'expression du facteur Er81 au niveau des neurones issus des DRG (Patel et al., 2003).

L'acquisition de l'expression dans les motoneurones est plus complexe et est différente de celle des neurones sensoriels : le facteur Er81 est exprimé dans la partie médiane de la colonne motrice latérale (MLMC) en regard du muscle innervé, l'expression dans sa partie latérale (LLMC) est plus variable. Initialement, des domaines très larges de compétences sont établis de manière précoce au sein des neurones de la MLMC et la LLMC dans le tube neural. Puis d'autres signaux de la périphérie vont pouvoir restreindre l'expression pour arriver au patron d'expression final (Wang and Scott, 2004).

Enfin, le facteur Er81 comme Pea3 pourrait réguler l'expression des cadhérines de type II dans les ensembles de motoneurones, nécessaire pour la ségrégation des motoneurones (Livet et al., 2002; Price et al., 2002).

En plus, de ces rôles au niveau des neurones, le facteur Er81 pourrait être impliqué dans le développement des mécanorécepteurs (Sedy et al., 2006), dans l'acquisition des phénotypes des neurones afférents proprioceptifs des muscles (Kucera et al., 2002).

c- Le facteur Erm et la mise en place des crêtes neurales

Le rôle du facteur Erm dans la mise en place du système nerveux se restreint actuellement à la mise en place des crêtes neurales. *erm* est exprimé dans les cellules neurales des racines ganglionnaires dorsales, du ganglion sensoriel crânial et du ganglion sympathique (Chotteau-Lelievre et al., 1997, Hagedorn et al., 2000). De plus, les cellules de la crête neurale provenant d'explants neuraux ou de racines ganglionnaires dorsales, les cellules satellites de la glie et les neurones sensoriels expriment ce facteur. Par contre, les cellules issues des cellules de la crête neurale qui n'ont pas une destinée neuronale n'expriment plus *erm* (Hagedorn et al., 2000; Paratore et al., 2002). L'utilisation d'un dominant négatif de ce facteur dans les cellules de la crête neurale réduit leur différenciation en neurones et stimule leur différenciation en cellules de la glie. Néanmoins, le facteur Erm est requis pour la prolifération des cellules de la glie sans que cela n'affecte leur destinée (Paratore et al., 2002).

9- Les membres du groupe PEA3 et cancer

Les facteurs du groupe PEA3 comme les autres facteurs ETS sont souvent retrouvés dans différents cancers dont les cancers du sein, oraux, gastro-intestinaux, poumon, gynécologiques ou de la prostate.

a- PEA3 et cancer du sein

Différentes données tendent à mettre en évidence l'implication des membres du groupe PEA3 dans le cancer mammaire.

D'une part, les trois gènes sont surexprimés dans certaines lignées issues de tumeurs mammaires humaines : les membres du groupe PEA3 sont peu ou pas exprimés dans les lignées possédant des récepteurs aux œstrogènes et aux progestagènes, alors que l'expression est forte dans les lignées dépourvues de ces récepteurs. D'autre part, il existe une forte expression de ces trois gènes dans les lignées cancéreuses hautement métastatiques comme les MDA-MB-231, en revanche cette expression est très faible dans des lignées de cellules peu métastatiques telles que les MCF-7 (Baert et al., 1997). La relation négative avec les récepteurs aux oestrogènes/ à la progestérone a ensuite été confirmée dans des tumeurs mammaires (Chotteau-Lelievre et al., 2004; Bieche et al., 2004). De même, en comparant différentes lignées cellulaires normales et des tumeurs mammaires induites, on peut

Introduction

remarquer une forte augmentation de l'expression des facteurs du groupe PEA3 dans les tumeurs (Galang et al., 2004; Howe et al., 2001).

Une corrélation entre l'expression de *HER2/neu* et l'expression de *pea3* a été établie à de nombreuses reprises dans des tumeurs. Chez des souris transgéniques pour l'oncogène *HER2/neu* qui induit des tumeurs mammaires, les gènes du groupe PEA3 semblent sélectivement surexprimés dans les cellules tumorales alors que l'expression reste faible dans l'épithélium environnant la tumeur. De plus, l'expression d'un dominant négatif du facteur Pea3 dans la glande mammaire de souris transgéniques pour l'oncogène *HER2/neu* retarde l'apparition des tumeurs mammaires et réduit leur taille et leur nombre. Aussi l'un ou l'autre de ces trois membres semble nécessaire pour la tumorigenèse induite par la protéine HER2/Neu (Shepherd et al., 2001). Ceci avait déjà été suggéré par deux études montrant que l'expression du gène *pea3* est retrouvée dans 93% des tumeurs mammaires surexprimant le gène *HER2/neu* (Benz et al., 1997) et dans des adénocarcinomes mammaires observés chez les souris transgéniques pour l'oncogène *HER2/neu* surexprimant le gène *pea3* (Trimble et al., 1993). En effet, dans différentes lignées de cellules mammaires, le facteur Pea3 régule la transactivation du gène *HER2/neu* (Benz et al., 1997). De même, HER2/neu va pouvoir agir sur l'activation du facteur Er81 et permettre ainsi d'activer sa fonction transactivatrice au niveau de certains de ces gènes cibles comme *smad7* (Dowdy et al., 2003), *MMP-1* (Bosc et al., 2001; Goel and Janknecht, 2004) ou *htert* (Goueli and Janknecht, 2004). Une étude clinique sur des tumeurs de femmes traitées au tamoxifène montre des résultats concordants : en effet 69% des tumeurs HER2 positives expriment le facteur de transcription Pea3 (Fleming et al., 2004). De même, une autre étude clinique basée sur l'analyse de 130 tumeurs humaines montrent une corrélation entre HER2 et Pea3 (Bieche et al., 2004).

Cependant, certaines études ont donné des résultats contradictoires. En effet, diverses expériences ont mis en évidence que le facteur Pea3 inhibe *in vitro* comme *in vivo* la croissance des cellules cancéreuses exprimant le gène *HER2/neu*, et qu'il réprime l'activité du promoteur du gène *HER2/neu* (Xing et al., 2000). Une étude clinique récente basée sur des études immunohistochimiques et d'hybridation *in situ* ne montre aucune corrélation entre HER2/Neu et le facteur Pea3 (Xia et al., 2006). Cette même étude ne montre pas de correspondance entre le facteur Pea3 et des signes pathocliniques ou une valeur pronostic.

Néanmoins, lorsque la protéine Pea3 est surexprimée de manière constitutive dans les cellules MCF-7, ces cellules acquièrent un phénotype métastatique. Ce phénomène s'accompagne d'une forte augmentation de l'expression du gène de la *MMP-9* (*collagénase*

de type IV) ainsi que d'une augmentation de la capacité invasive et de la mobilité des cellules *in vitro* et *in vivo* après implantation en souris immunodéficientes (Kaya et al., 1996).

La surexpression du facteur Pea3 augmente aussi la transcription de gènes impliqués dans la formation de métastases mammaires, comme l'*ostéopontine* dans des lignées mammaires de rat (El-Tanani et al., 2004), de *muc4* dans des cellules mammaires normales murines (Perez et al., 2003), ou de *cox-2* dans des cellules mammaires humaines (Subbaramaiah et al., 2002).

Trois études récentes portant sur des tumeurs humaines confirment le rôle du facteur Pea3 dans la cancérogenèse mammaire en tant que marqueur de l'agressivité tumorale (Bieche et al., 2004) et de la progression tumorale en effusions malignes (Davidson et al., 2004a; Davidson et al., 2004b), et celui du facteur Erm comme valeur pronostic des cancers épithéliaux mammaires (Chotteau-Lelievre et al., 2004). Une corrélation entre *pea3* et *ereg*, *nrg1*, *nrg3*, *erbB1*, *MMP-2*, *MMP-1* (marqueurs de l'agressivité tumorale) a aussi été montrée dans des tumeurs mais aussi dans différentes cellules cancéreuses (Bieche et al., 2004). Il en est de même pour la MMP-2, le récepteur à la Laminine de 67kDa et de l'Intégrine $\alpha 6$ dans les effusions de cancer du sein (Davidson et al., 2004b).

Enfin, une étude clinique réalisée par immunohistochimie montre que le taux de survie sans récurrence à 6 ans est significativement plus faible chez les patientes ayant eu une tumeur avec un profil Pea3⁺ et aucun parallèle n'est observé avec l'évolution métastatique (Kinoshita et al., 2002). Ces données vont à l'encontre des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* jusqu'à maintenant. De même, l'expression de manière inductible du facteur Pea3 dans des cellules humaines cancéreuses de sein inhibe la croissance tumorale et permet une augmentation de la survie en souris (Yu et al., 2006).

b- PEA3 et cancer du tractus oral

Le facteur de transcription Pea3 a aussi pu être associé aux cancers du tractus oral. Différentes études ont été menées à partir de cellules HSC3, des cellules invasives de cancer buccal. Dans ces cellules l'expression de *pea3* est retrouvée en parallèle de l'expression des MMP-1 et MMP-9, par contre l'expression de ces trois molécules n'est pas retrouvée dans des cellules issues de tumeurs orales (KB) non invasives (Shindoh et al., 1996). Dans ces cellules, l'HGF va induire l'expression de *pea3* et ainsi entraîner l'activation de MMPs (en particulier la MMP-9), ce qui peut être corrélé à l'augmentation du potentiel invasif de ces cellules en

présence d'HGF et à la diminution du potentiel invasif de cellules exprimant un dominant négatif du facteur Pea3 (Hanzawa et al., 2000). La corrélation Pea3/MMP/invasion avait précédemment été envisagée dans ces cellules par l'utilisation d'une construction antisens de *pea3*. Dans ces cellules exprimant constitutivement des ARNm antisens du facteur Pea3, on observe une diminution de l'expression des gènes et des protéines MMP-1 (collagénase de type I), MMP-3 (stromélysine), MMP-9, ainsi qu'une inhibition de la capacité invasive de ces cellules *in vitro* comme *in vivo* (Hida et al., 1997a).

Dans des cellules de carcinome squameux, l'expression des ARNm de *pea3* est détectée dans la plupart des cas, cette expression est plus importante dans les cas de métastases ganglionnaires (Hida et al., 1997b). L'augmentation de l'expression de *pea3* est aussi retrouvée dans des tumeurs de la langue, et ce de façon corrélée à celle du gène *MMP-1* (Izumiyama et al., 2005).

c- PEA3 et cancer du tractus gastro-intestinal

Crawford et son équipe ont montré les premiers que *pea3* comme les autres gènes du groupe était exprimé dans de nombreuses tumeurs du petit intestin chez la souris (souris Min) mais aussi dans des lignées cellulaires de cancer du côlon (Crawford et al., 2001). A la suite, de nombreuses études ont donné des résultats allant dans le même sens. En effet, l'analyse de tumeurs colorectales montrent une surexpression des trois membres du groupe PEA3 par rapport aux tissus normaux, et une corrélation entre l'expression au niveau ARNm de *pea3* et des gènes *MMP-1*, *matrilysine*, *cox-2* et *iNOS* au niveau des carcinomes ou des adénomes (Boedefeld et al., 2005; Horiuchi et al., 2003; Nosho et al., 2005b). Cette surexpression des trois membres du groupe PEA3 est retrouvée dans les tumeurs gastriques (64% pour *pea3*, 31% pour *er81* et 26% pour *erm*) et la corrélation entre les ARNm *pea3* et *matrilysine* est aussi établie (Yamamoto et al., 2004). Dans ces deux études, l'expression de *pea3* est corrélée à la profondeur de l'invasion, l'invasion lymphatique et veineuse, aux nodules lymphatiques et aux métastases, mais aussi au mauvais pronostic en terme de survie. D'autre part, l'expression constitutive d'un antisens *pea3* dans les cellules HT-29 (cellules de cancer colorectal) ne modifie pas la vitesse de prolifération des cellules mais diminue leur potentiel invasif (Horiuchi et al., 2003). De même, une autre étude par puces à ADN de différentes tumeurs du côlon montre de même une surexpression de *pea3* dans ces tumeurs par rapport aux tissus normaux, mais aussi dans les carcinomes invasifs par rapport aux adénomes. Ceci

Introduction

semblerait indiquer un rôle du facteur Pea3 dans la progression tumorale (Nosho et al., 2005a).

pea3 fait partie des gènes surexprimés de manière significative dans les banques d'ADNc de cancer du côlon par rapport aux banques de tissus normaux. De plus, dans des cellules de cancer du côlon (T84), la transfection par d'un siRNA dirigé contre *pea3* entraîne une diminution de la capacité proliférative et migratoire des cellules (Moss et al., 2006). Dans des cellules de cancer gastrique (MNK45) l'expression d'un antisens *pea3* modifie aussi leur potentiel invasif (Yamamoto et al., 2004).

Finalement, une étude sur un petit nombre de tumeurs du foie comparées à des tissus normaux montre que le gène *pea3* est exprimé dans les tumeurs mais pas dans les tissus normaux (Iguchi et al., 2000).

d- PEA3 et cancer du poumon

L'étude de tumeurs du poumon à petites cellules (NSCLC) et de lignées cellulaires cancéreuses de poumon montre que l'expression de *pea3* est détectée au niveau ARN dans la plupart des cas, alors que son expression n'est pas retrouvée dans le poumon normal et dans les lignées cellulaires correspondantes. De plus, la surexpression constitutive du facteur Pea3 dans des cellules cancéreuses de poumon (NSCLC) qui n'exprime pas le facteur Pea3, augmente les capacités de migration et d'invasion de ces cellules en présence ou non d'HGF (Hiroumi et al., 2001). Le facteur Pea3 va aussi pouvoir activer la voie Rho/ROCK, et par cette voie réguler l'invasion et la migration des cellules (Hakuma et al., 2005). Ces cellules surexprimant le facteur Pea3 injectées soit par voie sous-cutanée, soit en intra pulmonaire en souris immunodéficientes, provoquent des tumeurs dans la plupart des cas, accompagnées de métastases dans le cas des injections intra-pulmonaires (Hakuma et al., 2005).

Dans des cellules de poumon à potentiel métastatique, (PGBE1), le facteur Pea3 va pouvoir activer la Beta1,4-galactosyltransferase I. Les deux protéines sont surexprimées dans ces cellules par rapport à des cellules non métastatiques comme les PGLH7 et sont impliquées dans le potentiel invasif de ces cellules. De plus, la surexpression du facteur Pea3 dans les cellules PGLH7 entraîne une augmentation de la capacité de migration de ces cellules (Zhu et al., 2005).

e- PEA3 et cancer gynécologique

L'expression de *pea3* est retrouvée dans des carcinomes ovariens aussi bien dans les cellules tumorales que dans le stroma (Davidson et al., 2003a), mais aussi dans des effusions malignes issues de carcinomes ovariens (Davidson et al., 2004a). De manière intéressante, l'expression de *pea3* dans ces effusions est corrélée à l'expression de l' α v-, l' α 6-, la β 1-intégrine, l'EMMPRIN, et IL-8. Les ARNm EMMPRIN, bFGF, β 1-intégrine et *pea3* sont aussi co-exprimés au niveau des tumeurs et du compartiment stromal (Davidson et al., 2003a; Davidson et al., 2003b; Davidson et al., 2004a). Le facteur Pea3 a pu être associé à un mauvais pronostic en terme de survie dans les carcinomes ovariens et donc a pu être défini comme marqueur des tumeurs ovariennes avancées (Davidson et al., 2003a).

Dans les carcinomes de l'endomètre (EEC), la facteur Erm est exprimé aux stades correspondant à l'infiltration du myomètre ; l'augmentation de l'expression du facteur Erm apparaît principalement au passage de l'endomètre atrophie vers l'hyperplasie et le carcinome au cours de la progression tumorale (Planaguma et al., 2005).

Enfin, dans des cellules cancéreuses du col de l'utérus (siHa), l'expression constitutive d'un antisens de *pea3* entraîne une augmentation de la capacité invasive de ces cellules (Iwasaki et al., 2004).

f- Les fusions transcriptionnelles

- Tumeurs d'Ewing

Dans de rares cas de tumeurs d'Ewing, on peut retrouver des réarrangements chromosomiques entre *er81* (Jeon et al., 1995) ou *pea3* (Kaneko et al., 1996) et le gène *ews*. Ces translocations permettent l'expression d'une protéine EWS-ETS comprenant le domaine ETS des facteurs ETS impliqués, et permettent ainsi une transactivation accrue des gènes cibles de ces facteurs de transcription. On peut citer par exemple, *htert* qui a été défini comme un gène cible de EWS/E1AF, et qui permet une meilleure transactivation que la facteur E1AF seul (Takahashi et al., 2003). On peut noter que EWS/E1AF est aussi capable d'interagir avec p300. Par contre, EWS-Etv1 semble jouer le rôle d'un dominant négatif sur la transcription du récepteur du TGF β par le facteur Etv1 lui-même et réprime seul la transcription de ce récepteur (Im et al., 2000).

- Tumeurs de la prostate

Récemment il a été mis en évidence que *er81* (comme *erg*) est surexprimé dans des tumeurs de la prostate de la même façon que *TMPRSS2*. En effet, il existe une fusion transcriptionnelle entre l'exon 1 de *TMPRSS2* et le début de l'exon 4 de *er81* ou entre l'exon 2 de *TMPRSS2* et le début de l'exon 4 de *er81*. Ces fusions sont retrouvées en parallèle d'une surexpression de *er81* que ce soit en puces à ADN ou en Q-PCR dans des tumeurs de la prostate (Tomlins et al., 2005). Cette même équipe a aussi récemment mis en évidence une fusion transcriptionnelle de *TMPRSS2* avec un autre facteur ETS : *etv4* (ou *pea3*), qui est retrouvé encore plus rarement (2/98 cas) (Tomlins et al., 2006).

10- Les gènes cibles des facteurs du groupe PEA3

De nombreux gènes cibles ont été définis ces dernières années. La liste est résumée dans le tableau 9, avec leur rôle potentiel dans la tumorigenèse et le développement. Les méthodes d'analyse des promoteurs quand elles ont été menées, sont décrites dans le tableau 10.

- Métalloprotéases et molécules d'adhérence

L'activation de nombreuses métalloprotéases au niveau de leur promoteur a été associée à l'expression des facteurs du groupe PEA3 : *MMP-1*, *MMP-9* et *MMP-3* (Bosc et al., 2001; Higashino et al., 1995), *MT1-MMP* (Habelhah et al., 1999; Izumiyama et al., 2005) et *MMP-7* (matrilysine) (Crawford et al., 2001; Lynch et al., 2004). Une corrélation entre l'expression des métalloprotéases et l'expression des facteurs du groupe PEA3 a aussi été mise en évidence dans de nombreux tissus tumoraux (Tableau 8).

Mais les gènes codant les métalloprotéases ne sont pas les seuls gènes cibles mis en évidence. L'expression d'autres gènes codant des molécules d'adhérence ou du cytosquelette est régulée par les membres du groupe PEA3. En effet, il a été montré que :

- le facteur Pea3 active la transcription du gène *vimentine* dans des cellules épithéliales mammaires (Chen et al., 1996; Upadhyay et al., 2006),
- le facteur Erm est capable de transactiver le promoteur d'un gène codant une molécule d'adhérence intercellulaire : *ICAM-1* (de Launoit et al., 1998),

Introduction

- l'expression ectopique du facteur Er81 au niveau de la glande mammaire lactante de souris transgéniques permet la surexpression des gènes *stromélysine I* et *uPA* (Netzer et al., 2002).
- la surexpression du facteur Pea3 dans des cellules épithéliales engendre une augmentation de l'expression de gènes comme la *vimentine*, la *fibronectine*, codant des marqueurs des cellules fibroblastiques et une diminution de l'expression de gènes codant des marqueurs épithéliaux comme l'*E-cadhérine*, la γ ou β *caténine* (Upadhyay et al., 2006).

Les facteurs du groupe PEA3 peuvent aussi réguler l'expression d'autres gènes pouvant être associés à la tumorigenèse.

Gène dont l'expression est corrélée aux facteurs du groupe PEA3	Modèle tumoral	Référence
<i>MMP-1</i>	Effusion ovarienne, Oral, Colorectal	(Davidson et al., 2004a; Hanzawa et al., 2000; Hida et al., 1997b; Horiuchi et al., 2003)
<i>MMP-2</i>	Sein	(Bieche et al., 2004)
<i>MMP-3</i>	Oral	(Hanzawa et al., 2000; Hida et al., 1997b)
<i>MMP-7</i>	Sein, Colorectal, Gastrique	(Bieche et al., 2004; Boedefeld et al., 2005; Horiuchi et al., 2003; Nosho et al., 2005b; Yamamoto et al., 2004)
<i>MMP-9</i>	Effusion mammaire, Oral, Sein	(Davidson et al., 2004b; Hanzawa et al., 2000; Hida et al., 1997b; Kaya et al., 1996)
<i>MMP-13</i>	Sein	(Barrett et al., 2002)
<i>MMP-14</i>	Sein	(Barrett et al., 2002)
<i>MT1-MMP</i>	Langue	(Izumiya et al., 2005)
<i>Intégrine $\beta 1$</i>	Effusion ovarienne, carcinome ovarien	(Davidson et al., 2003b; Davidson et al., 2004a)
<i>Intégrine αv</i>	Effusion ovarienne	(Davidson et al., 2004a)
<i>Intégrine $\alpha 6$</i>	Effusion mammaire, Effusion ovarienne	(Davidson et al., 2004a; Davidson et al., 2004b)
<i>EMMPRIN</i>	Effusion ovarienne	(Davidson et al., 2004a)
<i>IL-8</i>	Effusion ovarienne	(Davidson et al., 2004a)
<i>LR 67kDa</i>	Effusion mammaire	(Davidson et al., 2004b)
<i>Cox-2</i>	Colorectal	(Boedefeld et al., 2005; Nosho et al., 2005b)
<i>EREG</i>	Sein	(Bieche et al., 2004)
<i>NRG1,3</i>	Sein	(Bieche et al., 2004)
<i>ErbB1</i>	Sein	(Bieche et al., 2004)
<i>ErbB2</i>	Sein	(Benz et al., 1997; Fleming et al., 2004; Trimble et al., 1993; Bieche et al., 2004)
<i>iNos</i>	Colorectal	(Nosho et al., 2005b)

Tableau 8 : Corrélation dans différents types de cancers entre l'expression des facteurs du groupe PEA3 et les gènes cibles potentiels.

• Facteurs impliqués dans la tumorigenèse

En collaboration avec d'autres facteurs de transcription

Le facteur de transcription Pea3 comme les autres membres de la famille PEA3 sont capables de transactiver le promoteur du gène *cyclooxygénase 2*, cet effet de transactivation nécessite les sites Ets et NF-IL6 (Howe et al., 2001; Liu et al., 2004). Le facteur Pea3 agit en synergie avec c-Jun et p300 pour transactiver ce promoteur, effet qui est augmenté par l'oxyde nitrique dans le cas de p300 (Liu et al., 2004). D'autre part, les facteurs de transcription c-Jun et β -caténine en collaboration avec les facteurs du groupe PEA3 permettent la transactivation du promoteur du gène *twist* (Howe et al., 2003) et du gène *ostéopontine* (El-Tanani et al., 2004).

Un dernier cas de synergie entre c-Jun et le facteur Pea3 pour la régulation de la transcription de gènes cibles est retrouvé dans la littérature au niveau du promoteur du gène *muc-4* humain dans des cellules cancéreuses pancréatiques (Fauquette et al., 2005) et du promoteur *muc-4* de rat dans des cellules mammaires normales (transactivation sous la dépendance des voies ERK/MAPK et SAPK/JNK) (Perez et al., 2003).

Autres molécules impliquées dans les mécanismes de tumorigenèse

Parmi les autres gènes transactivés par les facteurs du groupe PEA3 aussi impliqués dans la tumorigenèse, on peut citer :

- le promoteur du gène *mammaglobine*, marqueur du cancer du sein, transactivé par le facteur Pea3 (Hesselbrock et al., 2005),
- le promoteur du gène *cavéoline-1* dans des cellules épithéliales de poumon transactivé par les facteurs Erm et Pea3 (Kathuria et al., 2004),
- le promoteur du gène *galT1* transactivé uniquement par le facteur Pea3 (Zhu et al., 2005),
- le promoteur du gène *TGF β RII*, suppresseur de tumeurs transactivé par le facteur Pea3 comme par les facteurs Ets1 et Elf-3 dans des cellules souches F9 différenciées (Kopp et al., 2004),
- le promoteur du gène *WT1* (Discenza et al., 2004).

• Molécules impliquées dans les mécanismes de prolifération et apoptose

Il a aussi été montré une transactivation par le facteur Pea3 des promoteurs de gènes impliqués dans des mécanismes mis de prolifération, angiogenèse ou apoptose :

Introduction

- le promoteur du gène *p21^{waf/cip}* dans des cellules humaines à papillomavirus suite à un stress génotoxique (Funaoka et al., 1997),
- le promoteur du gène *PEG-3* (Su et al., 2001),
- le promoteur de l'*IL-8* dans des cellules cancéreuses hépatiques (Iguchi et al., 2000),
- l'activation de la transcription du gène *bax* par chacun des membres du groupe PEA3 en synergie avec le facteur de transcription USF-1, sans liaison à l'ADN directe des membres du groupe PEA3 (Firlej et al., 2005).

• Autres molécules régulées par les facteurs du groupe PEA3

En marge de ces molécules, il existe quelques gènes cibles potentiels qu'il ne nous est pas possible de classer avant :

- les gènes *c-fos* et des *sérines protéases inhibiteurs SSCA* sont régulés au niveau transcriptionnel par le facteur Pea3 dans des cellules cancéreuses du col de l'utérus (Iwasaki et al., 2004),
- le promoteur du gène *ZHX1* est transactivé par le facteur Pea3 dans des cellules F9 (Shou et al., 2003),
- les facteurs Er81 et Erm peuvent transactiver le promoteur du gène *prénésiline* (Pastorcic and Das, 2003b; Pastorcic and Das, 2004),
- le facteur Er81 peut activer la transcription du promoteur du gène *smad7* en synergie avec le facteur HER2/Neu, dans une moindre mesure les facteurs Pea3 et Erm sont aussi capables d'agir en synergie avec HER2/Neu au niveau de ce promoteur (Dowdy et al., 2003),
- dans des cellules épидидymales, le facteur Pea3 transactive le promoteur de la *GGT IV* au niveau d'un site proximal (Lan et al., 1999), mais pourrait agir en répresseur au niveau des sites distaux,
- les membres du groupe PEA3 pourraient aussi réguler la transcription de gènes importants au niveau du segment initial de l'épididyme : *α-5 reductase*, *gpt-pr4*, *Srd5a ggt* et *gpx 5* (Fox et al., 2006; Yang et al., 2006).

• Les gènes réprimés par les facteurs du groupe PEA3

Dans tous les cas décrits jusqu'ici, les facteurs du groupe PEA3 ont un effet transactivateur. Cependant, à l'heure actuelle, trois gènes ont été décrits comme régulés négativement par le facteur Pea3 :

Introduction

- la glutathione peroxydase 5 (*gpx-5*) (Drevet et al., 1998),
- l'*u-PAR*, cette répression est retrouvée au niveau protéique dans des cellules CHO transfectées par le facteur Pea3 (Hapke et al., 2001),
- le gène *HER2/neu* dans des cellules cancéreuses pancréatiques ou ovariennes (Xing et al., 2000; Fauquette et al., 2005).

L'analyse de la régulation de ces différents gènes cibles montre d'une part que ces facteurs se fixent le plus souvent au niveau du promoteur en position proximale par rapport au site d'initiation de la transcription (Tableau 10). D'autre part, l'analyse des différentes zones de fixation des facteurs Erm, Er81 et Pea3 permet de définir un consensus de fixation plus spécifique à ces facteurs **CAGGA(A/T)** (Tableau 11).

On peut noter que la plupart des gènes cibles montrés à l'heure actuelle pour les facteurs du groupe PEA3 ont un rôle dans les mécanismes impliqués dans la tumorigenèse.

Gène cible	Type de protéine codée	Activé par	Rôle potentiel dans la tumorigenèse ou le développement	Références
<i>α-5 réductase</i>	Enzyme de conversion	Pea3, Erm, Er81		(Fox et al., 2006; Yang et al., 2006)
<i>bax</i>	Facteur pro-apoptotique	Pea3, Erm, Er81	Connu pour son rôle apoptotique dans certains cancers	(Firlej et al., 2005)
<i>cavéoline-1</i>	Protéine structurale des cavéoles	Pea3, Erm	Surexprimé dans certains cancers en particulier métastatiques, rôle potentiel dans l'invasion, la migration ou l'anoïkis	(Kathuria et al., 2004)
<i>c-fos</i>	Facteur de transcription du complexe AP-1	Pea3		(Iwasaki et al., 2004)
<i>cyclooxygénase-2</i>	Métabolisme de l'acide arachidonique	Pea3, Erm et Er81	Corrélié à la tumorigenèse, rôle potentiel dans la prolifération cellulaire, angiogenèse, invasion et inhibition de l'apoptose	(Howe et al., 2001; Liu et al., 2004)
<i>galT 1</i>	Glycoprotéine membranaire	Pea3	Corrélation au potentiel métastatique (quantité de galT1 élevée dans lignées métastatiques)	(Zhu et al., 2005)
<i>GGT IV</i>	Enzyme du métabolisme du glutathion	Pea3	Régulation de la spermatogenèse et des facteurs testiculaires	(Lan et al., 1999)
<i>Gpt-pr4</i>	Facteur du fluide testiculaire	Pea3, Erm, Er81		(Yang et al., 2006)
<i>Gpx-5</i>	Glutathione peroxydase	Pea3, Erm, Er81		(Drevet et al., 1998)
<i>hTERT</i>	Sous unité de la télomérase	Er81	Surexpression dans les cancers, sortie de la sénescence	(Goueli and Janknecht, 2004)
<i>héparanase</i>	Enzyme de dégradation de la matrice extracellulaire	Pea3, Er81	Métastases, embryogenèse, réparation tissulaire et inflammation	(Lu et al., 2003)
<i>icam</i>	Molécule d'adhérence	Erm	Migration cellulaire, adhérence cellules-cellules, angiogenèse	(de Launoit et al., 1998)
<i>IL-8</i>	Interleukine	Pea3	Facteur angiogénique	(Iguchi et al., 2000)
<i>mammaglobine</i>	Sécréto-globine	Pea3	Marqueur du cancer du sein	(Hesselbrock et al., 2005)
<i>muc4</i>	Glycoprotéine	Pea3	Surexpression dans certains cancers et dans la glande mammaire lactante	(Perez et al., 2003)

Tableau 9 : Gènes cibles des facteurs du groupe PEa3.

Gène cible	Type de protéine codée	Activé par	Rôle potentiel dans la tumorigenèse ou le développement	Références
<i>MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MT1-MMP</i>	Métalloprotéases : dégradation de la matrice extracellulaire	Pea3 (Er81 pour MMP-1)	Implication dans la tumorigenèse, métastatisation, embryogenèse	(Bosc et al., 2001; Crawford et al., 2001; Habelhah et al., 1999; Higashino et al., 1995; Izumiyama et al., 2005 ; Lynch et al., 2004)
<i>HER2/neu</i>	Récepteur tyrosine kinase	Pea3	Surexpression corrélée à la tumorigenèse mammaire, au potentiel métastatique et à la chémorésistance	(Fauquette et al., 2005; Xing et al., 2000)
<i>Ostéopontine</i>	Glycophosphoprotéine	Pea3, Erm	Développement mammaire, métastases	(El-Tanani et al., 2004)
<i>p21^{waf/cip}</i>	Inhibiteur de Cdk	Pea3	Suppresseur de tumeurs	(Funaoka et al., 1997)
<i>PEG-3</i>	Forme tronquée de gadd34	Pea3	Surexpression retrouvée dans certains cancers (dominant négatif de gadd34)	(Su et al., 2001)
<i>Préséniline1</i>	Protéines de membrane	Erm, Er81	Développement du système nerveux central	(Pastorcic and Das, 2003; Pastorcic and Das, 2004)
<i>SSCA</i>	Inhibiteurs de sérine protéases	Pea3		(Iwasaki et al., 2004)
<i>smad7</i>	Inhibiteur de la voie du TGFβ	Er81, Erm, Pea3	Inhibiteur du TGFβ (inhibiteur de la progression dans le cycle cellulaire)	(Dowdy et al., 2003)
<i>TGFβRII</i>	Récepteur au TGFβ à activité sérine/thréonine kinase	Pea3	Agit comme un suppresseur de tumeurs	(Kopp et al., 2004)
<i>twist</i>	Facteur de transcription famille bHLH	Pea3, Erm, Er81	A des propriétés oncogéniques, corrélé au potentiel métastatique Dans le développement du membre et neuronal	(Howe et al., 2003)
<i>uPAR</i>	Récepteur de l'uPA	Pea3	Chémotaxie, angiogenèse, migration, adhérence	(Hapke et al., 2001)
<i>vimentine</i>	Filament intermédiaire	Pea3		(Chen et al., 1996)
<i>WT1</i>	Facteur de transcription	Pea3	Transition mésenchymo-épithéliale, Surexprimé dans cancers du sein	(Discenza et al., 2004)
<i>ZHX1</i>	Facteur de transcription à doigts de zinc et homéodomaine	Pea3	?	(Shou et al., 2003)

Introduction

Gène	Moyens d'étude	Séquence de l'EBS	position	Référence
<i>Cox-2</i>	Délétants Mutagenèse	taaaaa ggaa ggttct	-73	(Liu et al., 2004)
<i>Caveoline-1</i>	Mutagenèse Retard sur gel	gcagag ggat gtagtt	-849	(Kathuria et al., 2004)
<i>galTI</i>	Transactivation Mutagenèse Retard sur gel	cccgcct ttcc gcct	-203	(Zhu et al., 2005)
<i>GGT IV</i>	Transactivation Mutagenèse	ctctg ttcct gaggc	-19	(Lan et al., 1999)
<i>IL-8</i>	Délétants Mutagenèse Retard sur gel	caaata ggaa gtgtga	-134	(Iguchi et al., 2000)
<i>Mammaglobine</i>	Délétants Mutagenèse Retard sur gel	gaaaga gga gagaag gaagca gga gattctt	-265 -175	(Hesselbrock et al., 2005)
<i>Her2/neu</i>	Transactivation Mutagenèse Retard sur gel	gcttga gga gtataa	-30	(Xing et al., 2000)
<i>muc4 rat</i>	Transactivation Mutagenèse	taggcag gga ggtgcc	-250	(Perez et al., 2003)
<i>humain</i>	Retard sur gel	tttct ttcct ggtgg	-216	(Fauquette et al., 2005)
<i>PEG-3</i>	Mutagenèse Retard sur gel	gtt gtttcct tcttc	-104	(Su et al., 2001)
<i>préséniline</i>	Transactivation Mutagenèse Retard sur gel	agagcc gga aatgacg	-10	(Pastorcic and Das, 2003b)
<i>smad7</i>	Transactivation Mutagenèse Retard sur gel	cggaag atcct gtccc	+58	(Dowdy et al., 2003)
<i>TGFβRII</i>	Transactivation Mutagenèse	aggag ttcct gtttc tcct gtttcct cctggc	+19, +26	(Kopp et al., 2004)
<i>uPAR</i>	Transactivation Mutagenèse Retard sur gel	acgtta gga gagaga	-248	(Hapke et al., 2001)
<i>WT1</i>	Transactivation Mutagenèse Retard sur gel	ccggcc gga atatacg gcgccag gat gctccg	-851 -863	(Discenza et al., 2004)
<i>ZHX1</i>	Mutagenèse Retard sur gel	gagt ggttc gggggtt	-58	(Shou et al., 2003)

Tableau 10 : Séquences de liaison des facteurs du groupe PEA3 des promoteurs de ses gènes cibles.

Introduction

<i>cyclooxygénase-2</i>	t a a a a a g g a a g g t t c t
<i>cavéoline 1</i>	g g c a g a g g a t g t a g t t
<i>galTI</i>	a g g g c g g g a a g g c g g g
<i>GGT</i>	g c c t c a g g a a c c a g a g
<i>IL-8</i>	c a a a t a g g a a g t g t g a
<i>mammaglobine</i>	g a a a g a g g a a g a g a a g
	g a a g c a g g a a g a t t c t
<i>Muc-4 humain</i>	t a g g c a g g a a g g t g c c
<i>rat</i>	c c a c c a g g g a a g a a a a
<i>PEG-3</i>	g g a a g a g g a a a a c a a c
<i>préséniline</i>	a g a g c c g g a a a t g a c g
<i>smad7</i>	g g g a c a g g a t c t t c c g
<i>TGFβRII</i>	g a a a c a g g a a a c t c c t
	g c c g a g g g a a a c a g g a
<i>UpaR</i>	a c g t t a g g a a g a g a g a
<i>WT1</i>	g c g c c a g g a t g c t c c g
	c c g g c c g g a a t a t a c g
<i>ZHX1</i>	a a c c c c g g a a c c a c t c
A	4 7 8 7 2 13 0 0 18 15 5 5 5 6 4 4
T	2 0 0 1 2 0 0 0 0 3 1 4 7 3 2 4
G	9 5 6 6 3 2 18 18 0 0 9 4 4 5 4 7
C	3 6 4 3 11 3 0 0 0 0 3 5 2 4 8 3
Consensus	Gx(g/a)(g/a)CAGGA(A/T)Gxxxxx

Tableau 11 : Consensus de fixation des facteurs du groupe PEA3.

V- Les mécanismes d'ARN interférence

L'ARN interférence est un mécanisme permettant la dégradation d'un ARN par des petits siRNA (small interfering RNA) ou empêchant la traduction en protéine par des miRNA (microRNA). Ce mécanisme naturel, retrouvé conservé dans le monde végétal comme animal a été mis en évidence dans le monde animal en 1998 par Fire et *al.* Ils ont montré que l'introduction d'un ARN double brin chez le nématode entraînait la dégradation de l'ARN messager possédant une complémentarité avec cette séquence (Fire et al., 1998).

Ce mécanisme comprend deux étapes : tout d'abord la dégradation de l'ARNdb en petits ARN interférents appelés siRNA de 21 à 23 nucléotides, puis l'association de ces derniers à un complexe protéique qui permettra la dégradation de l'ARN cible. La dégradation de l'ARNdb en siRNA va se faire grâce à une enzyme de type ARNaseIII : Dicer. Les siRNA vont alors être pris en charge par le complexe RISC, qui va permettre une reconnaissance de

Introduction

la cible, l'ouverture du siRNA db pour permettre l'hybridation et ensuite la dégradation de l'ARN cible (Figure 15).

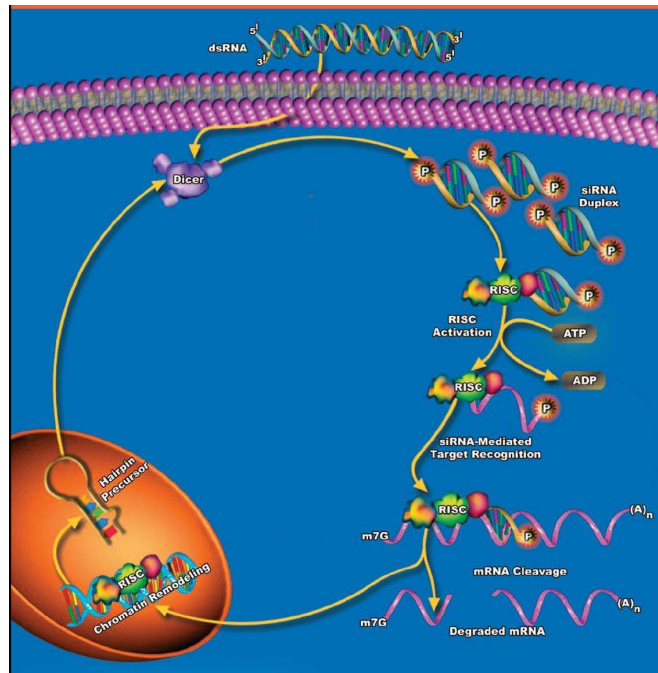


Figure 15 : Mécanismes de l'ARN interférence.

D'après www.imgenex.com.

Les ARNdb sont reconnus par le complexe Dicer qui va les dégrader en siRNA d'environ 21 nucléotides. Ceux-ci vont être pris en charge par le complexe RISC, qui va permettre la présentation du brin antisens au niveau de l'ARN cible et sa dégradation.

Ce mécanisme naturel a été détourné pour pouvoir artificiellement détruire spécifiquement certains ARN dans la cellule. Pour cela, des siRNA sous forme oligonucléotidiques peuvent être déterminés grâce à des logiciels. Au début, la sélection des siRNA se faisait empiriquement en se basant sur la connaissance des siRNA fonctionnels (Elbashir et al., 2002). Les séquences doivent être de 19 nucléotides flanquées d'un AA en 5' et d'un TT en 3' dans l'idéal (ou d'un AA en 5' uniquement). La séquence doit être située dans la région codante à 100 pb du site d'initiation ou de terminaison de la transcription. A l'heure actuelle, les données concernant l'efficacité des siRNA ont évoluées. Tout d'abord, une asymétrie peut être envisagée pour permettre de favoriser la prise en charge du brin antisens par rapport à l'autre. Ensuite, il faut tenir compte de la stabilité du duplex siRNA, de l'accessibilité de la cible ARN, la longueur du siRNA et respecter certaines caractéristiques de séquence (Pei and Tuschl, 2006). Ces caractéristiques sont maintenant prises en compte dans la mise au point des algorithmes des logiciels permettant la conception de siRNA.

Introduction

Les siRNA selon leur stabilité permettent d'avoir une expression pouvant dépasser une semaine d'expression. Cependant, des vecteurs d'expression de shRNA ont été conçus pour permettre l'expression constitutive des siRNA. Les siRNA sont insérés dans un vecteur d'expression selon une séquence pouvant se refermer sous forme d'épingle à cheveux, sous contrôle d'un promoteur de type ARN polymérase III (H1 ou U6) (Figure 16). Les siRNA seront transcrits sous forme de shRNA, qui seront pris en charge par Drosha qui permettra d'obtenir une épingle à cheveux (cf. mécanisme miRNA) puis par le système Dicer puis RISC. Des vecteurs de type plasmidiques, inductibles ou non, rétroviraux ou lentiviraux ont été décrits.

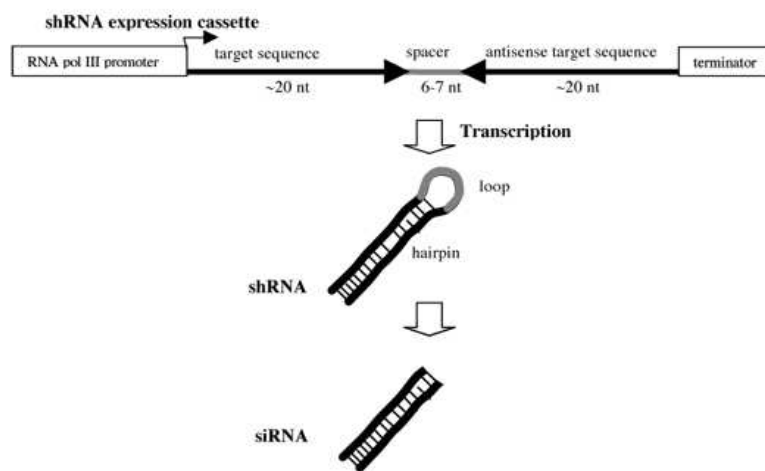


Figure 16 : Représentation d'une construction shRNA.

Selon www.genlantis.com

En parallèle du mécanisme siRNA, il existe dans la cellule, un mécanisme d'ARN interférence faisant intervenir des miRNA. Les miRNA sont codés dans le génome et vont empêcher la synthèse protéique. Les miRNA sont transcrits sous forme de pri-miRNA par l'ARN polymérase III. Ils sont alors reconnus et clivés par la ARNase III Drosha pour produire un pré-miRNA d'environ 70-90 nucléotides. Celui-ci, passé du noyau au cytoplasme grâce à l'Exportine 5, est pris en charge par Dicer et devient un miRNA fonctionnel (Cullen, 2006) (Figure 17). S'il existe un mésappariement entre le miRNA et la séquence cible, le miRNA va entraîner un blocage de la traduction, si l'homologie est parfaite le miRNA permettra la dégradation de l'ARN cible.

En utilisant ces observations, des miRNA artificiels dans le contexte nucléotidique des pri-miRNA ont été utilisés et semblent être très efficace pour permettre la répression de l'expression des gènes (Chang et al., 2006). Sur ce principe, l'équipe de Hannon a conçu une

Introduction

bibliothèque de shRNA mimant les pri-miRNA et clonés dans un vecteur rétroviral pSM2 avec un promoteur U6. Les shRNA^{mir} seront pris en charge par les complexes Drosha et Dicer pour être maturés de façon efficace et pourront alors être pris en charge par le complexe RISC (Chang et al., 2006).

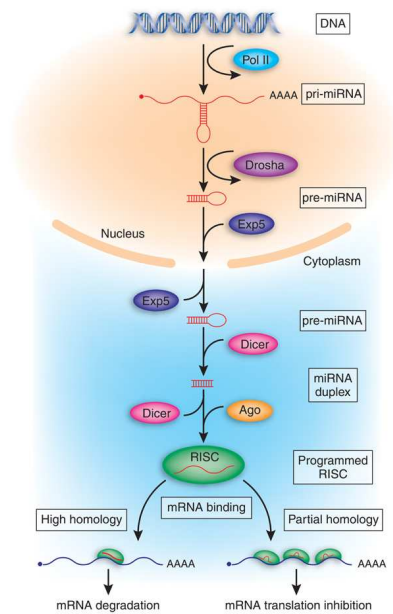


Figure 17 : Voie de synthèse des miRNA chez l'homme.

D'après (Cullen, 2006).

Les miRNA sont transcrits sous forme de pri-miRNA par l'ARN polymérase III. Ils sont alors reconnus et clivés par la ARNase III Drosha pour produire un pré-miRNA d'environ 70-90 nucléotides. Celui-ci, passé du noyau au cytoplasme grâce à l'Exportine 5, est pris en charge par Dicer et devient un miRNA fonctionnel.

Matériels et méthodes

I- Oligonucléotides utilisés

Pour notre étude, nous avons utilisé les oligonucléotides suivants :

Utilisation	Oligonucléotide	Séquence 5'-3'
Clonage bax	Pr bax 100S	ATGCGGTACCCACTGCCGCTGCCTCTCG
	Pr bax 100AS	ATGCGAATTCTTGCGGGGCACCCACGT
	Pr bax 5Sp1S	CATGCGGTACCTTGCGGGGCACCCACGTGAGGGGCCGCACGTCC ACGATCAGTCACGTGACCGTA
	Pr bax 5Sp1AS	GATCTACGGTCACGTGACTGATCGTGGACGTGCGGGCCCTCACGT GGGTGCCCCGCAAGGTACCGCATGGTAC
	Pr bax 3Sp1S	CGGTGCGCCGCAGCCGCCGGGGCGCACCCGGCGAGAGGCAGCG GCAGTGA
	Pr bax 3Sp1AS	GATCTCACTGCCGCTGCCTCTCGCCGGGTGCGCCCCGGCGGCTG CGGCGCACCGGTAC
Clonage cycD2	Pr CycD2 625 S	GAGCCATTTTCCTAGAAAGCTGTATCA
	Pr CycD2 625 AS	AGCCAGCCGGCCACCACTCGGTCCCGACTG
	Pr CycD2 450 AS	CTTGAGGCTCCGCTCGCCACCT
	Pr CycD2 433 S	CAGGCCAGCTGCTGTGCTCC
	Pr CycD2 64 S	CGGGCAGTTCGGAGGGAAGG
	Pr CycD2 306 AS	GGAGATCTAACTGCCCTTCC
Clonage p55cdc rat	Pr p55cdc 576S	ATGCGAGCTCTCTTAAGGATCCAAAGACCC
	Pr p55cdc 576AS	ATGCAAGCTTCCGCTGCTAGTGTTTCATTG
	Pr p55cdc 292S	ATGCGAGCTCACTCAGGTTTTTGATGCGAC
	Pr p55cdc 210S	ATGCGAGCTCGGTCCAGAGGACTGACTACC
	Pr p55cdc 106S	ATGCGAGCTCGATTTGCTCCCGGAAGACCC
	Pr p55cdc 93S	ATGCGAGCTCAAGACCCGCCCTCTTCAGT
Clonage p55cdc murin	Pr p55cdc A	ATGCGAGCTCCACAGGCTTCGATGTGACCT
	Pr p55cdc B	ATGCGAGCTCCCGCCCCCGTGTTCGATTC
	Pr p55cdc C	ATGCGAGCTCGATTTGCTCCCGGAAGACCC
	Pr p55cdc D	ATGCAAGCTTTCGCTGCTAGCGTTCATTG
	Pr p55cdc E	ATGCAAGCTTGAAAGGCGACCAAGCGCGAT
PCR	pea3 S	CGACTCAGATGTCCCTGGAT
	pea3 AS	AGGAAGGGATTGGAGCTTTC
	erm S	GGGAAATCTCGATCAGAGGACTG
	erm AS	AACTTGGTGCTTCATGCTCC
	cyclophiline S	GCATACAGGTCTTGGCATCTTGTC
	cyclophiline AS	ATGGTGATCTTCTTGCTGGTCTTGC
	bax S	AAGCTGAGCGAGTGTCTCCGGCG
	bax AS	GCCACAAAGATGGTCACTGTCTGCC
	36B4 S	CATGCTCAACATCTCCCCCTTCTCC
	36B4 AS	GGGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAG
	P55cdc S	CTCCTGGCAAATCTAGTTCC
	P55cdc AS	CTTGGCTTCTCCACATCAA
	cycD2 S	GAGAAGCTGTCCCTGATCCGCAAGC
	cycD2 AS	CCGGCGTTATGCTGCTCTTGACGG
	actine S	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA
	actine AS	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTCC
USF-1 S	ACCAGTGACGATGCCGTTGAC	
USF-1 AS	GGGGAATAAGGGTGGGTCTCTG	

Utilisation	Oligonucléotide	Séquence 5'-3'
Mutagenèse dirigée	E-box mt1	TTGCGGGGCACCCAATTGAGGGCCGCACGT
	E-box mt2	GTCCACGATCAGTCAATTGACCGTGGTGCGCC
	E-box mt1/2	TTGCGGGGCACCCAATTGAGGGCCGCACGTCCACGATCAGTCA ATTGACCGTGGTGCGCC
	E-box mt3	GAGCGATGATGATCAATTGACTAGTCCTGCGGGC
	Cd2 mt1	GATCTAACTGCCCTTCTAGCTTGCGTCACTG
	Cd2 mt2	CGGGCAGTTCGGAGAGAAGGACCGGTGCGAG
	p55 mt	ATGCGAGCTCGATTTGCTCTCCCAATACCCGCCCTCTTC

Tableau 12 : Listes des oligonucléotides utilisés en PCR.

II- Culture cellulaire

Plusieurs lignées de cellules sont utilisées : d'une part les TAC (cellules mammaires épithéliales de souris) dérivant de NMuMg (cellules épithéliales normales mammaires TACC CRL-1636) fournies par le Dr J. Soriano & le Pr R. Montesano (Faculté de Médecine, Département de Morphologie, Genève) (Soriano et al., 1995) et les clones cellulaires surexprimant les facteurs Erm ou Pea3 établis à partir de cellules TAC (clones TAC/erm1, TAC/erm14, TAC/pea3 8 et TAC/pea3 48) ou contrôles (clone TAC/pc7) (Chotteau-Lelievre et al., 2003), d'autre part les cellules MMT (cellules mammaires cancéreuses de souris ATCC CCL-51). Enfin, des cellules HEK293 GP (cellules productrices de virus, ATCC CRL-1573) sont utilisées pour la production de rétrovirus.

Les cellules TAC, MMT, HEK293 GP et les clones cellulaires sont cultivés dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) complété par 10% de SVF (Sérum de veau fœtal, Gibco BRL, Life Technologies, Invitrogen®), 1% d'acides aminés non essentiels et 100 unités de gentamycine, à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂. Les cellules TAC nécessitent la présence de collagène (30µg/ml) sur le support plastique afin d'y adhérer. Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont décollées de leur support et dissociées par une solution de trypsine-EDTA (Cambrex).

III- Transfection transitoire

1 - Vecteurs plasmidiques

a- Vecteurs d'expression

Différents vecteurs d'expression sont utilisés :

- pTracer (Life Technologies, Invitrogen®), pTracer-Erm; pTracer-Er81 ; pTracer-Pea3 contenant respectivement les ADN complémentaires (ADNc) de *erm*, *er81*, *pea3* murins clonés en aval du promoteur fort EF-1 α dans le vecteur pTracer décrits dans (Firlej et al., 2005).
- pCR₃-USF-1, -USF-2 et -TDUSF-1 fourni par le Dr B.Violet (Lefrancois-Martinez et al., 1995; Viollet et al., 1996),
- pcDNA3-Ets1, pcDNA3-Ets2,
- psv-Erg, -Fli, -Spi1,
- pcDNA3-p53.

b- Vecteurs rapporteurs

- Promoteur du gène *bax* murin

Nous avons utilisé dans l'étude du promoteur du gène *bax*, le vecteur rapporteur pGVBII contenant le gène codant la luciférase en amont duquel sont clonés le promoteur pleine longueur du gène *bax* murin (PM Bax PF -2673/-1) ou les mutants de délétion de ce promoteur (PM Bax KpnI -1041/-1, BstXI -455/-1, SacI -386/-1, SacII -162/-1, PstI -147/-1, SpeI -124/-1, Sp1dl -100/-1). Ces vecteurs nous ont été fournis par le Pr Sakai (Faculté de Médecine, Kyoto, Japon) (Igata et al., 1999).

Les fragments PMBax5Sp1 ou PMBax3Sp1 ont été construits par clonage des oligonucléotides pr bax 5Sp1 et pr bax 3Sp1 réappariés (et digéré par l'enzyme KpnI dans le cas du PMBax5Sp1) dans le vecteur pGVBII préparé par double digestion par les enzymes KpnI et BglII. Les oligonucléotides contiennent soit des sites de coupure pour les enzymes (Pr bax5Sp1S= site pour l'enzyme KpnI) soit les extrémités cohésives apportées par ces enzymes de restriction (Pr bax 3Sp1S= extrémité cohésive pour KpnI, Pr bax 5Sp1AS et Pr bax 3Sp1AS= extrémité cohésive pour BglII).

Matériels et méthodes

Le fragment PMBaxSp1dl AS a été amplifié par PCR à partir du fragment PMBaxSp1dl au moyen de la Taq polymérase Goldstar (Eurogentec), grâce aux oligonucléotides indiqués Pr bax 100S (contenant un site de restriction pour l'enzyme KpnI) et Pr bax 100AS (contenant un site de restriction pour l'enzyme EcoRI). Le fragment de PCR ainsi obtenu est préparé suite à la double digestion par les enzymes EcoRI et KpnI et cloné dans le vecteur PMBaxPF délété du fragment KpnI / EcoRI.

• Promoteur du gène *cycline D2* murin

Les fragments de délétion du promoteur du gène *cycline D2* (625, 450, 433, 306, 258, 132, 64) ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique de souris au moyen de la Taq polymérase Goldstar (Eurogentec), grâce aux oligonucléotides indiqués « Pr CycD2 » (-625S, -625 AS, -450S, -433S, -64S, 306AS) dans le tableau 12. Ces fragments ont été sous-clonés dans le vecteur TOPO PCR 2.1 (Invitrogen). Puis par double digestion par les enzymes XhoI et KpnI, ces fragments sont isolés et clonés dans le vecteur pGL4b.

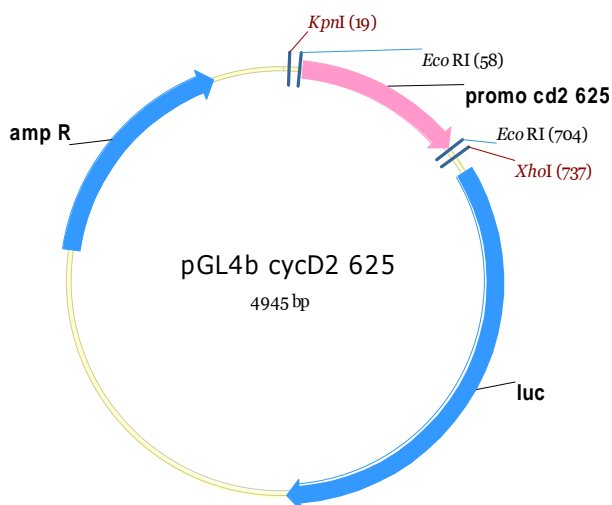


Figure 18 : Représentation graphique du vecteur pGL4b cd2 625.

Le fragment de promoteur du gène de la *cycline D2* a été inséré dans le vecteur pGL4b après sous-clonage dans le vecteur TOPO PCR2.1 au niveau des sites de restriction XhoI et KpnI.

• Promoteur du gène *p55^{cdc}* de rat

Les fragments de délétion du promoteur du gène codant la protéine *p55^{cdc}* (576, 292, 210, 106, 93) sont amplifiés à partir du vecteur pCAT-*p55^{cdc}* (Weinstein et al., 1998) grâce à la Pfu polymérase (Stratagène). Les oligonucléotides utilisés pour la PCR sont cités dans le tableau 12 (Pr *p55cdc* 576S, -576AS, 292S, 210S, 106S et 93S) et contiennent des sites de

restriction pour l'enzyme SacI (pour les oligonucléotides sens) ou l'enzyme HindIII (pour les oligonucléotides antisens). Après digestion par ces deux enzymes des fragments de PCR, ceux-ci sont isolés et clonés dans le vecteur pGL₃b.

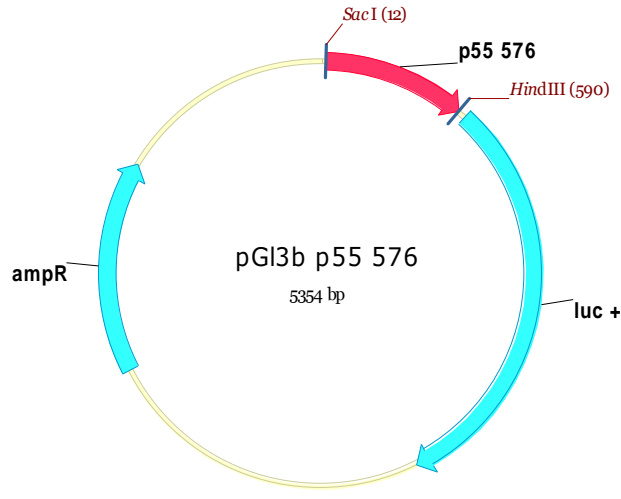


Figure 19 : Représentation graphique du vecteur pGL3b p55 576.

Le fragment de promoteur du gène *p55^{cdc}* a été inséré dans le vecteur pGL3b après sous-clonage dans le vecteur TOPO PCR2.1 au niveau des sites de restriction XhoI et KpnI.

- Promoteur du gène *p55^{cdc}* murin

Les fragments de délétion du promoteur du gène codant la protéine *p55^{cdc}* de souris (511, 402, 319, 300, 210, 106) sont amplifiés à partir d'ADN génomique de souris grâce à la Pfu polymérase (Stratagène). Les oligonucléotides utilisés pour la PCR sont cités dans le tableau 12 (Pr *p55^{cdc}* A à E) et contiennent des sites de restriction pour l'enzyme SacI (pour les oligonucléotides sens) ou l'enzyme HindIII (pour les oligonucléotides antisens). Après digestion des fragments de PCR par ces deux enzymes, ceux-ci sont isolés et clonés dans le vecteur pGL₄b.

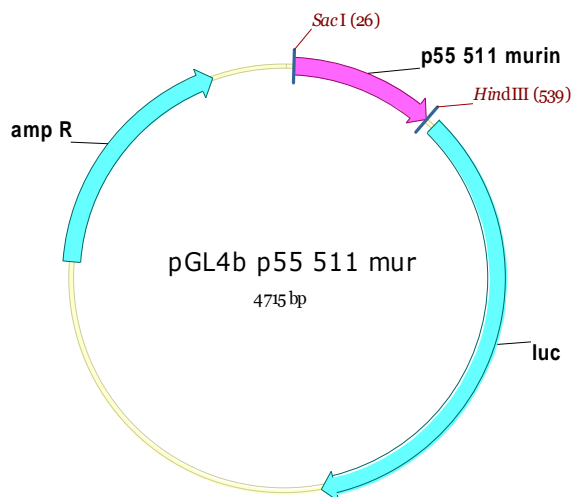


Figure 20 : Représentation graphique du vecteur pGL4b p55 511 murin.

Le fragment de promoteur du gène $p55^{cdc}$ murin a été inséré dans le vecteur pGL4b après sous-clonage dans le vecteur TOPO PCR2.1 au niveau des sites de restriction XhoI et KpnI.

c- Vecteurs d'expression de shRNA

Deux types de vecteurs d'expression ont été utilisés :

- un vecteur plasmidique, pSUPER (OligoEngine), pour les tests de fonctionnalité des siRNA et les tests de transactivation,
- un vecteur rétroviral, le pRetroSUPER (OligoEngine), pour permettre l'expression constitutive des siRNA dans les cellules TAC ou MMT.

Les différents oligonucléotides shRNA ont été clonés dans ces vecteurs au niveau des sites de restriction BglII et HindIII.

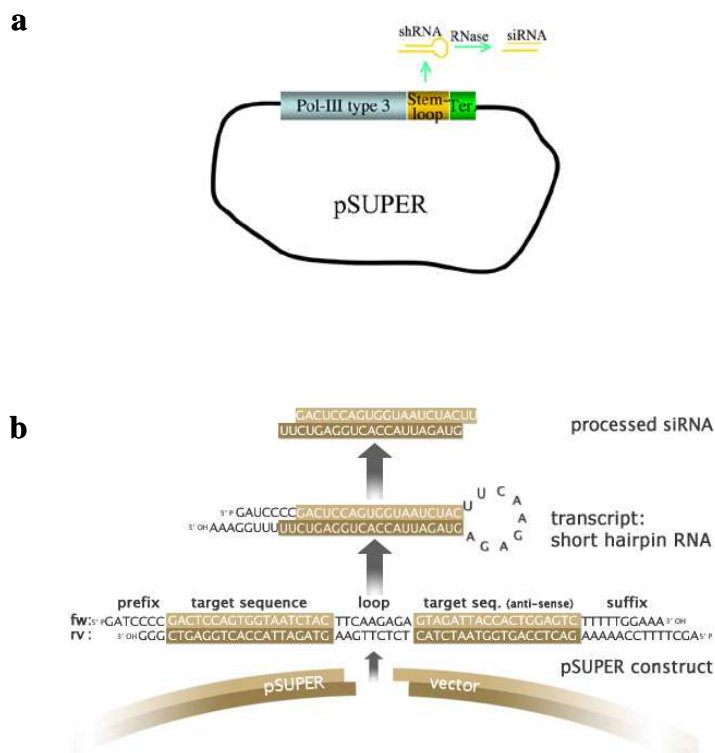


Figure 21 : Représentation graphique des vecteurs pSuper et pRetroSuper.

d- Vecteurs normalisateurs

Deux vecteurs normalisateurs ont été utilisés selon les cas dans les expériences de caractérisation d'activité transcriptionnelle en transfection transitoire :

- pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA) contenant le gène codant la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur de l'antigène T du virus SV40,
- pRL-TK (Promega) contenant le gène codant la luciférase renilla sous le contrôle du promoteur minimal de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex.

2- Transfection des cellules

a- Transfection de plasmides

• Pour des tests d'activité promotrice

La transfection est réalisée en puits de plaque 12 puits quand les cellules atteignent 70 % à 80 % de confluence, à raison de 80000 cellules par puits à l'ensemencement.

Matériels et méthodes

L'agent de transfection est un polymère d'éthylènimine (PEI, ExGen 500, Euromedex). Le mélange de transfection contient : 500 ng d'ADN final (comportant 25 ng de vecteur rapporteur, 25 ng de vecteur normalisateur et 250 ng de vecteur d'expression et 200 ng d'ADN de sperme de saumon) et 2 pmoles de PEI. Le contact ADN/PEI est réalisé sous 100 µl final dans de l'eau physiologique pendant 30 minutes. Les cellules sont rincées avec de l'OPTIMEM (milieu sans sérum, Life Technologies, Invitrogen®), puis mises en culture avec 500 µl d'OPTIMEM. Le mélange ADN/PEI est déposé sur les cellules. Au bout de 6 heures, le milieu est complété par 1,5 ml de DMEM 10% SVF.

Après 30h de transfection, les cellules sont rincées avec une solution de PBS et lysées par du tampon de lyse (Promega) pendant 15 minutes sous agitation.

- Pour la préparation ARN/protéines

Un million de cellules sont ensemencées la veille en boîte de culture de diamètre 100 mm. L'agent de transfection est un polymère d'éthylènimine (PEI, ExGen 500, Euromedex). Le mélange réactionnel comprend 6 µg d'ADN et 12 pmoles de PEI. Le contact ADN/PEI est réalisé sous 1,2 ml final dans de l'eau physiologique pendant 30 minutes. Les cellules sont rincées avec de l'OPTIMEM (milieu sans sérum, Life Technologies, Invitrogen®), puis mises en culture avec 6 ml d'OPTIMEM. Le mélange ADN/PEI est déposé sur les cellules. Au bout de 6 heures, le milieu est complété par 12 ml de DMEM 10% SVF. Après 36h de transfection, les cellules sont rincées avec une solution de PBS et lysées dans un tampon adapté pour extraire les ARN (paragraphe IV) ou les protéines (paragraphe VI).

b- Transfection des siRNA

40000 cellules sont ensemencées la veille en plaque 12 puits. L'agent de transfection est le jetSI (Polyplus Transfection). 8 pmol de jetSI sont mis en contact avec 46 µl d'OPTIMEM pendant 10 minutes. Ce mélange est alors mis en contact de 100 pmol de siRNA double brin dilués dans l'OPTIMEM sous 50 µl pendant 30 minutes. Les cellules sont rincées avec de l'OPTIMEM (Life Technologies, Invitrogen®), puis mises en culture avec 1 ml d'OPTIMEM. Le mélange est déposé sur les cellules. Après 4 heures, le milieu est complété par 1 ml de DMEM 10% SVF. Dans le cas de transfection dans des boîtes de plus grand diamètre, les quantités de chaque réactif sont augmentées de manière proportionnelle.

3- Dosage des activités rapportrices et normalisatrices

a- Système associant luciférase firefly (rapporteur)/ β -galactosidase (normalisateur)

2/15^{ème} du lysat cellulaire de transfection est additionné de réactif luciférase (Luciferase Assay Substrate, Promega). Ce réactif contient la luciférine qui, en présence de la luciférase présente dans le lysat, va être dégradée et permettre une émission de lumière. Celle-ci est mesurée pendant 15 secondes grâce au luminomètre Centro LB 960 (Berthold).

La normalisation est faite par le dosage de l'activité de l'enzyme β -galactosidase. Le substrat, galacton® (Galacto-Light Tropic I, Applied Biosystems), est mis en contact avec 2/15^{ème} du lysat cellulaire pendant 30 à 45 minutes. Une solution « acceleratorTM » est ensuite ajoutée et la quantification de la lumière émise est réalisée pendant 5 secondes à l'aide du luminomètre.

b- Système « duo » luciférases : luciférase firefly (rapporteur)/luciférase renilla (normalisateur)

2/15^{ème} de lysat cellulaire de transfection est additionné de réactif luciférase lucII (Dual Luciferase Reporter Assay System). Ce réactif contient la luciférine qui, en présence de la luciférase « Firefly » présente dans le lysat va permettre une émission de lumière. Celle-ci est mesurée pendant 10s grâce au luminomètre Centro LB 960 (Berthold). Puis la réaction est stoppée par le réactif « Stop and Glo », qui permet ensuite le dosage de l'activité luciférase « Renilla ». La quantification de la lumière émise est effectuée pendant 10 s à l'aide du luminomètre.

4- Infection des cellules par des rétrovirus

Pour la production virale, les cellules HEK 293 sontensemencées à J-1 au taux de 3×10^6 cellules par boîte de 100 mm et sont ensuite cotransfectées avec 5 μ g de vecteur pRetroSUPER et 1 μ g de vecteur pCMV-VsVg, selon les conditions décrites au paragraphe III2a. Le milieu de culture est renouvelé après 6h de transfection.

Après 2 jours d'incubation à 37°C, les surnageants contenant les particules virales sont collectés, filtrés et utilisés pour l'infection des cellules TAC ou MMT. 3×10^6 cellules par boîte de 100 mm sont incubées avec les surnageants en présence de 0,4 μ g/ml de polybrène

(Sigma). La sélection commence le jour suivant en présence de 2 µg/ml de puromycine (Gibco BRL).

IV- Etude de l'expression des ARN

1- Extraction des ARN

a- Méthode au « tri-reagentTM » (Euromedex)

Les ARN sont extraits à partir de cellules subconfluentes. Les cellules sont lysées dans du Tri ReagentTM, puis décollées à l'aide d'un grattoir. L'homogénat obtenu est placé pendant 15 minutes à 4°C pour dissocier les complexes nucléoprotéiques. Après addition d'1/5^{ème} de volume de chloroforme, le mélange est alors centrifugé à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les ARN situés dans la phase supérieure sont ensuite précipités par un volume d'isopropanol puis centrifugés à 12000 g pendant 30 minutes. Le culot obtenu est lavé avec une solution d'éthanol 70% puis repris dans une solution de formamide (pour les northern blots) ou d'eau MQ (pour les RT-PCR). La concentration des ARN est établie par spectrophotométrie à 260 nm.

b- Méthode d'extraction et purification sur colonne

Pour les études utilisant PCR quantitative, les ARN sont extraits et purifiés sur colonne en suivant le protocole fourni par Qiagen (RNA easy mini kit). Les ARN sont extraits à partir de cellules subconfluentes préalablement lysées dans un tampon de lyse fourni et purifiés par passage sur colonne. Les ARN sont alors élués dans l'eau RNase free. La concentration des ARN est établie par spectrophotométrie à 260 nm. Les ARN sont digérés enzymatiquement par une DNase au cours de la purification sur colonne.

2- Analyse des ARN par migration électrophorétique des ARN et transfert sur membrane selon la technique de Northern blot

a- Préparation et migration électrophorétique des ARN

Dix microgrammes d'ARN sont mis en présence de bleu de charge ARN, chauffés 5 minutes à 80°C, puis placés 5 minutes dans la glace. Le mélange est déposé sur un gel

contenant 1,2 % d'agarose, 17 % de formaldéhyde et du MOPS 1X. Les ARN sont séparés en fonction de leur charge et de leur taille par migration électrophorétique dans du tampon MOPS 1X.

b- Transfert des ARN sur une membrane de nitrocellulose

Les ARN sont transférés du gel sur une membrane de nitrocellulose (Hybond C extra; Amersham Pharmacia Biotech) par capillarité à l'aide d'une solution de SSC 10X pendant 24 heures. Les ARN sont ensuite fixés à la membrane par chauffage pendant 2 heures à 80°C.

3- Hybridation moléculaire

a- Préparation des sondes radioactives

Les fragments d'intérêt (sondes) sont marqués à l'aide d'un isotope radioactif (^{32}P) couplé au dCTP par la technique d'amorçage aléatoire (« Megaprime », Amersham Pharmacia Biotech). 25 ng du fragment d'intérêt sont mis en présence des amorces aléatoires fournies. Le mélange est chauffé à 90°C pendant 3-4 minutes pour permettre la dénaturation de l'ADN. L'élongation est alors effectuée en présence de 25 μCi de ^{32}P -dCTP, des désoxyribonucléotides (dNTP) contenus dans le tampon de marquage et d'une unité du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I, pendant 45 minutes à 37°C. La sonde est purifiée par passage sur une résine G50 (Séphadex, Amersham Pharmacia Biotech). L'activité spécifique est mesurée par un compteur à scintillation.

b- Pré-hybridation et hybridation

Une étape de pré-hybridation est nécessaire pour saturer les sites non spécifiques de fixation au niveau de la membrane. Les membranes sont mises en pré-hybridation dans le tampon d'hybridation à 42°C pendant au moins 2 heures. La sonde, préalablement dénaturée 5 minutes à 94°C, est ajoutée à raison de $1,5 \times 10^6$ cpm par ml de milieu et la réaction d'hybridation a lieu pendant 15 heures à 42°C.

c- Lavages des membranes

Les membranes sont lavées successivement dans une solution de SSC 2X, 0,1% SDS deux fois pendant 20 minutes à 42 °C, puis dans une solution de SSC 0,5X, 0,1% SDS deux fois pendant 20 minutes à 50°C. Les membranes sont alors mises en autoradiographie à -80°C pendant 3-4 jours avec un film (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech). Le film est ensuite développé pour obtenir l'autoradiogramme.

4- Rétrotranscription des ARN et PCR

a- Rétrotranscription des ARN

1 µg d'ARN extraits et purifiés sur colonne sont rétrotranscrits grâce à la transcriptase reverse MuLV et des hexanucléotides du « High Capacity cDNA archive kit » (Applied Biosystems) selon le protocole donné par le fournisseur.

b- PCR semi-quantitative

Les réactions de PCR semi-quantitative ont été réalisées au moyen de la Taq polymérase Goldstar (Eurogentec) en présence de 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,2 µM d'oligonucléotides sens et antisens et de 0,5 unités de taq polymérase. A ce mélange sont ajoutés les ADNc (1/20^{ème} de la réaction de rétrotranscription). La réaction de PCR consiste en une étape de 5 min à 95°C, puis x cycles d'amplification (95°C pendant 30s, 52°C pendant 30s puis 72°C pendant 30s), puis une élongation finale de 10 min à 72°C. Les échantillons sont ensuite analysés sur un gel d'agarose à 2% en présence de BET.

Gène	Nombre de cycles
<i>cyclophiline</i>	22
<i>36B4</i>	22
<i>pea3</i>	26-28
<i>erm</i>	30
<i>bax</i>	30
<i>cycD2</i>	28
<i>p55^{cdc}</i>	28
<i>actine</i>	25
<i>USF-1</i>	25

c- PCR quantitative utilisant le SYBR Green

Les réactions de PCR quantitative sont faites à l'aide du « brilliant SYBRgreen QPCR master mix » (Stratagene). 1/100^{ème} de la réaction de rétrotranscription est mélangé au « master mix » et au rox (un marqueur fluorescent permettant de normaliser la réaction), en présence de 2,5 pmoles de chaque amorces sous un volume de 20µl. La réaction est placée dans l'appareil MX4000 (Stratagene). Le protocole d'amplification consiste en une dénaturation initiale de 95°C pendant 10 min puis de 40 cycles d'amplification de 95°C pendant 30s, 55°C pendant 30s puis 72°C pendant 30s. La fluorescence émise par le SYBRgreen est mesurée à la fin de chaque étape d'amplification. La courbe de fusion des différents couples d'oligonucléotides est faite au moyen d'une étape de 30s à 95°C puis une hybridation pendant 30s à 55°C suivie d'une montée progressive à 95°C de 1°C toutes les 30s. La fluorescence est mesurée toutes les 30s. L'analyse des résultats de PCR en temps réel est faite par la méthode du ΔC_t .

V- Mutagenèse dirigée

Les mutations effectuées au niveau des séquences des promoteurs des gènes ont été réalisées avec la Pfu polymérase ou le « QuikChange site-directed mutagenesis » (Stratagene). 10 ng d'ADN plasmidique sont combinés aux oligonucléotides mutés (0.3 µM), 1 µM dNTP et 2,5 unités de *PfuTurbo* polymérase (Stratagene). Les oligonucléotides mutés utilisés sont listés pour le brin sens dans le tableau 12 (E-box mt1, E-box mt2, E-box mt1/2, E-box mt3, Cd2 mt1, Cd2 mt2, p55 mt). Le mélange est amplifié dans un appareil PCR. Les conditions de cycle sont de 95°C pendant 30 sec, 55°C pendant 1 min et 68°C pendant 10 min pendant 12 cycles. Le produit de PCR est soumis à la digestion par l'enzyme DpnI, qui dégrade l'ADN matriciel méthylé, puis transformé dans des bactéries compétences. L'introduction de la mutation est vérifiée par séquençage des plasmides ainsi obtenus.

VI- Analyse des protéines par la technique de Western blot

1- Extraction des protéines

Les cellules en culture subconfluentes sont rincées avec une solution de PBS, puis lysées pendant 30 minutes à 4°C dans un tampon de lyse protéique contenant 1% SDS. L'extrait cellulaire est chauffé et clarifié par centrifugation à 10000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est alors conservé. La concentration des protéines est déterminée par dosage des protéines par la méthode du BCA.

2- Préparation et migration des échantillons

20 à 40 µg des protéines diluées dans une solution de Laemmli sont déposés sur un gel d'acrylamide/polyacrylamide dénaturant (gel de séparation de 4,5%/ gel de concentration de 10-12,5%). La migration électrophorétique s'effectue dans le tampon de migration en fonction de leur poids moléculaire.

3- Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose

Après migration, un transfert semi-sec du gel d'acrylamide est effectué sur une membrane de nitrocellulose (Hybond C extra, Amersham Pharmacia Biotech) dans le tampon de transfert pendant 50 minutes à 200mA. L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration de la membrane au rouge ponceau.

4- Révélation immunologique

La membrane est placée dans une solution de TBS Tween (Tris Buffer Saline) contenant 5% de BSA (Bovine Sérum Albumine) pendant au moins une heure. L'anticorps primaire anti-Bax murin, anti-Pea3 ou anti-USF-1 (Santa Cruz) est dilué au 1/1000^{ème} dans le tampon TBS Tween contenant 1% de BSA et incubé avec la membrane pendant une nuit. La membrane est ensuite lavée quatre fois dix minutes dans une solution de TBS tween puis

incubée pendant une heure avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, dilué au 1/10000^{ème}. Après rinçage par une solution de TBS Tween, la détection est effectuée par chimioluminescence grâce au système Supersignal (PIERCE).

5- Immunoprécipitation

Les cellules transfectées de manière transitoire par les vecteurs pTracer-pea3 et pCR3 ou pCR3-USF-1 et cultivées en boîte de culture de diamètre 100mm pendant 36h sont lysés par 300 µl de tampon de lyse non dénaturant. Les lysats sont centrifugés et les surnageants sont conservés. Le surnageant est alors dosé par la méthode de Bradford. 700 mg de protéines sont mis en contact de 20µl de billes de protéines A/G pour faire la pré-saturation des billes. Après une centrifugation rapide, le surnageant est collecté et 30µl de billes de protéines A/G et 2 µl anti-V5 (Invitrogen) sont ajoutés. Après une nuit à 4°C et plusieurs lavages avec le tampon de lyse, les protéines immunoprécipitées sont collectées par centrifugation et éluées dans le tampon laëmmli 1X et analysées en western blot.

VII- Retard sur gel

1- Traduction *in vitro* en lysat de réticulocytes

Les protéines Pea3 et USF-1 ont été traduites en lysat de réticulocytes suivant le protocole donné par le fournisseur (Promega). Brièvement, les vecteurs pTracer-Pea3 et pTracer-USF-1 sont utilisés comme base pour la traduction *in vitro*, au moyen de la T7 ARN polymérase dans des lysats de réticulocytes de lapin.

2- Purification d'extraits nucléaires

Les cellules TAC subconfluentes sont décollées, culottées et resuspendues dans un tampon de lyse hypotonique et incubées sur la glace pendant 10 min. Le lysat est alors centrifugé à 10000g pendant 5 min. Le culot est resuspendu dans un tampon hypertonique et placé dans la glace pendant 30 min. Le surnageant contenant les extraits nucléaires est alors collecté après centrifugation 10 min à 10000g.

3- Retard sur gel

L'oligonucléotide double brin dérivé du promoteur minimal du gène *bax* (*bax wt*) est marqué au niveau de l'extrémité 5' par le ^{32}P -ATP en utilisant la T4 polynucléotide kinase (Invitrogen). Les oligonucléotides marqués sont purifiés sur une colonne Biospin 30 (Biorad) et l'activité spécifique est mesurée par comptage grâce à un compteur à scintillation. La réaction de liaison ADN/protéines est faite dans un tampon de binding 2X, 1mM de dithiothreitol, 12 μg d'extraits nucléaires (ou 2 μl de lysat de réticulocytes) et 60000 cpm de sonde oligonucléotidiques. Pour les expériences de compétitions, l'oligonucléotide non marqué est utilisé en excès (400 fois). Dans les expériences de super-retard, les anticorps anti-USF-1, anti-Pea3, anti-Erm ou anti-Pim-1 sont ajoutés au mélange. Après incubation pendant 20 min à température ambiante, les échantillons sont déposés sur un gel à 6% non dénaturant de polyacrylamide et migrés dans un tampon de Tris-Borate EDTA 0,5X. Le gel est ensuite séché puis exposé avec un film autoradiographique à -80°C .

Les oligonucléotides suivants ont été utilisés comme sonde ou compétiteur : *bax wt*: 5'-CACCCACGTGAGGGCCGCACGTCCACGATCAGTCACGTGACCGT-3', non-spécifique: 5'-GGGCGCACCCGGCGAGAGGCAGCGGCAGTG-3' et *bax mt*: 5'-TTGCGGGGCACCCAATTGAGGGCCGCACGTCCACGATCAGTCAATTGACCGTGTGCGCC-3'.

VIII- Puces à ADN

Pour l'étude des modulations transcriptionnelles entre différentes conditions expérimentales, des puces à ADN « Mouse Genome Survey Microarrays » (Applied Biosystems) ont été utilisées. Ces puces contiennent des sondes oligonucléotidiques de 60mers permettant de suivre l'expression de 28218 gènes validés murins.

Les ARN totaux extraits de cellules transfectées par un siRNA dirigé contre *erm* ou *pea3* (ou un siRNA contrôle) et purifiés sur colonne Qiagen sont testés sur puces « agilent », pour tester leur qualité. Ces puces consistent en un réseau capillaire très fin dans lequel est déposé un gel contenant un intercalant spécifique de l'ARN. Les échantillons sont déposés dans chaque puits de la puce et vont être soumis à un haut voltage, qui va permettre une séparation très rapide des brins d'ARN de l'échantillon en fonction de leur taille. Les molécules d'ARN vont se lier à l'intercalant et en fin de course vont être détectés par

fluorescence. L'appareil mesure l'intensité de la fluorescence qui dépend du temps de rétention dans le gel.

1,2 µg d'ARN totaux ont alors été amplifiés par le « NanoAmp™ RT-IVT labelling kit », puis marqués avec la DIG-UTP selon le protocole fourni par Applied Biosystems (figure 22). Cette étape consiste en une rétrotranscription de l'ARN en ADNc. Le second brin de l'ADNc est ensuite polymérisé en miroir du brin d'ADNc. L'ADNc double brin ainsi obtenu est purifié sur colonne. L'ADNc double brin est alors transcrit *in vitro* en présence d' UTP marqué à la digoxigénine. L'ARNc marqué à la DIG est purifié sur colonne et dosé.

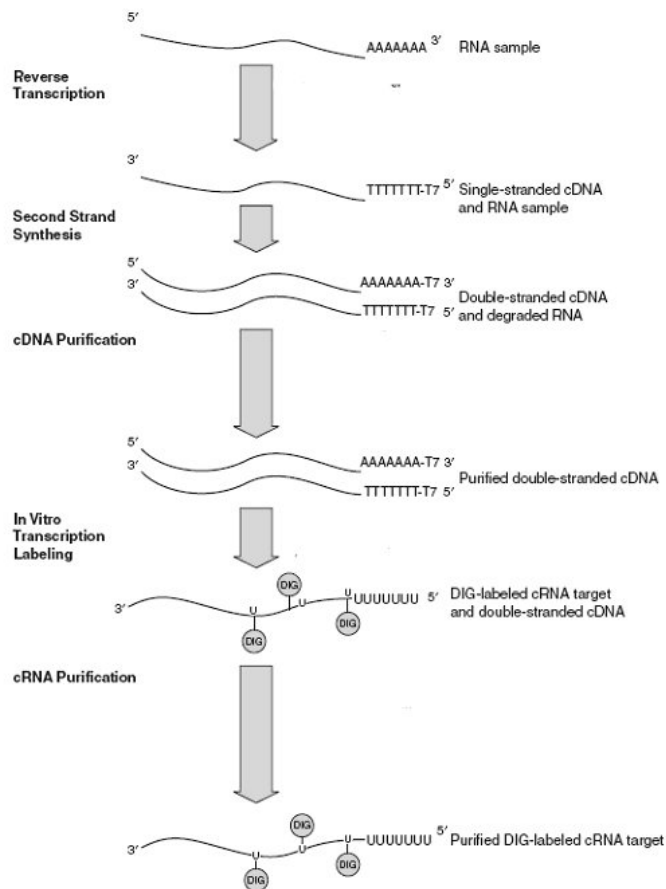


Figure 22 : Processus d'amplification et de marquage des ARN (Applied Biosystems).

Ensuite, 10µg d' ARNc marqués sont hybridés pendant 18h sur puces à ADN et traités selon le protocole fourni (« Chemiluminescence Detection Kit, Applied Biosystems Biosystems). Brièvement, après rinçage, les puces ADN sont mises en présence d'un anticorps anti-DIG couplé à la peroxydase. Les lames seront révélées en présence d'un substrat de la peroxydase dans l'appareil « Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarrays analyser ». L'acquisition des données de chemiluminescence et de fluorescence

de même que l'analyse primaire des résultats de puces à ADN est effectuée au moyen du logiciel Applied Biosystems Expression Array System Software v1.1.1. L'étude primaire consiste en 5 étapes : une correction d'image, une correction du bruit de fond local et global, puis 3 étapes de normalisation. Enfin, une normalisation finale est apportée par le logiciel *ace.map* mis au point par l'équipe du Dr Arndt Benecke.

Les profils d'expression et l'analyse statistique ont été réalisés grâce au logiciel *ace.map* (Brysbaert et al., en preparation). La normalisation entre les expériences a été faite par la méthode NeONORM (Noth et al., 2006). La valeur de la probabilité p est faite selon les tests standards. Les gènes référencés dans la puce par des numéros d'identité (probe-ID) ont alors été annotés selon le guide décrit précédemment (Noth et al., 2005).

IX- Etude phénotypique

Les cellules utilisées dans l'étude phénotypique sont de deux types :

- soit les lignées MMT exprimant de manière constitutive les shRNA dirigés contre *pea3* ou *erm*,
- soit les cellules MMT transfectées par des siRNA db selon le protocole décrit dans le paragraphe III2b.

1- Analyse de la prolifération cellulaire

Les cellules sontensemencées en plaque 12 puits à raison de 20000 cellules par puits (t0). Aux différents temps, le nombre de cellules est évalué par comptage cellulaire au compteur de cellules COULTER® Z2 (BECKMAN COULTER) après que les cellules aient été décollées et individualisées par une solution de trypsine-EDTA puis passées à travers une seringue de 1,2 mm de diamètre. Chacun point est compté trois fois.

2- Migration cellulaire à travers une membrane microporée

Cette étude est réalisée dans des chambres de culture de 6,5 mm de diamètre contenant une membrane de polycarbonate microporée possédant des pores de $8\mu\text{m}$ (type chambre de Boyden) (BD Biosciences) (Figure 23). La membrane est équilibrée avec du milieu de culture

pendant quelques heures. 40000 cellules (dans un volume de 0,2 ml de milieu DMEM 10% SVF) sontensemencées dans la chambre supérieure et du milieu DMEM 10% SVF est ajouté dans la chambre inférieure.

Les chambres sont placées pendant 18 heures à 37°C en présence de CO₂.

Après rinçage de la membrane par une solution de PBS, les cellules n'ayant pas traversés sont éliminées de la face supérieure de la membrane à l'aide d'un coton tige. La membrane est alors fixée par du méthanol froid pendant 10 minutes à 4°C, puis placée dans une solution de Hoechst 33258 pendant 10 minutes à l'obscurité. La membrane est excisée de son support et montée entre lame et lamelle avec du milieu de montage Glycergel (DAKO). Les cellules qui ont migré à travers la membrane et donc situées sur la face inférieure, sont comptées grâce à un microscope droit à fluorescence Olympus BH2.

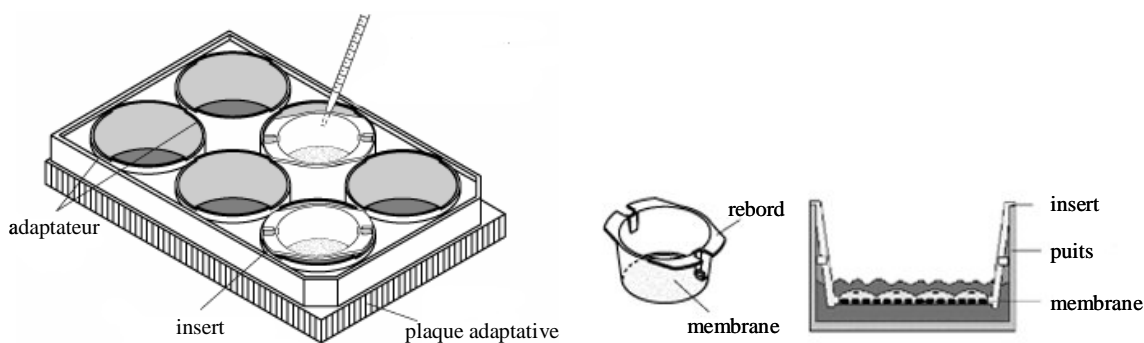


Figure 23 : Schéma classique d'inserts possédant une membrane microporée.

Après équilibration des membranes avec du milieu de culture, les cellules sontensemencées sur la membrane supérieure dans du milieu. Le puits est aussi rempli de milieu pour permettre la migration des cellules de la face supérieure de la membrane microporée vers la face inférieure.

3- Culture tridimensionnelle

En gel de collagène

150 µl d'un gel de collagène (collagène de type I à la concentration de 2 mg/ml de MEM en présence de 2,2 g/ml de bicarbonate de soude et 0,0048N de soude) sont coulés au fond d'un puits de plaque 48 puits. Après polymérisation, 2×10^4 cellules sontensemencées au dessus de ce gel en micromasses. Un second gel de 100µl est coulé par-dessus. Après polymérisation du milieu DMEM 10% SVF est ajouté sur le gel. L'HGF/SF est ajouté le

lendemain à la concentration de 20 ng/ml. La culture est maintenue pendant 7 jours, puis une coloration des cellules est réalisée à l'aide d'une solution de rouge neutre pendant 1h. Une fixation des structures est enfin réalisée à l'aide d'une solution de PAF 4 %. L'analyse est réalisée avec un microscope Axiovert 135 (Zeiss).

En matrigel®

Les cellules sont ensemencées dans 200 µl de Matrigel® en plaque 48 puits au taux de 4×10^3 cellules par puits. Après polymérisation, le milieu DMEM 10% SVF est ajouté. L'HGF/SF est ajouté le lendemain à la concentration de 20 ng/ml. La culture est maintenue pendant 7 jours, puis une coloration des cellules est réalisée à l'aide d'une solution de rouge neutre pendant 1h. Une fixation des structures est enfin réalisée à l'aide d'une solution de PAF 4 %. L'analyse est réalisée avec un microscope Axiovert 135 (Zeiss).

4- Injection en souris immunodéficientes

Les cellules MMT infectées par des shRNA dirigés contre *erm* et/ou *pea3* ont été injectées à des souris SCID femelles de 5 semaines environ. Les cellules MMT sont décollées puis comptées. Après 2 rinçages au PBS 1X, les cellules sont resuspendues à une concentration de 2×10^6 cellules par ml dans du PBS 1X. 100 µl de cette solution sont ensuite injectés aux souris par voie sous-cutanée. Dès l'apparition des tumeurs (environ 1 semaine), celles-ci sont mesurées tous les 3-4 jours. Les souris sont sacrifiées au bout de 2 semaines. La représentativité statistique est mesurée par un test de Mann-Whitney.

X- Solutions et tampons

Bleu de charge ARN : 6,5% Formaldéhyde, MOPS 1X, 50% Formamide, 2,5% Glycérol, Bleu de Bromophénol.

Gel de concentration à 4,5% : 4,5% Acrylamide/Bisacrylamide ; 75mM Tris pH=6,8 ; 0,06% SDS ; 0,03% persulfate d'ammonium ; 0,01ml TEMED.

Gel de séparation à 12,5% : 12,5% Acrylamide/Bisacrylamide ; 375mM Tris pH=8,8 ; 0,01% SDS ; 0,04% persulfate d'ammonium ; 0,01ml TEMED.

Gel de séparation à 10% : 10% Acrylamide/Bisacrylamide ; 375mM Tris pH=8,8 ; 0,01% SDS ; 0,04% persulfate d'ammonium ; 0,01ml TEMED.

Solution de Hoechst 33258 : 4mg Hoechst 33258 pour 1 litre de PBS.

Matériels et méthodes

MOPS 1X : 20mM MOPS (acide 4morpholino propane sulfonique), 5mM NaOAc pH=7,0
1mM EDTA.

PAF 4% : 4% paraformaldéhyde dans le PBS.

PBS : 2,7mM KCl ; 1,5mM KH₂PO₄ ; 138mM NaCl ; 8,1mM Na₂HPO₄.

Rouge neutre : 0,5% (w/v) dans H₂O.

Rouge ponceau : 2g rouge ponceau (Sigma), 30g de trichloroacétate, qsp 1L H₂O.

SSC 20X : 3M NaCl ; 0,3M sodium citrate pH=7,0.

Tampon de binding 2X: 50 mM HEPES, 50 mM KCl, 2 mM EGTA, 4 mM MgCl₂, 0.1% NP40 (v/v), 20% glycerol (v/v)

Tampon de Laemmli 5X : 5%SDS ; 1% βmercaptoéthanol ; 0,25M Tris HCl pH=6,5 ; 5% glycérol ; 0,05% Bleu de bromophénol.

Tampon de lyse protéique : 50mM Tris-HCl pH=7,5, 150mM NaCl, 1% NP40, 1% SDS, 1mM PMSF, 1mM orthovanadate, 1mM Na₄P₂O₇, 10μg/ml aprotinine, 10μg/ml leupeptine.

Tampon de lyse non dénaturant : 150mM NaCl, 50mM TrisHCl pH 7.5, 0,1% NP40, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 0,1mM Na₄P₂O₇, 10mM NaF, 1mM PMSF, 10μg/ml leupeptine, 10μg/ml aprotinine.

Tampon de migration de western blot : Tris 25mM, Glycine 0,192M ; SDS 0,1%.

Tampon d'hybridation 5X : SSPE 5X, Denhardt's 1X, SDS 0,1%, ADN de sperme de saumon 100μg/ml, formamide 50%.

Tampon de transfert de western blot : 48mM Tris ; 39mM Glycine ; 0,04% SDS ; 20% Méthanol.

Tampon de lyse hypotonique : 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 10 μg/ml aprotinin, 0.5 μg/ml leupeptin, 3 mM phenylmethylsulfonyl [PMSF], 3 mM dithiothreitol [DTT]

Tampon de lyse hypertonique : 50 mM HEPES, 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol (v/v), 3 mM DTT, 3 mM PMSF

TBS Tween : 150mM NaCl ; 10mM Tris ; 0,1% Tween 20.

TBE 10X: 0,1M Tris, 0,09 acide borique, 20mM EDTA

Résultats

I- Contexte de la thèse

Les facteurs de transcription du groupe PEA3 ont été montrés depuis 1996 (Kaya et al., 1996) et de façon récurrente comme impliqués dans les événements de cancérogenèse mammaire. L'équipe de recherche intégrée pour la thèse s'attache à l'étude du rôle des facteurs PEA3 dans le modèle mammaire et notamment au cours des événements de mise en place et de développement de la glande mammaire, mais aussi lors de sa dérive cancéreuse, et ce sur la base du modèle murin. Une lignée de cellules mammaires à caractère « normal » et une lignée de cellules cancéreuses ont été choisies dans ce cadre.

A partir des cellules normales, des clones surexprimant de manière constitutive les facteurs Erm et Pea3 ont permis de mettre en évidence que ces cellules présentent la capacité de faire de la morphogénèse spontanée en gel de collagène, c'est-à-dire de reproduire une arborescence épithéliale, sans stimulation par des facteurs de croissance, ce dont les cellules parentales sont incapables (Figure 24). De plus, les cellules surexprimant les facteurs Erm et Pea3 présentent une capacité invasive *in vitro* (expérience en gel de collagène) dont sont dépourvues les cellules parentales (Figure 24) (Chotteau-Lelievre et al., 2003).

Ces aspects morphogénétiques ont été complétés par la recherche de gènes cibles de ces facteurs qui a permis d'identifier des cibles moléculaires jusqu'alors non connues comme étant régulées par les membres du groupe PEA3, parmi celles-ci un certain nombre de gènes impliqués dans le cycle cellulaire (*gadd45*, *gadd153*, *cycline D2*, *p55^{cdc}*) ou encore dans l'apoptose (*bax*).

A partir de ces données, ma thèse s'est orientée autour des axes de recherche suivants :

- poursuivre les travaux concernant l'aspect « morphogénèse » en développant des modèles d'inhibition de l'expression des facteurs de transcription du groupe PEA3 de façon à les comparer aux modèles cellulaires de surexpression et avec en application finale l'utilisation de ces différents modèles par injection *in vivo* dans une glande mammaire desépthérialisée de souris,
- mettre au point des modèles mammaires d'inhibition de l'expression des facteurs du groupe PEA3 à partir de cellules cancéreuses avec pour but l'analyse des modifications phénotypiques des cellules et une application par injection *in vivo*, chez la souris,

- définir la régulation par ces facteurs des cibles moléculaires préalablement mises en évidence (*gadd45*, *p55^{cdc}*, *cycline D2* ou *bax*) et rechercher à partir de ces modèles de nouvelles cibles moléculaires.

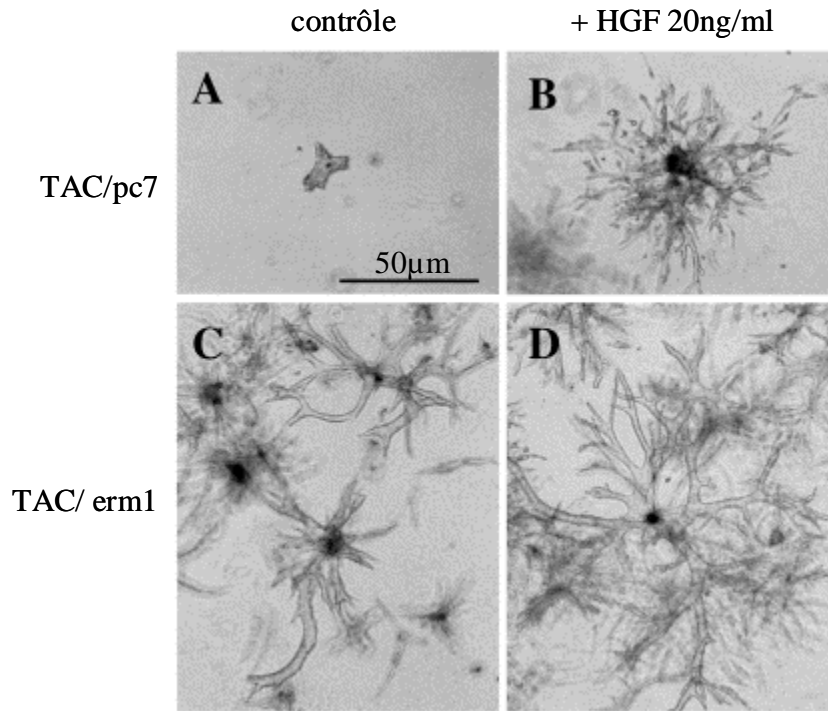


Figure 24 : La surexpression du facteur Erm dans les cellules TAC permet aux cellules de faire de la morphogenèse spontanée.

(d'après Chotteau-Lelièvre *et al*, 2003).

Les cellules sont cultivées en gel de collagène pendant 9 jours en absence (A, C) ou en présence (B, D) de 20ng/ml d'HGF. En l'absence de facteur de croissance externe, les cellules TAC forment des colonies sans branchement (A). L'addition d'HGF permet la formation de quelques branchements (B). Les cellules TAC/erm1 non traitées forment spontanément des branchements comme les cellules TAC/pc7 traitées à l'HGF (C). L'ajout d'HGF aux cellules TAC/erm1 permet un branchement plus important aussi bien en termes de quantité que de longueur de branches.

II- Présentation des différents modèles cellulaires utiles à nos études

Différents modèles cellulaires murins sont utilisés dans le cadre de l'étude du rôle des facteurs du groupe PEA3 dans la morphogenèse et la cancérisation mammaire soit, par l'intermédiaire de l'inactivation de l'expression des facteurs du groupe PEA3 par ARN interférence, soit par l'intermédiaire de la surexpression de ces facteurs de manière constitutive.

Deux lignées cellulaires sont à la base de la mise au point de ces modèles :

- une lignée de cellules épithéliales mammaires murines normales: les TAC (TAC 2.1 dérivées des NMuMg ATCC CRL-1636) (Soriano et al., 1995),
- une lignée de cellules épithéliales mammaires murines cancéreuses: les MMT (ATCC CCL-51),

Les cellules TAC ont été utilisées dans le cadre général d'étude de la morphogenèse mammaire. Deux modèles ont été envisagés :

- des cellules TAC surexprimant de manière constitutive les facteurs Erm et Pea3, établies préalablement à mon arrivée dans le laboratoire et déjà testées dans des études *in vitro* (Chotteau-Lelievre et al., 2003),
- des cellules TAC pour lesquelles l'expression de ces mêmes facteurs est réprimée par ARN interférence avec pour but de compléter les données obtenues *in vitro* avec les cellules surexprimant les facteurs PEA3.

Ces cellules normales dont l'expression des facteurs Erm et Pea3 est modulée (surexpression ou répression) devraient permettre :

- des études *in vivo* de transplantation mammaire. En effet, les cellules TAC injectées au niveau d'une glande mammaire préalablement désépithélialisée devraient reformer un arbre épithélial mammaire. Nous souhaitons mieux appréhender l'effet des facteurs Pea3 et Erm dans la morphogenèse mammaire en étudiant l'effet de ces cellules modulées pour l'expression de ces deux facteurs sur la formation de cet arbre épithélial mammaire.
- la recherche et l'étude des gènes cibles des facteurs du groupe PEA3.

Les cellules MMT sont utilisées dans le cadre de l'étude du rôle des facteurs du groupe PEA3 dans les mécanismes de la cancérogenèse mammaire. Ces cellules présentent un

niveau élevé d'expression des gènes *erm* et *pea3* et ne sont utilisées que dans le contexte de la répression de l'expression de ces deux facteurs.

Ces cellules dont l'expression des facteurs Erm et Pea3 est modulée par ARN interférence devront permettre :

- des études phénotypiques *in vitro* (tests de prolifération, migration ou invasion) et des études *in vivo* (injection à des souris immunodéficientes),
- la confirmation ou la recherche de nouveaux gènes cibles des facteurs du groupe PEA3,
- la comparaison des résultats obtenus avec les cellules normales correspondantes.

Deux systèmes ont été privilégiés pour l'approche d'ARN interférence et ce pour les deux types cellulaires:

- l'utilisation de shRNA (small hairpin RNA) par l'intermédiaire de vecteurs rétroviraux contenant un promoteur ARN polymérase III, dans le but d'obtenir des lignées de cellules réprimant constitutivement l'expression des facteurs du groupe PEA3. Cette approche a été la première envisagée pour les deux types de cellules TAC et MMT. L'intérêt de la mise au point de ces modèles cellulaires exprimant de manière constitutive des ARN interférents est leur utilisation dans des applications *in vivo* chez la souris.

- l'utilisation de siRNA (petits oligonucléotides d'ARN double brin) dans le cadre de transfections transitoires pour des expériences menées à court terme, c'est-à-dire les tests effectués dans les études *in vitro* (prolifération, migration, invasion...) ou la recherche de gènes cibles. Cette approche siRNA a été envisagée dans un second temps, pour pallier aux difficultés obtenues avec les shRNA.

III- Choix des séquences ARN interférentes

1- Détermination des séquences

Les séquences shRNA et siRNA ont été définies de deux manières :

- *dans un premier temps*, de façon « manuelle », en respectant les conditions nécessaires pour concevoir un siRNA basées sur la connaissance des siRNA « naturels » (Elbashir et al., 2002) : les séquences doivent être de 19 nucléotides flanqués d'un AA en 5' et d'un TT en 3' (ou d'un AA en 5' uniquement), la séquence doit être située dans la région codante (à partir de 100 pb du site d'initiation de la transcription) ou dans la région transcrite non traduite et au maximum à 100 pb du site de terminaison de la transcription.
- *dans un second temps*, grâce à l'utilisation de logiciels.

En effet, avec l'évolution de la recherche sur les mécanismes de l'ARN interférence, les éléments de définition d'une séquence ARN interférente ont été mieux décrits et ont permis la création d'algorithmes spécifiques. Nous avons utilisé les logiciels fournis par les sociétés Ambion et Invitrogen pour définir d'autres séquences ARN interférentes. Le logiciel fourni un classement des séquences selon leur fonctionnalité probable, que ce soit en tant que siRNA ou shRNA. Nous avons choisi chaque séquence ARN interférente d'après :

- sa probabilité de fonctionnalité (fournie par le logiciel)
- la possibilité de l'utiliser en shRNA ou en siRNA
- par comparaison entre les deux recherches que nous avons effectuées.

Toutes les séquences obtenues ont été soumises à une recherche d'homologie avec le génome murin grâce au logiciel BLAST (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.shtml>), qui recherche les zones d'homologie locale entre séquences, pour vérifier la spécificité de nos séquences ARN interférentes. Les séquences ont été sélectionnées si le nombre de mésappariements avec d'autres gènes est supérieur ou égal à 3.

2- Séquences shRNA

Trois séquences ARN interférentes ont été définies pour le gène *pea3* (deux de façon manuelle [RNAi *pea3* A et B] et une grâce aux logiciels mis à notre disposition [RNAi *pea3* C]), et trois séquences pour le gène *erm*, toutes sélectionnées manuellement (RNAi *erm* A, B et C). Les séquences sont listées dans le tableau 13 et leur positionnement sur les séquences ADNc de *pea3* et *erm* est présenté dans les figures 25 et 26.

Nom de la séquence shRNA	Séquence
RNAi <i>pea3</i> A	5'ggtgatggagtgatgggtt 3'
RNAi <i>pea3</i> B	5'cgactcagatgtccctggat 3'
RNAi <i>pea3</i> C	5'atctcccggaaatgggagc 3'
RNAi <i>erm</i> A	5'ctgccagtcactctacatg 3'
RNAi <i>erm</i> B	5'gaatcggccagccatgaac 3'
RNAi <i>erm</i> C	5'gttctgatgatgagcagt 3'

Tableau 13 : Séquence des shRNA utilisés dans notre étude.

Les séquences présentées ici sont les séquences du brin sens, en séquence de type ADN.

3- Séquences siRNA

Deux séquences siRNA ont été définies pour le gène *pea3* (si *pea3* 1 et 2) et une séquence pour le gène *erm* (si *erm*). La séquence si *pea3* 1 correspond à la séquence shRNA RNAi *pea3* A et la séquence si *erm* correspond à la séquence shRNA RNAi *erm* C.

La séquence si *pea3* 2 a été définie manuellement.

La séquence si *ctrl* correspond à un oligonucléotide qui n'est retrouvé dans aucune séquence de toute espèce confondue (Zhang et al., 2004) et sert de contrôle expérimental.

Les séquences siRNA sont reportées dans le tableau 14 et leur positionnement sur les séquences d'ADNc de *pea3* et *erm* est présenté respectivement dans les figures 25 et 26.

Les séquences ARN interférentes

Nom de la séquence shRNA	Séquence
<i>si pea3 1</i>	5'ggugauggagugatggguutt 3'
<i>si pea3 2</i>	5'caaaugcucauuucauugctt 3'
<i>si erm</i>	5'guuccugaugaugagcagutt 3'
<i>si ctrl</i>	5'gcgcguuuguaggauucgtt 3'

Tableau 14 : Séquence des siRNA utilisés dans notre étude.

Les séquences présentées ici sont les séquences du brin sens, en séquence de type ARN.

aatccgtggatgtgctttaaaaccacacctaacgtttgagcacaagtctcacgaactggcgctacaacttcatcagaa
 acgaagtctccaaatctgtccaacgcaaaaacacaaaaggagtctatgactaagtcttccaaccacaactgtctgctgc
 gcccgaaaacaagccggggctctggggaccggggctcaggccgctcgcctccggcctagccccgccaccttagttgt
 gtcacccccgggcatgctgagcatcccccgggctccggcacagacgcccggacctcaggtctctgcctccgcgcgg
 gggcccgccctgtggccggaggagcggccggatggagcggaggatgaaaggcggatacttggaccagcagtgccct
 acaccttctgcagcaaatctcccgaaatgggagcttggggcgaagcgtgatgggtcccgcagggaaagctcatggacc
 gggctccctgccccttccgactcagaagatctctccaggacctcagtcacttccaagagacgtggctcgcagaagct
 caggtaccggacagtgatgagcagtttgttctgtattccattcagaaaacttagctttccatagccccaccaccagga
 tcaagaaggaaccccagagtcctccgacagaccccgcctgtcctgcagcaggaagccaccactccctaccaccatgg
 agagcagtgcttactccagacaaatcgccatcaagtccccgctcccggtgcccctggacagtcgcccctgcagccc
 tttccagggcagaaacagcagcagagcctcctgagagcctccagctcttccagctcccaccctggccacgggtacctg
 gtgagcacagctccgtcttccagcagcccgtggacatgtgcccactccttccatctcctcagggaggggcccgggaacc
 tctcccagccccctatcaacaccaactgtcggagccctgccaccctacccccagcagaacttcaagcaggagtagcat
 gaccctctgtacgaacaggctggccagcccgttcaagccagggtgggtcagtgggcacaggtaccaggggcccgggg
 tggatgataaacaggagcgcacagacttcgcctacgggaggggcccaccctaccagcgcgggggtgccttacacgactca
 gatgtccctggatgtgcatcaatgtacctccaccagagggcttctctggaacctctccaaggatggagtgatgggtt
 atggctatgaaaaatcccttcgaccatcccagatgatgtctgcatgtccctaaaaaatttgaaggagacatcaagca
 ggaagggattggagcttccactgtggcagtttctggtggccctgctggatgaccctcaaatgctcatttcattgcttg
 gacagggccggggaatggagtttaaaactaattgaacctgaagaggttgccaggctctggggatccagaagaaccggcca
 gccatgaattatgacaagctgagccgctcgcctgcgatactattatgaaaaggcatcatgcagaaggtggctggcgaac
 gctacgtgtacaagtttgtgtgagcagccggagccctgttctctcctggcctcccagataatcaacgtccagctctgaa
 ggtgagtttgaccggccagtcagtgaggagacaggtcccttctgcccacttggatgagagtgctgctacctccca
 gaactcactggccccgctccgccttccggccacagagtggtatattcttagaccagtggttccccttgacatg
 gtgggttgctcagtgatataatcaactgatttgggtatgggtgaaggccctcttctctgatgctgtagaagtctctggg
 gtcagagctccactatcccatctgatactcctggccagactacaaatgctcatttcattgcttggacagggccgggaat
 ggagtttaaactaattgaacctgaagaggttgccaggctctggggatccacagctgctaaccagagctcgcgggaaag
 acagtgaggcaggccaaatctaaaggcagtagctgaagttcgcctgtggctcacctgtaccttcagttcagcttggcct
 ctgctaggctctgtcagaggccaagttcctcacccccacacagagatccagtggtctattctggggacatacaggg
 acttcccttgtttattatggcaacagggccaagggattctcagaacaccctgtgtctcccctctcccaacccccatg
 ggagacaaagttctgcctggcttctgcctgaacaggggggtcctgtgtcttgggtgctgtgctctgggagggcaggagc
 atgtgggcccagctgggggggggtgtggaagtagagatggctctctgcccctaggcctaccaggcctaattccacctt
 tgctcttatgcccagaccttaataaagcctctgctctccccggaattc

RNAi *pea3* C

RNAi *pea3* B

RNAi *pea3* A
= *si pea3* 1

si pea3 2

Figure 25 : Positionnement des séquences shRNA et siRNA sur la séquence de l'ADNc du gène *pea3* murin.

L'ATG et le codon stop sont encadrés et indiqués en rouge. Les séquences shRNA et siRNA sont indiquées en couleur.

Les séquences ARN interférentes

ggaagcaccatgg[atg]ggttttgtgatcagcaagtccttttatgggtcccagggaaatctcgatcagaggactgtcgag
ggcgacctttgattgacagaaagaggaagtttgggacacagatctggctcacgattctgaagagttgtttcaggatct
tagccagctgcaggaggcttgggttagctgaagcacaagtctctgatgatgagcagtttgtcccagattttcagtcctgat
aacttgggtgcttcatgctccacctcccaccaagatcaaacggggagctgcacagcccctcctccgagttgtcgtcctgta
gccacgagcaggctcttgggtgctaagatggagaaaagtgcctctacaactattgtgcctacgataggaaagcctccctc
tgggttcaagccattaaccccggccgcccactcctctgtcaccaccatcagaattccctatttccccacctcaggca
actctgccacctcaggtctcaccctggagctggcccagttcaaggggtgggtcctgcccgactcctcactcacttc
cagaacctggatcacagcaacaacatttgcgggtccccggccaccacatcagcccctgcaaagtccaaagatgatgcc
tgaagccagtatccatcagaacagagatttcagcgacagctgtctgagcccagccatcccttccctcctcagtcagga
gttctcggagatagtcgccccagctaccaccggcagatgtcagagcccattgtccccgcagctccgccacccttcagg
gattcaagcaggaataccatgaccactgtttgaacatgggggtccctgggatgcctgggtcctccagtagatgggtcca
gtcaccatgggcatcaagcaagagccccgagattactgtgctgactcagaagtgcctaa[ctgccagtcactctacatg
agaggcgggtatttctccagcagccatgaaggattcccgtatgagaaggaccccaggctgtactttgatgatacttgcg
tggatcccgagagactggaaggcaagtcaagcaggagcccaccatgtatcgagaggggctccttatcagagacgagg
ctctctgcagctgtggcagttccttgtcaccctcctggatgaccagccaatgcccacttcatcgcctggactggccga
ggcatggaatttaagctcatagaaccggaagaggttgcctgccttggggatccagaagaatcggccagccatgaaact
atgacaagctgagccgctctctccgctattactatgaaaagggcatcatgcagaaggtggctggggaacgctacgtcta
caaatttgtgtgtgacccggatgactcttctctatggccttcccggacaatcagcgccttccctgaaggcagaatcc
gaatgccccctcaatgaggaggacacgctgcctctgactcactttgaagacaaccctgcttacctcctggacatggatc
gctgcagcagcctcccctacaccgaaggcttcgcttac[caa]gtttctgaatggccgagtagccacaccctagagctagc
agtctcatccaggcaaccgagggcagtggttttgggttcttggctgttccctaaagcttgccctttgagtattat
caggagaacccaagctgtctctggattcgacaccctttaaagacaaatccttggctcgggaggagtggaacaggggaga
gacaaaaaccacccttccctggggagacgtggataccgtcctccttggccacatggccagtatgtgcagagcagtagt
cagtgtgttcagggtagcgccatgaaaggggaccagtgatgacaatctgcgttgatcatggactactaaaatgcc
ttcacacaggaggctttgacttgacacaattcttgggaagaaactgcacaccataggacagtcgataaggctgagtcg
ggaggctcagaccattgaggct

RNAi *erm C*
= si *erm*

RNAi *erm A*

RNAi *erm B*

Figure 26 : Positionnement des séquences shRNA et siRNA sur la séquence de l'ADNc du gène *erm* murin.

L'ATG et le codon stop sont encadrés et indiqués en rouge. Les séquences shRNA et siRNA sont indiquées en couleur.

IV- Mise au point de modèles cellulaires de répression de l'expression des facteurs Erm et Pea3

1- Mise en évidence de la répression de l'expression des facteurs Erm et Pea3 par l'utilisation de séquences shRNA

a- Validation de la fonctionnalité des séquences shRNA

Les trois séquences shRNA sélectionnées dirigées contre les ARNm *erm* et les trois séquences sélectionnées dirigées contre ceux de *pea3* ont été dans un premier temps clonées dans le vecteur plasmidique pSuper (Oligoengine). Ce vecteur permet l'expression constitutive des ARN interférents sous forme d'une épingle à cheveux sous contrôle d'un promoteur H1 grâce à l'ARN polymérase de type III.

La fonctionnalité des shRNA est alors testée en transfection transitoire dans les cellules TAC. En effet, les cellules TAC présentent un taux de transfection d'environ 40 à 60%, tandis que les cellules MMT présentent un taux maximal de transfection de 5%. Les cellules MMT ne sont donc pas utilisables dans ce cadre.

La validation de la fonctionnalité des séquences shRNA a été réalisée de trois façons :

- au niveau ARNm par PCR quantitative ou semi-quantitative,
- au niveau protéique (à partir de cellules exprimant les facteurs Pea3 et Erm étiquetés, de façon exogène) par western blot,
- en mesurant l'effet de transactivation des facteurs Pea3 et Erm sur un promoteur « TORU » (Wasylyk et al., 1990) comprenant un motif EBS et cloné dans un vecteur rapporteur comprenant un promoteur SV40.

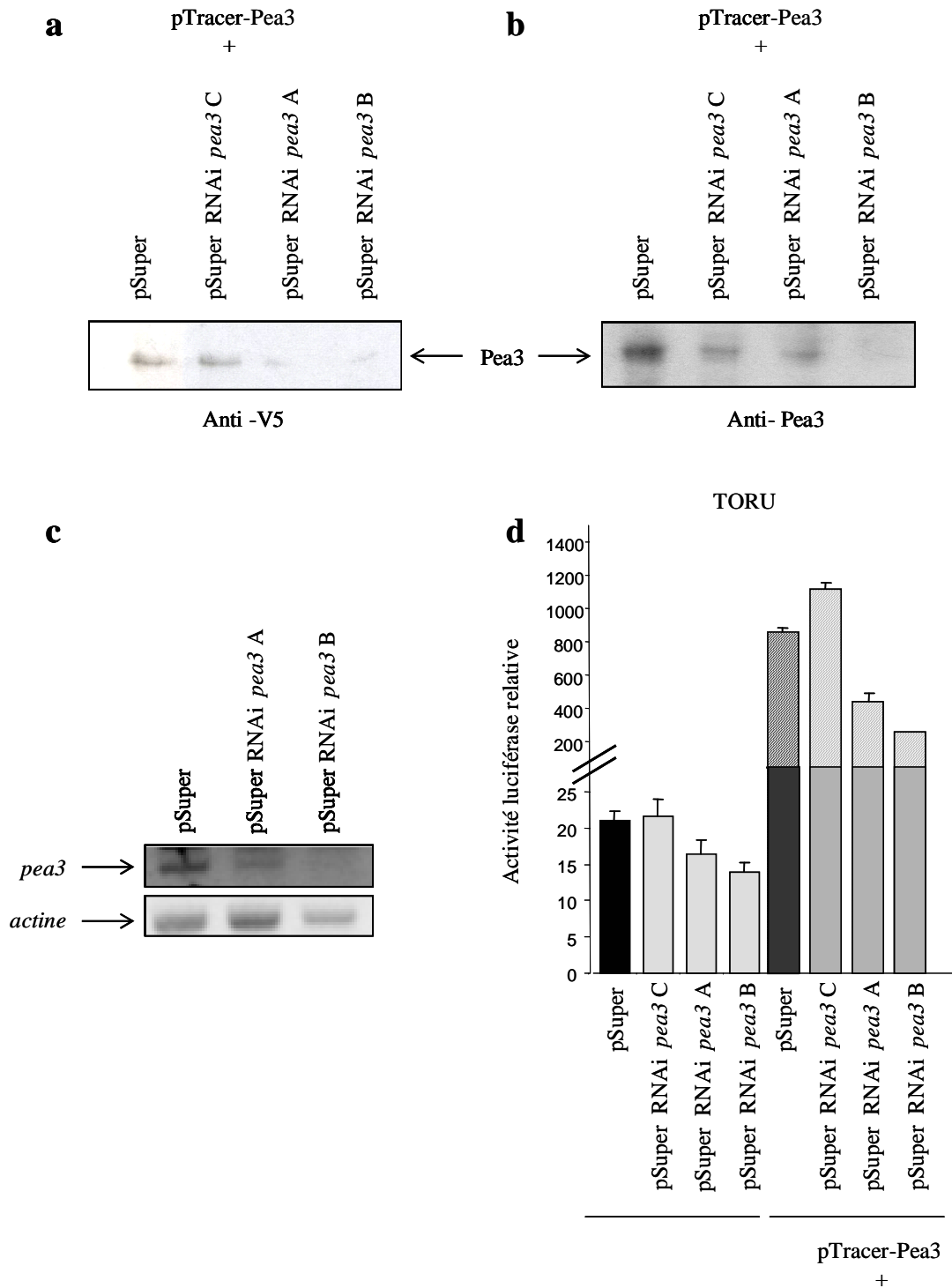


Figure 27 : Validation de la fonctionnalité des séquences ARN interférentes dirigées contre *pea3* par western blot, RT-PCR semi-quantitative et test de transactivation.

Les cellules TAC ont été transfectées de manière transitoire par le vecteur pSuper ou pSuper RNAi *pea3* (c) et le vecteur d'expression pTracer ou pTracer-Pea3 (a, b) ainsi que le vecteur rapporteur « TORU » (d). **a, b, Western blot**, à partir de 20µg de protéines et avec l'anticorps anti-Pea3 (a) ou anti-V5 (b). **c, PCR semi-quantitative**, les ARN extraits de ces cellules ont été utilisés pour amplifier les transcrits *cylophilline* et *pea3*. **d, Test de transactivation**.

- Validation de la fonctionnalité des séquences shRNA dirigées contre *pea3*

- Western blot

Après transfection transitoire des cellules TAC par le vecteur d'expression pTracer-Pea3 et le vecteur pSuper vide ou contenant l'une ou l'autre des séquences shRNA dirigées contre *pea3*, l'expression du facteur Pea3 est vérifiée par western blot de deux manières : soit par l'utilisation d'un anticorps anti-V5 (les protéines Pea3 exogènes sont fusionnées avec l'épitope V5, suite au clonage dans le vecteur pTracer) ou par l'utilisation d'un anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine Pea3.

Les séquences RNAi *pea3* A et B entraînent une diminution drastique de la quantité de protéines Pea3, que ce soit après révélation avec l'anticorps anti-V5 (Figure 27 a) ou après révélation avec l'anticorps anti-Pea3 (Figure 27 b). La séquence RNAi *pea3* C ne réprime que faiblement l'expression protéique de ce facteur de transcription (Figure 27 a et b).

- Test de transactivation

Nous avons voulu confirmer ce résultat en testant la modulation de l'activité transcriptionnelle du promoteur « TORU » après surexpression (colonnes 5 à 8) ou pas (colonnes 1 à 4) du facteur Pea3 (Figure 27 d).

Les cellules TAC ont été transfectées par un vecteur rapporteur contenant le promoteur « TORU » en amont du gène de la luciférase et une construction plasmidique pSuper (vide ou contenant l'une ou l'autre des séquences RNAi *pea3* A, B ou C), en présence ou non du vecteur pTracer-Pea3 (permettant l'expression exogène du facteur Pea3).

Les séquences RNAi *pea3* A et B permettent une diminution de l'activité transcriptionnelle basale du promoteur « TORU » (colonnes 3 et 4 vs colonne 1), mais aussi de l'activité de transactivation du facteur Pea3 (colonnes 7 et 8 vs colonne 5). A contrario, la séquence RNAi *pea3* C ne modifie ni l'activité basale (colonne 2 vs colonne 1) ni l'activité de transactivation par le facteur Pea3 de ce promoteur (colonne 5 vs colonne 4).

-PCR

Les séquences RNAi *pea3* A et B ont été sélectionnées afin de confirmer l'effet de répression au niveau de l'expression des ARN endogènes de *pea3*. Pour cela, les cellules TAC ont été transfectées par le vecteur plasmidique pSuper vide ou contenant l'une ou l'autre des séquences RNAi *pea3* A et B.

L'expression de *pea3* analysée par PCR semi-quantitative, est diminuée de plus de 50% à 70% dans les cellules TAC exprimant les ARN interférents RNAi *pea3* A et B par rapport aux cellules contrôles (Figure 27 c), confirmant les données obtenues en western blot et test de transactivation. L'évaluation quantitative est réalisée par rapport à l'expression de l'*actine*.

Les séquences RNAi *pea3* A et B permettent une répression conséquente de l'expression du facteur Pea3 d'au minimum 50% tant au niveau ARN que protéique dans les cellules TAC transfectées de manière transitoire et dont le taux de transfection est au maximum de 60%. Ces séquences seront celles utilisées dans le reste de l'étude.

• Validation de la fonctionnalité des séquences ARN interférentes dirigées contre *erm*

-Western blot

Après transfection transitoire des cellules TAC par le vecteur d'expression pTracer-Erm et le vecteur pSuper vide ou contenant l'une ou l'autre des séquences shRNA dirigées contre *erm*, l'expression du facteur Erm est vérifiée par western blot. L'expression du facteur Erm ne peut être vérifiée qu'au moyen de l'épitope V5 situé en C-terminal de la protéine Erm exprimée *via* le vecteur plasmidique pTracer. En effet, à l'heure actuelle, nous ne possédons pas d'anticorps fonctionnel pour détecter le facteur Erm dans nos cellules.

La séquence RNAi *erm* C permet une diminution d'environ 80% du taux de la protéine Erm exogène, alors que les séquences RNAi *erm* A et B ne permettent pas une diminution significative (Figure 28a).

-Test de transactivation

Nous avons voulu confirmer ce résultat sur l'activité transactivatrice de Erm au niveau du promoteur « TORU » (Figure 28c), que ce soit au niveau endogène (colonnes 1 à 4) ou au niveau du facteur Erm apporté de façon exogène (colonnes 5 à 8).

Modèles cellulaires de répression de l'expression

Les cellules TAC ont été transfectées par un vecteur rapporteur contenant le promoteur « TORU » en amont de la luciférase et une construction plasmidique pSuper (vide ou contenant l'une ou l'autre des séquences RNAi *erm* A, B ou C), en présence ou non du vecteur pTracer-Erm (permettant l'expression exogène du facteur Erm).

Les séquences RNAi *erm* A et B permettent une répression de l'activité transcriptionnelle basale du promoteur « TORU » d'environ 50% (colonnes 2 et 3 vs colonne 1), et de l'activité de transactivation du facteur Erm sur ce promoteur d'environ 30 à 40% (colonnes 6 et 7 vs colonne 5). La séquence RNAi *erm* C permet de réprimer l'activité transcriptionnelle basale du promoteur d'environ 50% (colonne 4 vs colonne 1), et de l'activité de transactivation du facteur Erm sur ce promoteur de 75% (colonne 8 vs colonne 5).

-PCR

La fonctionnalité de la séquence RNAi *erm* C a été validée au niveau transcriptionnel en testant la répression de l'expression des ARN endogènes de *erm* par PCR quantitative. Les cellules TAC ont été transfectées par le vecteur plasmidique pSuper vide ou contenant la séquence RNAi *erm* C. La répression de l'expression de *erm* est évaluée à environ 35% (Figure 28b).

La séquence RNAi *erm* C permet une bonne répression de l'expression de Erm au niveau ARN, qu'elle soit endogène ou exogène, et protéique. Cette séquence sera utilisée dans le reste de l'étude.

• Conclusion

Après les tests de validation fonctionnelle, nous avons donc sélectionné deux séquences shRNA interférentes pour *pea3* : RNAi *pea3* A et B, et une pour *erm* : RNAi *erm* C.

Ces séquences ont ensuite été clonées dans le vecteur rétroviral pRetroSuper de façon à pouvoir établir *via* les rétrovirus produits, des cellules TAC et MMT ayant intégré de manière stable au génome les constructions rétrovirales contenant les shRNA.

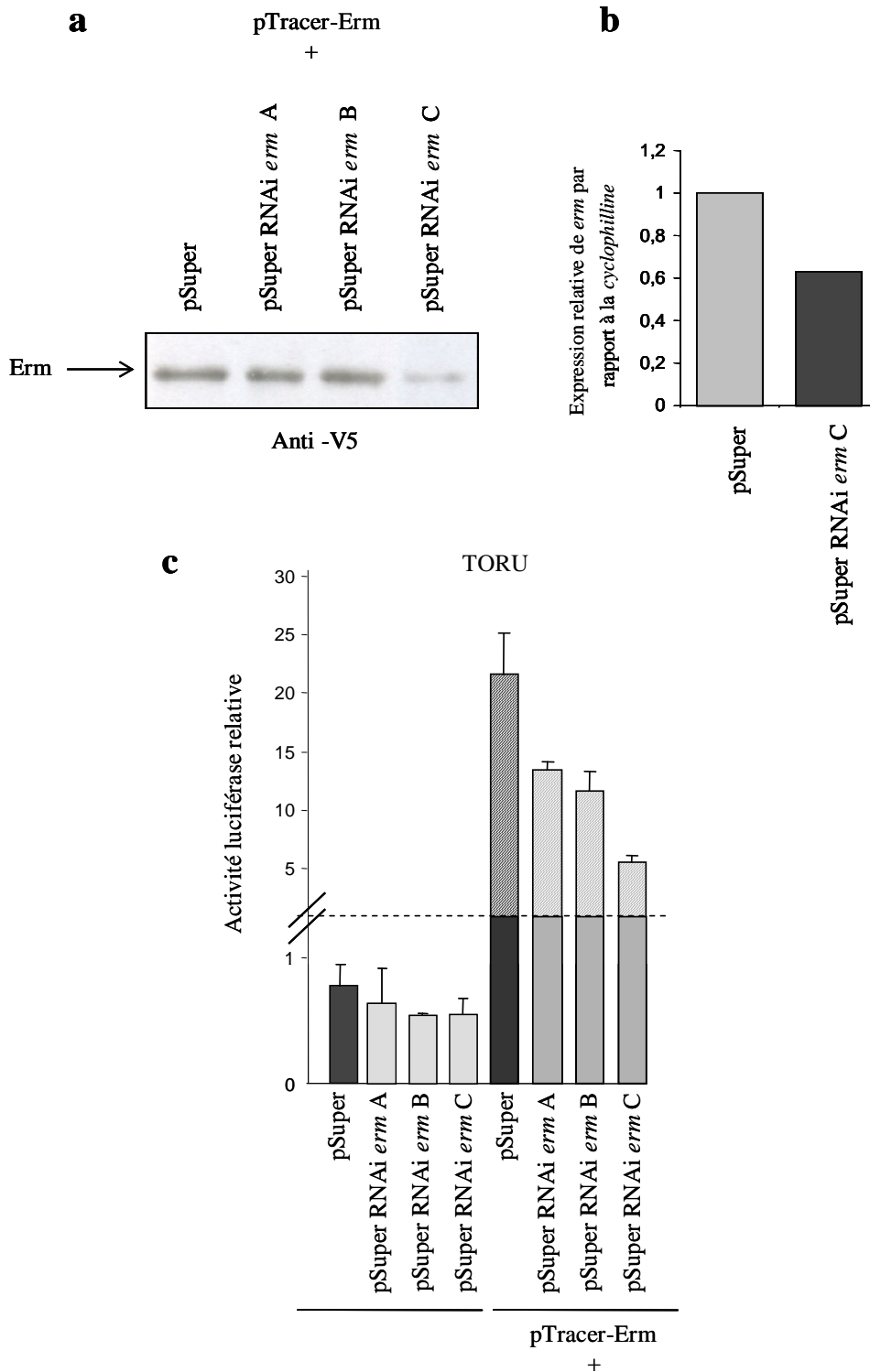


Figure 28 : Validation de la fonctionnalité des séquences ARN interférentes dirigées contre le gène *erm* par western blot, RT-PCR quantitative et test de transactivation.

Les cellules TAC ont été transfectées de manière transitoire par le vecteur pSuper ou pSuper RNAi *erm* (b) et le vecteur d'expression pTracer ou pTracer-Erm (a) ainsi que le vecteur rapporteur « TORU » (c). **a**, Western blot, à partir de 20µg de protéines et avec l'anticorps anti-V5. **b** PCR semi-quantitative, les ARN extraits de ces cellules ont été utilisés pour amplifier les transcrits *cyclophiline* et *erm*. **c**, Test de transactivation.

b- Etablissement de lignées de cellules TAC exprimant de façon stable les shRNA

Les lignées de cellules TAC exprimant de manière constitutive les shRNA dirigés contre *erm* et *pea3* ont été établies à partir des vecteurs rétroviraux pRs RNAi *erm* ou *pea3*.

Pour cela des cellules HEK 293 GP ont été transfectées par ces vecteurs rétroviraux afin de produire le stock viral correspondant qui sera ensuite utilisé pour infecter les cellules TAC. Les cellules ayant intégré de façon stable dans leur génome les différentes constructions rétrovirales sont ensuite sélectionnées à l'aide de la puromycine, amplifiées et congelées pour stockage. Ces différentes lignées ont ensuite été caractérisées après extraction des ARN et des protéines.

Les cellules TAC ont été infectées par les rétrovirus issus du pRetroSuper vide ou du pRetroSuper contenant les séquences RNAi *pea3* A et B, et la séquence RNAi *erm* C. Les lignées obtenues sont appelées TAC Rs, TAC RNAi *pea3* A, TAC RNAi *pea3* B et TAC RNAi *erm* C.

La validation du taux de répression a été réalisée par PCR semi-quantitative et quantitative pour le gène *pea3* et PCR semi-quantitative pour le gène *erm* avec comme référent l'expression du gène *actine* ou *cyclophiline*.

Les cellules TAC RNAi *pea3* A et B présentent une répression d'environ 50% des transcrits *pea3* (Figure 29 a et b). Les cellules TAC RNAi *erm* C présentent une répression de l'expression du gène *erm* d'environ 20% (Figure 29c).

Afin d'essayer d'optimiser le taux de répression de l'expression des facteurs Erm et Pea3, les essais d'infection des cellules TAC par les rétrovirus pRetroSuper RNAi *pea3* A, B et RNAi *erm* C ont été réalisés à plusieurs reprises, de même que des séries de trois infections successives des cellules par les mêmes rétrovirus. En moyenne, les taux de répression obtenus ont toujours été équivalents quelques soient les modalités du protocole d'infection. Les résultats présentés dans la figure 29 sont représentatifs des lignées présentant le meilleur taux de répression et utilisées par la suite.

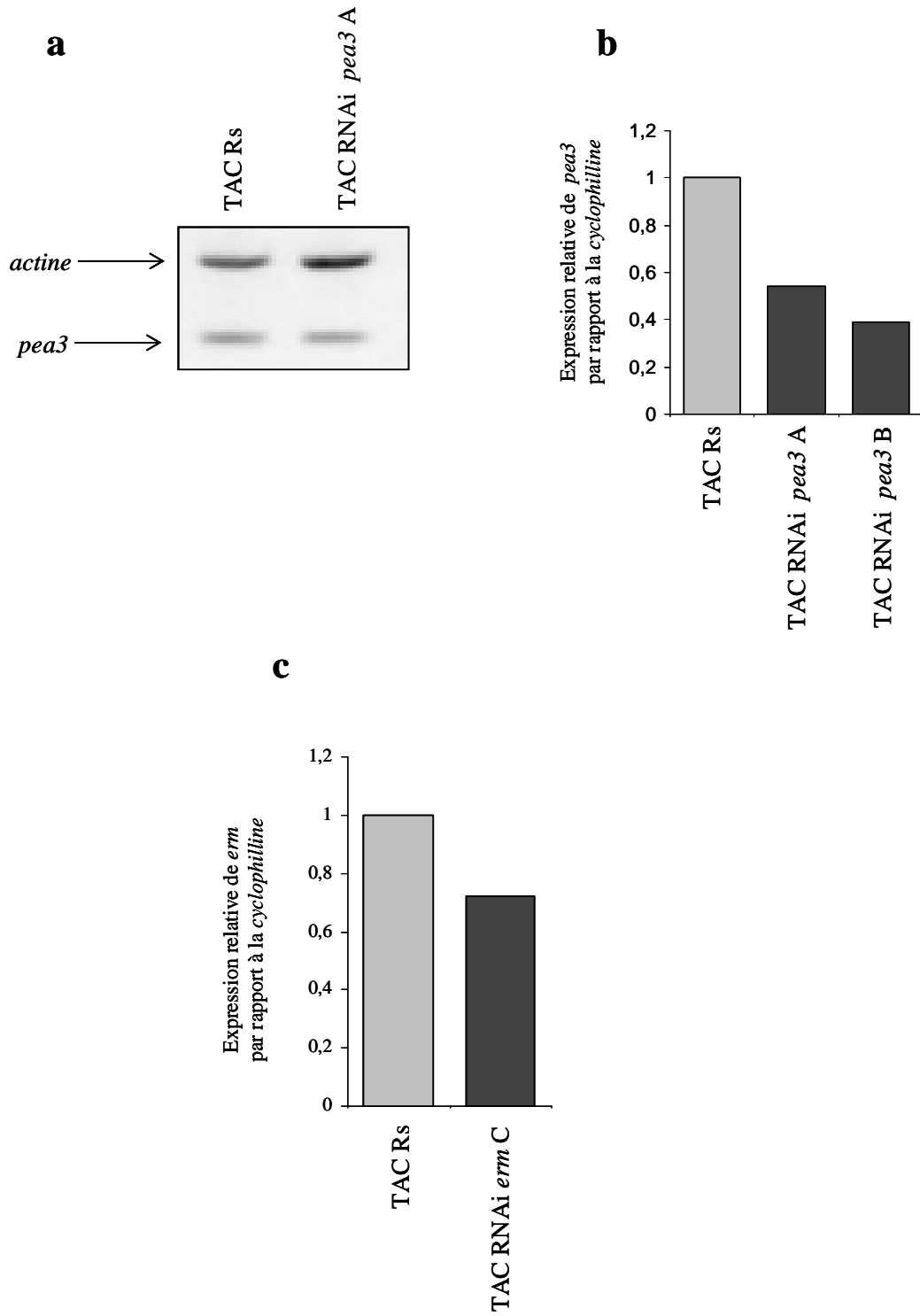


Figure 29 : Caractérisation de l'expression de *pea3* et *erm* dans les lignées TAC Rs, TAC RNAi *pea3* A et B, TAC RNAi *erm* C.

Les RT-PCR ont été réalisées à partir des ARN extraits des cellules TAC RNAi *pea3* A et B, TAC RNAi *erm* C pour amplifier les transcrits de *pea3* et *actine* (a), *pea3* et *cyclophiline* (b), *erm* et *cyclophiline* (c). **a**, PCR semi quantitative. **b**, **c**, PCR quantitative.

c- Etablissement de lignées de cellules MMT exprimant de façon stable les shRNA

Les lignées de cellules MMT exprimant de manière constitutive les shRNA dirigés contre *erm* et *pea3* ont été établies à partir des vecteurs rétroviraux pRs RNAi *erm* ou *pea3*.

Les cellules MMT ont été infectées par les rétrovirus issus du pRetroSuper vide ou du pRetroSuper contenant les séquences RNAi *GFP* (un shRNA contrôle dirigé contre la *GFP*), les séquences RNAi *pea3* A et B, ou la séquence RNAi *erm* C selon le même protocole que pour les cellules TAC (paragraphe IV-1-b).

Les lignées obtenues sont appelées :

- MMT Rs, MMT RNAi *GFP*, MMT RNAi *pea3* A, MMT RNAi *pea3* B et MMT RNAi *erm* C,
- MMT Rs/Rs, MMT RNAi *pea3* A/ RNAi *erm* C (lignées issues de deux infections successives : la lignée MMT Rs par le rétrovirus pRs et la lignée MMT RNAi *pea3* A par le rétrovirus pRs RNAi *erm* C).

Comme pour les cellules TAC, les infections ont été faites à plusieurs reprises, et sont présentés ici les résultats obtenus pour les lignées présentant les plus fortes inhibitions constitutives de l'expression de *pea3* et *erm*. Des essais d'infections successives ont été menés et ne nous ont pas permis d'améliorer le taux de répression de chacun de ces deux facteurs.

• MMT RNAi *pea3* A et MMT RNAi *pea3* B

L'expression des ARNm de *pea3*, testée en PCR semi-quantitative par rapport au gène référent *36B4* (Figure 30a) ou quantitative par rapport au gène référent *cyclophiline* (Figure 30b) montre une inhibition de l'ordre de 50% pour la lignée MMT RNAi *pea3* A et de 60% pour la lignée MMT RNAi *pea3* B par rapport aux MMT contrôles (MMT Rs et MMT RNAi *GFP*).

L'analyse par western blot de la figure 30c montre une répression de l'expression de la protéine Pea3 d'environ 50-60% pour les lignées MMT RNAi *pea3* A et B par rapport au contrôle Actine, confirmant ainsi les données concernant les transcrits.

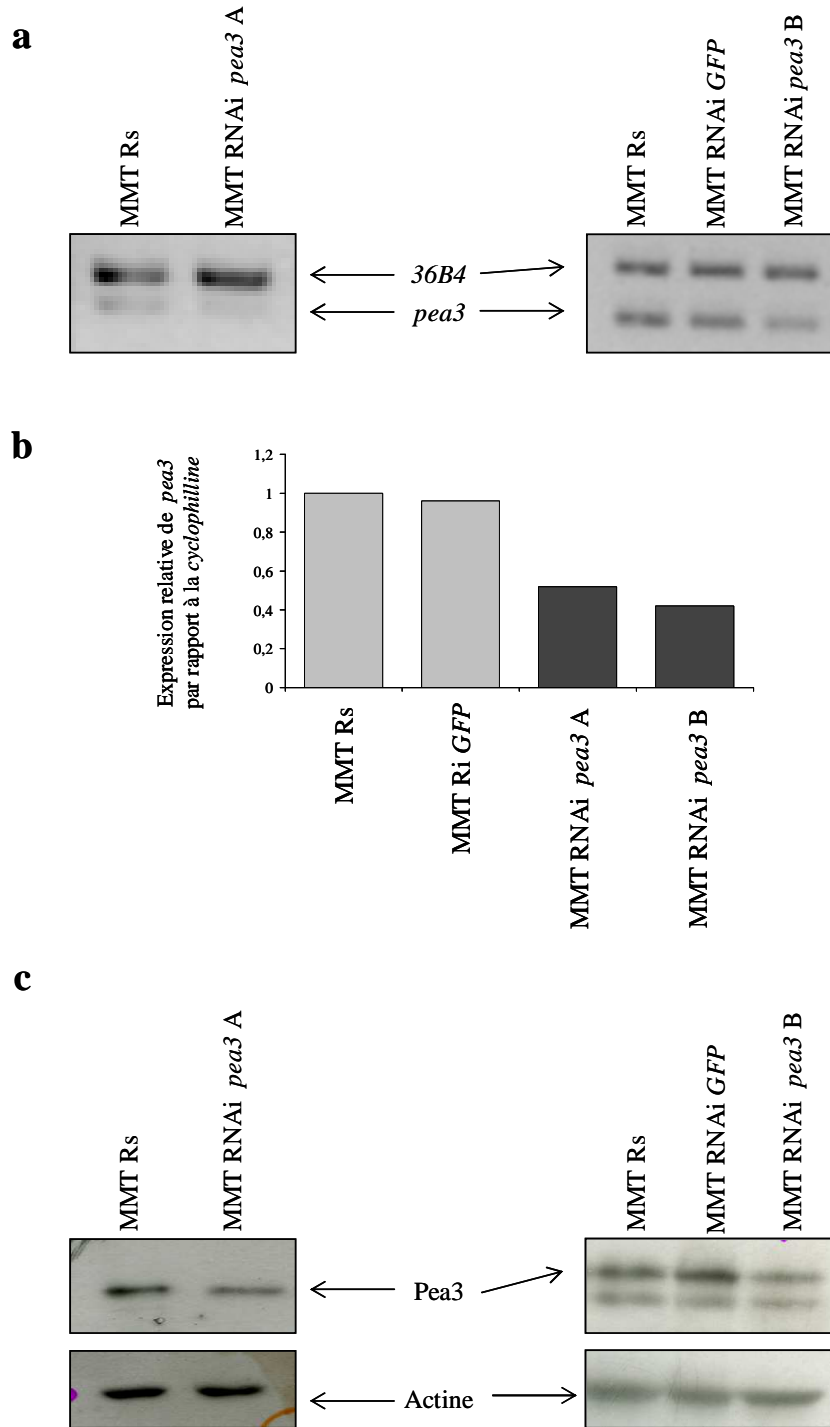


Figure 30 : Caractérisation de l'expression de *pea3* dans les cellules MMT Rs, RNAi GFP, RNAi *pea3* A et B.

a, b. Les RT-PCR ont été réalisées à partir des ARN extraits des cellules MMT Rs, MMT RNAi GFP et MMT RNAi *pea3* A et B, pour amplifier les transcrits de *pea3* et *36B4* (a), *pea3* et *cyclophiline* (b). **a, PCR semi quantitative. b, PCR quantitative. c, Western blot,** à partir de 20µg de protéines extraites de ces cellules et avec un anticorps anti-Pea3 ou anti-Actine.

- MMT RNAi *erm C*

L'expression des transcrits *erm* de la lignée MMT RNAi *erm C* réalisée par PCR semi-quantitative (Figure 31a) et par PCR quantitative (Figure 31b) par rapport au référent *cyclophiline*, montre une inhibition de l'expression de *erm* d'environ 40%. La validation au niveau protéique n'a pu être réalisée faute d'un anticorps fonctionnel dans nos modèles.

- MMT RNAi *pea3 A/ erm C*

L'expression de *erm* et *pea3* dans les lignées doublement infectées MMT Rs/Rs et MMT RNAi *pea3 A/ erm C* a été réalisée par PCR quantitative par comparaison au gène référent *36B4* (Figure 32a [*pea3*] et b [*erm*]) et PCR semi-quantitative par rapport au référent *cyclophiline* (Figure 32c).

Une répression de l'expression de *pea3* comme celle de *erm* est d'environ 50% dans la lignée MMT RNAi *pea3 A/ erm C* par rapport à la lignée contrôle.

Malgré un taux de répression évalué au maximum à 50-60%, ces différentes lignées ont été utilisées dans les différents tests morphogénétiques *in vitro* et *in vivo* décrits ultérieurement.

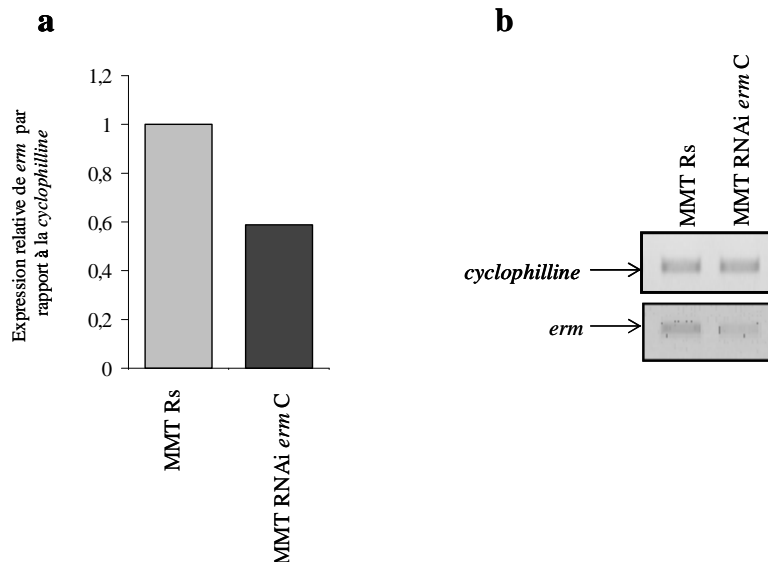


Figure 31 : Caractérisation de l'expression de *erm* dans les lignées MMT Rs et MMT RNAi *erm C*.

Les RT-PCR ont été réalisées à partir des ARN extraits des cellules MMT Rs et MMT RNAi *erm C* pour amplifier les transcrits de *erm* et *cyclophilin*. **a**, PCR quantitative. **b**, PCR semi-quantitative.

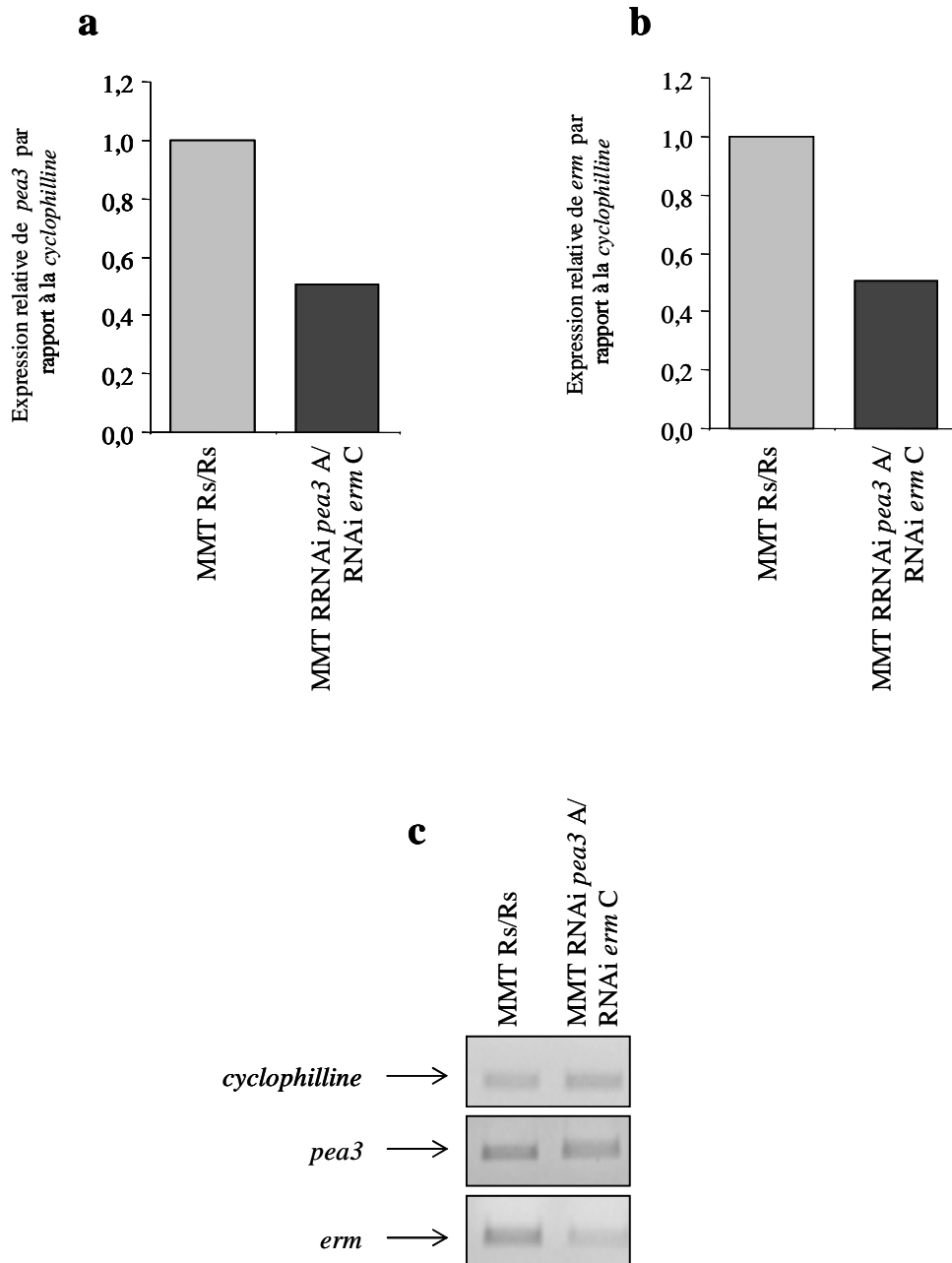


Figure 32 : Caractérisation de l'expression de *pea3* et *erm* dans les cellules MMT Rs/Rs et MMT RNAi *pea3 A* / *erm C*.

Les RT-PCR ont été réalisées à partir des ARN extraits des cellules MMT Rs/Rs et MMT RNAi *pea3 A* / RNAi *erm C* pour amplifier les transcrits de *pea3* et *cyclophiline* (a), *erm* et *cyclophiline* (b) ou *pea3*, *erm* et *cyclophiline* (c). **a, b**, PCR quantitative. **c**, PCR semi-quantitative.

2- Mise en évidence d'une répression de l'expression des facteurs Erm et Pea3 par l'utilisation d'oligonucléotides siRNA

La stratégie utilisant les oligonucléotides siRNA a été envisagée suite au taux d'inhibition d'au maximum 60% obtenu *via* les lignées shRNA *pea3* et *erm*, dans le but d'obtenir des cellules dont le taux de répression est plus important. Cette alternative siRNA est utilisable pour des expériences menées à court terme, comme certains tests morphogénétiques n'excédant pas une semaine de durée et pour les expériences menées dans le cadre de la recherche des gènes cibles des facteurs Erm et Pea3.

a- Validation de la fonctionnalité des oligonucléotides siRNA *pea3* et *erm* dans les cellules TAC

Les cellules TAC ont été transfectées de manière transitoire avec les siRNA dirigés contre *pea3* (*pea3* 1 et 2) et *erm* préalablement définis.

La validation du taux de répression a été réalisée par PCR semi-quantitative et quantitative pour le gène *pea3* et PCR quantitative pour le gène *erm* en utilisant comme référent le gène *cyclophiline* ou *36B4*.

Nous mettons en évidence que les siRNA *pea3* 1 et 2 entraînent une diminution de la quantité d'ARNm de *pea3* d'environ 98% (Figure 33a et c). L'analyse au niveau protéique n'a pu être obtenue car les anticorps dont nous disposons ne permettent pas de mettre en évidence la protéine Pea3 endogène dans les cellules TAC.

Le siRNA dirigé contre *erm* permet une diminution de 80% de la quantité d'ARNm de *erm* (Figure 33b). L'analyse protéique n'a pu être menée faute d'un anticorps anti-Erm fonctionnel dans notre modèle cellulaire.

Ces siRNA *pea3* 1-2 et *erm* ont été utilisés dans les cellules TAC dans le cadre de l'étude de nouveaux gènes cibles des facteurs du groupe Pea3 et d'études phénotypiques *in vitro*.

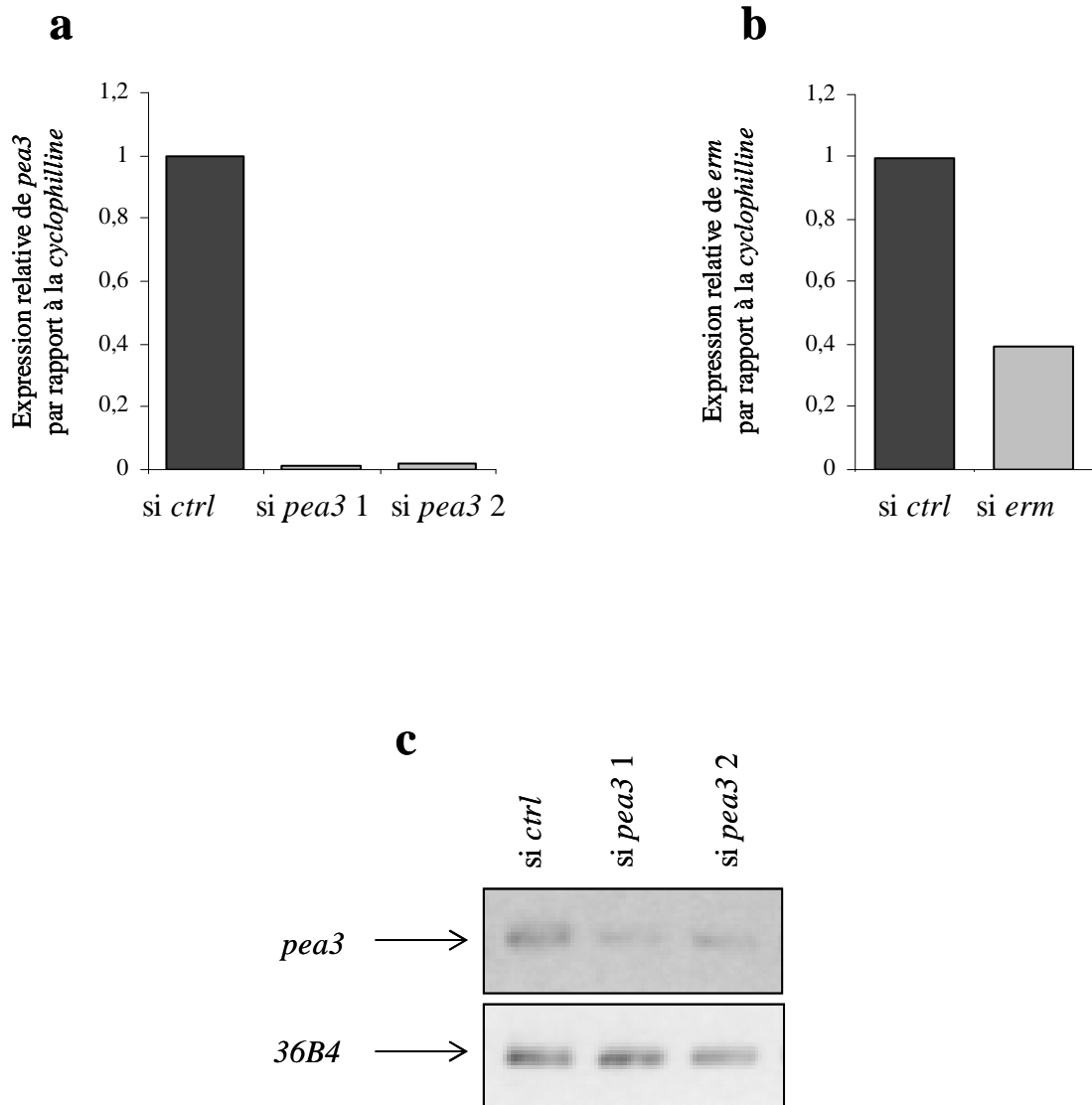


Figure 33 : Caractérisation de l'expression de *pea3* et *erm* dans les cellules TAC transfectées par des siRNA dirigés contre *pea3* et *erm*.

Les RT-PCR ont été réalisées à partir des ARN extraits des cellules TAC transfectées par les siRNA si *ctrl*, si *pea3* 1, si *pea3* 2 ou si *erm* pour amplifier les transcrits de *pea3* et *cyclophilin* (a), *erm* et *cyclophilin* (b) ou *pea3* et *36B4* (c). **a, b, PCR quantitative. c, PCR semi-quantitative.**

b- Validation de la fonctionnalité des siRNA dans les cellules MMT

Les cellules MMT ont été transfectées de manière transitoire avec les siRNA dirigés contre *pea3* et *erm* décrits précédemment, de façon à contrôler la fonctionnalité des siRNA dans ces cellules.

La validation du taux de répression a été réalisée par PCR semi-quantitative et quantitative pour les gènes *pea3* et *erm* avec comme référent le gène *cyclophiline*, et par western blot pour le facteur Pea3.

L'analyse par PCR quantitative de l'expression de *pea3* montre que pour un taux de transfection de 70 à 80% dans les MMT, les deux siRNA dirigés contre *pea3* sont capables de diminuer la quantité d'ARN de 70% (si *pea3* 2) à 80% (si *pea3* 1) (Figure 34a et b). La diminution observée au niveau ARN est retrouvée au niveau protéique en western blot pour les deux siRNA *pea3* dans les mêmes proportions que pour l'ARN (Figure 34e).

Pour un même taux de transfection, quand les MMT ont été transfectées par le siRNA *erm*, nous observons une diminution de la quantité d'ARNm *erm* de 80% (Figure 34c et d). Nous n'avons pas pu tester la diminution au niveau protéique faute d'anticorps performant.

Ces siRNA si *pea3* 1 et 2 et si *erm* ont ensuite été utilisés dans l'étude du comportement *in vitro* de cellules dont l'expression des facteurs Pea3 et Erm est inhibée par ARN interférence et dans l'étude de nouveaux gènes cibles des facteurs du groupe PEA3.

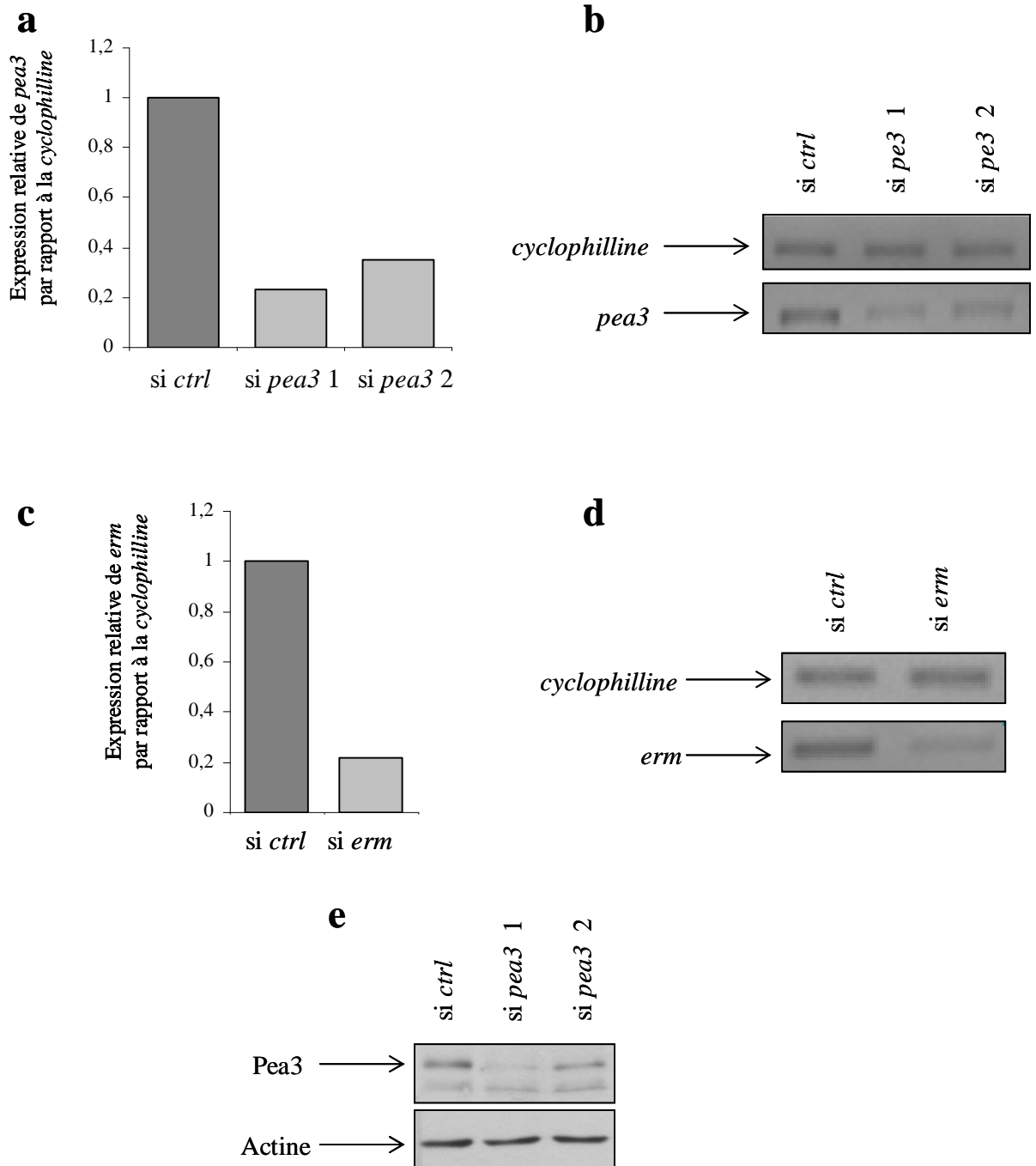


Figure 34 : Caractérisation de l'expression de *pea3* et *erm* dans les cellules transfectées MMT par des siRNA dirigés contre *pea3* et *erm*.

a, b, c, d, les RT-PCR ont été réalisées à partir des ARN extraits des cellules MMT transfectées par les siRNA si *ctrl*, si *pea3* 1, si *pea3* 2 ou si *erm* pour amplifier les transcrits de *pea3* et *cyclophiline* (a, b), *erm* et *cyclophiline* (c, d). **a, c**, PCR quantitative. **b, d**, PCR semi-quantitative. **e**, Western blot à partir de 40µg de protéines extraites de ces cellules et avec un anticorps anti-Pea3 ou anti-Actine.

V- Etude du rôle des facteurs du groupe PEA3 sur le phénotype des cellules mammaires

Cette étude du rôle des facteurs de transcription Erm et Pea3 a été initiée dans les cellules TAC et MMT, à partir des modèles d'inhibition de leur expression mis au point, sur la base d'analyses phénotypiques réalisées *in vitro* et *in vivo*.

Les modèles suivants ont été utilisés :

- les cellules TAC et MMT dont l'expression des facteurs Erm et Pea3 est inhibée de manière transitoire par l'intermédiaire des siRNA. Le taux de répression a été contrôlé au cours du temps et perdure au moins jusque 96h post-transfection (50% d'inhibition à 96h),
- les lignées MMT exprimant de manière constitutive et stable des shRNA dirigés contre les gènes *erm* et *pea3*.

Dans la présentation suivante, seuls les résultats concernant les cellules MMT seront détaillés. En effet, les expériences menées avec les cellules TAC n'ont pas donné de résultats exploitables.

1 - Facteurs du groupe Pea3 et prolifération cellulaire

L'analyse de la prolifération cellulaire a été réalisée par comptage des cellules à différents temps de culture. Les cellules MMT transfectées par les différents siRNA ou les lignées de cellules MMT shRNA sont ensemencées de façon équivalente et comptées toutes les 24h à l'aide d'un compteur de cellules, jusqu'à obtention de la confluence des cellules (entre 3 et 4 jours).

a- MMT siRNA

Les cellules transfectées avec les siRNA *pea3* 1 et 2 comme le siRNA *erm* prolifèrent moins vite que les cellules transfectées par un siRNA contrôle. La diminution est de 40 à 50% (Figure 35).

Ces expériences ont été réalisées 4 fois en triplicat avec les si *pea3* 1 et 2, et 3 fois avec le si *erm*.

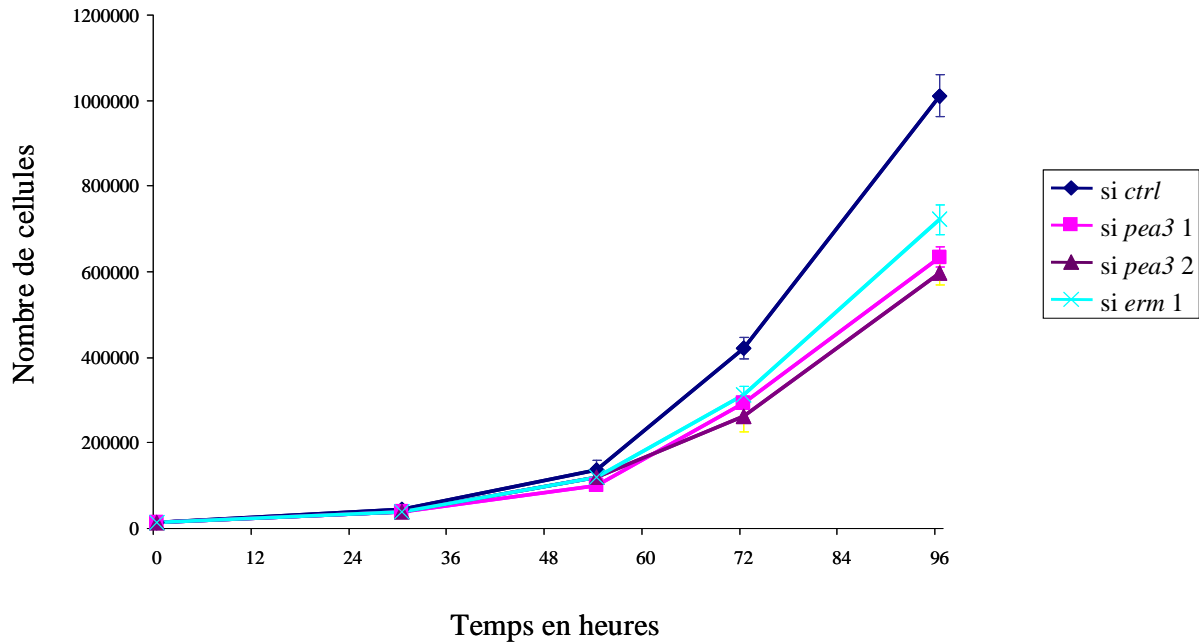


Figure 35 : Analyse de la prolifération cellulaire des cellules MMT transfectées par les siRNA dirigés contre *erm* et *pea3* par comptage des cellules.

Les MMT transfectées par les siRNA si *ctrl*, si *pea3* 1 et 2 ou si *erm* sont comptées pour suivre leur croissance. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne des valeurs de comptage +/- la déviation standard.

b- MMT shRNA

Les résultats présentés dans la figure 36 montrent que les cellules MMT RNAi *pea3* A (Figure 36a) comme les cellules MMT RNAi *pea3* B (Figure 36b) ont une capacité de prolifération diminuée d'environ 40% par rapport aux cellules contrôles. Cette expérience a été réalisée en triplicat et reproduite 3 fois.

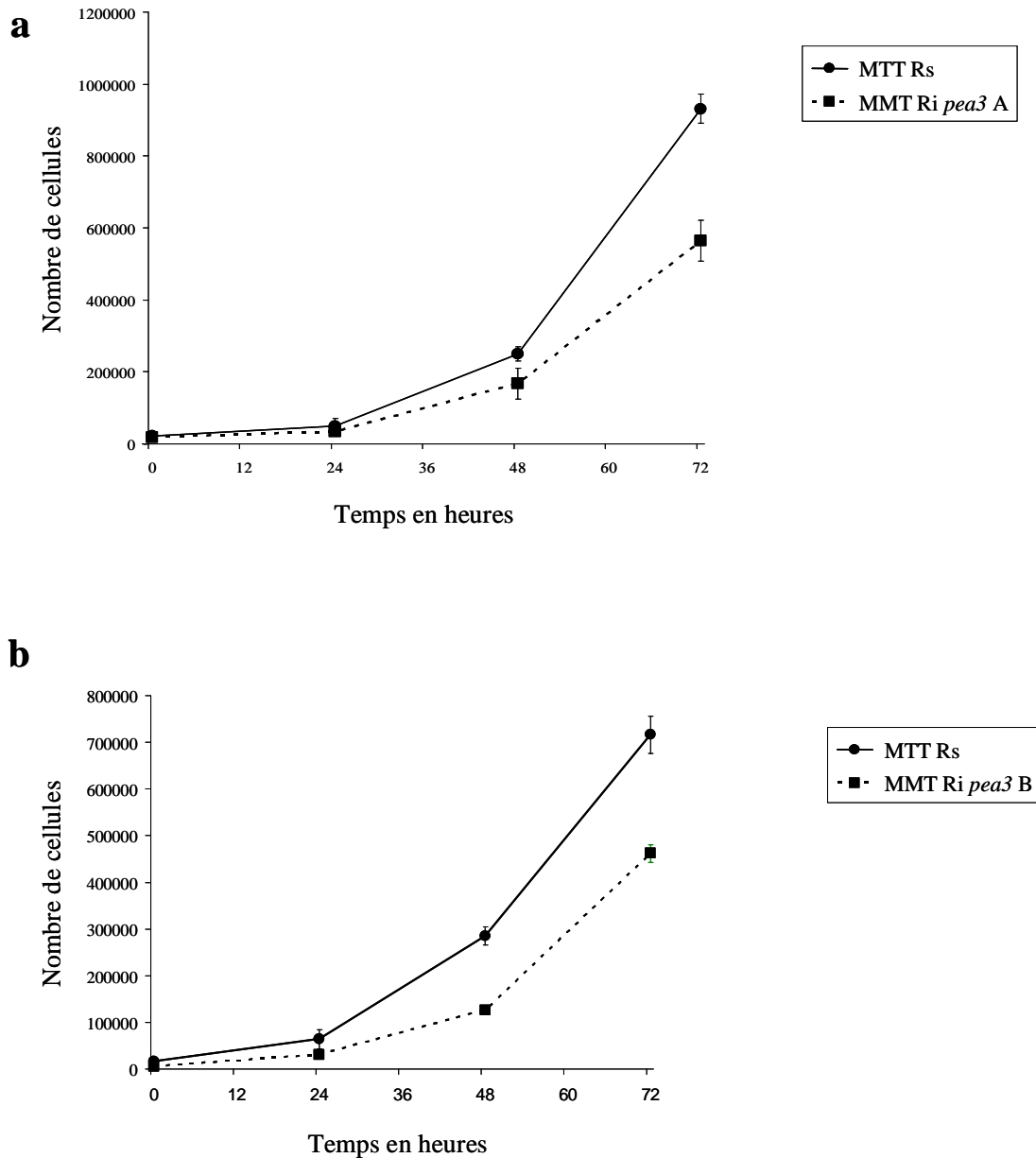


Figure 36 : Analyse de la prolifération cellulaire des lignées MMT RNAi *pea3* A et B par comptage des cellules.

Les cellules MMT Rs et MMT RNAi *pea3* A (a) ou MMT RNAi *pea3* B (b) sont comptées toutes les 24h. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne des valeurs de comptage +/- la déviation standard.

2- Facteurs du groupe PEA3 et migration cellulaire

Parallèlement, nous avons entrepris de comparer la capacité de migration des cellules MMT à travers une membrane microporée. Les cellules MMT transfectées par les différents

siRNA ou les lignées de cellules MMT shRNA sontensemencées dans la chambre supérieure d'une chambre de Boyden et du milieu de culture est ajouté dans la chambre inférieure. Après 18h de culture, les cellules se trouvant sur la partie supérieure sont éliminées à l'aide d'un coton tige. Les cellules ayant eu la capacité de la traverser la membrane sont comptées après fixation et coloration. Le comptage a été réalisé sur plusieurs champs de la membrane.

a- MMT siRNA

Les cellules transfectées préalablement par les différents types de siRNA (si *ctrl*, si *pea3* 1, si *pea3* 2 et si *erm*) sontensemencées dans une chambre de Boyden sur la membrane microporée.

Les résultats présentés dans la figure 37 (a et b) montrent que les cellules transfectées par les siRNA dirigés contre *pea3*, comme *erm*, ont une capacité de migration à travers la membrane diminuée d'environ 70 à 80% par rapport au contrôle et ce de façon statistiquement représentative. Ces résultats sont représentatifs des différentes expériences qui ont été reproduites 10 fois pour les si *pea3* 1, 6 fois pour si *pea3* 2 et pour si *erm*.

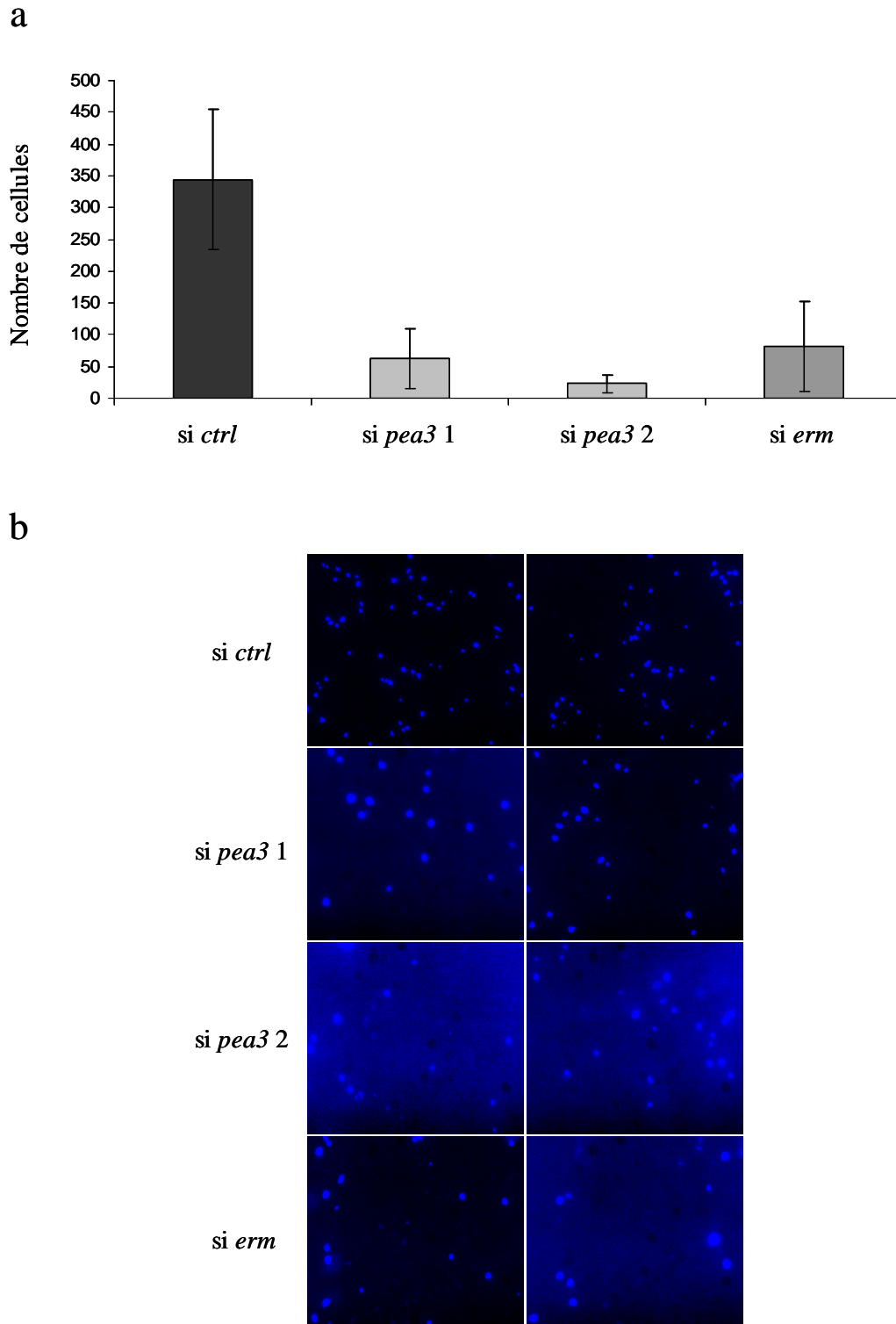


Figure 37 : Analyse de la capacité de migration à travers une membrane microporée des cellules MMT transfectées par les siRNA dirigés contre *pea3* et *erm*.

a, Histogramme représentatif du comptage des cellules ayant traversé les membranes microporées.

b, Photos des membranes microporées.

Les MMT transfectées par les si *ctrl*, si *pea3 1* et 2 ou si *erm* sont ensemencées sur la partie supérieure d'une membrane microporée. Après 18h, les cellules ayant traversé la membrane microporée sont comptées après fixation et coloration au Hoechst.

b- MMT shRNA

Les mêmes expériences menées avec les lignées MMT RNAi *pea3* A et MMT RNAi *pea3* B montrent qu'elles possèdent une capacité de migration à travers la membrane diminuée d'environ 50% par rapport aux cellules contrôles (Figure 38).

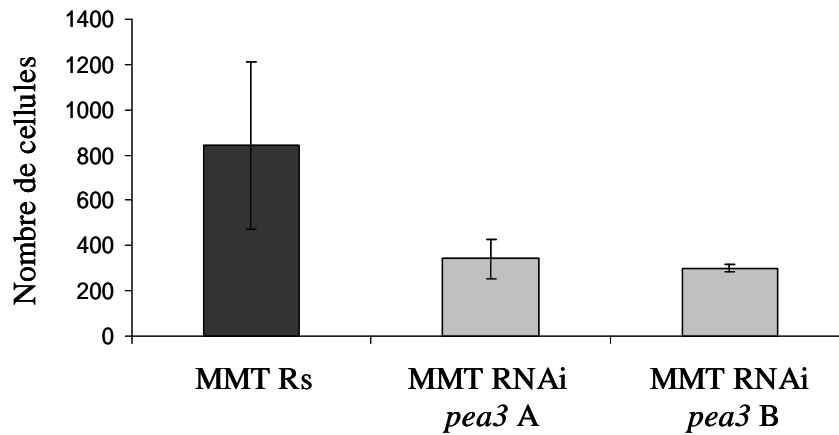


Figure 38 : Analyse de la capacité de migration à travers une membrane microporée des lignées MMT RNAi *pea3* A et B.

Les cellules MMT Rs, RNAi *pea3* A et RNAi *pea3* B sont ensemencées sur la partie supérieure d'une membrane microporée. Après 18h, les cellules ayant traversé la membrane microporée sont comptées après fixation et coloration au Hoechst.

3- Facteurs du groupe PEA3 et potentiel invasif

La capacité d'invasion des cellules MMT et sa modulation par les facteurs Erm et Pea3 a été appréhendée par des expériences utilisant la culture tridimensionnelle des cellules dans un gel reconstitué (gel de collagène ou Matrigel®). Les cellules ensemencées dans ces gels tridimensionnels vont former des structures présentant une « morphogenèse » avec des branchements (illustration figures 39a, b, c et 40, colonne contrôle).

Les différents modèles de répression de l'expression des facteurs Pea3 et Erm ont été utilisés dans cette étude, mais seuls sont présentés les résultats concernant les MMT siRNA, les expériences menées avec les MMT shRNA n'ayant pas donné de résultats exploitables.

a- Culture en Matrigel®

Les cellules MMT transfectées par les si *erm*, si *pea3* 1, si *pea3* 2 ou par un siRNA contrôle, sont mises en culture dans le Matrigel® 24h après la transfection. Les cellules sont maintenues en culture pendant 7 jours en présence ou non d'HGF à 20ng/ml puis colorées et analysées (Figures 39a, b, c).

Diverses expériences ont été menées et ont donné des résultats reproductibles. Les photos proviennent du résultat des deux expériences indépendantes suivantes:

- expérience n°1 : MMT si *ctrl*, si *erm* et si *pea3* 1 (Figure 39a, b)
- expérience n°2 : MMT si *ctrl*, si *erm* et si *pea3* 2 (Figure 39c)

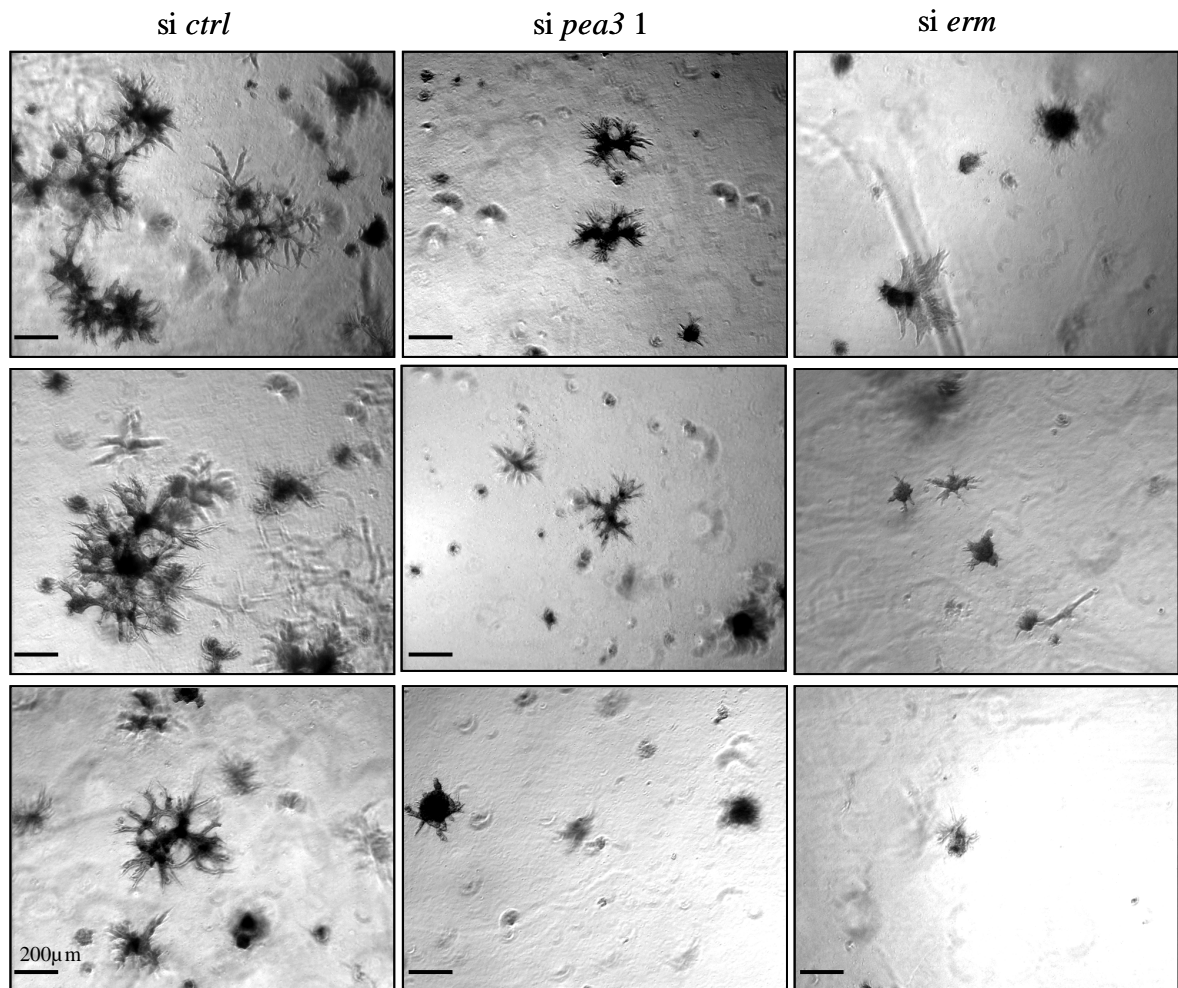
Les cellules MMT transfectées par un siRNA contrôle présentent des arborescences typiques que peuvent former les cellules MMT cultivées en gel tridimensionnel : les cellules s'organisent entre elles et forment des branchements mimant une « morphogenèse épithéliale » (Figure 39a, b, c, colonne 1). Les cellules MMT transfectées par les siRNA si *pea3* 1 et 2 ou si *erm* perdent en grande partie la capacité de produire des structures organisées (Figure 39a, b, c, colonnes 2 et 3).

b- Culture tridimensionnelle en gel de collagène

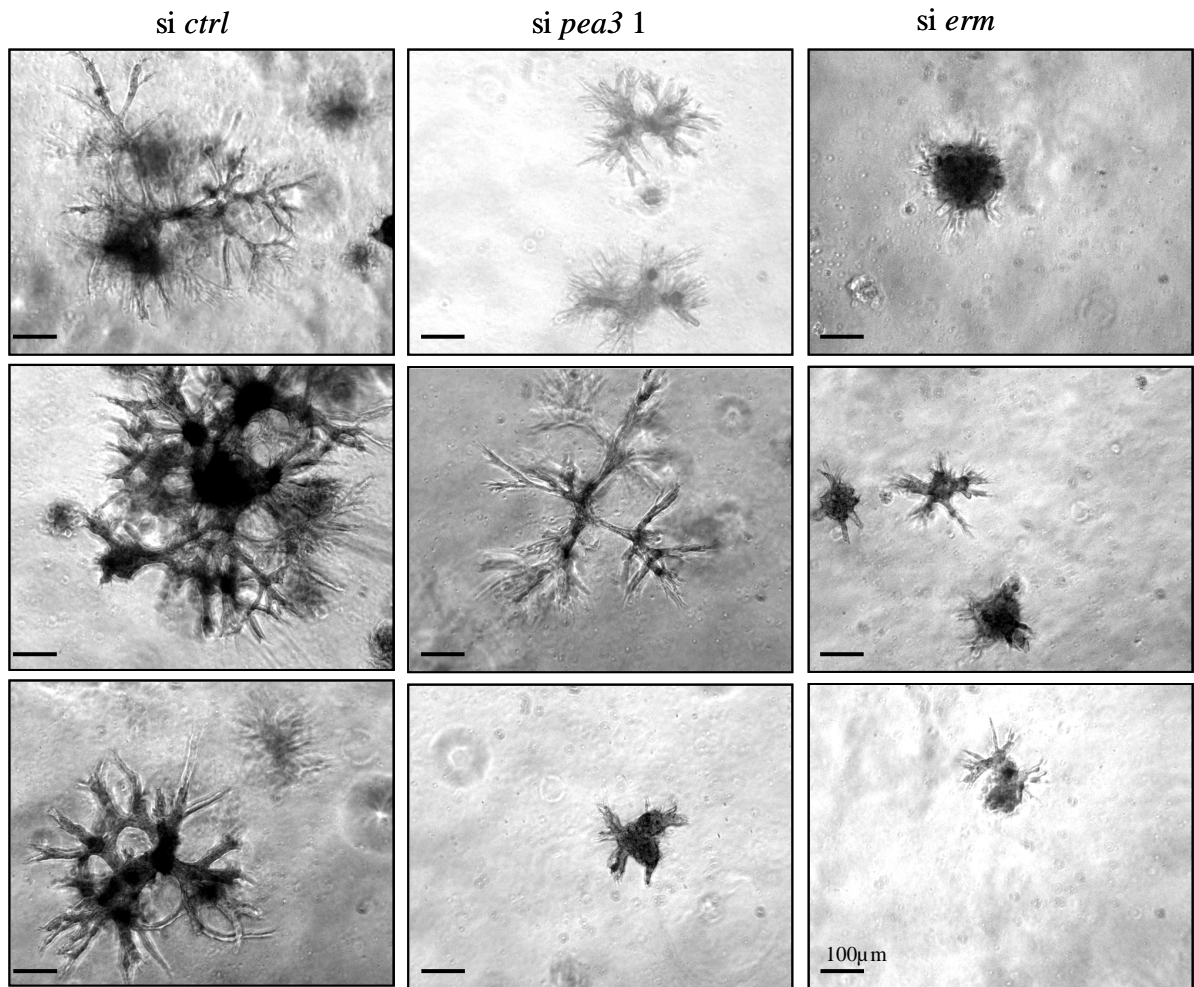
Les cellules MMT transfectées la veille par le siRNA *pea3* 1 ou siRNA *ctrl* ont étéensemencées en « micromasses » entre deux gels de collagène et cultivées pendant 7 jours en présence ou non d'HGF puis colorées et analysées (Figure 40).

Les MMT si *ctrl* ainsi mises en culture en gel de collagène présentent des structures caractéristiques qui se forment à la périphérie de la masse cellulaire centrale. Ces cellules s'organisent et forment une arborescence évoluant en trois dimensions, comme illustré dans la figure 40 (b et c, deux structures 3D observées au grossissement X100 sont présentées). Sur une photo d'un grossissement moins important (Figure 40a, grossissement X50), ces structures apparaissent comme des zones denses (voir flèches). Quand ces cellules ont été transfectées avec un siRNA dirigé contre *pea3*, ces zones denses ne sont pas visibles. Peu de structures se forment autour de la masse et ces structures apparaissent nettement moins développées (Figure 40d et e ; l'illustration f correspond à l'une des rares structures observables dans cette condition expérimentale).

a



b



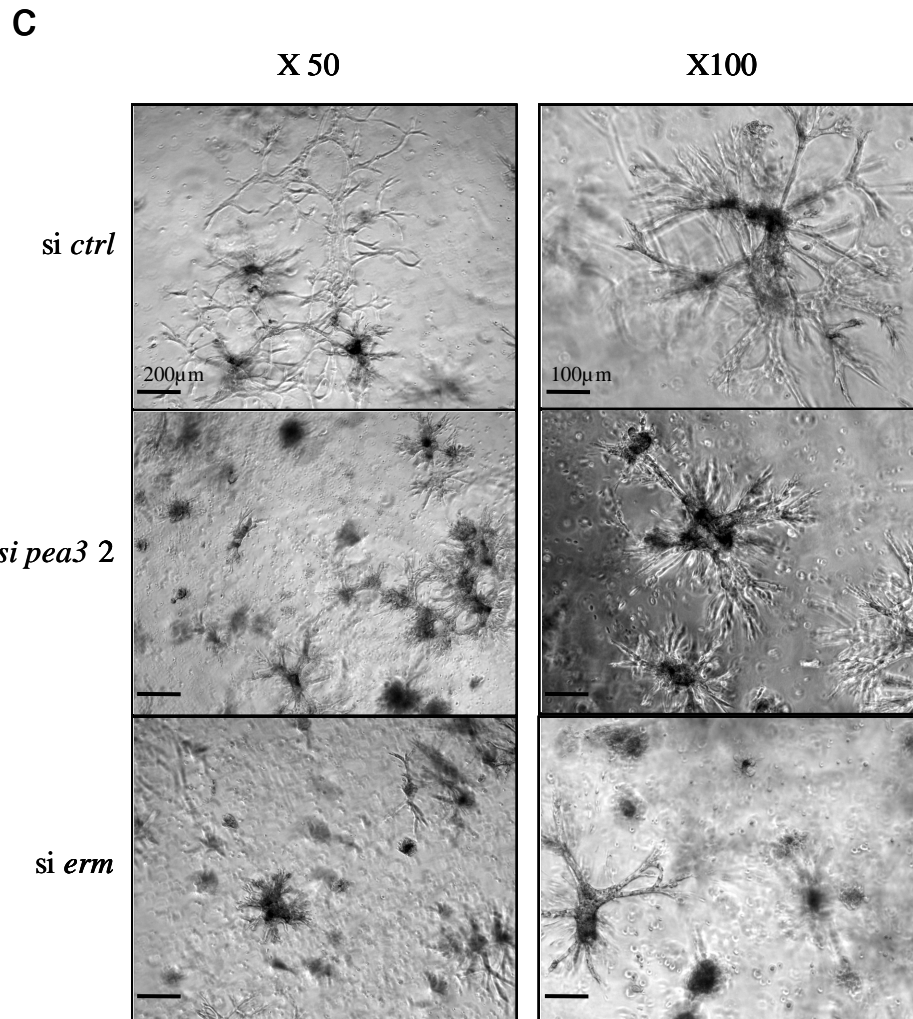


Figure 39 : Etude du comportement morphogénétique des cellules MMT transfectées par des siRNA dirigés contre *erm* et *pea3* et cultivées en Matrigel®.

Les cellules MMT transfectées par les siRNA *si ctrl*, *si pea3 1* (a, b), *si pea3 2* (c) ou *si erm* (a, b, c) sont mises en culture en Matrigel® en présence d'HGF à 20 ng/ml. Les vues sont prises grâce à un microscope et agrandies 50 (a, c) ou 100 fois (b, c).

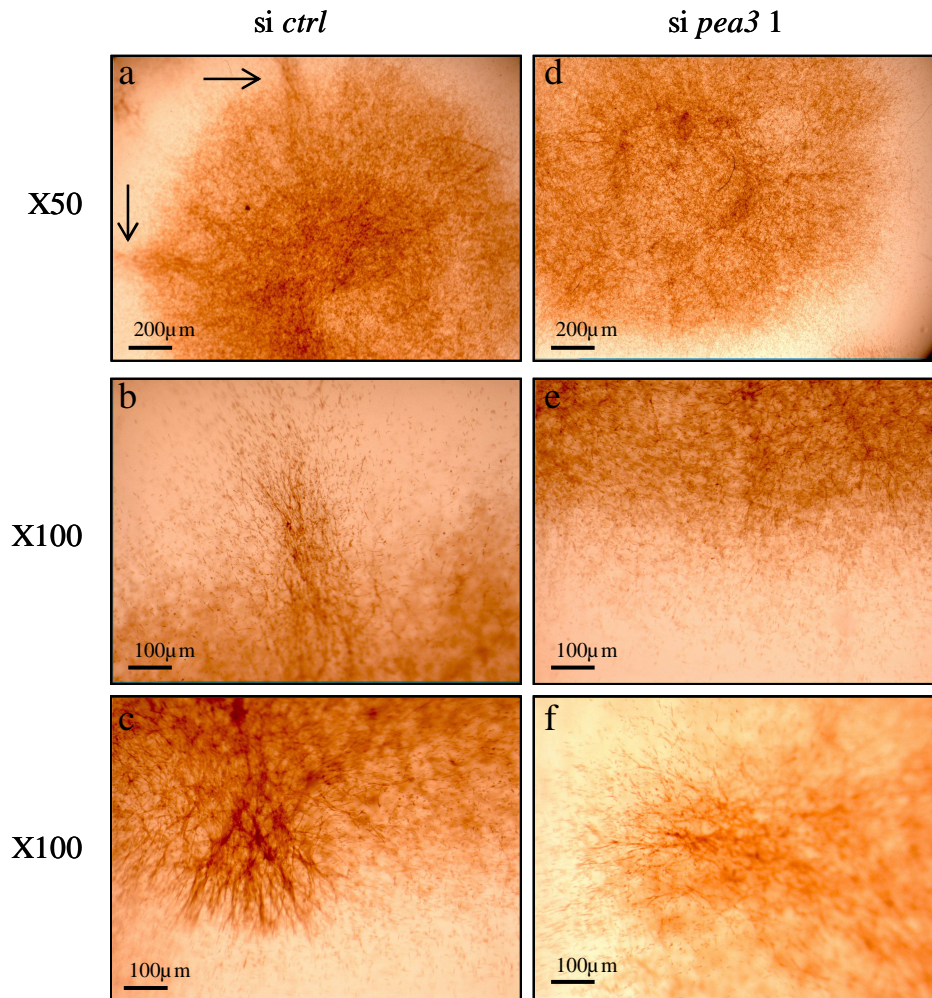


Figure 40 : Etude du comportement morphogénétique des cellules MMT transfectées par des siRNA dirigés contre *erm* et *pea3* et cultivées en gel de collagène.

Les cellules MMT transfectées par un siRNA contrôle, ou dirigé contre *pea3* sont mises en culture dans un gel de collagène en présence d'HGF à 20ng/ml. Les vues sont prises grâce à un microscope et agrandies 50 ou 100 fois.

En conclusion, la répression de l'expression des facteurs Pea3 et Erm dans les cellules MMT leur confère des capacités de prolifération, migration et morphogénétiques nettement diminuées par rapport aux cellules contrôles, dans les tests réalisés *in vitro*.

4- Mise en évidence *in vivo* du rôle des facteurs du groupe PEA3 dans la tumorigenèse mammaire

Pour conforter les résultats obtenus *in vitro*, montrant le rôle potentiel des facteurs Erm et Pea3 dans les processus cellulaires (migration, prolifération, invasion) participant à la cancérogenèse cellulaire, nous avons étudié le comportement des cellules MMT modulées pour l'expression des facteurs Erm et Pea3 *in vivo* chez la souris.

Les cellules utilisées dans ce cadre sont les lignées de cellules MMT exprimant de manière constitutive les ARN interférents dirigés contre *erm* ou *pea3* (MMT Rs, MMT RNAi *pea3* A, MMT RNAi *erm* C, MMT RNAi *pea3* A/ RNAi *erm* C) et les cellules MMT en contrôle expérimental. Les cellules ont été injectées par voie sous-cutanée dans chaque flanc de souris SCID immunodéficientes. Par expérience, 5 souris ont été traitées pour chaque lignée cellulaire.

Lorsque des cellules MMT sont injectées dans ces conditions, les cellules forment une tumeur qui est palpable et mesurable au bout de 3 à 5 jours (en fonction du nombre de cellules injectées). Les cellules MMT Rs donnent le même profil d'évolution de la tumeur que les cellules MMT (données non montrées).

En comparaison aux cellules MMT Rs, les tumeurs issues de cellules MMT RNAi *pea3* A apparaissent plus petites dès les premiers temps de mesure et continuent à se développer moins rapidement que les tumeurs issues des cellules contrôles. 15 jours après l'injection, les tumeurs sont deux fois plus petites que les tumeurs contrôles (Figure 41).

Des résultats similaires sont obtenus avec les lignées MMT RNAi *erm* C et RNAi *pea3* A/ *erm* C avec un effet moindre pour *erm* et plus fluctuant pour *pea3/erm*.

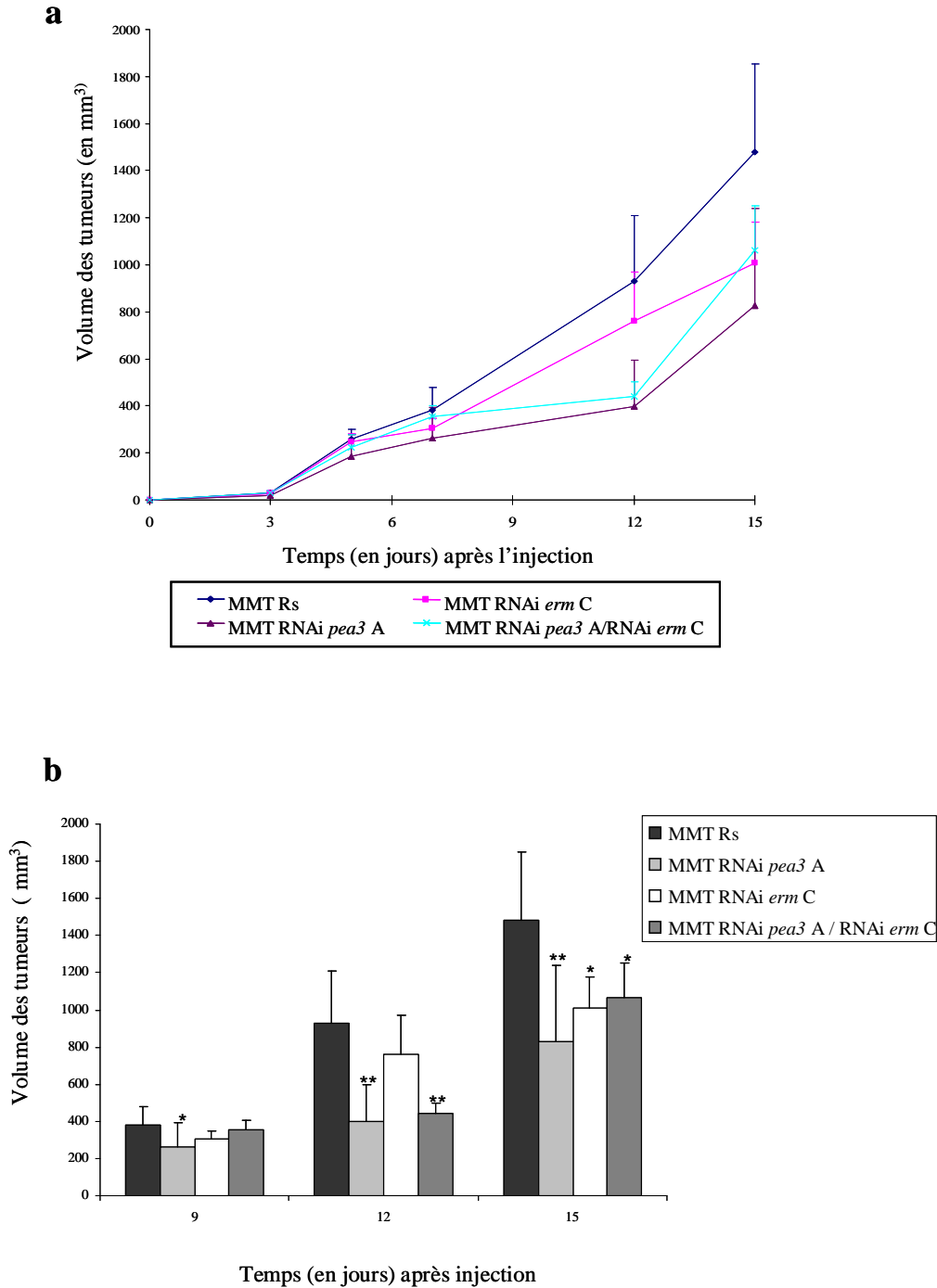


Figure 41 : Etude de l'évolution tumorale des lignées de cellules MMT réprimant l'expression des facteurs Erm et Pea3 injectées à des souris immunodéficientes.

a, Présentation sous forme de courbe.

b, Présentation sous forme d'historgramme avec les données statistiques.

8×10^5 cellules MMT Rs, MMT RNAi *erm C*, MMT RNAi *pea3 A* ou MMT RNAi *pea3 A* / RNAi *erm C* sont injectées dans chaque flanc de 5 souris. Les tumeurs apparaissent au bout de 3 jours et sont alors mesurées tous les 3-4 jours. Les points correspondent à la moyenne de la taille des tumeurs de chaque groupe expérimental +/- la déviation standard. Probabilité selon test de Mann-Whitney ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

VI- Mise en évidence de nouveaux gènes cibles des facteurs du groupe PEA3

Dans le cadre de la recherche et l'étude de nouveaux gènes cibles des facteurs de transcription du groupe PEA3, différents modèles cellulaires ont été utilisés :

- les cellules TAC surexprimant de manière constitutive les facteurs Erm ou Pea3. Ces cellules correspondent aux lignées TAC/pc7, TAC/erm1 et TAC/pea3 8 caractérisées dans Chotteau-Lelievre et al., 2003. Les lignées TAC/erm1 et TAC/pea3 8 surexprimant de façon stable et constitutive les facteurs Erm et Pea3 respectivement. La lignée TAC/pc7 est la lignée contrôle. La surexpression des transcrits *erm* et *pea3* a été contrôlée par PCR semi-quantitative et quantitative (Figure 42a à d). La surexpression du facteur Pea3 a été confirmée par western blot (Figure 42e), celle du facteur Erm n'a pu être confirmée faute d'anticorps fonctionnel,
- les cellules TAC surexprimant de manière transitoire les facteurs Erm ou Pea3,
- les cellules TAC ou MMT exprimant de manière transitoire un siRNA dirigé spécifiquement contre *erm* ou *pea3* (modèle présenté paragraphe IV-2),
- les lignées MMT exprimant de manière constitutive un shRNA dirigé contre *erm*, *pea3* ou *erm* et *pea3* (modèle présenté paragraphe IV-1-c).

Mise en évidence de nouveaux gènes cibles

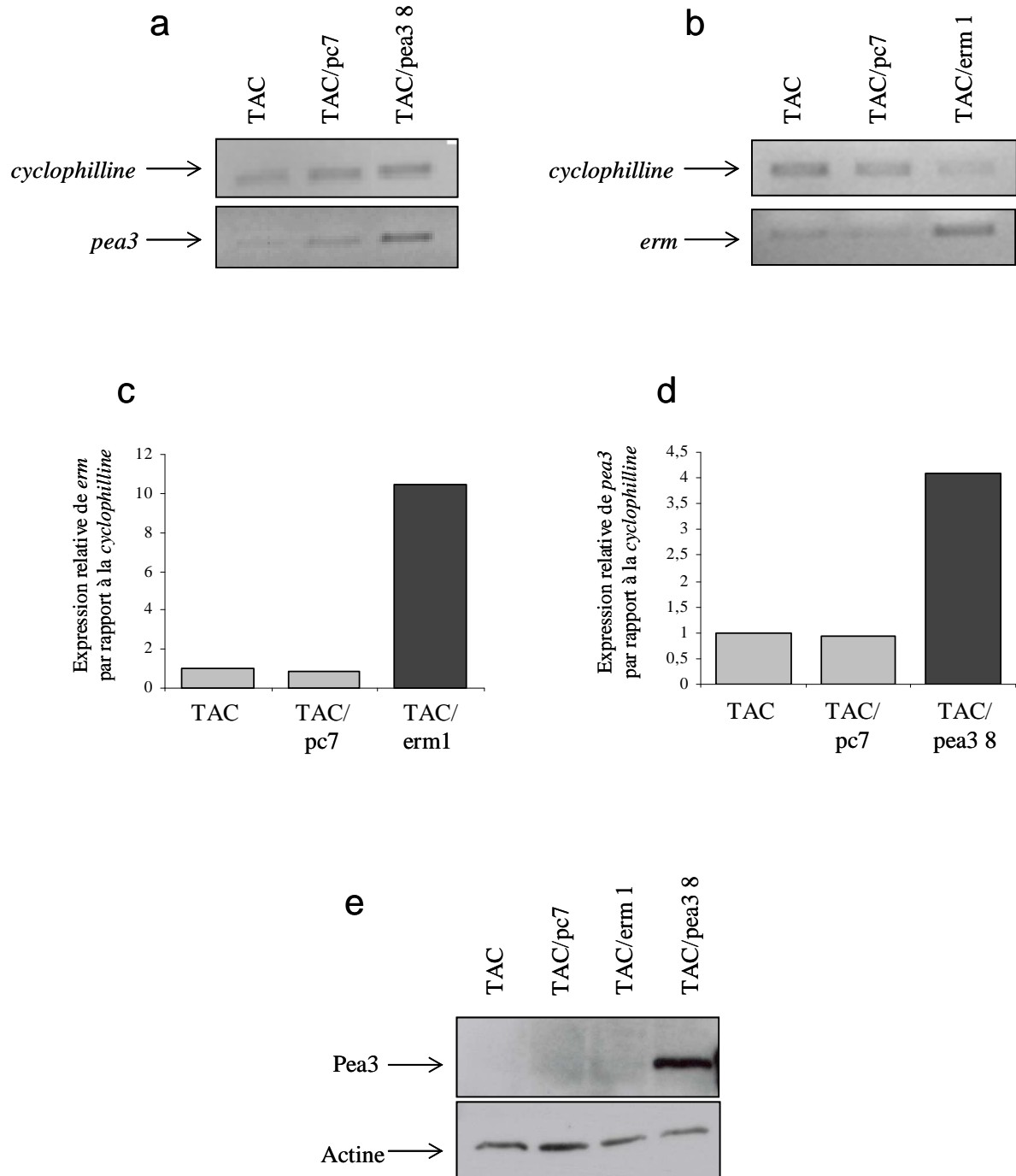


Figure 42 : Analyse de l'expression des transcrits *erm* et *pea3* et du facteur Pea3 dans les cellules TAC, TAC/pc7, TAC/erm1, TAC/pea3 8.

a, b, c, d, Les RT-PCR ont été réalisées à partir des ARN extraits des cellules TAC ou TAC surexprimant de manière constitutive les facteurs Erm et Pea3, pour amplifier les transcrits *cyclophiline* et *pea3* (a, d), *cyclophiline* et *erm* (b, c). **a, b,** PCR semi-quantitative. **c, d,** PCR quantitative. **e,** Western blot, à partir de 20µg de protéines et avec un anticorps anti-Pea3 ou anti-Actine.

1 - Contexte de l'étude

Des expériences menées avant mon arrivée dans le laboratoire et ayant eu pour base l'utilisation d'une puce à ADN (AtlasTM Mouse cDNA Expression Arrays, Clontech) et la comparaison du transcriptome des cellules TAC/erm1 et TAC/pc7, ont permis de définir huit gènes régulés de façon importante : *bax*, *gadd 45*, *gadd 153*, *faf1*, *cycline D2*, *p55^{cdc}*, *pim-1*, *NFkB* (Tableau 15). Afin de conforter la régulation de l'expression de ces gènes ainsi mise en évidence, des expériences de northern blot et/ou PCR semi-quantitative ont été réalisées. Les résultats obtenus, indiqués dans le tableau 15, ont permis de confirmer ou d'infirmer les résultats des puces à ADN. Le travail a donc été poursuivi pour les gènes *bax*, *cycline D2* et *p55^{cdc}* pour lesquels nous avons entrepris la caractérisation de la régulation par les facteurs du groupe PEA3. L'étude de la régulation du gène *bax* a été la plus complète à ce jour, car aucun des facteurs impliqués dans l'apoptose n'a jamais été décrit comme étant régulé par les facteurs du groupe PEA3.

Gène ciblé	Fonction potentielle	Résultats des macro-array	Confirmation
<i>pim-1</i>	Sérine/thréonine kinase	Réprimé	Non confirmé (PCR)
<i>bax</i>	Facteur pro-apoptotique	Surexprimé	Surexprimé (PCR)
<i>p55^{cdc}</i>	Division cellulaire	Surexprimé	Surexprimé (PCR)
<i>cycline D2</i>	Régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire	Réprimé	Surexprimé (PCR)
<i>gadd 45</i>	Modulation du cycle cellulaire et arrêt de la réplication	Réprimé	Réprimé (PCR)
<i>gadd 153</i>	Modulation du cycle cellulaire et arrêt de la réplication	Réprimé	Non confirmé (Northern)
<i>faf-1</i>	Rôle dans l'apoptose et la voie de transduction de l'ubiquitine	Surexprimé	Réprimé (Northern)
<i>Nfkb</i>	Facteur de transcription	Réprimé	Réprimé (Northern)

Tableau 15 : Gènes cibles potentiels des membres du groupe PEA3 mis en évidence par l'utilisation d'une puce à ADN AtlasTM Mouse cDNA Expression Arrays, par comparaison du transcriptome des cellules TAC/pc7 versus TAC/erm1.

2- Un nouveau gène régulé par les facteurs de transcription du groupe PEA3 : le gène *bax*

Les données essentielles obtenues à l'issue de ce travail ont été publiées dans Journal of Biological Chemistry (Firlej et al., 2005). L'article est présenté dans la partie a. Les données complémentaires non publiées dans l'article et représentant des expériences appuyant le travail publié sont présentées dans la partie b.

a- Publication dans Journal of Biological Chemistry (Firlej et al., 2005)

Firlej, V., Bocquet, B., Desbiens, X., de Launoit, Y. and Chotteau-Lelievre, A. (2005) **Pea3 transcription factor cooperates with USF-1 in regulation of the murine *bax* transcription without binding to an Ets-binding site.** *J Biol Chem*, 280, 887-898.

Résumé de l'article

Après avoir confirmé à partir des différents modèles cellulaires de surexpression ou de répression de l'expression des facteurs Pea3 et/ou Erm disponibles à l'époque (TAC, TAC/pc7, TAC/erm1, TAC/pea3 8, TAC transfectées de manière transitoire par les vecteurs pTracer, pTracer-Erm, pTracer-Pea3, pSuper RNAi *pea3* A, pSuper vide) la régulation du gène *bax*, nous avons entrepris la caractérisation de cette régulation par l'étude du promoteur de ce gène.

En effet, les facteurs de transcription du groupe PEA3 sont capables de transactiver le promoteur du gène *bax* dans des expériences de transfection transitoire réalisées dans des cellules mammaires murines transfectedes par des vecteurs permettant une surexpression de l'un ou l'autre des membres du groupe PEA3 et le promoteur d'intérêt (ou des délétants) clonés dans un vecteur rapporteur.

Le plus petit fragment promoteur qui conserve la capacité d'être transactivé par les facteurs du groupe PEA3 est de 100pb en amont du codon d'initiation de la traduction. Ce fragment ne présente pas de sites consensus de fixation à l'ADN pour les protéines de la famille ETS, ce qui nous place dans une modalité de régulation jamais décrite. La première

explication serait que les facteurs du groupe PEA3 se lient à l'ADN par un site de fixation non consensuel. Une autre explication possible mais inhabituelle pourrait être une transactivation passant par l'interaction d'un membre du groupe PEA3 avec un facteur de transcription se liant à l'ADN mais ne nécessitant pas la liaison à l'ADN du facteur du groupe PEA3. Parmi les sites consensuels identifiés à l'aide des banques de données, trois nous ont semblé particulièrement intéressants car ils concernent des facteurs connus pour interagir avec des membres de la famille ETS (Li et al., 2000): USF-1 (Greenall et al., 2001) , Sp1, ou le complexe transcriptionnel AP-1 (complexe Fos/Jun) (Gutman and Wasylyk, 1990; Nakae et al., 1995).

Nous avons entrepris de confirmer cette hypothèse, en réalisant des tests de surexpression des membres du groupe PEA3 en association avec ces cofacteurs potentiels (Sp1, AP-1, USF-1). Nous avons observé, parmi les facteurs testés, que seul USF-1 agissait en synergie avec la protéine Pea3 pour transactiver le fragment de 100pb du promoteur du gène *bax*. Nous avons pu confirmer ceci en mutant chacune des deux E-box (sites de fixation aux facteurs de la famille de USF-1) ou les deux. Ces mutations entraînent une perte de toute capacité transactivatrice : individuelle (de Pea3 ou de USF-1) ou synergique (Pea3+USF-1).

Par la technique de retard sur gel, en utilisant différents oligonucléotides couvrant les 100pb du promoteur du gène *bax* et des extraits nucléaires de cellules mammaires normales surexprimant la protéine Pea3, nous avons montré que USF-1 pouvait bien se fixer *in vitro* au niveau de ce promoteur de manière spécifique. La bande obtenue est bien retardée par un anticorps dirigé contre la protéine USF-1. L'utilisation d'un oligonucléotide muté sur les deux E-box n'entraîne aucun retard.

Nous avons aussi pu montrer qu'il n'y avait pas de fixation directe de la protéine Pea3 au niveau du fragment de 100pb du promoteur du gène *bax*. Par contre, l'utilisation d'un anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine Pea3 entraîne une diminution du retard, prouvant l'implication de Pea3 dans le complexe USF-1/ADN au niveau du promoteur du gène *bax*.

Ce travail a donc permis de mettre en évidence la capacité du facteur Pea3 de réguler la transcription du gène *bax* sans se fixer à l'ADN mais par l'interaction avec le facteur USF-1 *via* sa fixation à l'ADN sur des E-box. Le facteur de transcription Pea3 se comporte donc dans ce contexte comme un cofacteur.

b- Données complémentaires non publiées dans l'article

Les données présentées ici confortent les résultats publiés dans l'article (Firlej et al., 2005). Ils sont constitués par :

- la démonstration de l'absence de liaison des facteurs du groupe PEA3 au niveau du promoteur proximal du gène *bax*,
- l'étude de constructions supplémentaires du promoteur du gène *bax*,
- la démonstration de la fonctionnalité des shRNA *pea3* et *erm*,
- l'étude de la régulation du promoteur du gène *bax* par le facteur Erm,
- des données supplémentaires concernant l'implication du facteur USF-1 dans cette régulation,
- le test d'autres facteurs de transcription sur le promoteur du gène *bax*.

- *Démonstration de l'absence de liaison des facteurs du groupe PEA3 au niveau du promoteur proximal du gène bax*

Pour tester la liaison directe des facteurs du groupe PEA3 au niveau du promoteur minimal du gène *bax*, des protéines traduites en lysat de réticulocytes de chacun des facteurs du groupe PEA3 ont été incubées en présence d'une sonde marquée recouvrant les deux E-box du fragment de promoteur PMBaxSp1dl *bax* wt. Un retard est observé en présence du facteur USF-1, confirmant la liaison directe de ce facteur au niveau du promoteur du gène *bax*, mais aucune bande n'est observée avec les facteurs du groupe PEA3, Erm, Er81 et Pea3 (Figure 43). Ceci confirme que ces facteurs ne peuvent pas se lier directement à l'ADN, mais agiraient par l'intermédiaire d'un autre facteur.

- *Etude de constructions supplémentaires du promoteur du gène bax*

Des constructions supplémentaires issues du fragment PMBaxSp1dl ont été réalisées de façon à préciser plus finement la zone du promoteur impliquée dans la régulation par les facteurs Pea3 et USF-1. Les constructions PMBax5Sp1 et 3Sp1 correspondent aux 50pb de la partie 5' ou 3' du fragment proximal PMBaxSp1dl (Figure 44a). La construction PMBaxSp1dlAS correspond au fragment du promoteur de 100pb cloné en antisens en amont de la luciférase dans le vecteur rapporteur.

Le gène *bax*



Figure 43 : Test de la liaison des facteurs du groupe PEA3 sur le promoteur minimal du gène *bax*.

Des protéines traduites en lysat de réticulocytes (notées LR) ont été incubées en présence d'une sonde oligonucléotidique « *bax wt* » recouvrant les deux E-box et marquée au ^{32}P . Chaque piste correspond à la sonde marquée en présence de : *piste 1*, LR USF-1 ; *piste 2*, LR Erm ; *piste 3*, LR Er81 ; *piste 4*, LR Pea3.

Ces différents fragments de promoteur ont été cotransfectés dans les cellules TAC en présence des vecteurs permettant l'expression du facteur Pea3 et/ou USF-1.

Le fragment PMBax5Sp1 est transactivé par le facteur Pea3 et la coopération entre les facteurs Pea3 et USF-1 est bien retrouvée de la même manière que pour le fragment de 100pb (PMBaxSp1dl), confirmant notre hypothèse que la transactivation liée aux facteurs USF-1 et Pea3 est bien associée à cette zone du promoteur. Le fragment PMBax3Sp1 ne présente pas d'activité transcriptionnelle basale suggérant que l'initiation de la transcription et la régulation par les facteurs Pea3 et USF-1 est portée par les 50pb contenant les deux E-box en 5' du fragment PMBaxSp1dl (Figure 44b).

La construction antisens du promoteur minimal de 100pb ne présente pas d'activité transcriptionnelle basale et ne permet aucune transactivation par les facteurs USF-1 et/ou Pea3 (Figure 44b) confirmant ainsi la spécificité de l'activité transcriptionnelle du promoteur PMBaxSp1dl et de la régulation par les facteurs Pea3 et USF-1.

Le gène *bax*

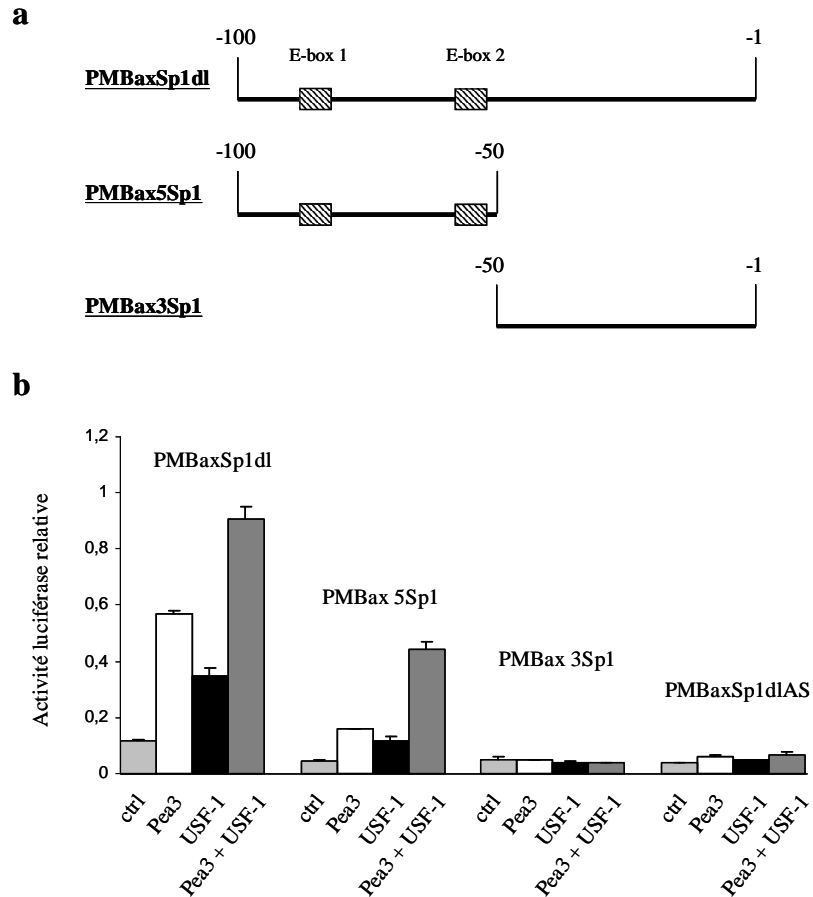


Figure 44 : Test de l'activité des facteurs Pea3 et USF-1 sur les constructions promotrices PMBax5Sp1 et PMBax3Sp1.

Les vecteurs d'expression pTracer (ctrl), pTracer-Pea3 et/ou pCR3-USF-1 (USF-1) et le vecteur rapporteur contenant le fragment minimal du promoteur du gène *bax* cloné en amont de la luciférase (PMBaxSp1dl) ou les délétants (PMBax5Sp1, PMBax3Sp1) ou son homologue antisens (PMBaxSp1dlAS) ont été cotransfectés de manière transitoire dans les cellules TAC. L'activité luciférase de chaque condition expérimentale a été normalisée par rapport à celle obtenue avec le vecteur d'expression pSV- β -galactosidase.

- Démonstration de la fonctionnalité des shRNA *pea3* et *erm*

Le promoteur du gène *bax* étant régulé par les membres du groupe PEA3, il a été utilisé pour tester la fonctionnalité des shRNA *pea3* et *erm* en parallèle des expériences menées avec le promoteur « TORU » (Paragraphe IV-1) (Figure 45).

Les cellules TAC ont été transfectées par un vecteur rapporteur contenant le promoteur PMBaxKpnI en amont de la luciférase et une construction plasmidique pSuper (vide ou contenant l'une ou l'autre des séquences RNAi *pea3* A, B ou C ou *erm* A, B ou C), en

Le gène *bax*

présence ou non du vecteur pTracer-Pea3 ou pTracer-Erm (permettant l'expression exogène du facteur Pea3 ou Erm).

Les séquences RNAi *pea3* A et B permettent une diminution de l'activité transcriptionnelle basale du promoteur PMBaxKpnI (Figure 45, colonnes 3 et 4 vs colonne 1), mais aussi de l'activité de transactivation du facteur Pea3 (colonnes 7 et 8 vs colonne 5). Au contraire, la séquence RNAi *pea3* C ne modifie ni l'activité basale (colonne 2 vs colonne 1), ni l'activité de transactivation de ce promoteur par le facteur Pea3 (colonne 5 vs colonne 4).

Les séquences RNAi *erm* A et B ne modifient ni l'activité transcriptionnelle basale du promoteur PMBaxKpnI (colonnes 2 et 3 vs colonne 1), ni l'activité de transactivation du facteur Erm sur ce promoteur (colonnes 6 et 7 vs colonne 5). La séquence RNAi *erm* C permet de réprimer l'activité transcriptionnelle basale du promoteur d'environ 40% (colonne 4 vs colonne 1), et de l'activité de transactivation de ce promoteur par le facteur Erm de 70% (colonne 8 vs colonne 5).

Nous confirmons les résultats obtenus sur le promoteur « TORU » en montrant que les séquences RNAi *pea3* A et B et RNAi *erm* C réduisent bien l'activité basale du promoteur PMBaxKpnI ainsi que l'activité transactivatrice des facteurs Pea3 et Erm, au contraire des autres séquences testées.

- Mise en évidence de la régulation du promoteur du gène *bax* par le facteur *Erm*

L'effet de transactivation des autres facteurs du groupe PEA3 (Erm et Er81) sur le gène *bax* a été testé pour les constructions promotrice PMBaxSp1dl et PMBaxSacI. Les vecteurs d'expression pTracer-Erm ou -Er81 ont été cotransfectés dans les cellules TAC en présence ou non du vecteur pCR3-USF-1 et du vecteur rapporteur PMBaxSp1dl, PMBaxSacI ou du vecteur vide.

Le facteur Erm transactive les deux portions du promoteur du gène *bax* (6 fois par rapport au vecteur vide) et peut collaborer avec le facteur USF-1 pour potentialiser cet effet, notamment sur le promoteur PMBaxSp1dl (18 fois par rapport au vecteur vide) (Figure 46). Cet effet de collaboration est moins prononcé que dans le cas du facteur Pea3.

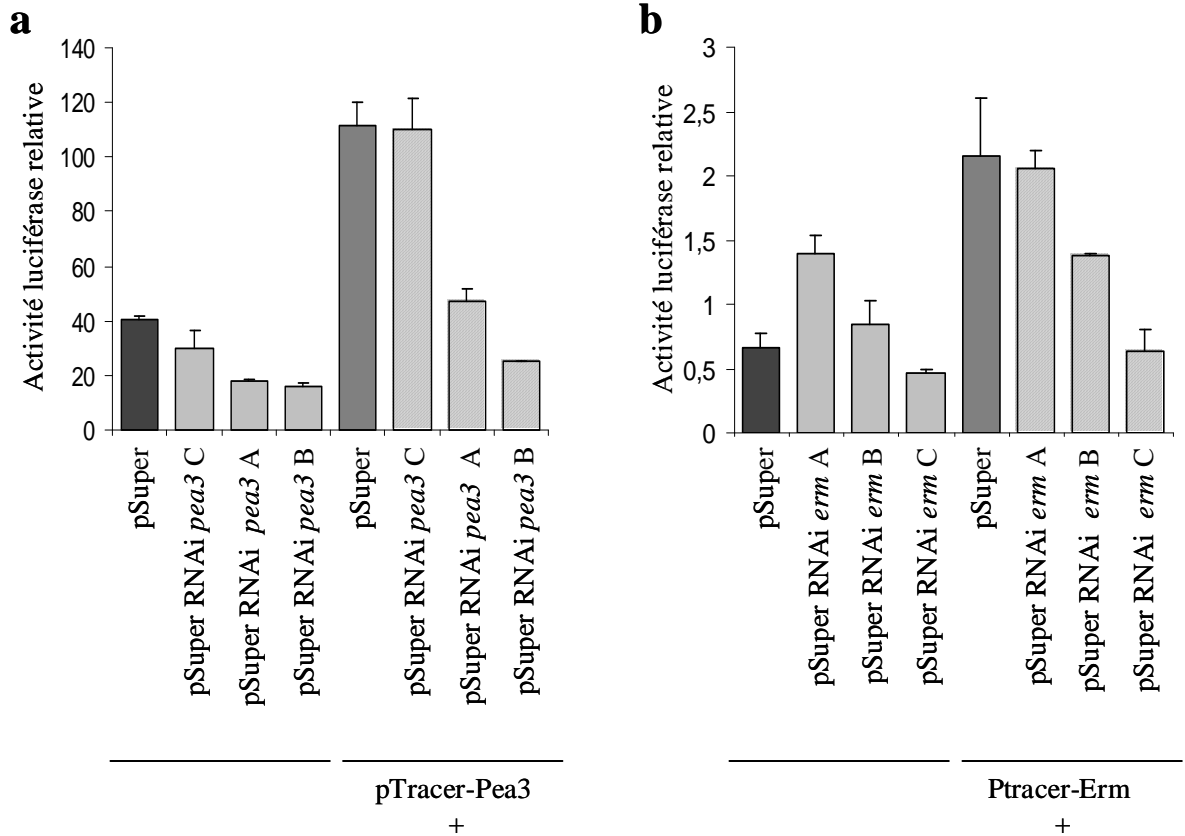


Figure 45 : Effet des différentes constructions pSuper RNAi *pea3* et *erm* sur l'activité du promoteur PMBaxKpnI.

Le vecteur d'expression pTracer (ctrl) ou pTracer-Pea3 (Pea3) et le vecteur pSUPER, pSuper RNAi *pea3* A, B ou C (a) ou le vecteur d'expression pTracer (ctrl) ou pTracer-Erm (Erm) et le vecteur pSUPER, pSuper RNAi *erm* A, B ou C (b), et le vecteur rapporteur PMBaxKpnI ont été cotransfectés de manière transitoire dans les cellules TAC. L'activité luciférase de chaque condition expérimentale a été normalisée par rapport à celle obtenue avec le vecteur d'expression pSV- β -galactosidase.

Le facteur Er81 est capable de transactiver faiblement le promoteur du gène *bax* PMBaxSp1dl (4 fois par rapport au vecteur vide), mais aucun effet coopératif avec USF-1 n'est observé (données non montrées).

Des constructions permettant l'expression d'ARN interférents dirigés contre *erm* ont été utilisées pour confirmer la spécificité de l'activité synergique entre Erm et USF-1. Le vecteur pSuper RNAi *erm* C a été cotransfecté dans les cellules TAC en présence ou non des vecteurs d'expression pTracer-Erm et pCR3-USF-1, et des constructions proximales du gène *bax* (PMBaxSp1dl et PMBaxSacI).

La cotransfection du vecteur pSuper RNAi *erm* C réduit l'activité transactivatrice basale de PMBaxSacI de 60% et celle de PMBaxSp1dl de 40%, et réduit de façon drastique l'effet de synergie des facteurs Erm et USF-1 (Figure 46).

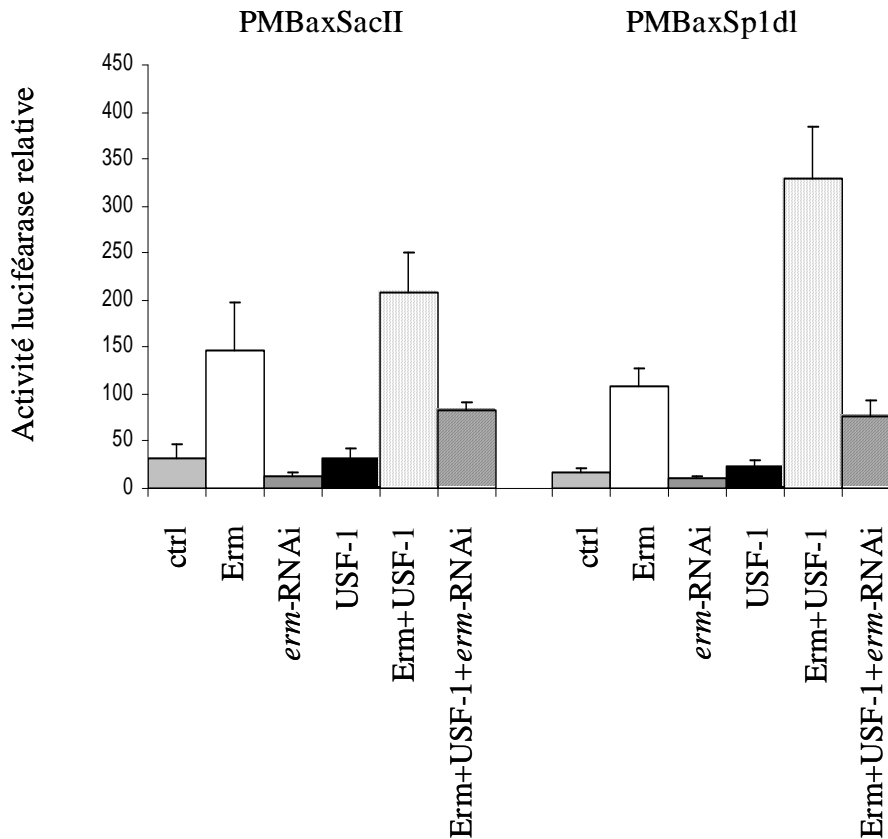


Figure 46 : Etude de l'activité du facteur Erm suite à la transfection du shRNA RNAi *erm* C sur les constructions promotrices PMBaxSacI et PMBaxSp1dl.

Les vecteurs d'expression pTracer (ctrl), pSuper-RNAi *erm*, pTracer-Erm, et/ou pCR3-USF-1 (USF-1) et le vecteur rapporteur contenant le fragment proximal PMBaxSacI ou minimal PMBaxSp1dl ont été cotransfectés de manière transitoire dans les cellules TAC. L'activité luciférase de chaque condition expérimentale a été normalisée par rapport à celle obtenue avec le vecteur d'expression pSV- β -galactosidase.

Nous avons montré par la technique de retard sur gel que les facteurs Pea3 et USF-1 peuvent former un complexe au niveau des deux E-box du promoteur PMBaxSp1dl grâce à l'utilisation des anticorps anti-USF-1 et anti-Pea3 (Firlej et al., 2005). La même expérience a été réalisée avec un anticorps anti-Erm (Figure 47). Des extraits nucléaires de cellules TAC ont été mis en présence d'une sonde marquée recouvrant les deux E-box, *bax* wt, et des anticorps anti-USF-1 ou anti-Erm.

Le gène *bax*

L'anticorps anti-USF-1 est capable de déplacer la formation des deux complexes. Un anticorps dirigé contre la protéine Erm est capable de déplacer la formation du complexe supérieur ternaire Erm/USF-1/ADN (Figure 47).

Ces résultats démontrent que de la même manière que le facteur Pea3, le facteur Erm peut transactiver le promoteur minimal du gène *bax* en agissant *via* le facteur USF-1.



Figure 47 : Retard sur gel à partir d'extraits nucléaires de cellules TAC et de la sonde *bax* wt.

Des extraits nucléaires de cellules TAC sont incubés en présence de la sonde oligonucléotidique *bax* wt marquée au ^{32}P , recouvrant les deux E-box. Chaque piste contient la sonde marquée en présence d'extraits nucléaires de TAC + *piste 1*; \emptyset , *piste 2*, anticorps anti-USF-1 ; *piste 3*, anticorps anti-Erm.

- Démonstration de l'implication du facteur USF-1 dans la régulation du gène *bax*.

L'équipe de Greenall a montré que les facteurs Pea3 et USF-1 sont capables d'interagir *in vitro* (Greenall et al, 2001). Pour confirmer que ces deux facteurs interagissaient *in vivo* dans les cellules TAC, celles-ci ont été transfectées par des vecteurs permettant l'expression des facteurs USF-1 et Pea3 (marqué par un épitope V5). Les lysats protéiques ont

été immunoprécipités avec l'anticorps anti-V5 et la révélation après western blot a été réalisée avec les anticorps anti-Pea3 et anti-USF-1.

La bande observée dans la piste 4 démontre que le facteur USF-1 est immunoprécipité avec la protéine Pea3, confirmant l'interaction de ces deux facteurs *in vivo* dans notre modèle cellulaire (Figure 48).

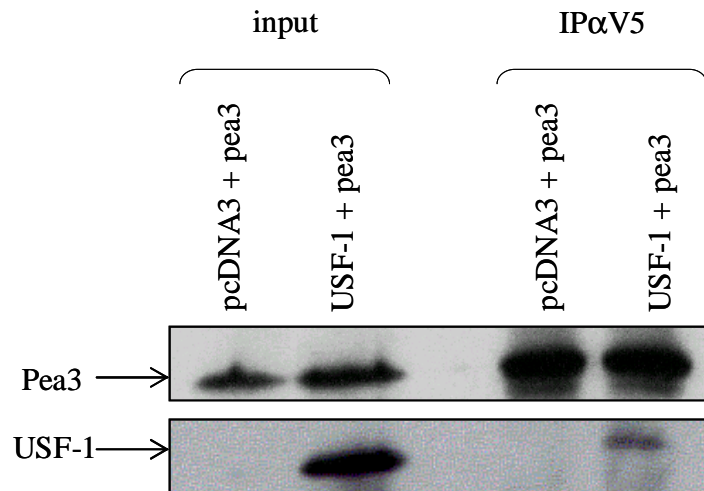


Figure 48 : Test de coimmunoprécipitation des facteur Pea3 et USF-1 dans les cellules TAC.

Les vecteurs d'expression pcDNA3, pTracer-Pea3 et/ou pCR3-USF-1 (USF-1) ont été cotransfectés de manière transitoire dans les cellules TAC. Après purification des protéines, une immunoprécipitation a été réalisée par un anticorps anti-V5 et la révélation du western blot a été réalisée par un anticorps dirigé contre la protéine USF-1 ou la protéine Pea3.

Les facteurs USF-1 et USF-2 sont capables de transactiver le promoteur minimal du gène *bax*, mais seul USF-1 peut agir en synergie avec le facteur Pea3. De plus, l'utilisation d'un dominant négatif de USF-1 (TD USF-1) qui est délété de son domaine transactivateur, empêche toute transactivation liée aux facteurs USF-1 et Pea3 (Firlej et al., 2005). La liaison de ces facteurs sur le fragment minimal du promoteur du gène *bax* a été testée en retard sur gel.

Des protéines USF-1, Pea3, TD-USF-1 et USF2a traduites en lysat de réticulocytes ont été mises en contact avec la sonde *bax* wt (recouvrant les deux E-box) marquée.

Le gène *bax*

Comme USF-1, USF2a est capable de se fixer à cette séquence d'ADN dans des expériences de retard sur gel, de même que le dominant négatif de USF-1, TD USF-1 (Figure 49).



Figure 49 : Mise en évidence de la liaison sur la sonde *bax* wt des facteurs USF-1, -2a et du dominant négatif TD-USF-1.

Des protéines traduites en lysat de réticulocytes (notés LR) ont été incubées en présence d'une sonde oligonucléotidique *bax* wt recouvrant les deux E-box marquée au ^{32}P . Chaque piste correspond à la sonde marquée en présence de : *piste 1*, LR USF-1, *piste 2*, LR TD-USF-1 ; *piste 3*, LR Pea3 ; *piste 4*, LR USF-2a.

- *Test de la capacité de transactivation d'autres facteurs de transcription ou cofacteurs au niveau du promoteur minimal du gène *bax**

Nous avons testés si d'autres membres de la famille ETS, à l'instar des facteurs du groupe PEA3, étaient capables de transactiver le promoteur minimal du gène *bax*. Les vecteurs permettant l'expression des facteurs Fev, Fli-1, Erg, Spi, Ets1 et Ets2 ont été cotransfectés dans les cellules TAC avec le vecteur PMBaxSp1dl contenant le promoteur minimal du gène *bax*. Aucun de ces facteurs n'est capable de transactiver le fragment de 100pb de promoteur du gène *bax* (Figure 50a), confirmant la spécificité d'action des facteurs du groupe PEA3 au niveau du promoteur minimal du gène *bax*.

Le gène *bax*

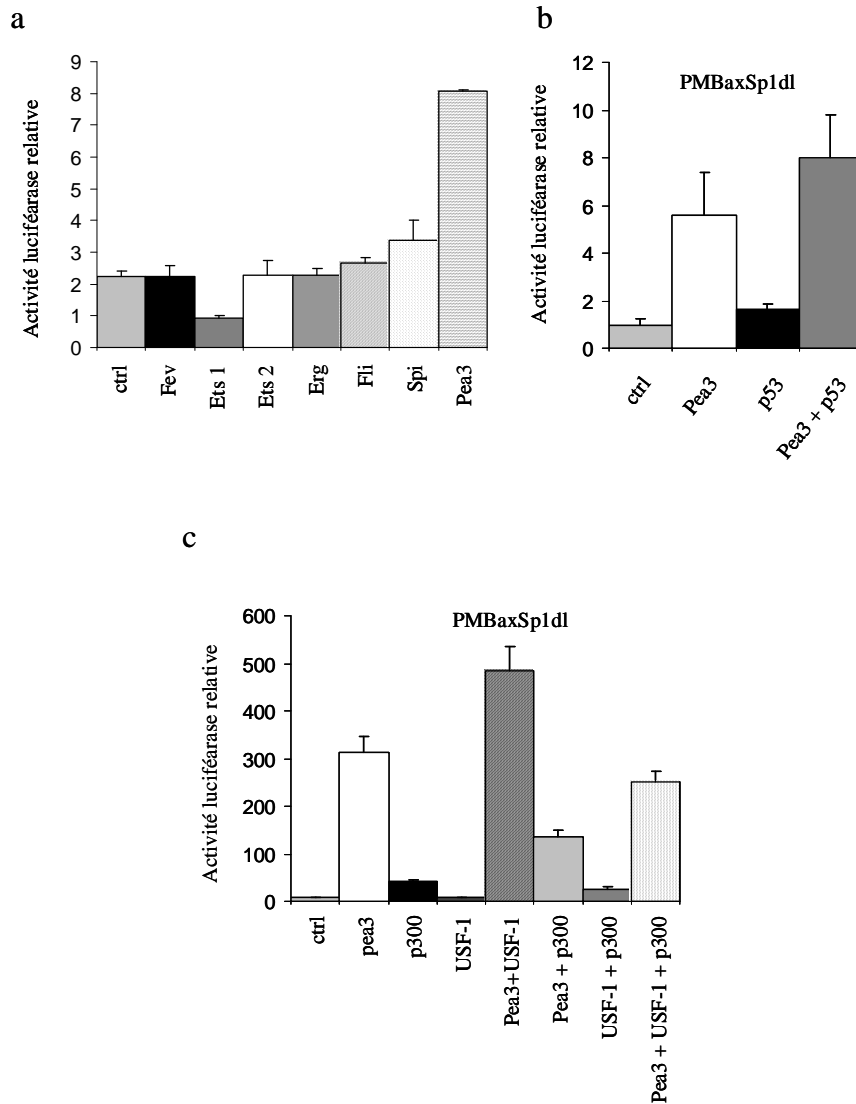


Figure 50 : Etude de l'activité des autres membres de la famille ETS, du facteur p53 et du cofacteur p300 sur le promoteur minimal du gène *bax*.

Les vecteurs d'expression pcDNA3 ou pSV (ctrl), pcDNA3-Ets1, -Ets, pSV-Fev, -Erg, Fli, Spi (a) ou pcDNA3-p53 (p53) (b) ou pcDNA3-p300 (p300) et pCR3-USF-1 (USF-1) (c) et le vecteur rapporteur contenant le fragment minimal cloné en amont de la luciférase ou le vecteur vide correspondant ont été cotransfectés de manière transitoire dans les cellules TAC. L'activité luciférase de chaque condition expérimentale a été normalisée à celle obtenue avec le vecteur d'expression pSV- β -galactosidase..

Le promoteur humain du gène *bax* est activé transcriptionnellement par le facteur p53 (Miyashita and Reed, 1995), mais pas le promoteur murin testé dans les cellules CaCo2 (Igata et al., 1999), Saos et Hela (Schmidt et al., 1999). Nous avons voulu savoir si le facteur p53 pouvait avoir un effet sur la transactivation induite par les membres du groupe PEA3. Le vecteur permettant l'expression du facteur p53 a été transfecté dans les cellules TAC en

Le gène *bax*

présence ou non du vecteur pTracer- Pea3. Aucun effet n'est observé, ni sur l'activité basale de transcription, ni en collaboration avec le facteur Pea3 (Figure 50b).

Il a été montré pour le facteur Er81, que celui-ci était capable d'agir en synergie avec le cofacteur p300 pour transactiver le promoteur du gène MMP-1 et le promoteur « TORU » (Papoutsopoulou and Janknecht, 2000; Goel and Janknecht, 2003; Goel and Janknecht, 2004). De plus, le facteur p300 peut aussi agir en synergie avec le facteur Pea3 au niveau du gène *cox-2* (Liu et al., 2004). Nous avons donc testé l'effet de ce cofacteur sur l'activité des constructions PMBaxSacII et -Sp1dl. Le vecteur d'expression du facteur p300 a été cotransfecté dans les cellules TAC en présence ou non des vecteurs permettant l'expression des facteurs Pea3 et/ou USF-1.

Le facteur p300 ne modifie pas l'activité transcriptionnelle des promoteurs proximaux du gène *bax*, et ne permet pas non plus d'augmenter la transactivation liée aux facteurs Pea3 et/ ou USF-1, que ce soit au niveau du promoteur PMBaxSacI ou PMBaxSp1dl (Figure 50c).

L'activité de régulation du promoteur du gène *bax* par les facteurs du groupe PEA3 semble donc spécifique de cette sous famille de facteurs ETS et nécessite l'interaction avec USF-1 et sa liaison à l'ADN sur des E-box.

Ces données complémentaires ont donc permis de conforter les données publiées dans l'article concernant les modalités de régulation du promoteur du gène *bax* par le facteur Pea3 en coopération avec le facteur USF-1, mais aussi d'apporter des informations concernant les modalités de régulation par le facteur Erm.

3- Etude de la régulation des gènes *cycline D2* et *p55^{cdc}* par les facteurs de transcription du groupe PEA3

a- Cycline D2

- Analyse transcriptionnelle

Selon la même approche que pour le gène *bax*, nous avons voulu confirmer le résultat de régulation du gène *cycline D2* obtenu grâce aux puces à ADN AtlasTM Mouse cDNA Expression Arrays. L'expression au niveau transcriptionnel de *cycline D2* a été testée par PCR quantitative et semi-quantitative dans différents modèles cellulaires pour lesquels l'expression de *pea3* ou *erm* est modifiée. Le gène contrôle utilisé dans ces expériences est la *cyclophiline*. Nous mettons en évidence que l'expression du gène *cycline D2* est augmentée par la surexpression du facteur Pea3 d'un facteur 4,5 (Figure 51a) et par la surexpression du facteur Erm d'un facteur 2 (Figure 51c) par rapport à l'expression de la *cyclophiline*. L'expression de *cycline D2* est inhibée de 40 à 50% dans les cellules TAC dont l'expression de *pea3* est inhibée par ARN interférence (si *pea3* 1 et si *pea3* 2) (Figure 51b). Ce taux de répression est retrouvé dans les cellules MMT dont l'expression de *erm* et/ou *pea3* est inhibée par ARN interférence (si *erm* et MMT RNAi *pea3* A/ RNAi *erm* C) (Figure 51d).

- Clonage des fragments du promoteur *cycline D2* murin

Pour déterminer le mécanisme par lequel les membres du groupe PEA3 régulent l'expression de ce gène, nous avons entrepris le clonage du promoteur murin du gène *cycline D2*. Les fragments de référence correspondent à des fragments de 625pb (extrémité 3' située juste en amont du site d'initiation de la traduction) et 450 pb (extrémité 3' située à 175 pb en amont du site d'initiation de la traduction), qui diffèrent par leur extrémité 3'. Les autres fragments ont été conçus d'après le positionnement de sites EBS potentiels (Figure 52), les ARN messagers décrits et les EST mis en évidence à ce jour (Figure 52).

Suite au clonage des fragments du promoteur du gène *cycline D2* à l'issue de PCR sur de l'ADN génomique de souris C57Black ou OF1, nous nous sommes aperçus que la séquence amplifiée comportait des différences avec la séquence publiée dans les banques de données ([AF015788](#)) et la séquence publiée dans l'article de Jun et al (Jun et al., 1997). Ces différences sont retrouvées dans les banques d'EST et les banques de BAC (Figure 52).

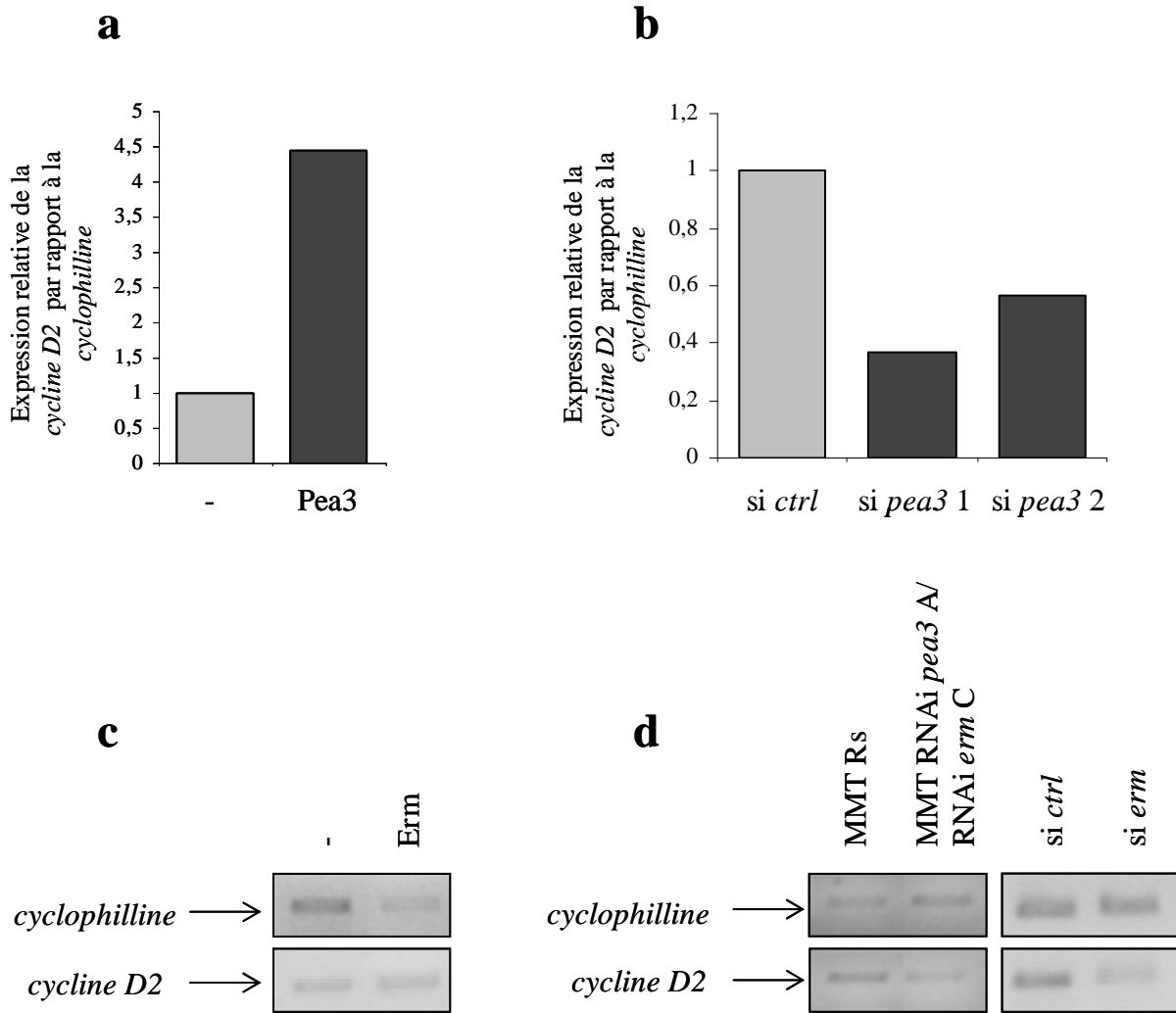


Figure 51 : Caractérisation de l'expression des transcrits *cycline D2* dans des cellules TAC ou MMT dont l'expression de Erm ou Pea3 est modifiée.

Les RT-PCR ont été réalisées à partir des ARN extraits des différents types cellulaires pour amplifier *cycline D2* et la *cyclophiline*. **a**, PCR quantitative, cellules TAC ou TAC surexprimant le facteur Pea3 de manière constitutive **b**, PCR quantitative, cellules MMT transfectées par des siRNA contrôles (colonne 1) ou dirigés contre *pea3* (colonnes 2 et 3). **c**, PCR semi-quantitative, cellules TAC ou TAC surexprimant le facteur Erm. **d**, PCR semi-quantitative, cellules MMT Rs (piste 1) ou MMT RNAi *pea3* A/ *erm* C (piste 2) ou transfectées par des siRNA contrôles (piste 3) ou dirigés contre *erm* (piste 4).

cyclineD2 et *p55^{cdc}*, deux nouvelles cibles potentielles

GCACACACGTACACACCCTTTATGCCCCCATGGTATGCCTACA**GAAT**GTCAGAAAGGATAATCAAT
 AGGA**ATCC**ATGGGGTTTGTGG**TTCC**CT**ATCC**GAGGCCCTAG**GCAT**GCGGGGCT**GGAT**GGGGA
 GAGGGCCTCGGAGAAGTAGGGAGAGGG**TTGGGG**TGGGGAGCGGGGATCGTGTTTGAAGTTT
 GGTCAGGCCAGCTGCTGTGCTCCTTAATAACAAGAG**GGAA**GGGGGGGGGAGAGGGAGGGAAA
 GATTGAAAGGAGGGGAGGGACGCTAGAGGAGGGGA**GGAA**AGGGGGAGGA**GGAA**CCTGAGAGG
 GGGAGGAGATCTAACTGCC**CTT**CCAGCTTGCCTCACTGCCTGAGCGAGAGAGGAGAGCGAGCTG
 AGGAGAGCCGGGCAGTTCGGAG**GGAA**GGACCGGTGCGAGTCAGGCGGCCCTTGAGGCTCCGCT
 CGCCACCTTCCACTCTTCTCTCTCTCTCCCTCTCTCTTTGCCATTCT**TTCC**TCTCCCAAATC
 TCCATTAGCCAAA**GGAA**GGAGGTAAG**GGAA**GCACTCCCGACCCCCCGCACCTCCAAAAAAT
 AATAATAATAAAAAAATTTACAGTCGGGACCGAGTGGTGGCCGGCT**GGC**

Annotations: 433/258, -499, -417, -391, -373, 306/132, -349, 64, BY313362, BY308768, BY782950, 450 AS, BY330212, 625 AS.

Figure 52 : Séquence du fragment de 625pb du promoteur du gène *cycline D2* clonée dans le vecteur rapporteur pGL4b.

Les chiffres en bleu indiquent les sites d'initiation potentiels mis en évidence par extension d'amorce par Jun et al. (Jun et al., 1997). Les chiffres en rose indiquent le début des ESTs parfaitement homologues sur le reste de la séquence du gène *cycline D2*. Les lettres en gras correspondent aux différences par rapport à la séquence publiée. Les séquences en rouge correspondent aux EBS potentielles. Les flèches en violet indiquent le début de chaque fragment.

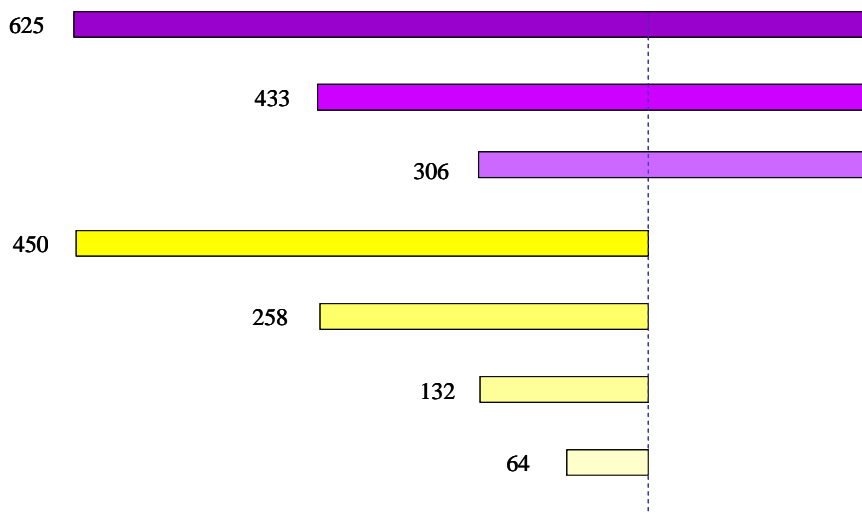


Figure 53 : Représentation des différents fragments du promoteur du gène *cycline D2* clonés dans le vecteur rapporteur pGL4b.

Cinq fragments de délétion ont été conçus dans le vecteur rapporteur pGL4b contenant le gène de la luciférase : pGL4b cd2 433 et 306 (construits sur la base du fragment de 625pb) et pGL4b 258, 132 et 64 (construits sur la base du fragment de 450pb) (Figure 53).

- Analyse de l'activité transactivatrice des facteurs du groupe PEA3

Les différents fragments ont été testés en transfection transitoire dans les cellules TAC (cd2 625, 433, 306, 450, 450, 233, 132 et 64). Tous ces fragments du promoteur du gène *cycline D2* possèdent une activité promotrice basale à l'exception du fragment de 64 pb (Figure 54, première colonne de chaque condition expérimentale). L'activité transactivatrice basale décroît entre les fragments 433 et 306, et entre les fragments 258 et 132. Néanmoins, les fragments délétés de la partie 3' (450, 233, 132) ont une activité basale plus importante. Le fragment de 175pb (partie 3' des fragments 625, 433 et 306) pourrait donc contenir un élément répresseur de la transcription ou diluer l'activité transactivatrice du promoteur du gène *cycline D2*. Ce fragment est en cours de clonage pour vérifier cette hypothèse. Le fragment de 64 pb ne possède pas d'activation promotrice basale, ce qui semble indiquer qu'il ne possède pas de site d'initiation de la transcription.

Afin d'évaluer la capacité des facteurs de transcription du groupe PEA3 d'activer la transcription du promoteur *cycline D2*, les cellules TAC ont été cotransfectées avec les constructions promotrices (cd2 625, 433, 306, 450, 450, 233, 132 et 64) et les vecteurs d'expression de chacun des facteurs du groupe PEA3 (pTracer-Erm, pTracer-Er81, pTracer-Pea3).

Les expériences de cotransfection montrent que tous ces fragments du promoteur (à l'exception du 64) sont transactivés par les trois membres du groupe PEA3 de façon plus ou moins importante (Figure 54). Le fragment de 450 pb est transactivé 5 fois par le facteur Pea3 et 3 fois par les facteurs Erm et Er81. La transactivation est de 2-3 fois pour le plus petit fragment de 132 pb (Figure 54). Nous avons donc un fragment promoteur minimal de 132 pb présentant une activité transcriptionnelle et transactivé par les membres du groupe PEA3, suggérant la présence d'éléments de réponse aux facteurs ETS au sein de cette séquence.

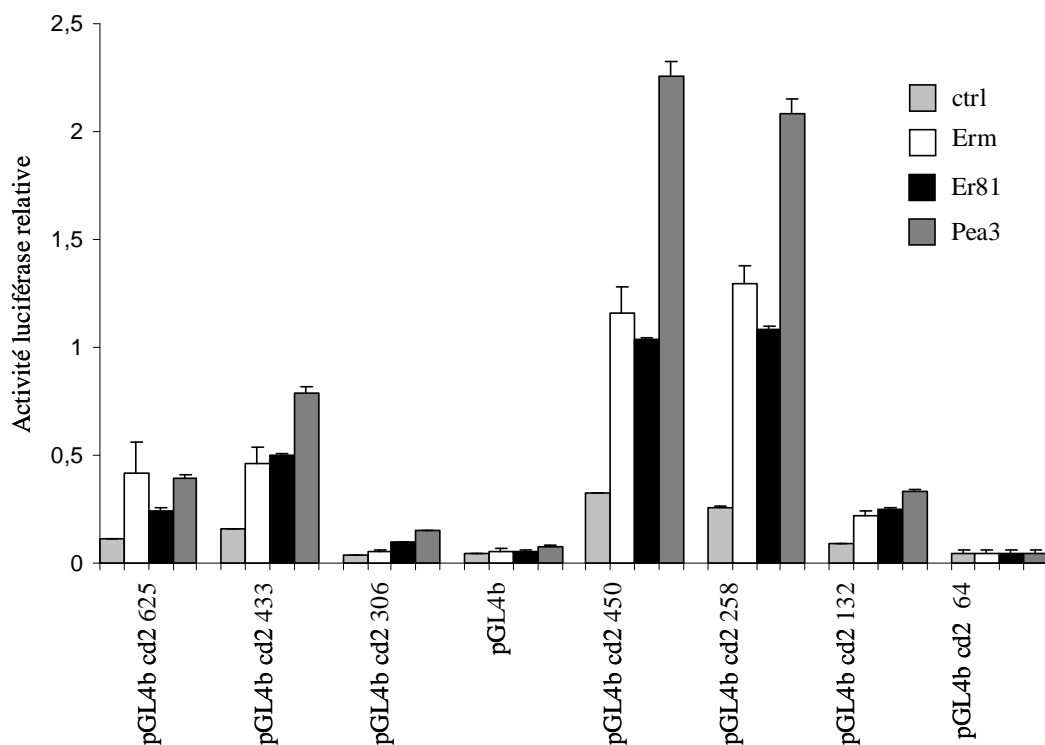


Figure 54 : Etude de l'activité des membres du groupe PEA3 au niveau du fragment pleine longueur et les différents fragments de délétion du promoteur du gène *cycline D2*.

Les vecteurs d'expression pTracer (ctrl), pTracer-Erm, -Er81 et -Pea3 et les vecteurs rapporteurs contenant les différents fragments de délétion du promoteur du gène *cycline D2* cloné en amont de la luciférase ou le vecteur vide correspondant ont été cotransfectés de manière transitoire dans les cellules TAC. L'activité luciférase de chaque condition expérimentale a été normalisée par rapport à celle obtenue avec le vecteur d'expression pRL-TK.

• Effet de mutations de séquences EBS

La séquence de 132 pb du promoteur du gène *cycline D2* a été soumise à des logiciels de recherche de sites potentiels de liaison pour des facteurs de transcription (TESS, TF-Search). Deux sites EBS potentiels ont été mis en évidence au sein de cette séquence. La mutagenèse de ces sites a donc été entreprise. Les deux sites ont été mutés individuellement de GGAA en AGAA (mutation précisée pour abolir la capacité de fixation des protéines Ets). La mutation du site le plus en amont du site d'initiation potentiel de la transcription est notée mt1 et la mutation du site le plus proximal est notée mt2 (Figure 55a). Ces mutations ont été introduites dans les fragments 132 et 258 clonés dans le pGL4b (pGL4b cd2 258 mt1 et mt2, PGL4b cd2 132 mt1 et mt2).

Les expériences de cotransfection de ces constructions dans les cellules TAC ont été réalisées avec les vecteurs d'expression pTracer et pTracer-Pea3. La mutation mt2 n'engendre aucune modulation de l'activité basale du promoteur de 132 pb et du promoteur de 258 pb, et ne modifie pas l'activité de transactivation par le facteur de transcription Pea3. La mutation mt1 par contre, diminue l'activité basale des fragments de promoteur 132 pb et 258 pb, mais ne modifie pas l'effet de transactivation du facteur Pea3 (Figure 55b).

L'étude des différentes constructions du promoteur du gène *cycline D2* a permis de mettre en évidence leur activité transcriptionnelle jusqu'à un fragment de 64 pb (issu du 450 pb) qui ne présente pas d'activité. Les facteurs Erm, Er81 et Pea3 sont capables de transactiver ces portions de promoteur (excepté le fragment de 64 pb). Les mutations mt1 et mt2 de deux sites consensus de reconnaissance des protéines ETS ne modifient pas de façon significative ni l'activité transcriptionnelle des constructions promotrices 258 et 132, ni la capacité de transactivation du facteur Pea3.

Afin de compléter cette étude, d'autres mutants sont en cours de clonage (mutation différente de celle effectuée pour le mt1 et mt2).

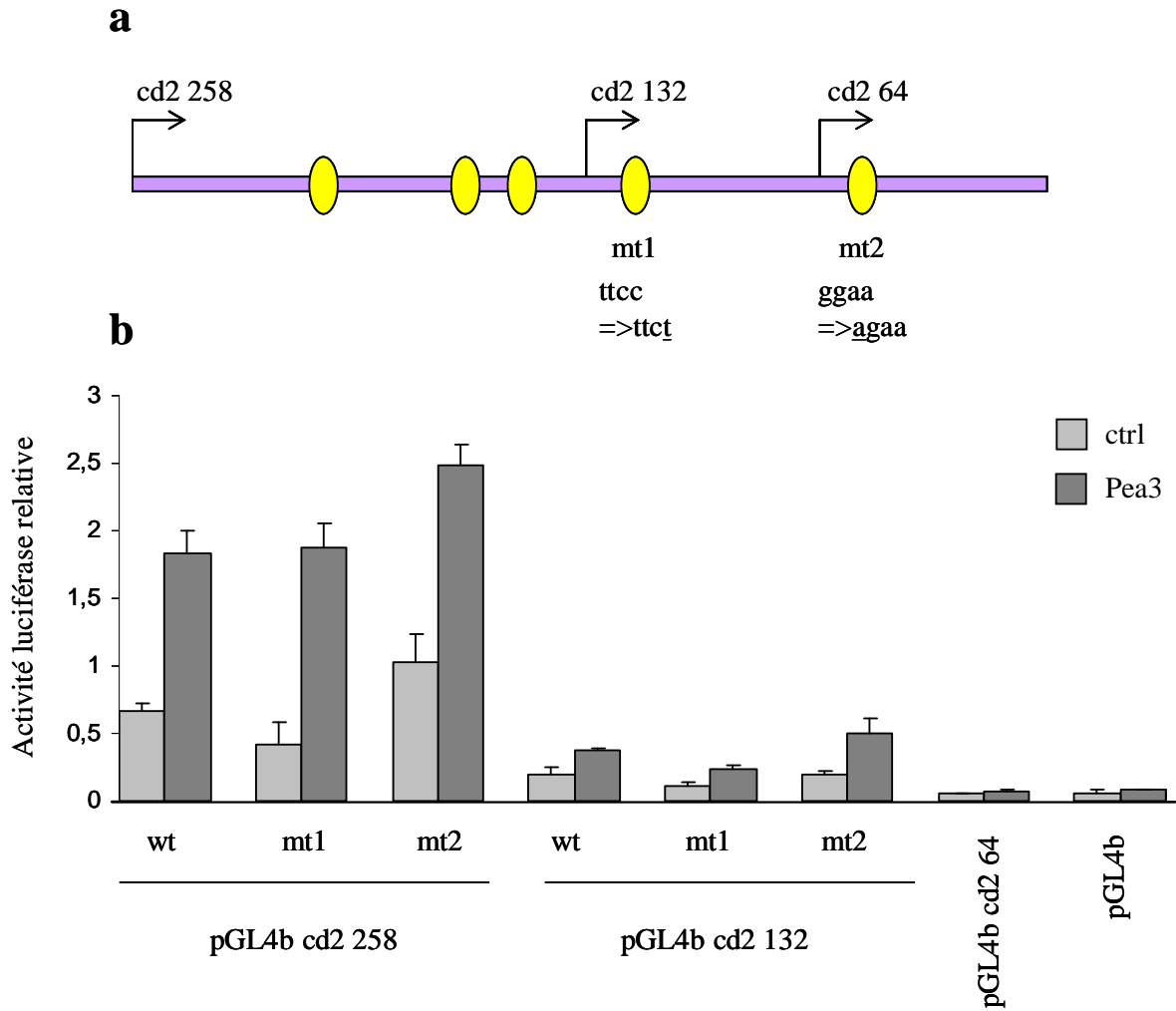


Figure 55 : Effet de mutations au niveau de séquences EBS au sein du promoteur du gène *cycline D2*.

Les vecteurs d'expression pTracer (ctrl), pTracer-Pea3 et les vecteurs rapporteurs contenant les différents fragments de délétion du promoteur du gène *cycline D2* clonés en amont de la luciférase, sauvage ou mutés au niveau de sites EBS ou le vecteur vide pGL4b ont été cotransfectés de manière transitoire dans les cellules TAC. L'activité luciférase de chaque condition expérimentale a été normalisée par rapport à celle obtenue avec le vecteur d'expression pRL-TK.

b- *p55^{cdc}*

• Analyse transcriptionnelle

Les résultats obtenus lors de l'analyse des puces à ADN (AtlasTM Mouse cDNA Expression Arrays) montrant une potentielle surexpression de *p55^{cdc}* dans les cellules TAC exprimant constitutivement le facteur de transcription Erm, ont été confirmés par northern blot et PCR quantitative. En northern blot (Figure 56), nous montrons que la surexpression constitutive de *erm* dans les cellules TAC entraîne une augmentation de la quantité d'ARNm de *p55^{cdc}* en comparaison aux cellules contrôles. Ce résultat a pu être confirmé par PCR quantitative dans les cellules TAC exprimant de manière constitutive le facteur de transcription Pea3 (Figure 57a), mais aussi dans les cellules MMT dont l'expression de *pea3* est réprimée par ARN interférence (Figure 57b). La modulation de l'expression de *p55^{cdc}* a été quantifiée par rapport à la *cyclophiline* : la quantité d'ARNm de *p55^{cdc}* est augmentée d'un facteur 2 dans les cellules TAC surexprimant le facteur Pea3 et diminuée de 50% dans les cellules MMT transfectées par un siRNA dirigé contre *pea3*. Nous avons confirmé cet effet dans des cellules dont l'expression de *erm* est réprimée par ARN interférence (Figure 57c). En effet, dans les cellules MMT transfectées par un siRNA dirigé contre *erm*, nous observons une répression de l'expression de *p55^{cdc}* d'environ 50%.

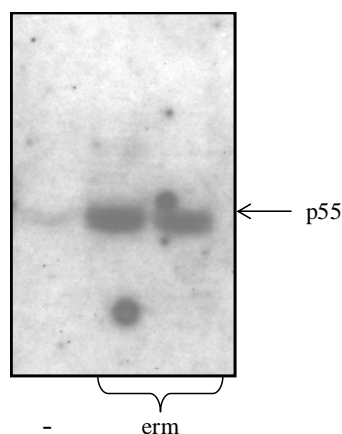


Figure 56 : L'expression du gène *p55^{cdc}* est augmentée dans des cellules TAC dans lesquels le facteur Erm est surexprimé.

Un northern blot a été réalisé à partir d'ARN extraits de cellules TAC ou de cellules TAC pour lesquelles Erm est surexprimé de manière constitutive. L'hybridation a été réalisée avec une sonde *p55^{cdc}* marquée au ³²P.

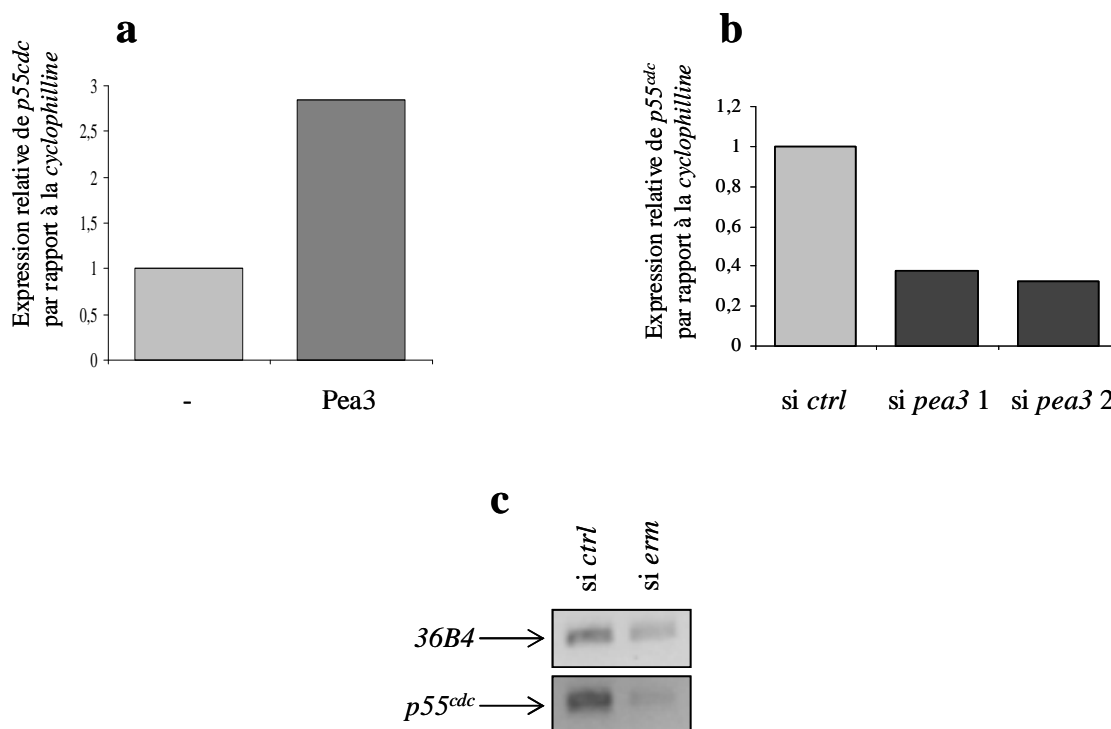


Figure 57 : Caractérisation de l'expression du gène *p55^{cdc}* dans les cellules TAC ou MMT pour lesquelles l'expression des facteurs du groupe PEA3 est modulée.

Les RT-PCR ont été réalisées à partir des ARN extraits des différents types cellulaires pour amplifier *p55^{cdc}* et la *cyclophiline*. **a**, PCR quantitative, cellules TAC ou TAC surexprimant le facteur Pea3 de manière constitutive **b**, PCR quantitative, cellules MMT transfectées par des siRNA contrôles ou dirigés contre *pea3*. **c**, PCR semi-quantitative, cellules MMT transfectées par des siRNA contrôles ou dirigés contre *erm*.

Nous avons alors entrepris de caractériser le promoteur du gène *p55^{cdc}* et sa régulation par les facteurs du groupe PEA3. Au début de cette étude, la séquence du promoteur murin n'était pas disponible dans les banques de données. Nous nous sommes donc intéressés à la séquence promotrice de rat (Weinstein et al., 1998). L'équipe de Weinstein nous ayant fourni un vecteur comprenant ce promoteur de 1000pb en amont du gène rapporteur de la CAT, nous l'avons sous-cloné dans le vecteur pGL3b (vecteur rapporteur luciférase).

✓ Etude du promoteur *p55^{cdc}* de rat

• Clonage des fragments du promoteur *p55^{cdc}* de rat

```
CTTAAGGATCCAAAGACCCACAAGAGTCCGCCACAGGATGTCCC CAAGAACAG
CCTAACCTAACCTTCACAACGAAAGGCTGGAATTCTGATCATTGTTTTGACCCC
ACCCCA TTCCCTCTCACTTTGTGTTTGTGAACTCCACACAGGCCACGTAA TTCC
TTCC CAGCAGGCGCCCTCCCATTACAGACCGCTACCTGCCACCGTCTCTAACCA
ATTGGGTGCTCGGGTCGAGTTTACGTGTGTGTATATAACCTAAGGACCACCCCA
CTCAGGTTTTGATGCGACCTTCACAGACTCCAAGATCTTCTAACTGCCAGGTCCA
ACCCAGCGAAAAGCCCAAACACGAGCGGTCCAGAGGACTGACTACCAGGTCCCG
CCCCGGGCTCCGATTTGGGCTCGGACTAAGGCTCCCGGAGGTGGATCGGGA
TTTCGTTCCAAACGCTTAGCGATCGCACTCTCGTGAGATTGCTCCCGGAAGAC
CGCCCCTCTTCAGTGTAGCGACCAATCGACAAAGGCGACGGTTAAGACAGTTG
GGTTTTGAAGGAGCCAATGAACACTAGCAGCGGA
      ↳ CK474039 +1
```

Figure 58 : Séquence du fragment de 576 du promoteur du gène *p55^{cdc}* de rat cloné dans le vecteur rapporteur pGL3b.

Les séquences en rose et bleu correspondent aux EBS potentielles. Les séquences encadrées en bleu correspondent aux sites EBS identifiés par la recherche bioinformatique par TESS et en vert par la recherche genomix. En vert est indiqué le plus long ADNc décrit pour *p55cdc* de rat (CK474039).

cyclineD2 et *p55^{cdc}*, deux nouvelles cibles potentielles

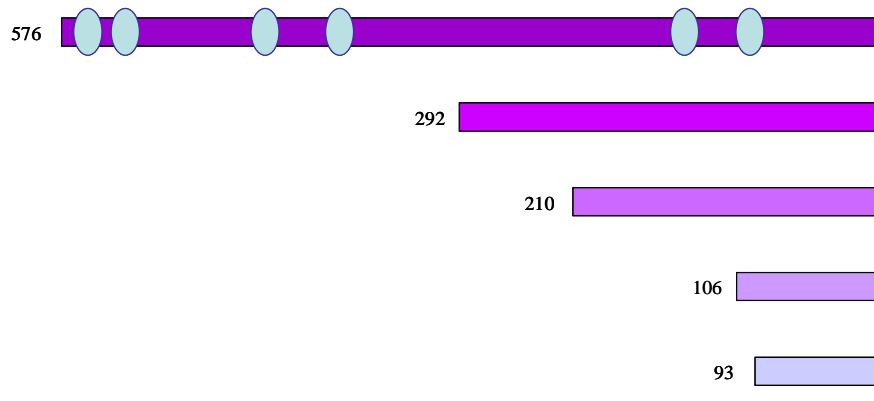


Figure 59 : Représentation des différents fragments du promoteur du gène de *p55^{cdc}* de rat cloné dans le vecteur rapporteur pGL3b.

Le fragment de référence est le fragment de 576pb dont l'extrémité 3' est située à 21pb en aval de l'extrémité 5' du plus long ADNc décrit pour le gène *p55^{cdc}* de rat. Des fragments de délétion ont ensuite été réalisés en fonction de la position des sites EBS potentiels (Figure 58) et clonés dans le vecteur pGL3b : pGL3b *p55* 292, 210, 106 et 93 (Figure 59).

- Analyse de l'activité transactivatrice des facteurs du groupe PEA3

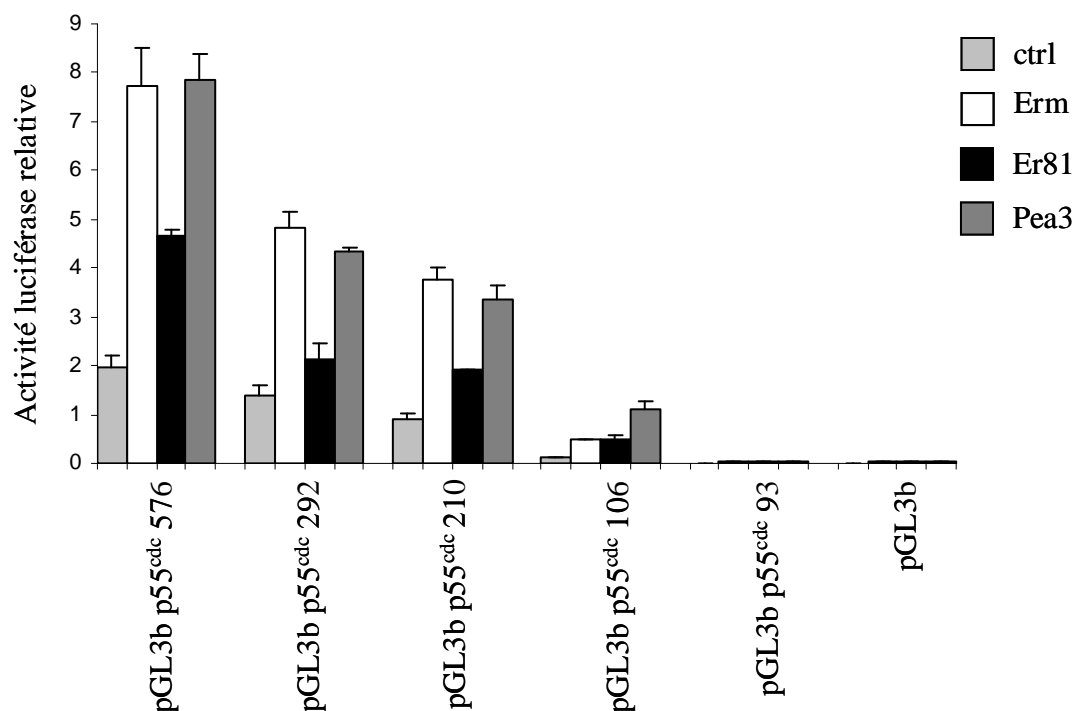


Figure 60 : Etude de l'activité transactivatrice des membres du groupe PEA3 sur le promoteur du gène *p55^{cdc}* et les différents fragments de délétion

Les vecteurs d'expression pTracer (ctrl), pTracer-Erm, -Er81 et -Pea3 et le vecteur rapporteur contenant les différents fragments du promoteur du gène *p55^{cdc}* clonés en amont de la luciférase ou le vecteur vide pGL3b ont été cotransfectés de manière transitoire dans les cellules TAC. L'activité luciférase de chaque condition expérimentale a été normalisée par rapport à celle obtenue avec le vecteur d'expression pRL-TK.

Les cellules TAC ont été transfectées de manière transitoire avec les constructions promotrices pGL3b *p55^{cdc}* 576, 292, 210, 106 et 93 et les vecteurs d'expression pTracer ou pTracer-Pea3. L'activité luciférase observée dans les points contrôles (Figure 60, première colonne de chaque condition expérimentale) montre que toutes les constructions testées du fragment de 576pb à celui de 106 pb présentent une activité transcriptionnelle basale. Cette activité basale décroît au fur et à mesure des délétions. La perte des 104pb situées entre le fragment 210 et le fragment 106 entraîne une perte de 90% de l'activité transcriptionnelle. Le fragment 93 pb ne présente pas d'activité basale (Figure 60). Le fragment promoteur minimal *p55^{cdc}* est donc le fragment 106 pb.

Le fragment de 106 pb comme les autres fragments du promoteur de *p55^{cdc}* de rat possèdent différents sites EBS potentiels. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet de

transactivation possible des facteurs du groupe PEA3 sur les différents fragments de délétion du promoteur *p55^{cdc}* de rat. Les cellules TAC ont été transfectées par les vecteurs permettant l'expression des facteurs Pea3, Erm ou Er81 en présence des vecteurs contenant les différents fragments du promoteur du gène *p55^{cdc}*. Nous montrons que le fragment de référence de 576 pb est transactivé de 4 fois par les facteurs Erm et Pea3, et de 2 fois par le facteur Er81. Ce potentiel transactivateur est conservé pour tous les fragments jusqu'au fragment minimal de 106 pb. L'effet de transactivation observé au niveau de ce fragment minimal est de 3 fois pour les facteurs Erm et Er81 et de 5 fois pour le facteur Pea3.

• Etude de l'effet des shRNA *pea3* et *erm* sur l'activité transcriptionnelle basale du promoteur du gène *p55^{cdc}* de rat

Les cellules TAC ont été cotransfectées avec les différents fragments de promoteur et les vecteurs permettant l'expression de shRNA dirigés contre *erm* ou *pea3* (pSuper, pSuper RNAi *erm* C et pSuper RNAi *pea3* A). Nous montrons que la construction pSuper RNAi *erm* C entraîne une répression de l'activité transcriptionnelle de 70% pour le fragment de 292 pb et de 20% pour le fragment de 210 pb, et la construction pSuper RNAi *pea3* A entraîne une répression de 40% pour le fragment de 576pb, 30% pour le fragment de 292 pb et 50% pour le fragment de 210 pb (Figure 61). La répression endogène des facteurs Erm et Pea3 par l'intermédiaire des shRNA *erm* et *pea3* entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle des différentes constructions promotrices. Ces résultats confortent l'implication de ces facteurs de transcription dans la régulation du promoteur *p55^{cdc}* de rat.

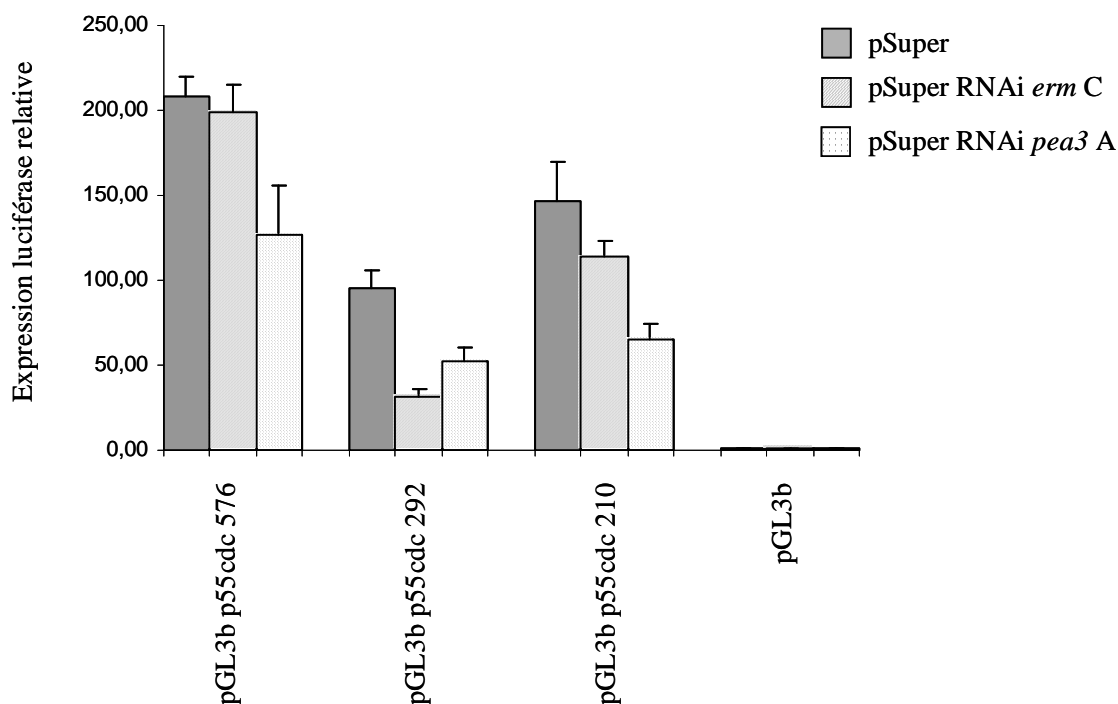


Figure 61 : Effet de shRNA dirigés contre *erm* et *pea3* sur l'activité basale du promoteur proximal du gène *p55^{cdc}*.

Les vecteurs d'expression pSuper, pSuper-RNAi *pea3 A* ou -RNAi *erm C* et le vecteur rapporteur contenant les différents fragments du promoteur du gène *p55^{cdc}* clonés en amont de la luciférase ou le vecteur vide pGL3b ont été cotransfectés de manière transitoire dans les cellules TAC. L'activité luciférase de chaque condition expérimentale a été normalisée par rapport à celle obtenue avec le vecteur d'expression pRL-TK.

• Effet de mutations des séquences EBS

La recherche des sites potentiels de fixation des facteurs de la famille ETS par les logiciels TF Search et TESS a montré la présence d'un site EBS dans le fragment de 106 pb (fragment de promoteur minimal transactivé par les facteurs du groupe PEA3). Nous avons modifié la séquence de TCCCGGAAGACCC en TCTCCCAATACC par mutagenèse dirigée (Figure 62a). L'introduction de cette mutation n'induit pas la formation ni l'élimination de séquences consensuelles pour d'autres facteurs de transcription, sauf ceux dont GGAA fait partie du consensus de fixation. L'analyse de l'activité transcriptionnelle de ce fragment pGL3b p55 106 mt après transfection transitoire dans les cellules TAC montre que cette mutation engendre non seulement une diminution drastique de l'activité basale du promoteur de 106 pb, pour arriver à une valeur proche du pGL3b, mais bloque aussi l'effet de transactivation des facteurs du groupe PEA3 (Figure 62b). Ces résultats impliquent une importance considérable de ce site de fixation au sein du promoteur de 106 pb.

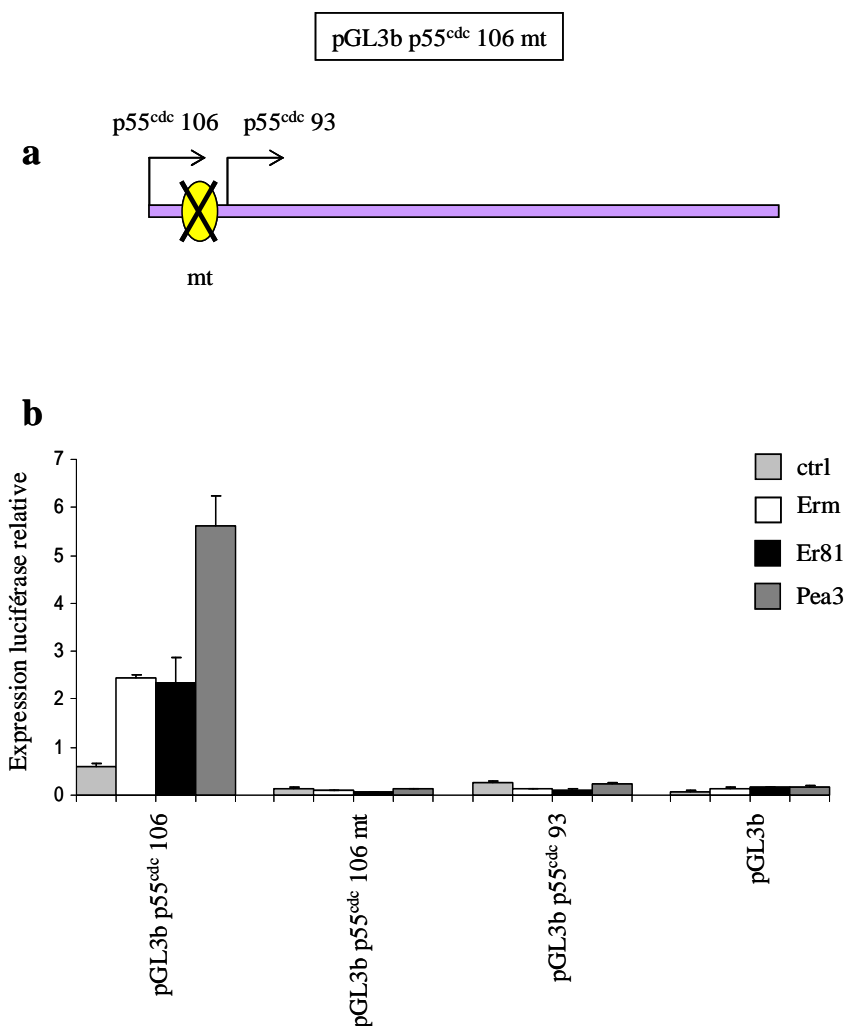


Figure 62 : Etude de l'activité des facteurs du groupe PEA3 sur la forme mutée du fragment minimal du promoteur de *p55^{cdc}*.

a, Représentation schématique du fragment de 106 pb du promoteur de *p55^{cdc}* avec le positionnement de la séquence EBS mutée. **b**, Test de transactivation, les vecteurs d'expression pTracer (ctrl), pTracer-Erm, -Er81 et -Pea3 et le vecteur rapporteur contenant les fragments minimaux du promoteur du gène *p55^{cdc}* ou de la version mutée du fragment de 106 pb cloné en amont de la luciférase ou le vecteur vide pGL3b ont été cotransfectés de manière transitoire dans les cellules TAC. L'activité luciférase de chaque condition expérimentale a été normalisée par rapport à celle obtenue avec le vecteur d'expression pRL-TK.

✓ *Etude du promoteur p55^{cdc} murin*

• Clonage des fragments du promoteur *p55^{cdc}* murin

Les données du séquençage du génome murin nous ont permis de nous intéresser à l'homologie entre les séquences humaine / murine / rat (Figure 64). L'observation de l'alignement des trois séquences montre qu'elles sont très homologues sur une partie de leur

longueur et que le site EBS situé dans le fragment 106 du promoteur de rat est conservé entre les trois espèces ainsi que la zone flanquant ce site.

Nous avons donc entrepris de cloner les fragments du promoteur murin équivalents aux fragments de 292, 210 et 106 pb du promoteur de rat (nommés 319, 210 et 106) et une version de ces différents fragments allongée en 3' de 192 pb (nommés respectivement 511, 402 et 300) (Figures 63, 64 et 65) dans le vecteur pGL4b, pour être testés en transfection transitoire dans les cellules TAC. Cette deuxième série de fragments a été conçue car tous les ARNm décrits dans les banques de données n'ont pas leur extrémité 5' située dans le fragment de 106 pb.

\xrightarrow{A}
 cacaggcttcgatgtgaccttcaaagat**ttcc**cagatgctctaactgccgggccaacccagaga
 gatggccggcagagagcgg**atcc**caggactaactgtgcggaacccgccccgtg**ttcc**gattc
 \xrightarrow{B}
 gggctccgattcgggcagggacgaaggctcccagagatgggttc**ggattccttcc**aaatgcttg
 gtcgtgcactctcgtgagatttgctccc**ggaa**gacccggccctcttcagtgtagcgaccaatcgg
 \xrightarrow{C} $\xrightarrow{BY237063}$ $\xrightarrow{AK160204}$
 caagggcgacggttaagacagttgggtttgaaggagccaatgaacgctragcagcggagagttt
 $\xrightarrow{AK029424}$ \xleftarrow{D}
 aagaacaacagtccggcgtgtccttagcttgtct**ggaaa**aagaacgcgttcggcaggcgcactga
 $\xrightarrow{mRNA\ NM023223}$ $\xrightarrow{mRNA\ AF312208}$
 cgcgctgcgaggagctgggggtttgtgttcgggagagctgagtacggagagggaccgggctgct
 gcgagctgtggcaggcggagcccaggagcccggcga**ggat**cgcgcttggtcgcctttc
 \xleftarrow{E}

Figure 63 : Séquence du fragment 420 du promoteur du gène *p55^{cdc}* de souris cloné dans le pGL4b.

Les séquences en rouge correspondent aux EBS potentielles. En bleu sont indiquées certaines des EST correspondant à la séquence du promoteur de *p55^{cdc}* murin et les ARNm décrits jusqu'à aujourd'hui.

cyclinD2 et *p55^{cdc}*, deux nouvelles cibles potentielles

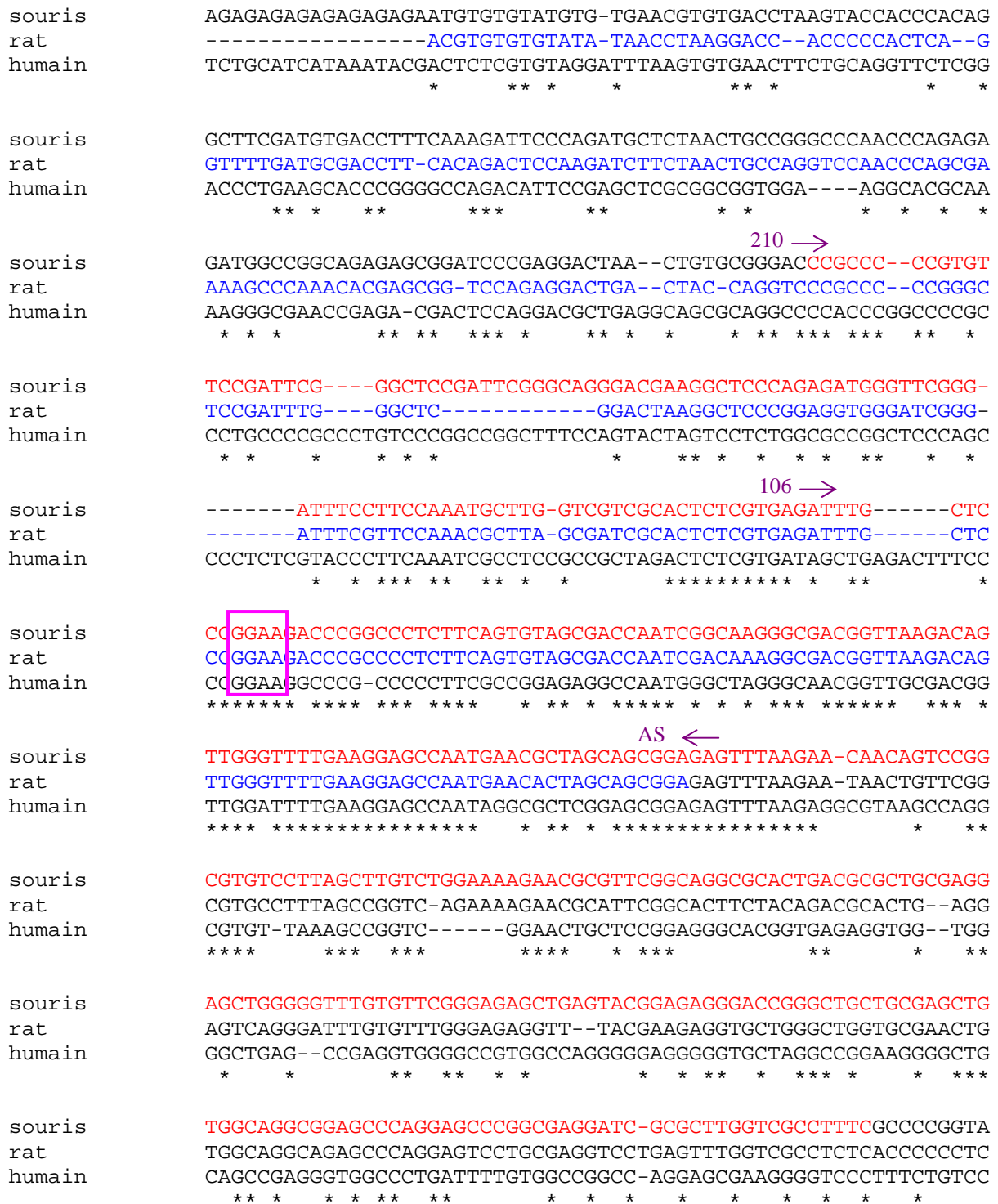


Figure 64 : Alignement des séquences du promoteur *p55^{cdc}* de rat, souris et humain.

En bleu est indiquée la région de 576pb du promoteur *p55^{cdc}* de rat cloné dans le pGL3b. En rouge est indiquée la région de 420pb du promoteur *p55^{cdc}* murin clonée dans le pGL4b. La séquence EBS conservée dans les différents promoteurs est encadrée en rose.

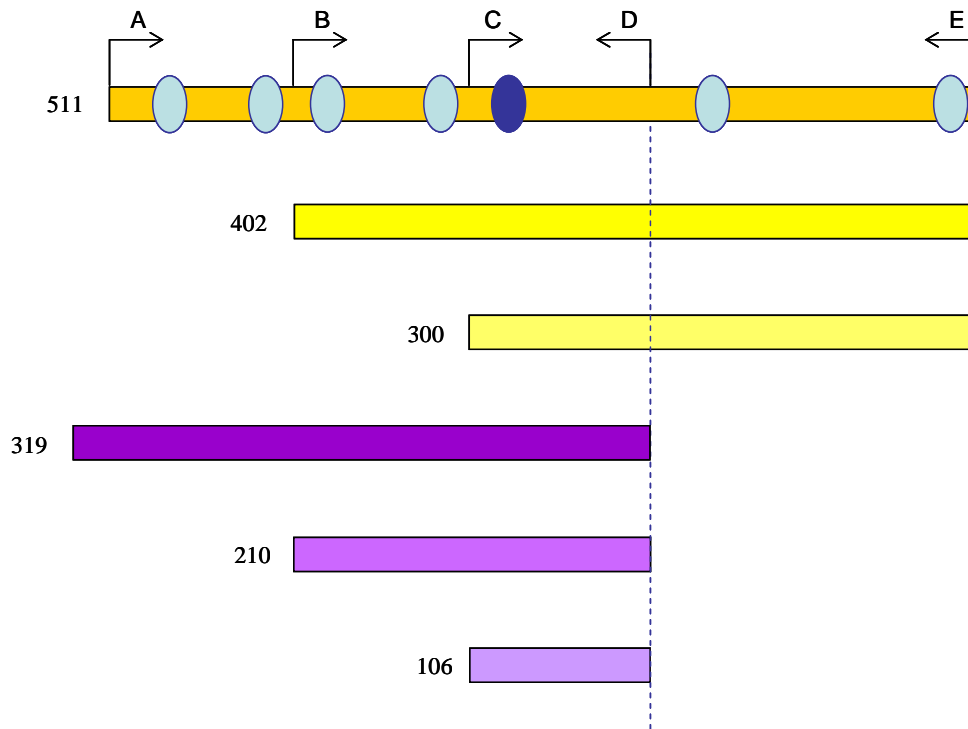


Figure 65 : Représentation schématique des différents fragments du promoteur du gène *p55^{cdc}* murin cloné dans le pGL4b.

Les sites EBS définis par les banques de données sont positionnés sur le fragment 511. En foncé est indiqué le site EBS conservé entre les espèces rat, souris et homme.

- Analyse de l'activité transactivatrice des facteurs du groupe PEA3

Les cellules TAC ont été transfectées de manière transitoire avec les constructions promotrices pGL4b *p55^{cdc}* 511, 402, 319, 300, 210 et 106 et les vecteurs d'expression pTracer ou pTracer-Pea3. L'activité luciférase observée dans les points contrôles (première colonne de chaque condition expérimentale) montre que toutes les constructions testées présentent une activité transcriptionnelle basale (Figure 66). Les fragments 319 jusque 106 (équivalent aux constructions de rat testées) présentent le même profil d'activité (l'activité transcriptionnelle diminue avec la taille du fragment). Par contre, pour les fragments de 511 pb à 300 pb, l'activité promotrice basale augmente quand la taille du fragment diminue, suggérant la présence d'éléments régulateurs dans la région 3', mais fonctionnels dans le cadre de la construction 300 (Figure 66).

L'expression du facteur Pea3 permet une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'un facteur 2 à 3 en moyenne pour les différentes constructions (significativement moins importante pour le fragment 106) (Figure 66).

Pour confirmer l'importance du site EBS conservé entre les espèces, nous allons concevoir un fragment de 106 pb muté au niveau de ce site EBS et construire un fragment équivalent au fragment de 93 pb de rat (c'est-à-dire délété de la région contenant le site EBS).

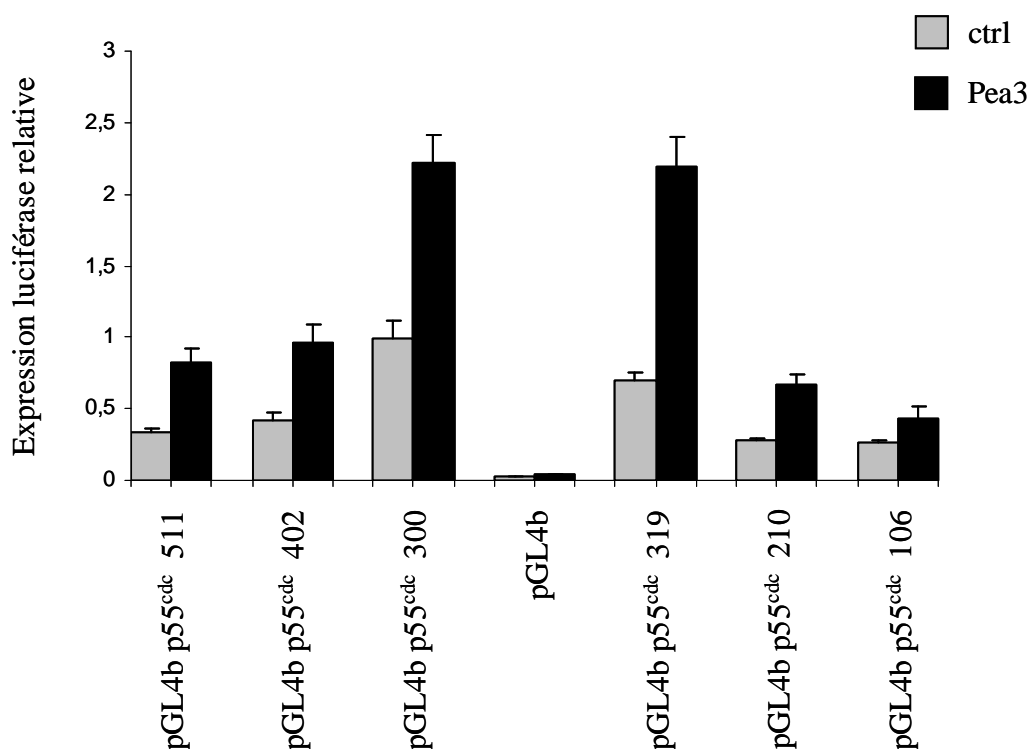


Figure 66 : Etude de l'activité transactivatrice des membres du groupe PEA3 sur le promoteur du gène *p55^{cdc}* murin et les différents fragments de délétion.

Les vecteurs d'expression pTracer (ctrl), pTracer-Erm, -Er81 et -Pea3 et le vecteur rapporteur contenant les différents fragments du promoteur du gène *p55^{cdc}* cloné en amont de la luciférase ou le vecteur vide pGL4b ont été cotransfectés de manière transitoire dans les cellules TAC. L'activité luciférase de chaque condition expérimentale a été normalisée par rapport à celle obtenue avec le vecteur d'expression pRL-TK.

Ces données préliminaires de régulation vont dans le sens des résultats obtenus pour le promoteur de rat, mais avec une activité transcriptionnelle basale beaucoup plus importante pour ces constructions de promoteur *p55^{cdc}* murin. Ce niveau basal élevé est peut être relevant de la plus faible activité transactivatrice du facteur Pea3. Ce travail devra donc être poursuivi en étendant aux autres membres Erm et Er81 et en étudiant l'importance des sites EBS dans cette régulation. La première mutagenèse concernera le site EBS conservé entre les séquences homme, souris et rat dont la mutation affecte de façon drastique l'activité transcriptionnelle de rat.

4- Mise en évidence de nouvelles cibles des facteurs Erm et Pea3 par la technique de puces à ADN (Mouse Genome Survey Microarray, Applied Biosystems)

Nous avons pu entamer récemment une étude de mise en évidence de gènes régulés par les facteurs Erm et Pea3 à partir de modèles cellulaires de répression de l'expression de ces facteurs. Nous avons choisi la technologie Applied Biosystems, Mouse Genome Survey Microarray et ce travail est réalisé en collaboration avec le Dr Arndt Benecke (IRI, systems epigenomics group).

Pour cette étude, les ARN ont été extraits des modèles suivants :

- des cellules MMT non modifiées (2 échantillons),
- des cellules MMT transfectées par un siRNA contrôle (3 échantillons),
- des cellules MMT transfectées par un siRNA dirigé contre *pea3* (4 échantillons),
- des cellules MMT transfectées par un siRNA dirigé contre *erm* (3 échantillons).

La qualité et la pureté des ARN ont été vérifiées par la technologie des puces Agilent[®], puis les ARN ont été amplifiés et marqués à la digoxygénine. Les ARN ont alors été fragmentés et hybridés pendant 18 h sur des puces à ADN reconstituant le génome murin. Après révélation, les résultats ont été analysés grâce au logiciel Biosystems Expression Array System Software et le logiciel ace.map par l'équipe du Dr Arndt Benecke (comme décrit dans le matériel et méthodes).

Brièvement, chaque échantillon « test » est comparé individuellement à chaque échantillon MMT + si *ctrl*. De la même manière, chaque échantillon de cellules MMT est comparé aux échantillons MMT + si *ctrl*. Ces analyses ont permis de mettre en évidence une variation de l'expression de certains gènes entre les différents types de cellules. Nous avons choisi de sortir de cette analyse, les gènes ayant une valeur $p < 0,01$, c'est-à-dire dont la probabilité d'être régulés est de 99%. Les gènes dont l'expression est significativement différente entre les cellules MMT et les cellules MMT + siRNA *ctrl* ont été exclus de l'analyse. Pour le facteur Pea3, nous avons sélectionné les gènes régulés plus ou moins deux fois avec la probabilité $p < 0,01$, tandis que pour le facteur Erm, nous avons sélectionné les gènes régulés avec une probabilité $p < 0,01$ sans limite minimum de régulation.

Pour le gène *pea3*, le pourcentage moyen d'inhibition dans les échantillons si *pea3* est de 72% avec une forte variance au sein des échantillons MMT + si *pea3* et MMT + si *ctrl*.

Pour le gène *pea3*, beaucoup de gènes régulés avec un seuil supérieur à deux fois. Pour le gène *erm*, peu de gènes présentent un fort niveau de régulation positive ou négative. Ce gène n'étant pas représenté sur les puces à ADN, nous n'avons pas pu contrôler le taux moyen de répression de *erm* dans les cellules MMT + si *erm* par rapport au contrôle MMT + si *ctrl*.

L'analyse des gènes dont l'expression est régulée suite à la répression de l'expression de *pea3*, a permis de mettre en évidence 84 gènes dont la probabilité de régulation est supérieure à 99% parmi les 130 gènes mis en évidence lors de l'analyse des lames. La liste de ces gènes est représentée dans le tableau 16 : l'expression relative représente l'expression des gènes dans les cellules transfectées par un siRNA dirigé contre *pea3* par rapport aux cellules transfectées par un siRNA contrôle.

L'analyse des gènes dont l'expression est régulée suite à la répression de l'expression d'*erm* a permis de mettre en évidence 44 gènes dont la probabilité de régulation est supérieure à 99% parmi les 69 gènes mis en évidence de l'analyse des puces. La liste de ces gènes est représentée dans le tableau 17 : l'expression relative représente l'expression des gènes dans les cellules transfectées par un siRNA dirigé contre *erm* par rapport aux cellules transfectées par un siRNA contrôle.

Parmi les gènes régulés, 8 gènes sont retrouvés dans les deux analyses (*Pea3* et *Erm*) avec une probabilité supérieure à 99% (Tableau 18).

Ces résultats préliminaires ne sont présentés que sous forme d'une liste des différents gènes ainsi mis en évidence dans les différentes conditions expérimentales et avec une probabilité $p < 0,01$, puis classés dans différentes catégories en fonction de leur rôle décrit dans la littérature. Une représentation schématique des 83 et 44 gènes régulés identifiés par l'analyse des puces est présentée dans les figures 67 à 69.

Résultats des hybridations de puces à ADN

Gène	geneID	P (si <i>pea3/si ctrl</i>)	Expression relative (si <i>pea3/si ctrl</i>)	Nom complet et fonction
Csh1 Plib	18775	0,0009	0,16	<i>chorionic somatomammotropin hormone 1/placental lactogen-I beta</i> , hormone impliqué dans la prolifération
Csh1 Plig	215029	0,0012	0,17	<i>chorionic somatomammotropin hormone 1/placental lactogen I gamma</i> , hormone impliqué dans la prolifération
Prnd	26434	0,0031	0,18	<i>prion protein dublet</i> , protéine homologue au prion
Has2	15117	0,0005	0,22	<i>hyaluronane synthetase</i> , métabolisme de la hyaluronane. Rôle dans la prolifération cellulaire, migration, invasion de cellules cancéreuses
Cdh17	12557	0,0004	0,29	<i>cadherin 17</i> , cadhérine du foie
Tuba7	22147	0,0045	0,30	<i>tubuline alpha 7</i> , composant des microtubules
Pcbp1	23983	0,0037	0,32	<i>poly(rC) binding protein 1</i> , protéine de liaison à l'ARN
Aqp3	11828	0	0,34	<i>aquaporine 3</i> , canal acueux pour transport eau et glycérol dans la peau.
Eif3s8	56347	0,0015	0,37	<i>eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8</i> , facteur d'initiation de la traduction
LOC629758	629758	0,0006	0,40	Null, molécule de type hsp90, protéine chaperone
Fgfr1	14182	0,0005	0,38	<i>fgf receptor 1</i> , récepteur au FGF. Rôle dans le développement, la prolifération cellulaire, la régulation négative de l'apoptose...
Acsl4	50790	0,0018	0,41	<i>acyl-CoA synthetase long-chain family member 4</i> , voie de biosynthèse des lipides et dégradation des longues chaînes d'acides gras
Usp43	216835	0,0093	0,41	<i>ubiquitin specific peptidase 43</i> , endopeptidase impliquée dans la dégradation de l'ubiquitine
Snn	20621	0,0011	0,45	<i>stannin</i> , fonction cellulaire inconnue. Pourrait avoir un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire.
LOC632638 Eps8	13860	0	0,45	<i>epidermal growth factor receptor pathway substrate 8</i> : Substrat de l'EGF récepteur. Rôle dans la polymérisation de l'actine et la mobilité cellulaire, oncogène potentiel
Acaca	107476	0,0047	0,46	<i>acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha</i> , biosynthèse des acides gras
Tspan14	52588	0,0035	0,46	<i>tetraspanin 14</i> , les tétraspanines en général régulent la morphologie cellulaire, la mobilité, l'invasion...
Slc4a8	59033	0,0006	0,47	<i>solute carrier family 4, member 8</i> , canal ionique cotransporteur sodium/bicarbonate
LOC625403	625403	0,0037	0,47	<i>RIKEN cDNA 6330405D24 gene</i> , similaire aux protéines de liaison aux acides gras
Stip1	20867	0,0064	0,47	<i>stress-induced phosphoprotein 1</i> , organisation du complexe hsp70/hsp90.
Sc4mol	66234	0,0007	0,48	<i>sterol-C4-methyl oxidase-like</i> , métabolisme des lipides
LOC622384 LOC634810	622384	0,0009	0,48	Null, similaire aux protéines de liaison aux acides gras
Rras2	66922	0,0032	0,48	<i>related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2</i> , GTPase. Facteur transformant, rôle dans la survie cellulaire
Ldlr	16835	0,0003	0,48	<i>low density lipoprotein receptor</i> , métabolisme du cholestérol
Irx2	16372	0,0005	0,48	<i>iroquois related homeobox 2</i> , facteur de transcription impliqué dans le développement

Résultats des hybridations de puces à ADN

Gène	geneID	P (si <i>pea3/si ctrl</i>)	Expression relative (si <i>pea3/si ctrl</i>)	Nom complet et fonction
Rgs2	19735	0,0059	0,48	<i>regulator of G-protein signaling 2</i> , régulation de la signalisation des récepteurs à protéines G
Tra1	22027	0,0009	0,48	<i>tumor rejection antigen</i> , protéine hsp
Myh9	17886	0,0078	0,49	<i>myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle</i> , myosin non musculaire. Donne une activité contractile aux cellules.
Phgdh	236539	0,0037	0,49	<i>3-phosphoglycerate dehydrogenase</i>
Fads2	56473	0,0016	0,50	<i>fatty acid desaturase 2</i> , voie de biosynthèse des acides gras
Hspd1	15510	0,0032	0,50	<i>heat shock protein 1</i> , protéine chaperonne
Socs4	67296	0,0004	2,01	<i>suppressor of cytokine signaling 4</i> , suppresseur de la signalisation des cytokines.
Phc3	241915	0,0087	2,01	<i>polyhomeotic-like 3 (Drosophila)</i> , composant du complexe PRC
Atp1a2	98660	0,0002	2,01	<i>ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, alpha 2 polypeptide</i> , pompe ATP à cation dépendante
Zfp54	22712	0	2,02	<i>zinc finger protein 54</i> , facteur de transcription
Ube2s	77891	0,0076	2,09	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2S</i> , enzyme de ligation de l'ubiquitine
Fgfr1op	75296	0,0077	2,11	<i>fgfr1 oncogene partner</i> , protéine du centrosome impliquée dans l'ancrage des centromères.
Csf1	12977	0,002	2,11	<i>colony stimulating factor 1</i> , activateur des macrophages
Gpha2	170458	0,0001	2,13	glycoprotein hormone alpha 2
Mgmt	17314	0,0028	2,13	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i> , méthyltransférase, impliqué dans la réparation de l'ADN.
Rrm2b	382985	0,0059	2,15	<i>ribonucleotide reductase M2 B</i> , transforme les désoxyribonucléotides en ribonucléotides
Ppm1d	53892	0,0001	2,17	<i>protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform</i> , sérine-thréonine phosphatase qui inactive les voies p53 et MAPK.
Nusap1	108907	0,0001	2,19	<i>nucleolar and spindle associated protein 1</i> , protéine de liaison aux microtubules
BB114266	235047	0	2,19	<i>expressed sequence BB114266</i> , régulation de la transcription
LOC435791	435791	0,0047	2,26	<i>interferon zeta</i>
Phlda3	27280	0,0001	2,27	<i>pleckstrin homology-like domain, family A, member 3</i> , rôle potentiel dans l'apoptose liée à Fas.
Fas	14102	0,0018	2,29	<i>fas (TNF receptor superfamily member)</i> , voie pro-apoptotique
Vcam1	22329	0,0017	2,29	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i> , molécule d'adhésion
Sesn2	230784	0,0052	2,34	<i>sestrin 2</i> , rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire
BC031441	240120	0	2,35	<i>cDNA sequence BC031441</i> , protéine à doigt de zinc
BC049807	435791	0	2,36	<i>cDNA sequence BC049807</i> , similaire à l'interféron zeta
Zfp119	104349	0,0001	2,41	<i>zinc finger protein 119</i> , facteur de transcription
Zfp688	69234	0	2,47	<i>zinc finger protein 688</i> , facteur de transcription
Nfyb	18045	0	2,48	<i>nuclear transcription factor-Y beta</i> , facteur de transcription
Fst	14313	0	2,50	<i>follicle-stimulating hormone receptor-like 1</i> , inhibiteur de l'activine (famille TGFβ)
Wisp1	22402	0,0007	2,52	<i>WNT1 inducible signaling pathway protein 1</i> , protéine de la voie de signalisation Wnt1

Résultats des hybridations de puces à ADN

Gène	geneID	P (si <i>pea3</i> /si <i>ctrl</i>)	Expression relative (si <i>pea3</i> /si <i>ctrl</i>)	Nom complet et fonction
Tns1	21961	0,0003	2,56	<i>tensin 1</i> , protéine de liaison à l'actine située des points d'adhésion cellules/matrice extracellulaire.
Trp53inp1	60599	0,0033	2,60	<i>transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1</i> , inhibe le cycle cellulaire et induit l'apoptose
Ei24	13663	0	2,69	<i>etoposide induced 2.4 mRNA</i> , facteur pro-apoptotique
Slc22a18	18400	0,0083	2,70	<i>solute carrier family 22, member 18</i> , canal ionique transporteur d'anions
Bbc3	170770	0	2,71	<i>Bcl-2 binding component 3</i> : inducteur d'apoptose des voies p53 dépendantes ou indépendantes
Notch3	18131	0	2,80	<i>notch gene homolog 3</i> , molécule impliquée dans le développement
Snx16	74718	0	2,80	<i>sorting nexin 16</i> , trafic membranaire
Rab30	75985	0,0001	2,88	<i>RAB30, member RAS oncogene family</i> , GTPase de la famille ras
Pmm1	29858	0,003	2,93	<i>phosphomannomutase 1</i>
Ccl17	20295	0,0041	3,07	<i>small inducible cytokine subfamily A17</i> , chemokine
Hmmr	15366	0,0014	3,20	<i>hyaluronan mediated motility receptor</i> ,
Krt1-17	16667	0	3,41	<i>keratin 17</i> , constituant du cytosquelette
Foxn2	14236	0,0097	3,49	<i>forkhead box N2</i> , facteur de transcription
Arl9	384185	0,0002	3,86	<i>ADP-ribosylation factor-like 9</i>
Abca8b	27404	0	3,91	<i>ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8b</i>
Casq2	12373	0	4,07	<i>calsequestrin 2</i> , protéine de liaison au calcium
2600006K01 Rik	70319	0,0084	4,08	<i>RIKEN cDNA 2600006K01 gene</i> , procollagen, molécule d'adhésion
Igfbp7	29817	0	4,12	<i>insulin-like growth factor binding protein 7</i> , protéine de liaison à l'IGF
Myh7	140781	0	4,22	<i>myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta</i>
Rdm1	66599	0	4,24	<i>RAD52 motif 1</i> , impliqué dans la réparation de l'ADN
LOC210457	210457	0,0001	4,50	<i>Null</i> , protéine à domaine LIM, similaire à la testine (supresseur de tumeur)
Ces5	234673	0,0016	4,87	carboxylesterase 5
Defb28	545475	0	4,88	<i>Null</i> , défensine
Aldh1l1	107747	0,0004	5,03	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1
Des	13346	0	5,64	<i>desmin</i> , protéine du cytosquelette
Slc5a1	20537	0,0006	8,09	<i>solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1</i> , canal ionique
Dscam1l	114873	0	8,52	<i>down syndrome cell adhesion molecule-like 1</i> , molécule d'adhérence
Tnfsf7	21948	0,003	13,16	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7</i> , cytokine de la voie du TNF

Tableau 16 : Liste des gènes dont l'expression est modulée dans des cellules MMT transfectées par un siRNA dirigé contre *pea3* par rapport à des cellules MMT transfectées par un siRNA contrôle.

L'expression relative représente l'expression des gènes dans les cellules transfectées par un siRNA dirigé contre *pea3* par rapport aux cellules transfectées par un siRNA contrôle.

Résultats des hybridations de puces à ADN

Gène	geneID	P (si <i>erm</i> /si <i>ctrl</i>)	Expression relative (si <i>erm</i> /si <i>ctrl</i>)	Nom complet et fonction
Hgf	14234	0,0038	0,36	<i>hepatocyte growth factor</i> , facteur de croissance impliqué dans la migration, prolifération et dispersion des cellules
Tub7	22147	0,008	0,41	<i>tubuline alpha 7</i> , composant des microtubules
Fgf1r	14182	0,0051	0,44	<i>fgf receptor 1</i> , récepteur au FGF. Rôle dans le développement, la prolifération cellulaire, la régulation négative de l'apoptose
1300003K24 Rik = R3hdm2	71750	0,005	0,60	<i>RIKEN cDNA 1300003K24 gene</i> , R3H domain containing 2, phosphoprotéine
Wbscr16	94254	0,0095	0,46	<i>williams-Beuren syndrome chromosome region 16 homolog (human)</i>
LOC631287	631287	0,0007	0,66	<i>Null, similar to interferon induced transmembrane protein 2</i>
Acsl4	50790	0,0058	0,69	<i>acyl-CoA synthetase long-chain family member 4</i> , métabolisme des lipides
Ddx19a	13680	0,0036	0,71	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 19a</i> , hélicase ARN
Ptplad	57874	0,0055	0,77	<i>protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1</i> , médiateur de la signalisation de <i>rac1</i>
Maged2	80884	0,0034	0,85	<i>melanoma antigen, family D, 2</i> , marqueur métastatique
Igf1r	16001	0,0069	0,91	<i>insulin-like growth factor I receptor</i> , récepteur de l'IGF.
Smc4l1	70099	0,0086	1,17	<i>SMC4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1 (yeast)</i> , protéine de liaison à la chromatine
Ppme1	72590	0,0008	1,19	<i>protein phosphatase methyltransferase 1</i>
Smtn	29856	0,0096	1,20	<i>smoothelin</i> , protéine structurale
S100a4	20198	0,0086	1,2	<i>S100 calcium binding protein A4</i> , protéine impliqué dans la prolifération, les métastases, l'adhérence, et l'angiogenèse
Hectd1	207304	0,0055	1,21	<i>HECT domain containing 1</i> , ubiquitine ligase
Cdk9	107951	0,0096	1,22	<i>cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase)</i> , facteur de régulation de l'élongation de la transcription
LOC638711	638711	0,0031	1,24	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3</i> , protéine de liaison à l'ARN
Tspyl2	52808	0,0098	1,24	<i>TSPY-like 2</i> , protéine d'assemblage du nucléosome
Mobk1b	232157	0,0007	1,25	<i>MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 1B (yeast)</i> ,
Suz12	52615	0,0045	1,26	<i>suppressor of zeste 12 homolog (Drosophila)</i> , membre de la famille polycomb
Kif21a	16564	0,0064	1,27	<i>kinesin family member 21A</i> , activité de microtubules
Hnrpr	74326	0,005	1,28	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R</i> , protéine de liaison à l'ARN
Rbm15	229700	0,0085	1,33	<i>RNA binding motif protein 15</i> , protéine de liaison à l'ARN
Hnrpa3	229279	0,0058	1,33	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3</i> protéine de liaison à l'ARN
Ppp2cb	19053	0,0035	1,36	<i>protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform</i> , phosphatase impliquée dans de nombreuses voies de signalisation dont la voie Wnt.
Stam	20844	0,0280	1,37	<i>signal transducing adaptor molecule</i> , molécule adaptatrice de type SH3
Bbc3	170770	0,0094	1,39	<i>Bcl-2 binding component 3</i> : inducteur d'apoptose des voies p53 dépendantes ou indépendantes

Résultats des hybridations de puces à ADN

Gène	geneID	P (si <i>erm</i> /si <i>ctrl</i>)	Expression relative (si <i>erm</i> /si <i>ctrl</i>)	Nom complet et fonction
Acbd3	170760	0,007	1,40	<i>acyl-Coenzyme A binding domain containing 3</i> , métabolisme des lipides
Mpp5	56217	0,0016	1,41	<i>membrane protein, palmitoylated 5 (MAGUK p55 subfamily member 5)</i> , protéine membranaire qui pourrait être impliquée dans les jonctions intercellulaires
Pcgf2	22658	0,0093	1,44	<i>polycomb group ring finger 2</i> , membre de la famille polycomb
Aff4	93736	0,0046	1,46	<i>AF4/FMR2 family, member 4</i> , facteur de transcription
Clcc1	229725	0,003	1,47	<i>chloride channel CLIC-like 1</i> , canal chlore
Impdh1	23917	0,0078	1,49	<i>inosine 5'-phosphate dehydrogenase 1</i>
Scarbl	20778	0,0096	1,53	<i>scavenger receptor class B, member 1</i> , récepteur aux lipoprotéines permettant l'efflux de cholestérol vers les lipoprotéines.
Arpc4	68089	0,0075	1,69	<i>actin related protein 2/3 complex, subunit 4</i> , polymérisation de l'actine
Ssxb3	278174	0,0095	1,74	<i>synovial sarcoma, X member B, breakpoint 3</i> , corépresseur de la transcription
Idh1	15926	0,0051	1,76	<i>isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+)</i> , soluble, oxydo-réductase
Serpin B2	18788	0	1,8	<i>serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 2</i> , inhibiteur de Upa
Igfbp7	29817	0,0093	1,82	<i>insulin-like growth factor binding protein 7</i> , protéine de liaison au facteur IGF
Rnasen	14000	0,0048	2,12	<i>ribonuclease III, nuclear</i> , protéine de dégradation de l'ARN
AA792894 = <i>krcc1</i>	57896	0,007	2,23	<i>EST AA792894</i> , protéine à doigt de zinc liant l'ARNdb
Arhgap5	11855	0,0042	2,38	<i>Rho GTPase activating protein 5</i> , protéine à activité GTPase, impliquée entre autres les signaux contrôlant les adhésions focales.

Tableau 17 : Liste des gènes dont l'expression est modulée dans des cellules MMT transfectées par un siRNA dirigé contre *erm* par rapport à des cellules MMT transfectées par un siRNA contrôle.

L'expression relative représente l'expression des gènes dans les cellules transfectées par un siRNA dirigé contre *erm* par rapport aux cellules transfectées par un siRNA contrôle.

Gène	geneID	P (si <i>erm</i> /si <i>ctrl</i>)	Expression relative (si <i>erm</i> /si <i>ctrl</i>)	P (si <i>pea3</i> /si <i>ctrl</i>)	Expression relative (si <i>pea3</i> /si <i>ctrl</i>)
Tub7	22147	0,008	0,41	0,0045	0,30
Fgfr1	14182	0,0051	0,44	0,0005	0,38
Acsl4	50790	0,0058	0,69	0,018	0,41
Bbc3	170770	0,0094	1,39	0	2,71
Igfbp7	29817	0,0093	1,82	0	4,12

Tableau 18 : Liste des gènes dont l'expression est modulée par *pea3* et *erm*.

Résultats des hybridations de puces à ADN

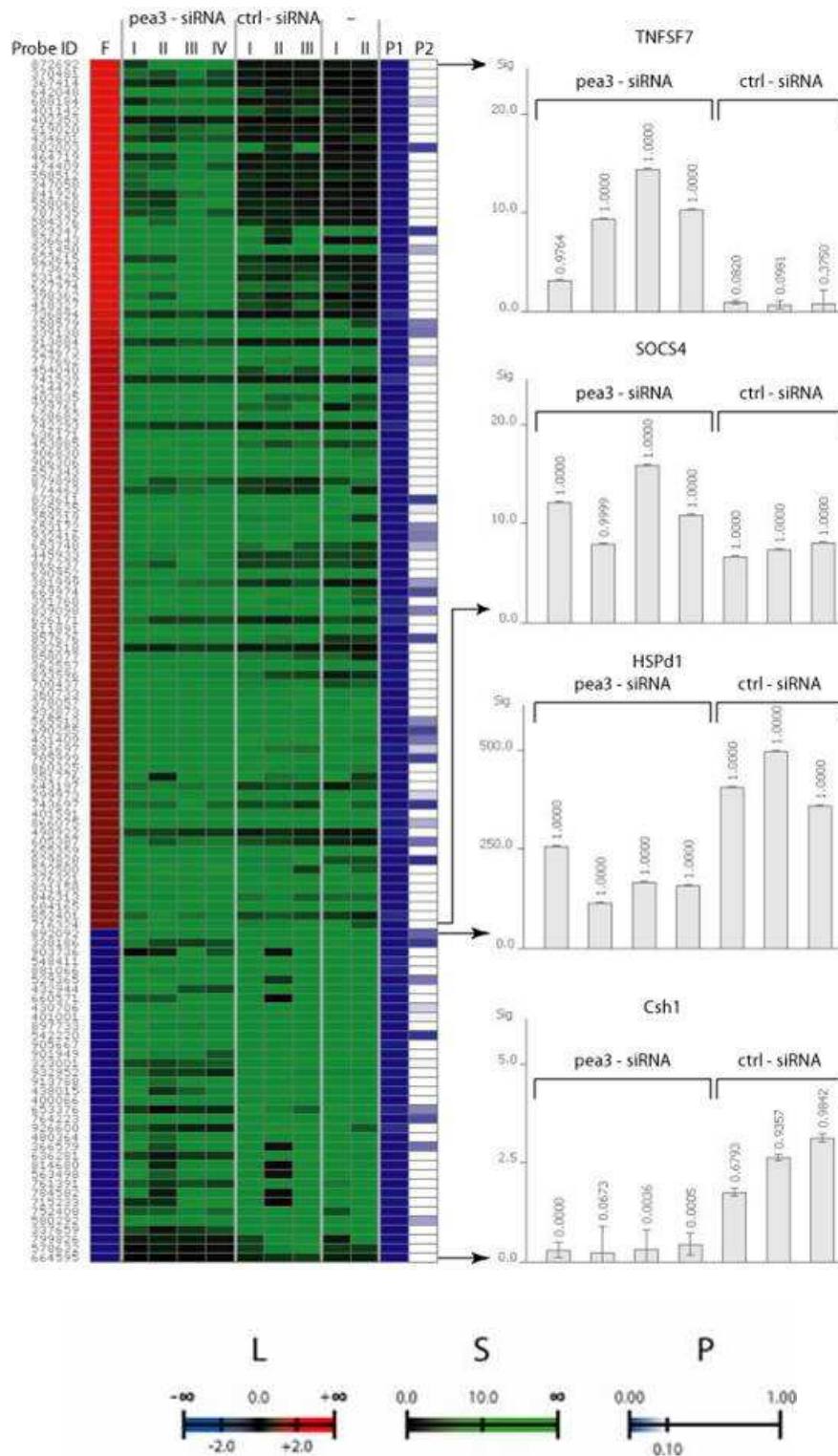


Figure 67 : Profil d'expression des différents gènes sélectionnés suite à l'expérience de puces à ADN avec les cellules MMT transfectées par les siRNA *pea3*.

La colonne F correspond à l'expression moyenne et normalisée des différents gènes sur la puce à ADN (en log). Les colonnes vertes correspondent à l'expression brute de chacun des gènes dans nos différents échantillons (MMT + si *pea3* [*pea3*-siRNA], MMT + si *ctrl* [*ctrl*-siRNA] et MMT [-]). P1 correspond à la valeur p entre les échantillons MMT + si *pea3* et MMT + si *ctrl*. P2 correspond à la valeur p entre les échantillons MMT + si *ctrl* et MMT. Les graphiques représentent l'expression brute dans chacun des échantillons du gène le plus et le moins réprimé et le plus et le moins activé.

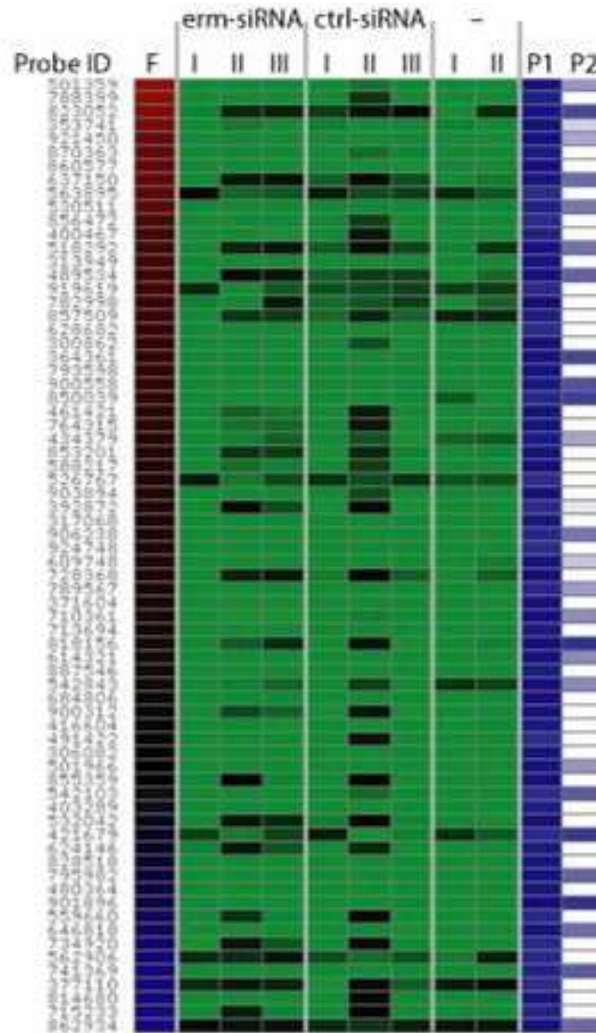


Figure 68 : Profil d’expression des différents gènes sélectionnés suite à l’expérience de puces à ADN avec les cellules MMT transfectées par les siRNA *erm*.

La colonne F correspond à l’expression moyenne et normalisée des différents gènes sur la puce à ADN (en log). Les colonnes vertes correspondent à l’expression brute de chacun des gènes dans nos différents échantillons (MMT + si *erm* [erm-siRNA], MMT + si *ctrl* [ctrl-siRNA] et MMT [-]). P1 correspond à la valeur p entre les échantillons MMT + si *erm* et MMT + si *ctrl*. P2 correspond à la valeur p entre les échantillons MMT + si *ctrl* et MMT.

Résultats des hybridations de puces à ADN

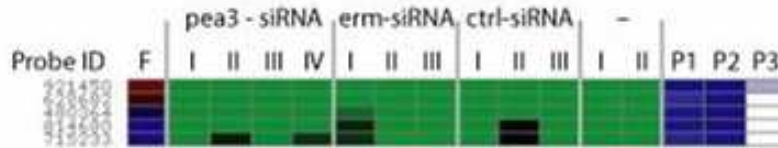


Figure 69 : Profil d'expression des différents gènes sélectionnés suite à l'expérience de puces à ADN avec les cellules MMT transfectées par les siRNA *erm* et *pea3*.

La colonne F correspond à l'expression moyenne et normalisée des différents gènes sur la puce à ADN (en log). Les colonnes vertes correspondent à l'expression brute de chacun des gènes dans nos différents échantillons (MMT + si *erm* [erm-siRNA], MMT + si *pea3* [pea3-siRNA], MMT + si *ctrl* [ctrl-siRNA] et MMT [-]). P1 correspond à la valeur p entre les échantillons MMT + si *erm* et MMT + si *ctrl*. P2 correspond à la valeur p entre les échantillons MMT + si *erm* et MMT + si *ctrl*. P3 correspond à la valeur p entre les échantillons MMT + si *ctrl* et MMT.

L'analyse de la liste des gènes régulés par les facteurs Erm et/ou Pea3, permet en fonction des connaissances quand à leur rôle décrit dans la littérature, de les classer dans les catégories suivantes :

- des gènes codant des canaux ioniques ou des transporteurs (*slc4a8*, *slc22a18*, *slc5a1*, *aqp3*, *clcc1*, *atp1a2*, *abca8b*),
- des chémokines ou molécules du système immunitaire (*ccl17*, *socs4*, *ifngr2*, *csf1*, *Defb28*, *BC049807*, *loc435791*, *loc631287*),
- des molécules du métabolisme des lipides ou des acides gras (*ldlr*, *sc4mol*, *scarb1*, *acaca*, *acs14*, *fads2*, *acbd3*, *loc625403*, *loc622384*),
- des molécules liées à l'ubiquitine (*hectd1*, *usp43*, *ube2S*),
- des molécules de réparation de l'ADN (*mgmt*, *rdm1*, *rrm2b*),
- des protéines impliquées au niveau des nucléotides et de la transcription, traduction, réplication (*RNAsen*, *Eif3s8*, *tspyl2*, *ddx19*, *cdx9*, *smc411*) dont des protéines de liaison à l'ARN (*hnrpr*, *hnrpa3*, *rbm15*, *krcc1*, *pcbp1*, *LOC638711*),
- des facteurs de transcription (*foxn2*, *irx2*, *Nfyb*, *aff4*) dont protéine à doigt de zinc (*Zfp54*, *zfp119*, *zfp688*, *BB114266*, *BC031441*) ou un corépresseur de la transcription (*ssxb3*),
- des molécules impliquées dans l'apoptose ou dans les voies afférentes (*bbc3*, *ei24*, *tnfsf7*, *phlda3*, *fas*, *Trp53inp1*),
- des molécules plus ou moins impliquées dans la prolifération cellulaire ou le cycle cellulaire (*sestrin2*, *stannin*),
- des protéines du cytosquelette et de la structure cellulaire (*myh9*, *myh7*, *tns1*, *des*, *arpc4*, *krt1-17*, *smtn*),

Résultats des hybridations de puces à ADN

- des protéines des microtubules ou de leur dynamique (*tuba7, fgfr1op, nusap, kif21a*),
- des molécules impliquées dans la régulation de la migration, l'invasion et des métastases (*serpinB2, maged2, hgf, hmmr, has2, tspan14, eps8, follistatine, s100a4*),
- des molécules d'adhérence (*dscam11, vcam, cdh17, 2600006KOIRik*),
- des molécules liées aux voies de signalisation des facteurs de croissance ou des hormones (*fgfr1, igfbp7, igfr, csh1\PliB, csh1\PliG, gpha2*),
- des éléments de régulation des voies de signalisation (*rgs2, ppm1d, wisp1, ptplad, notch3, stam, arl9, arhgap5*),
- des gènes de la voie ras (*rras2, rab30*),
- des molécules du groupe polycomb (*phc3, suz12, pcgf2*),
- des protéines chaperonnes ou des molécules reliées (*LOC629758, tra1, hspd1, stip1*),
- D'autres facteurs suppresseurs de tumeurs (*mobk1d, loc210457*),
- D'autres molécules non classifiables (*prnd, snx16, rh3dm2, wbscr16, phgdh, mpp5, idh1*),
- d'autres enzymes de modification (*ces5, pmme, aldh1l1, impdh1, phgdh, ppp2cb*).

Discussion et conclusion

I- De nouveaux modèles d'étude de l'implication des facteurs du groupe PEA3 dans la morphogenèse et la tumorigenèse

Dans le cadre de ce travail, nous avons mis au point de nouveaux modèles de répression de l'expression des facteurs Erm et Pea3 pour l'étude de l'implication de ces facteurs dans les mécanismes de la morphogenèse et de la tumorigenèse mammaire, en utilisant le principe de l'ARN interférence et ce dans les deux modèles cellulaires TAC (cellules normales) et MMT (cellules cancéreuses).

Nous avons choisi deux modalités d'utilisation de l'ARN interférence :

- l'utilisation de siRNA sous forme oligonucléotidique, utilisés dans le cadre de transfections transitoires des cellules TAC et MMT, permettant une inhibition à moyen terme de l'expression des facteurs Pea3 et Erm. Ces modèles de répression transitoire ont été utilisés dans des études phénotypiques *in vitro* et dans la recherche de gènes cibles,

- l'utilisation de shRNA par l'intermédiaire de vecteurs rétroviraux ; par cette approche nous avons obtenu des lignées TAC Rs, TAC RNAi *pea3* A et B, TAC RNAi *erm* C, MMT Rs, MMT RNAi *pea3* A et B, MMT RNAi *erm* C et MMT RNAi *pea3* A/ RNAi *erm* C, exprimant de manière constitutive des siRNA dirigés contre *pea3* et *erm*. Ces différentes lignées ont pu être utilisées dans des études phénotypiques *in vitro* et/ou *in vivo* et dans la recherche de gènes cibles.

Par l'approche siRNA, nous avons défini des séquences oligonucléotidiques ARN interférentes fonctionnelles aussi bien dans des cellules mammaires normales que cancéreuses. Ces séquences (deux pour *pea3* et une pour *erm*) permettent une inhibition de l'expression de l'ARNm de chacun des deux facteurs d'au moins 80%.

Les recherches sur la définition de séquence siRNA se sont considérablement développées et de nouveaux algorithmes ont été mis au point. Ces logiciels permettent de mieux appréhender la probabilité de fonctionnalité des séquences prédites mais aussi leur spécificité en éliminant au maximum la probabilité qu'un siRNA aille cibler une autre séquence que celle contre laquelle il est dirigé (effet 'off-target'). En limitant cet effet 'off-target', ces séquences présentent aussi une meilleure efficacité dans le temps.

Discussion et conclusion

Selon ce principe nous avons récemment choisi de nouvelles séquences siRNA dirigées contre *pea3* et *erm* (SMART Pool Dharmacon) dans le but d'obtenir différents siRNA efficaces et fonctionnels permettant de conforter certains résultats obtenus et d'en compléter d'autres. Il est maintenant reconnu que la validation des effets des siRNA doit être contrôlée en comparant au moins 2 séquences siRNA par gène ciblé.

Parmi les séquences testées, 2 séquences sur 4 présentent une bonne efficacité d'inhibition pour *pea3* comme pour *erm*. Ces séquences offrent ainsi la possibilité de conforter les résultats obtenus jusqu'à maintenant et donc de les utiliser dans des études morphogénétiques ou dans les études de caractérisation des gènes cibles.

En plus, des siRNA dirigés contre *erm* et *pea3*, nous possédons des siRNA dirigés contre *er81*. Les premiers tests de validation fonctionnelle de ces séquences ont été réalisés mais ne donnent pas de résultats concluants, faute d'oligonucléotides performants en PCR. Ces essais doivent être poursuivis dans le but de pouvoir obtenir des modèles cellulaires d'inhibition de l'expression de ce facteur et donc de tester son implication dans la cancérogenèse d'une part et la morphogenèse mammaire d'autre part.

Deux séquences shRNA pour *pea3* et une séquence shRNA pour *erm* ont montré leur fonctionnalité dans des tests de transactivation ou sur l'expression endogène et exogène (apportées par le vecteur pTracer-Pea3 ou -Erm) de chacun de ces deux facteurs. Pourtant, exprimés de manière constitutive et stable dans les cellules cancéreuses murines ou dans les cellules normales murines par l'intermédiaire du vecteur rétroviral pRetroSuper, ces shRNA permettent une diminution de l'expression de l'ARNm de *pea3* de 60% et de *erm* de 50% au maximum. Le vecteur rétroviral ou les séquences ARN interférentes utilisés dans ce cadre ne semblent donc pas optimaux pour permettre une répression massive de l'expression des facteurs Pea3 et Erm. Différentes hypothèses permettant d'expliquer ces taux de répression partiels peuvent être avancées :

- la production des siRNA dans les cellules est insuffisante et ne permet pas de saturer les séquences cibles. Le promoteur contrôlant la transcription des séquences shRNA est le promoteur H1 (promoteur de l'ARN H1, composant de la RNase P). Ce promoteur est un promoteur humain de type ARN polymérase III, que nous utilisons dans un modèle murin, et qui pourrait donc ne pas être de fonctionnalité optimale. Une solution alternative que nous avons envisagée serait de remplacer ce promoteur ARN pol III H1 par un promoteur fort ARN

Discussion et conclusion

pol II (type CMV). Un vecteur conçu sur ce principe et permettant la transcription de petits ARN par un promoteur de type ARN pol II est maintenant commercialisé : le pSilencer-CMV (Ambion). Nous avons réalisé le clonage d'une séquence shRNA *pea3* dans ce vecteur plasmidique et testé la fonctionnalité de la séquence par des tests de transfection transitoire mais sans résultats concluants. Une autre solution serait de tester un autre promoteur ARN pol II (U6 ou U1) murin. Une dernière solution consisterait à changer de système viral, comme par exemple en passant par des lentivirus qui sont connus pour être efficaces avec des shRNA (Snove and Rossi, 2006).

- les séquences sous forme shRNA ne sont pas optimales pour une inhibition conséquente. Il faudrait alors envisager l'utilisation de nouvelles séquences shRNA dirigées contre *erm* ou *pea3*. En effet, depuis que nous utilisons ces shRNA en 2003, les algorithmes permettant la conception de ces séquences ont considérablement évolué. A l'époque, la sélection des siRNA se faisait empiriquement en se basant sur la connaissance des siRNA naturels (Elbashir et al., 2002). Nous envisageons donc de concevoir de nouvelles séquences shRNA par ces nouveaux algorithmes. Une dernière possibilité envisagée serait d'utiliser des shRNA dont la structure est basée sur celle des miRNA naturels. En effet, des miRNA artificiels ont été utilisés et semblent être très efficaces pour permettre la répression de l'expression des gènes (Chang et al., 2006). Sur ce principe, l'équipe de Hannon a conçu une librairie de shRNA mimant la structure des miRNA dans un vecteur rétroviral pSM2 contenant un promoteur U6 (Figure 70). Ce principe pourrait donc être utilisé dans notre cas.

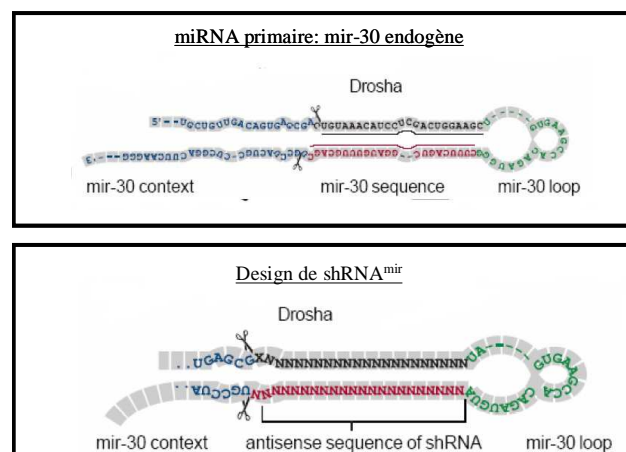


Figure 70 : Structure d'un shRNA^{mir} comparée au miRNA primaire.

D'après www.openbiosystems.com

La mise au point de modèles de cellules exprimant de manière constitutive des ARNs interférents avec une inhibition d'environ 90% devrait permettre d'effectuer d'autres manipulations *in vivo*. D'une part, pour confirmer l'effet des facteurs du groupe PEA3 dans la formation de tumeurs en souris immunodéficientes, et d'autre part, pour permettre d'étudier le rôle des facteurs du groupe PEA3 dans les mécanismes de formation d'un arbre épithélial mammaire.

II- Rôles potentiels des facteurs du groupe PEA3 dans les cellules mammaires cancéreuses

1- Les facteurs de transcription Pea3 et Erm ont un effet pro-prolifératif

Nous avons pu montrer par l'utilisation de siRNA (ou shRNA) dirigés contre *pea3* ou *erm* que la répression de l'expression de *pea3* et *erm* induit une diminution des capacités de prolifération des cellules. Les facteurs Pea3 et Erm semblent donc impliqués dans le contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses en se comportant comme des facteurs permettant l'augmentation du potentiel de prolifération.

Le rôle des facteurs du groupe PEA3 dans la régulation de la prolifération a déjà été suggéré dans différents modèles expérimentaux. En effet, dans des cellules cancéreuses du côlon, la transfection par des siRNA dirigés contre *pea3* entraîne une inhibition de la croissance de ces cellules (Moss et al., 2006). Dans des tumeurs de cancer du sein, une corrélation a été montrée entre l'expression ARN de *pea3* et celle de l'antigène *MKI67*, marqueur des cellules en prolifération (Bieche et al., 2004). Par l'utilisation d'un dominant négatif du facteur Erm, il a été montré, chez la souris, qu'au cours du développement des crêtes neurales, le facteur Erm est impliqué dans la prolifération des cellules qui adoptent un devenir glial (Paratore et al., 2002). D'autre part, certains gènes démontrés comme cibles des facteurs du groupe PEA3 sont aussi connus pour être impliqués dans la prolifération cellulaire, *HER2/neu* (Xing et al., 2000), *muc4* (Fauquette et al., 2005; Perez et al., 2003) ou *WT1* (Discenza et al., 2004).

Une corrélation positive a aussi été montrée entre l'expression de la *cycline D1* et l'expression de *pea3* et *erm* dans différents tissus, tumeurs ou lignées cellulaires. Cette étude

Discussion et conclusion

a été réalisée par PCR en temps réel (Galang et al., 2004). Dans nos modèles cellulaires de modulation de l'expression des facteurs Pea3 et Erm, nous avons mis en évidence une régulation positive du gène *cycline D2* et du gène *p55^{cdc}* par ces facteurs. Les Cyclines D1 et D2 sont importantes pour le passage de la transition G1/S au cours du cycle cellulaire et donc pour la croissance des cellules. Le facteur *p55^{cdc}* est lui aussi impliqué dans la régulation du cycle cellulaire au niveau de la transition métaphase/anaphase, lors de la mitose.

Dans le cadre de la mise en évidence des gènes cibles des facteurs Pea3 et Erm dans notre modèle de cellules cancéreuses mammaires réprimant l'expression de ces facteurs, nous avons récemment mené une étude comparative du transcriptome de ces cellules par utilisation des puces à ADN Mouse Genome Survey Microarray, Applied Biosystems. Parmi les gènes cibles identifiés (mais non encore validés), sont retrouvés de nombreux gènes connus pour exercer un rôle dans la prolifération. Nous pouvons citer parmi ces gènes, le gène codant *FGFR1*, le récepteur au FGF, et le gène codant la Stanine, dont l'expression est activée par le facteur Pea3. Le FGF permet une régulation positive de la prolifération cellulaire en particulier dans les cellules épithéliales (Boilly et al., 2000). La Stanine est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et dans la croissance cellulaire de cellules endothéliales (Billingsley et al., 2006). Le gène de la Sestrin2 ressort de cette étude comme étant réprimé par le facteur Pea3. Cette molécule induite par p53 est responsable d'un arrêt dans le cycle. Enfin, un certain nombre de gènes codant des Hsp apparaissent régulés positivement par le facteur Pea3. Ces Hsp, et Hsp90 en particulier, exercent un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire, en stabilisant des molécules importantes pour ce mécanisme (Whitesell and Lindquist, 2005).

La régulation, selon notre analyse, de ces différents facteurs connus pour jouer un rôle dans la prolifération et d'autres ayant un rôle plus ou moins établi dans la prolifération cellulaire (cf tableaux 19 et 20) permet d'envisager que l'effet de modulation de la prolifération cellulaire que nous avons observé dans nos modèles de répression de l'expression des facteurs Pea3 et Erm, pourrait se faire au travers de l'activation ou la répression de ces gènes. Toutes ces données vont dans le sens de l'activité pro-proliférative de ces facteurs dans nos modèles cellulaires.

Néanmoins, une publication récente va au contraire de ces données (Yu et al., 2006). Ces travaux montrent que la surexpression ectopique du facteur de transcription Pea3 dans des lignées de cellules cancéreuses du sein empêche la croissance cellulaire et bloque les cellules en phase G1. Cette étude est l'une des rares études *in vitro* allant dans le sens d'une activité

anti-tumorale du facteur Pea3, mais surtout la seule montrant un effet anti-prolifératif de ce facteur.

2- Les facteurs de transcription Pea3 et Erm ont un effet pro-migratoire et pro-invasif

Nous avons pu montrer un effet des facteurs Erm et Pea3 dans la migration des cellules cancéreuses mammaires murines. En effet, un siRNA (ou shRNA) dirigé contre chacun de ces deux facteurs du groupe PEA3 inhibe de façon dramatique la capacité de migration à travers une membrane microporée de ces cellules. Dans d'autres modèles cellulaires et en utilisant d'autres technologies que l'ARN interférence, il a pu être montré que le facteur de transcription Pea3 est impliqué dans les phénomènes de mobilité cellulaire.

La mobilité des cellules MCF-7 (cellules cancéreuses mammaires) ou NSCLC (cellules tumorales de poumons) est augmentée suite à la surexpression de manière ectopique du facteur de transcription Pea3 (Hiroumi et al., 2001; Kaya et al., 1996). Dans les cellules NSCLC, le facteur Pea3 régule la capacité de migration de ces cellules en activant la voie Rho/ROCK.

L'expression d'un dominant négatif du facteur Pea3 dans des cellules de tumeurs orales HSC3 entraîne une diminution *in vitro* de la capacité invasive de ces cellules en gel de collagène (Hida et al., 1997a) ou à travers une membrane microporée recouverte de Matrigel® (Hanzawa et al., 2000).

Le facteur de croissance HGF/SF est bien connu pour son implication dans les mécanismes de migration cellulaire. Différentes données montrent une inter-relation entre les facteurs du groupe PEA3 (et Pea3 en particulier) et la voie de signalisation de l'HGF. L'HGF augmente l'expression (de manière dose-dépendante) de *pea3* dans le modèle cellulaire HSC3 précité et n'est plus capable de générer les effets migratoire et invasif pour les cellules dont l'expression du facteur Pea3 est réprimée (Hanzawa et al., 2000). De même, la stimulation de la voie de signalisation HGF potentialise l'activation de Rho/ROCK sous le contrôle du facteur Pea3 (Hakuma et al., 2005).

Le gène codant l'HGF fait partie des gènes dont l'expression est montrée comme étant régulée positivement par le facteur Erm dans les expériences utilisant les puces à ADN Applied Biosystems.

Discussion et conclusion

Ces différentes données semblent indiquer un lien étroit de régulation entre la voie HGF et les facteurs Pea3 et Erm, permettant d'imaginer l'imbrication de ces facteurs dans les événements morphogénétiques que nous avons pu observer dans nos modèles cellulaires.

Nous avons montré l'importance de l'effet de la répression de l'expression des facteurs Pea3 et Erm dans les cellules mammaires murines cancéreuses, sur leur capacité à envahir un gel de collagène et à s'organiser au sein de ce gel. Cet effet peut être dû à une association de plusieurs événements. En effet, pour envahir un gel, qui représente une structure en trois dimensions, et s'y organiser, différents processus entrent en jeu :

- la prolifération,
- la migration,
- l'invasion,
- la modulation de l'adhérence cellulaire.

Nous avons déjà discuté de l'importance des facteurs du groupe PEA3 dans les mécanismes de prolifération et migration. Nous pouvons supposer d'après nos résultats que les facteurs Pea3 et Erm pourraient aussi être impliqués dans la régulation des événements conduisant à l'invasion cellulaire.

L'implication du facteur Pea3 dans les phénomènes d'invasion a déjà été envisagée par d'autres études. La surexpression de manière constitutive du facteur Pea3 dans des cellules mammaires cancéreuses non métastatiques leur confère des propriétés invasives dans des tests *in vitro* et suite à l'injection dans des souris immunodéficientes (Kaya et al., 1996). La surexpression du facteur Pea3 dans des cellules de tumeurs du poumon entraîne aussi une augmentation du potentiel de migration et d'invasion (Hiroumi et al., 2001; Zhu et al., 2005). Diverses études menées *in vitro* comme *in vivo* avec des dominants négatifs du facteur Pea3 montrent une diminution du potentiel invasif des cellules (Hanzawa et al., 2000; Hida et al., 1997a; Horiuchi et al., 2003). Enfin, une étude récente menée dans des cellules tumorales du colon montre que ces cellules transfectées par un siRNA dirigé contre *pea3* ont un pouvoir invasif moins important que les cellules transfectées par un siRNA contrôle (Moss et al., 2006).

Différents gènes montrés comme cibles du facteur Pea3 et des autres membres du groupe, confortent l'idée de l'implication du facteur Pea3 dans ces phénomènes de migration et d'invasion.

Discussion et conclusion

Tout d'abord, les métalloprotéases, protéines impliquées dans la digestion de la matrice extracellulaire, et donc dans les phénomènes d'invasion et de métastases, ont été les premières molécules à être mises en évidence comme cibles potentielles des facteurs du groupe PEA3 (Bosc et al., 2001; Crawford et al., 2001; Habelhah et al., 1999; Higashino et al., 1995; Izumiyama et al., 2005; Lynch et al., 2004). L'expression de ces molécules est souvent corrélée à l'expression de *pea3* dans des tumeurs (sein, oral, colorectal) ou effusions (ovarienne ou mammaire) (Tableau 7) (de Launoit et al., 2006). On peut aussi noter qu'en parallèle de l'acquisition ou de la perte du phénotype invasif des cellules lié à la modulation de l'expression du facteur Pea3, on observe une variation de l'expression de certaines métalloprotéases, comme la MMP-9 (Kaya et al., 1996), la MMP-1 ou la MMP-3 (Hida et al., 1997a). L'expression de *EMMPRIN* (inducteur des métalloprotéases), est aussi corrélée à l'expression de *pea3* dans des effusions ovariennes (Davidson et al., 2004a). Le facteur Pea3 peut réguler la transcription de l'*héparanase* (Lu et al., 2003), gène codant une molécule impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire.

En marge de ces molécules, d'autres gènes associés à la formation de métastases, ou à l'invasion, ont été décrits comme cibles des facteurs du groupe PEA3. On peut citer *muc-4* (Perez et al., 2003), *opn* (El-Tanani et al., 2004), *cox-2* (Howe et al., 2001; Liu et al., 2004) qui sont régulés par ces facteurs dans des cellules mammaires. La Mucine-4 régule négativement l'adhérence cellule-matrice extracellulaire et cellule-cellule. De plus, une diminution de l'expression de *muc-4* entraîne une diminution de la croissance tumorale et des métastases dans des cellules de mélanomes ou de cancer du pancréas (Andrianifahanana et al., 2006). L'Ostéopontine est une molécule clé dans la progression tumorale et la formation de métastases, en particulier pour le cancer du sein. C'est une glycoprotéine sécrétée qui régule les interactions cellule-matrice extracellulaire et la signalisation cellulaire par sa liaison aux intégrines et au récepteur CD44 (Wai and Kuo, 2004). Cox-2 est une molécule de la voie de biosynthèse de l'acide arachidonique. La surexpression de ce facteur est associée à une augmentation du potentiel invasif (Telliez et al., 2006). On retrouve aussi des gènes potentiellement impliqués dans les phénomènes invasifs ou métastatiques comme cibles du facteur Pea3 comme la *cavéoline-1* (Kathuria et al., 2004) ou *galTI* (Zhu et al., 2005), dans des cellules pulmonaires.

L'étude par puces à ADN menée sur les cellules MMT traitées par des siRNA dirigés contre *erm* ou *pea3* a mis en évidence un certain nombre de gènes impliqués dans la migration ou l'invasion des cellules cancéreuses. L'expression de la Serpine B2, un inhibiteur de l'uPA

Discussion et conclusion

serait réprimée par le facteur Erm, tandis que l'expression de la Follistatine, un inhibiteur de l'Activine serait réprimée par le facteur Pea3. La Serpine B2 va avoir un effet protecteur contre les métastases *via* son effet inhibiteur d'uPA, une protéase qui permet une meilleure dissémination des cellules dans le contexte métastatique (Medcalf and Stasinopoulos, 2005). Le facteur Activine est connu pour son implication dans le développement, mais aussi en tant que suppresseur de tumeurs, à travers son effet anti-angiogénique (et l'effet pro-angiogénique de la follistatine) (Krnet et al., 2006).

Notre étude révèle que le facteur Erm activerait l'expression de *maged2*, qui est un gène marqueur du statut métastatique et que le facteur Pea3 activerait l'expression de *has2*, *tspan14* et l'*eps8*. Si l'on ne connaît pas le rôle du facteur Tspan14, les tétraspannines ont un rôle dans la structure cellulaire, la migration cellulaire et l'invasion (Hemler, 2005). La hyaluronane synthétase agit sur la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Cook et al., 2006; Udabage et al., 2005a; Udabage et al., 2005b). Eps8 va pouvoir induire un comportement métastatique en activant la voie Rac (Funato et al., 2004) et va réguler la mobilité cellulaire en agissant sur l'Actine (Disanza et al., 2004).

Parmi les molécules importantes dans les mécanismes de tumorigenèse, on peut citer les intégrines, les molécules d'adhérence, les interleukines et leurs récepteurs. Il faut noter que différentes corrélations ont été faites entre des molécules de ce type (IL-8, intégrines, LR 67kDa...) et l'expression du facteur Pea3 dans diverses tumeurs, dont des tumeurs métastatiques ou des effusions (Tableau 8) (Davidson et al., 2003b; Davidson et al., 2004a; Davidson et al., 2004b). De plus, concernant les molécules d'adhérence, une étude récente a montré que la surexpression du facteur Pea3 dans des cellules épithéliales entraîne une augmentation de l'expression des gènes *vimentine* ou de *fibronectine*, et une répression de l'expression de *E-cadhérine* ou de β ou γ *caténine* (Upadhyay et al., 2006).

Nous avons pu mettre en évidence à l'aide des puces à ADN, des molécules impliquées dans l'adhérence des cellules, dont l'expression est activée par les facteurs du groupe PEA3. Parmi ces molécules, on trouve la Cadhérine 17, un marqueur de mauvais pronostic dans les cancers gastriques. A contrario, le facteur Pea3 pourrait réprimer l'expression de Vcam et de Dscam, deux molécules d'adhérence cellule-cellule, et du procollagène, une molécule d'adhérence non caractérisée.

Tous ces éléments confortent l'implication des deux facteurs Erm et Pea3 dans la migration et l'invasion cellulaire et laissent supposer que cette régulation passera notamment par l'intermédiaire des différents gènes identifiés.

3- Les facteurs de transcription Pea3 et Erm influencent la formation de tumeurs *in vivo*

Nous avons pu montrer que les tumeurs issues des cellules exprimant de manière stable des ARN interférents dirigés contre *erm* et *pea3* (ou les deux) se développent moins rapidement que les cellules cancéreuses témoins après injection *in vivo* à des souris immunodéficientes. Nous confortons ainsi les effets observés lors des études menées *in vitro*, à savoir que la répression de l'expression des facteurs Erm et Pea3 entraîne une diminution des processus conduisant à la formation tumorale (prolifération, migration et invasion) ce qui est reflété *in vivo* par une diminution de la croissance tumorale.

L'inhibition de la formation des tumeurs n'est néanmoins pas totale. Ceci pourrait être expliqué de deux façons :

- par le taux de répression des facteurs Erm et Pea3 dans les cellules utilisées pour le test, qui n'excède pas 50%. Les tests *in vitro* effectués avec ces cellules nous montrent que nous obtenons les mêmes effets avec ces cellules (sur la prolifération et la migration à travers une membrane microporée) qu'avec les oligonucléotides siRNA, mais de façon moins marquée,

- par le fait que les facteurs Erm et Pea3 sont des éléments importants de ce processus mais pas essentiels et qu'ils participent à cet effet avec d'autres facteurs.

L'utilisation de nouvelles séquences shRNA, ou la mise au point de l'utilisation de petits siRNA en injection directe dans la tumeur, devrait nous permettre de distinguer entre ces deux propositions.

Les tumeurs formées chez la souris à partir des différentes lignées de cellules injectées évoluent vers un processus métastatique et des métastases se sont formées au bout de l'expérimentation, notamment au niveau du foie et des poumons. L'apparition des métastases semble moins importante dans les souris injectées avec les cellules pour lesquelles l'expression des facteurs Pea3 et Erm est réprimée (données non montrées car préliminaires). Ces constatations devront être éprouvées par une analyse plus complète des ces métastases au niveau des organes touchés.

Des études *in vivo* ont déjà été menées avec des cellules surexprimant le facteur Pea3 (cellules de cancer du sein ou de cancer du poumon), et montrent une augmentation de la croissance tumorale et des métastases (Hakuma et al., 2005; Kaya et al., 1996). De même,

Discussion et conclusion

l'expression d'un dominant négatif du facteur Pea3 dans des souris transgéniques pour *HER2/neu* retarde l'apparition de tumeurs mammaires (Shepherd et al., 2001).

La présente analyse par puces à ADN de gènes régulés plus ou moins par les facteurs Erm et Pea3 suite à la transfection par des siRNA dirigés contre *erm* ou *pea3*, a permis de mettre en évidence quatre gènes suppresseurs de tumeurs *in vivo*: le gène du locus 210457 (homologue du gène *testine*), *mobk1d* qui intervient dans l'inhibition de la croissance tumorale, le gène du locus 435791 (homologue du gène codant l'interféron ζ et le gène *pcgf2*).

Ces différentes données confortent l'idée de l'implication des facteurs du groupe PEA3 dans les processus conduisant à la mise en place et l'évolution d'une tumeur. Des études complémentaires devraient permettre d'appréhender le niveau de leur implication et notamment au cours de l'évolution métastatique.

III- Mise en évidence de nouveaux gènes cibles des facteurs du groupe PEA3

Une première étude utilisant des puces à ADN (Atlas™ Mouse cDNA Expression Arrays) avait permis de mettre en évidence huit gènes potentiellement régulés par les facteurs du groupe PEA3, codant essentiellement des molécules impliquées dans la régulation du cycle cellulaire ou de l'apoptose. Nous nous sommes intéressés à la régulation de trois d'entre eux : les gènes *bax*, *cycline D2* et *p55^{cdc}*.

1- Le gène bax

a- Le promoteur du gène *bax*, un nouveau mode de régulation pour les facteurs du groupe PEA3

Nous avons pu mettre en évidence la régulation du gène *bax* tant au niveau transcriptionnel que traductionnel dans des cellules mammaires normales surexprimant les facteurs de transcription Erm ou Pea3, ou dans des cellules dont l'expression du facteur Pea3 est diminuée par ARN interférence. C'est la première fois qu'un membre de la famille Bcl-2 est désigné comme cible des facteurs du groupe PEA3.

Nous montrons que les membres du groupe PEA3 sont capables de transactiver le promoteur du gène *bax* que ce soit au niveau du promoteur de pleine longueur ou au niveau d'un fragment minimal de 100 pb en amont du codon d'initiation de la traduction. Des séquences EBS potentielles sont retrouvées le long de la séquence promotrice du gène *bax*, mais plus à partir du fragment de 162 pb (PMBaxSacII). Nous nous sommes basés sur ce fragment pour mettre en évidence le mécanisme de transactivation par les facteurs de la famille PEA3. Nous avons alors montré que le facteur Pea3 comme Erm nécessite le facteur de transcription USF-1 pour exercer son activité transactivatrice. En effet, les facteurs Pea3/Erm et USF-1 coopèrent pour transactiver les fragments de promoteur du gène *bax* de 162 et 100 pb. L'interaction entre les deux facteurs USF-1 et Pea3 avait déjà été documentée précédemment (Greenall et al., 2001). Néanmoins, la différence réside dans le cas présent, dans le fait que pour le promoteur du gène *bax*, la liaison du facteur Pea3 à l'ADN n'est pas nécessaire. A l'instar de l'équipe de A Greenall, nous avons pu montrer que les facteurs Pea3 et USF-1 interagissait bien dans notre modèle cellulaire.

Discussion et conclusion

Enfin, nous avons pu prouver par la technique de retard sur gel la formation d'un complexe ternaire ADN/ Pea3/ USF-1.

Différentes études avaient déjà montrés l'implication des facteurs Ets et USF-1 dans la régulation de promoteurs en se liant à leur site respectif (E-box et EBS). Par exemple, Ets1 et USF-1 interagissent au niveau du LTR du virus HIV de type 1 (Sieweke et al., 1998), du promoteur *BRCA2* (Davis et al., 1999) ou du promoteur au *récepteur au mannose* (Egan et al., 1999).

Dans la littérature, des cas similaires de régulation transcriptionnelle sans liaison à l'ADN ont déjà été documentés. Par exemple, Oct-1 forme un complexe avec un élément CREB, qui lie son élément de réponse au niveau du promoteur du gène de la Cycline D1, mais sans requérir la liaison de Oct-1 à l'ADN (Boulon et al., 2002). Ce modèle existe aussi au niveau du promoteur du gène *bcl-2*, qui est lui régulé par les facteurs Cdx et C/EBP-Myb, la liaison à l'ADN ne s'effectuant qu'au niveau du site fixé par Cdx (Heckman et al., 2003). Enfin, Howe et al, qui ont montré la surexpression du facteur Pea3 en réponse à une activation de la voie Wnt-1 pour transactiver le gène *cox-2*, émettent la possibilité que le facteur Pea3 puisse lier les protéines C/EBP au niveau du site NF-IL6 sans liaison à l'ADN (Howe et al., 2001).

Nous avons donc mis en évidence un nouveau mode de régulation de la transcription par des facteurs de transcription appartenant à la famille ETS, sans liaison directe à l'ADN mais par l'intermédiaire d'un autre facteur de transcription, dont une schématisation est présentée dans la figure 71.

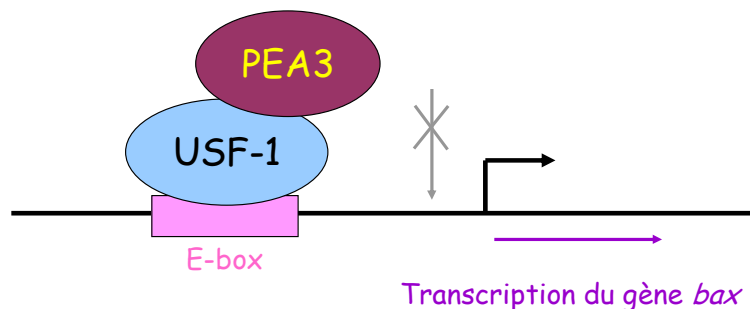


Figure 71 : Mécanisme de régulation de la transcription du gène *bax* par les facteurs du groupe PEA3.

D'après (Firlej et al., 2005).

Le facteur Pea3 agit *via* USF-1 et les sites E-box pour transactiver le promoteur du gène *bax* sans sa propre liaison à l'ADN.

b- La régulation de l'expression du gène *bax*, un rôle des facteurs Pea3 et Erm dans l'apoptose?

Bax est une protéine issue de la famille Bcl-2 dont les membres sont connus pour être des acteurs des voies de l'apoptose. Cependant les cellules TAC exprimant de manière constitutive les facteurs Erm et Pea3, ne présentent pas une induction plus importante de l'apoptose. Une hypothèse serait que Bcl-2 serait lui aussi régulé, ne modifiant dès lors pas la balance Bcl-2/Bax, qui agit sur les voies de l'apoptose. Cependant, nous n'avons pu mettre en évidence aucune modification de l'expression au niveau ARNm de *bcl-2* dans notre modèle cellulaire. Néanmoins, nous pouvons supposer que dans des cellules mammaires normales, la protéine Bax pourrait avoir un autre rôle que l'induction de l'apoptose mais plutôt un rôle dans l'invasion, la migration ou la prolifération, événements associés aux modifications phénotypiques observées dans les modèles cellulaires dont l'expression des facteurs PEA3 est modulée, décrits précédemment. A l'heure actuelle, différentes données permettent d'imaginer un rôle dans ce sens. Wick *et al* ont montré que Bcl-2 promeut la migration et l'invasion de cellules gliomales (Wick et al., 1998). Un autre travail définit une nouvelle voie pour la migration de ces cellules sous contrôle de l'HGF qui requiert des différences dans la balance Bcl-2/Bax (Wick et al., 2001). De plus, Bcl-2 peut avoir un rôle dans l'invasion et la formation de métastases en induisant l'expression de la MMP-2 (Choi et al., 2005). En ce qui concerne la prolifération, différentes données ont montré que des molécules pro-apoptotiques comme Bax, Bad ou Bid possèdent une fonction pro-proliférative alors que des molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-XL possèdent une fonction anti-proliférative (Cory et al., 2003; Yin, 2006). Bcl-2 agirait en affectant la transition G0-G1 et donc la pré-phase S, tandis que Bid agirait au niveau de la transition G2/M. Concernant Bax, il a été montré récemment que Bax réverse l'effet anti-prolifératif de la molécule Bcl-2 dans des lymphocytes T (Cheng et al., 2004). On pourrait donc imaginer que c'est cet effet qui serait favorisé dans notre cas.

La présente analyse par puces à ADN des gènes régulés à partir de modèles de répression de l'expression de Pea3 et Erm a permis de mettre en évidence de nombreux gènes impliqués dans l'apoptose (*bbc3*, *ei24*, *tnfsf7*, *phlda3*, *fas*, *Trp53inp1*) ou pouvant aussi avoir un rôle dans l'induction ou l'inhibition des phénomènes apoptotiques (Tableau 19 et 20). Ces molécules, toutes pro-apoptotiques, sont surexprimées dans les cellules MMT après transfection par un siRNA dirigé contre *pea3*, ce qui pourrait indiquer que le facteur Pea3

pourrait avoir un rôle potentiel dans l'induction de l'apoptose, rôle que nous n'avons pas pu mettre en évidence dans les expérimentations effectuées jusqu'alors.

2- Les gènes *cycline D2* et *p55^{cdc}*

a- Les facteurs du groupe PEA3 régulent la transcription des gènes *cycline D2* et *p55^{cdc}*

Nous avons pu montrer que les facteurs du groupe PEA3 sont capables d'activer la transcription des gènes *cycline D2* et *p55^{cdc}* (démonstration effectuée jusqu'à maintenant uniquement pour le facteur Pea3 pour le gène *p55^{cdc}*). En effet, nous observons une régulation de l'expression au niveau transcriptionnelle de ces deux gènes dans des cellules où l'expression des facteurs Pea3 ou Erm est soit augmentée de façon constitutive, soit réprimée par ARN interférence.

Par l'étude de leur promoteur respectif, nous avons pu montrer l'activité transactivatrice de ces facteurs.

• Les facteurs PEA3 transactivent le promoteur du gène *cycline D2*

Deux séries de clonage du promoteur du gène *cycline D2*, différant de 175 pb, ont été réalisées : série 1 (625, 433 et 306) et série 2 (450, 258, 132 et 64). Les facteurs de transcription Pea3, Erm et Er81 sont capables de transactiver ces constructions promotrices d'un facteur 4 en moyenne pour la série 1 et d'un facteur 4 à 8 pour la série 2. Le fragment de 64pb ne présente pas d'activité transcriptionnelle. Le travail a été poursuivi sur les constructions de la série 2 qui présentent une activité de transcription basale supérieure à celle de la série 1, de même qu'un niveau de transactivation plus élevé par les facteurs PEA3.

Le fragment de 132 pb (série 2) montre la présence de deux sites de liaison potentiels pour les facteurs du groupe PEA3. La mutation du site le plus proximal (mt2) a montré que ce site ne semblait pas être nécessaire pour la transactivation par le facteur Pea3. La mutation du site EBS en position plus distale dans ce fragment n'entraîne qu'une faible diminution de la transactivation liée au facteur Pea3. L'effet est surtout visible sur l'activité basale du promoteur. Deux hypothèses peuvent être formulées. La première hypothèse est la non-fonctionnalité de cette mutation liée à la forte richesse en GC de ce fragment de promoteur, et impliquant une liaison moins forte, mais toujours possible des facteurs du groupe PEA3. Nous

pourons effectuer une autre mutagenèse en modifiant le site EBS de façon plus drastique afin de valider cette hypothèse. La deuxième hypothèse est que le facteur Pea3, comme dans le cas du promoteur du gène *bax* (Firlej et al., 2005) ou de la *cox-2* (Liu et al., 2004), agirait par l'intermédiaire d'un autre facteur, comme c-Jun ou c-Myc, que l'on retrouve tous deux dans le fragment promoteur 132 pb, avec ou sans sa liaison à l'ADN. On peut même supposer que la liaison à l'ADN pourrait se faire par le site NF-IL6 présent dans ce fragment, comme cela a pu être supposé pour la transactivation du promoteur de la *cox-2* (Howe et al., 2001).

Néanmoins, le fragment de 258 pb du promoteur *cycline D2* présente une activité transactivatrice basale plus importante que le fragment de 132 pb et la transactivation par les facteurs PEA3 est aussi plus importante que dans le cas du fragment plus petit. Il serait donc intéressant d'étudier plus précisément les trois sites EBS, situés dans ce fragment de promoteur en amont du fragment de 132 pb.

D'autre part, il sera intéressant de chercher à prouver l'interaction physique entre le facteur Pea3 et l'ADN au niveau des différents sites de fixation par des techniques de retard sur gel ou d'immuno-précipitation de la chromatine.

- Les facteurs du groupe PEA3 transactivent le promoteur du gène *p55^{cdc}*

Nous avons montré la régulation au niveau transcriptionnel du gène *p55^{cdc}* dans les cellules dont l'expression de *erm* et *pea3* est modulée par surexpression ou répression par ARN interférence. Nous avons alors entrepris de caractériser cette régulation au niveau de son promoteur. Nous avons donc cloné différents fragments du promoteur *p55^{cdc}* de rat, dans un premier temps, car seule la séquence du promoteur de rat était disponible dans les banques de données, puis murin, dans un second temps, grâce aux données publiées du génome murin. Pour le promoteur de rat, nous avons cloné cinq fragments de 576 pb à 93 pb (576, 292, 210, 106 et 93). Nous mettons en évidence une transactivation par les membres du groupe PEA3 des différents fragments de ce promoteur, de 576 pb à 106 pb en amont du site d'initiation de la traduction. Le fragment de 93 pb n'est pas transactivé par les facteurs PEA3. Nous avons cloné les fragments équivalents pour le promoteur murin (319, 210 et 106). En plus de ces fragments, et étant donné le positionnement des sites potentiels d'initiation de la transcription, nous avons cloné des fragments de délétion plus longs en 5' de 192 pb (511, 402 et 300). Nous montrons que comme pour le promoteur de rat, le facteur Pea3 est capable de transactiver tous les fragments de promoteur utilisés.

La recherche de sites de fixation pour les facteurs ETS au niveau du promoteur *p55^{cdc}* de rat a permis de mettre en évidence la présence d'un EBS en position -74 par rapport à l'ADNc le plus long décrit pour le rat (CK474039). La mutation de ce site dans le fragment de 106 pb entraîne une diminution de l'activité basale de ce promoteur et bloque la capacité de transactivation par le facteur Pea3. Nous avons pu confirmer cette hypothèse en utilisant un fragment de délétion de 93 pb ne contenant plus cet EBS.

La comparaison des séquences promotrices de rat, de souris et humaine permet de mettre en évidence une conservation inter-espèce de ce site, soulignant son importance potentielle. Le fragment de 106 pb qui contient cet EBS, est le plus petit fragment du promoteur de *p55^{cdc}* de souris toujours transactivé par les facteurs du groupe PEA3. La mutation de ce site pourra être entreprise de la même manière que dans le promoteur de rat pour évaluer son importance dans l'activité transactivatrice du facteur de transcription Pea3. Il serait aussi intéressant de construire le fragment de délétion ne contenant plus ce site.

Des études en retard sur gel ou en immunoprécipitation de la chromatine devront être envisagées, pour prouver l'interaction physique du facteur de transcription Pea3 à l'ADN et permettent de compléter la caractérisation de la régulation du promoteur de *p55^{cdc}* de souris par les facteurs du groupe PEA3.

b- Le facteur Pea3, un facteur pro-prolifératif *via* la régulation de l'expression des gènes *cycline D2* et *p55^{cdc}*?

Nous avons pu mettre en évidence la régulation au niveau transcriptionnel des deux gènes *cycline D2* et *p55^{cdc}*, qui codent chacun pour une protéine impliquée dans le cycle cellulaire.

Actuellement peu d'éléments sont connus en ce qui concerne le gène *p55^{cdc}* et sa protéine associée. Néanmoins toutes les informations connues tendent à montrer que cette molécule est importante dans la régulation du cycle cellulaire. La protéine *p55^{cdc}* est une protéine homologue de Cdc20/Slp1 chez la levure ou Fizzy chez la drosophile. *p55^{cdc}* est exprimé que ce soit au niveau transcriptionnel comme traductionnel à partir de la phase S avec un pic en G2/M, pour ensuite être dégradé à la transition M/G1. Cette protéine va être requise pour la transition métaphase/anaphase. Il est en effet connu que *p55^{cdc}* est un activateur de l'APC (Anaphase Promoting Complex), qui va pouvoir directement lier l'APC et ainsi activer la fonction d'ubiquitination des cyclines (Fang et al., 1998). On peut noter que

dans des cellules myéloïdes, p55^{cdc} a des effets pléiotropiques, comme une augmentation de l'apoptose (dans le cas où la voie de l'apoptose initiée par le sevrage en sérum et facteurs de croissance est activée), une entrée prématurée des cellules en phase S et une inhibition de la différenciation en granulocytes par le G-CSF. De façon intéressante, le facteur p55^{cdc} semble aussi être lié à différentes voies apoptotiques dans des cellules cancéreuses (Lin et al., 2003).

La protéine codée par le gène *cycline D2* fait partie de la famille très conservée des cyclines. Ces membres sont caractérisés par une périodicité dans l'abondance des protéines qui varient au cours du cycle cellulaire. Les cyclines fonctionnent comme des régulateurs des kinases CDK. Les différentes cyclines exhibent une expression différentielle et des patrons de dégradation qui contribuent à la coordination dans le temps de chaque événement au cours du cycle cellulaire.

Dans la famille des cyclines, la Cycline D1 était déjà connue pour être régulée par les facteurs de la famille ETS. Les facteurs Ets1 et Ets2 sont capables de transactiver le promoteur du gène de la *cycline D1*, protéine importante dans la transition G1/S (Albanese et al., 1995; Fukuma et al., 2003). Comme cité auparavant, l'équipe de Galang avait déjà pu établir une corrélation entre l'expression de la *cycline D1* et l'expression de *pea3* et *erm* dans des cellules normales ou tumorales mammaires (Galang et al., 2004). De plus récemment, il a été mis en évidence que le facteur PU-1 induisait l'expression de la Cycline D2 dans des cellules leucémiques (Vicari et al., 2006).

La Cycline D2 forme un complexe avec CDK4 et CDK6, et agit comme une sous-unité régulatrice de ces protéines, essentielles pour la transition G1/S. L'inhibition de l'expression de ce gène par recombinaison homologue suggère un rôle essentiel au niveau de la granulosa ovarienne et dans la prolifération des cellules germinales (Sicinski et al., 1996). De plus, les souris déficientes pour la Cycline D2 ont des anomalies du cervelet (Huard et al., 1999), empêche la prolifération des lymphocytes B (Lam et al., 2000; Solvason et al., 2000). Par contre, des souris *cycline D1*^{-/-}, *cycline D2*^{-/-}, *cycline D3*^{-/-} se développent jusqu'au milieu de la gestation et meurent d'anomalies cardiaques, combinées à une anémie sévère (Kozar et al., 2004). Néanmoins, les fibroblastes *cycline D2*^{-/-} issus de souris déficientes pour la *cycline D2* prolifèrent plus lentement par rapport aux cellules issus de souris sauvages (Bouchard et al., 1999). On peut noter qu'une forte expression de ce gène est observée dans certains (cancers ovarien, testiculaire, colique).

Le fait que le facteur de transcription Pea3 puisse réguler l'expression de ces deux gènes cibles pro-prolifératifs va dans le sens d'un rôle du facteur Pea3 dans la prolifération

cellulaire. Comme nous en avons discuté précédemment, différentes données et gènes cibles mis en évidence confortent cette hypothèse. De plus, nous avons pu montrer dans des cellules mammaires cancéreuses que le facteur Pea3 est capable de réguler la prolifération de ces cellules.

3- Trois promoteurs et trois liaisons à l'ADN proximales des facteurs PEA3

L'étude de la régulation des trois gènes *bax*, *p55^{cdc}*, *cycline D2* tend à montrer que dans ces cas, la transactivation par les facteurs de transcription PEA3 se ferait de manière très proche du site d'initiation de la transcription.

En ce qui concerne le gène *bax*, les expériences d'extension d'amorce ont montré la présence de plusieurs sites de transcription potentiels entre -26 et -69 pb par rapport au site d'initiation de la traduction (Schmidt et al., 1999). Un ARNm de 831 pb est décrit pour ce gène, qui commence à -44 pb du site d'initiation de la traduction.

Les expériences d'extension d'amorce effectuées sur le promoteur de la *cycline D2* ont montré la présence de sites d'initiation de la transcription en positions - 499, - 417, - 391, - 373, et - 349 par rapport au site d'initiation de la traduction (Jun et al., 1997). Par contre, les diverses EST décrites pour ce promoteur sont situées entre les positions -241 à -289 par rapport au site d'initiation de la traduction. Nos expériences supposent donc que la régulation du promoteur du gène *cycline D2* se ferait en position très proximale par rapport au site potentiel d'initiation de la transcription.

La position potentielle du site d'initiation de la transcription du gène de *p55^{cdc}* ne peut être déduite que des ADNc décrits dans la banque GenBankTM. Le plus long ADNc décrit présente une extrémité 5' à -24 pb par rapport à l'extrémité 3' du fragment de promoteur cloné dans le pGL3b. De la même manière, différents ADNc murins ont été décrits, leur extrémité 5' remonte de -158 à -230 pb par rapport à l'extrémité 3' du plus grand fragment cloné (les ARNm étant décrits à -88 et -67 pb de cette extrémité 3'). Si l'on tient compte de cette disposition, la régulation de la transcription de ce gène par les facteurs du groupe PEA3 se fait aussi dans ce cas en position proximale dans le promoteur.

Des séquences E-box et EBS proches du site d'initiation de la transcription sont souvent décrites dans la littérature. En effet, une E-box est décrite en position -7, -2 par rapport au site d'initiation de la transcription du gène de la Cathepsine B (Yan et al., 2003), de même qu'une E-box et qu'un site composite Ets/E2F sont retrouvés respectivement en positions -18 et -58 au niveau du promoteur humain du gène *BRCA2* (Davis et al., 1999).

Parmi les gènes cibles décrits à l'heure actuelle comme étant régulés par les facteurs du groupe PEA3, on peut remarquer que les sites consensuels de fixation EBS sont fréquemment situés en situation proximale par rapport au site d'initiation de la transcription (Tableau 10). On peut citer le promoteur du gène codant la GGT IV (Lan et al., 1999) où l'EBS est situé en -19, le promoteur du gène *prénésiline* (une EBS est décrite en position -10) (Pastorcic et Das, 2003a) ou encore le promoteur du gène de la *cox-2* en position -73 (Liu et al., 2004).

Ces données de régulation dans les régions proximales des séquences promotrices, pourraient être en accord avec les études montrant que les facteurs du groupe PEA3 pourraient faciliter la formation du complexe de préinitiation de la transcription. En effet, le facteur Erm a été montré comme capable de se lier à TAFII60, TAFII40 et TBP (Defossez et al., 1997).

4- De nouveaux gènes cibles pour les facteurs du groupe PEA3 mis en évidence par une étude de puces à ADN

Nous avons pu mettre en évidence de nouveaux gènes régulés par les facteurs du groupe PEA3 grâce à l'étude menée par puces à ADN. Nous avons ainsi identifié 84 gènes régulés par le facteur Pea3 avec un seuil supérieur à 2 et une probabilité de 99%, et 44 gènes régulés par le facteur Erm avec une probabilité de 99%.

Les gènes régulés suite à la transfection par un siRNA dirigé contre *erm*, même s'ils ont une très forte probabilité, sont faiblement régulés sur les puces à ADN. Une explication vient du fait que trois échantillons différents de cellules traitées par un siRNA dirigé contre *erm* ou par le siRNA *ctrl* ont été utilisés. Or dans ces différents cas, le taux de transfection des différentes manipulations peut varier et donc le taux d'inhibition aussi, ceci cause donc une forte variance entre les échantillons utilisés, qui peut être importante et peut ainsi diluer l'effet observé sur les gènes cibles. Nous avons néanmoins mis en évidence des gènes qui sont

régulés de façon statistiquement représentative, même si la répression ou l'activation de ces gènes n'est pas très importante. Le gène *erm* n'est pas retrouvé sur les puces à ADN utilisées, nous ne pouvons donc pas vérifier cette hypothèse. Par contre, pour *pea3*, nous trouvons une inhibition moyenne de 72% pour les différents échantillons.

Nous pouvons noter que parmi les gènes régulés par *erm* et *pea3*, un certain nombre de gènes qui ont été montrés comme étant régulés dans des tumeurs ou cellules tumorales (Tableau 19), ce qui conforte l'idée d'un rôle des deux facteurs Erm et Pea3 dans la cancérogénèse.

Gènes réprimés en parallèle de la répression de	Gènes surexprimés dans certains cancers solides
<i>Erm</i>	<i>fgfr1, hgf, maged2, igfr1</i>
<i>pea3</i>	<i>has2, cdh17, eif3s8, fgfr1, eps8, rras2, tra1, ascl4</i>

Tableau 19 : Gènes régulés dans les cellules modulées pour l'expression de *pea3* et *erm* et surexprimés dans des cancers solides.

Certains de ces gènes, comme ceux codant des facteurs impliqués dans l'invasion, la migration ou la prolifération, ont pu être corrélés aux aspects phénotypiques que nous avons décrits auparavant pour les cellules dont l'expression des facteurs Pea3 et Erm est modulée, et donc pourraient être associés aux mécanismes impliqués dans la tumorigénèse.

En marge de ces molécules, il est intéressant de retrouver plusieurs gènes codant des canaux. Même si ces facteurs n'ont pas à priori de rôle qui peut être relié directement aux phénotypes décrits précédemment dans la littérature ou dans ce travail, il sera intéressant de s'y attarder par la suite. On peut toutefois noter que AQP3, une molécule servant au transfert d'eau, en particulier au niveau de la peau, a été décrite comme exprimée dans des cellules de cancer du colon (Moon et al., 2003) et que les canaux de type Slc sont souvent décrits comme régulés dans des cas de cancers par l'étude de puces à ADN.

Beaucoup de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides sont aussi mis en évidence. Même si avec les éléments connus jusqu'ici sur les facteurs du groupe PEA3, il est difficile de comprendre le rôle de ces facteurs dans le métabolisme des lipides, il sera intéressant de s'en préoccuper. On peut noter que la modulation du métabolisme des acides gras est impliquée dans différents processus cancéreux. Par exemple, des protéines LRP (Ildr related protein) sont des marqueurs de cancers ou de la progression tumorale (agissent par

exemple sur les MMP) (Emonard et al., 2005), tandis que *ascl4* (dont l'expression est réprimée par l'utilisation d'un siRNA dirigé contre *pea3* ou *erm*) est surexprimé dans les cancers du colon et dans des hépatocarcinomes (Cao et al., 2001; Kurokawa et al., 2004).

Certaines chémokines ou molécules du système immunitaire ont déjà montré leur importance dans les cancers à différents niveaux, il semble donc intéressant de retrouver certaines d'entre elles modulées dans notre sélection. Par exemple, l'interféron ξ a une fonction antitumorale, on peut supposer qu'*a fortiori* de l'interféron α et β , il pourrait agir comme régulateur du cycle cellulaire ou inducteur de l'apoptose (Oritani and Kanakura, 2005).

Un dernier point intéressant à noter est que dans cette analyse, on retrouve de nombreuses molécules impliquées dans les mécanismes impliquant les nucléotides et en particulier la liaison à l'ARN et la régulation de la transcription.

Si l'on compare les résultats obtenus pour les facteurs Pea3 et Erm, il en ressort que peu de gènes sont régulés à la fois par les facteurs Erm et Pea3, ce qui pourrait être expliqué par une spécificité de régulation des deux facteurs. Cette hypothèse pourra être éprouvée en complétant cette première analyse par une étude complémentaire.

Le FGFR1 est régulé par ces deux facteurs. Sachant que *erm* ainsi que *pea3* sont régulés par le FGF, il est intéressant de noter que tous deux pourraient être impliqués dans une boucle d'autorégulation.

Enfin, parmi tous ces gènes, beaucoup ont un rôle direct ou indirect dans la régulation de la croissance cellulaire, *via* la régulation du cycle cellulaire ou de l'apoptose (cf. résumé dans les tableaux 20 et 21).

Gène	Cycle cellulaire / prolifération	Apoptose
<i>Aqp3</i>	Action pro-proliférative potentielle	
<i>Csh1</i>	Contrôle de la croissance cellulaire	
<i>Fgfr1</i>	Induit la prolifération	Induit la survie cellulaire
<i>Has2</i>	Induit la prolifération	
<i>Hgf</i>	Induit la prolifération	Bloque certaines voies apoptotiques
<i>Hsp 90/stip1</i>	Imp pour croissance cellulaire	Echappement de la voie apoptotique
<i>Igfr</i>	Facteur proprolifératif	Facteur antiapoptotique principalement
<i>Pcgf2</i>	Action sur cycle cellulaire	
<i>Ptplad</i>	Régulation de la prolifération cellulaire	
<i>Rras2</i>	Progression dans le cycle	Induit la survie cellulaire
<i>Snn</i>	Contrôle du cycle cellulaire	

Tableau 20 : Rôle potentiel des gènes dont l'expression est régulée par *erm* ou *pea3* dans la croissance cellulaire et l'apoptose.

Discussion et conclusion

Gène	Cycle cellulaire / prolifération	Apoptose
<i>Bbc3</i>		Facteur apoptotique
<i>Ei24</i>		Facteur apoptotique
<i>Fas</i>		Facteur apoptotique
<i>Follistatine</i>	Inhibiteur de la prolifération cellulaire	
<i>Igfbp7</i>	Agit sur la cinétique du cycle cellulaire (effet -)	
<i>Interféron ζ</i>	Blocage en phase G1 ?	Inducteur potentiel
<i>Mgmt</i>	Quand activé, blocage du cycle en G1	
<i>Mobk1b</i>	Inhibition de la croissance cellulaire	Induction de l'apoptose
<i>Nusap</i>	Régulateur positif de la mitose	
<i>Phlda3</i>		Impliqué dans la voie du TNF apoptotique
<i>Ppm1d</i>	Agit au niveau G2/M	
<i>Rdm1</i>	Quand activé, blocage du cycle en G1	
<i>Rrm2b</i>	Quand activé, blocage du cycle en G1	
<i>S100a4</i>	Régule positivement la croissance cellulaire	
<i>Serpin B2</i>		Inducteur de l'apoptose
<i>Sestrine 2</i>	Induit un arrêt du cycle cellulaire	
<i>Socs4</i>	Régule négativement la signalisation EGF	
<i>Suz12</i>	Régule positivement la prolifération	
<i>Tensine 1</i>		Induction de l'apoptose par d'autres membres de la famille
<i>Tnfsf7</i>		Impliquée dans une voie apoptotique
<i>Trp53inp1</i>		Facteur apoptotique
<i>Wisp1</i>		Peut activer voies anti-apoptotiques

Tableau 21 : Rôle potentiel des gènes dont l'expression est augmentée suite à la transfection par un siRNA dirigé contre *erm* ou *pea3*, dans la croissance cellulaire et l'apoptose.

A partir de ces listes de gènes cibles, certains seront sélectionnés en fonction de leur intérêt potentiel dans le but de confirmer la régulation montrée par l'analyse des puces à ADN et d'entreprendre ensuite l'étude de leur régulation par les facteurs PEA3.

IV- Conclusions et perspectives

Nous avons mis au point des modèles cellulaires modifiés pour l'expression des facteurs du groupe PEA3 qui nous ont permis de :

- mettre en évidence l'implication des facteurs de transcription du groupe PEA3 dans les modifications morphogénétiques observées (prolifération, migration et invasion),
- mettre en évidence de nouvelles cibles moléculaires des facteurs du groupe PEA3, *bax*, *cycline D2* et *p55^{cdc}*, et celles définies par la recherche par puces à ADN.

Les travaux pourront être poursuivis par différentes approches.

D'une part, il faudra compléter et/ou améliorer les modèles cellulaires de modulation de l'expression des facteurs du groupe PEA3 mis au point, notamment les modèles de répression constitutive de l'expression des facteurs PEA3, dans le but d'une utilisation *in vivo*.

Dans le cas des cellules TAC, un modèle de répression des facteurs du groupe PEA3 pourra être utilisé dans le cadre de la réimplantation de ces cellules dans une glande mammaire préalablement désépithélialisée. En effet, les cellules TAC injectées au niveau d'une glande mammaire préalablement désépithélialisée devraient reformer un arbre épithélial mammaire. Nous pourrions ainsi mieux appréhender le rôle des facteurs du groupe PEA3 dans la recolonisation de la glande par morphogenèse.

Dans le cas des cellules MMT, les nouveaux modèles cellulaires envisagés pourront permettre de conforter les résultats mis en évidence et aller plus loin dans la caractérisation du rôle des facteurs du groupe PEA3 dans la mise en place du processus cancéreux et son statut métastatique.

Il sera aussi intéressant de s'attacher à l'étude du troisième facteur du groupe PEA3, le facteur Er81, et ce dans les deux modèles cellulaires, de façon à appréhender son rôle dans ces différents événements.

L'analyse par puces à ADN a permis de mettre en évidence un certain nombre de gènes qui seraient régulés par les facteurs Pea3 et/ou Erm. Parmi les cibles ainsi déterminées, certaines confortent l'idée des rôles proposés jusqu'ici pour les facteurs du groupe PEA3 et d'autres correspondent à des « voies » pour lesquelles les facteurs du groupe PEA3 n'ont

Discussion et conclusion

jamais été associés et qu'il sera intéressant d'explorer; parmi celles-ci, les voies de biosynthèse des acides gras et des lipides ou encore des facteurs impliqués dans la réplication, la transcription ou la traduction.

L'étude des caractéristiques de régulation de ces nouvelles cibles par les facteurs PEA3 et de leur association aux événements morphogénétiques décrits dans ce travail sera envisagée pour les gènes que nous sélectionnerons.

Nous envisageons de poursuivre et compléter la recherche des cibles moléculaires des facteurs PEA3 en étendant l'analyse par puces à ADN aux modèles de cellules mammaires normales surexprimant ces facteurs ou pour lesquelles l'expression de ces facteurs est réprimée. Cette étude permettra de comparer les régulations observées à celles obtenues avec les cellules mammaires cancéreuses.

L'analyse comparative des phénotypes observés *in vitro* et *in vivo*, aussi bien à partir des modèles de cellules normales, que des modèles de cellules cancéreuses et la découverte de nouveaux gènes cibles des facteurs du groupe PEA3, devraient nous permettre de mieux appréhender le rôle des facteurs du groupe PEA3 dans la morphogenèse mammaire et dans sa tumorigenèse.

Valorisation des compétences un nouveau chapitre de la thèse

Ce travail est une synthèse et une réflexion sur mes travaux de recherche. Il constitue le programme « valorisation des compétences, un nouveau chapitre de la thèse » réalisé avec le soutien et l'accompagnement de l'association Bernard Grégory. Il a pour vocation de valoriser l'expérience acquise au cours de la préparation du doctorat sur le marché du travail, qu'il s'agisse du secteur privé ou public. La thèse est ici résumée de façon à être accessible à tout public. J'ai ensuite exposé le contexte, le déroulement et les différents enjeux de ma thèse. Un bilan financier a été exposé. J'ai enfin détaillé les différentes compétences développées lors de mon travail de thèse. Ce travail effectué d'avril à juillet 2006 a été soutenu en public.

I- Présentation de la thèse :

1 - Présentation générale

Ma thèse se déroule dans le cadre de l'école doctorale Biologie et Santé, au sein de l'Institut de Biologie de Lille et de l'Université de Lille 1. Elle se place dans le cadre de la recherche sur le cancer, en particulier le cancer mammaire.

Elle s'intitule « Implication des facteurs de transcription du groupe PEA3 dans la morphogenèse mammaire et sa dérive cancéreuse ». En résumé, les gènes du groupe PEA3 sont au nombre de trois. Ils semblent être impliqués, selon les études menées jusque-là, dans la mise en place des organes comme la glande mammaire, le poumon ou le rein, pendant l'embryogenèse. Mais leur expression est aussi corrélée à la cancérisation de divers organes et en particulier dans les phénomènes de métastases. J'ai essayé, pendant ces quatre ans, de mieux comprendre le rôle de ces facteurs aussi bien dans le développement de la glande mammaire que dans sa cancérisation chez la souris.

2- Contexte de ma thèse :

Ma thèse s'est déroulée au sein de deux laboratoires. J'ai donc fait partie de deux équipes différentes avec, pour points communs, ma directrice de thèse (qui fait partie des deux laboratoires) et le sujet de recherche.

L'équipe à laquelle je me suis trouvée intégrée au sein de l'Université de Lille 1 se compose de 5 personnes, sous la responsabilité du Pr Xavier Desbiens : deux maîtres de

conférence (Dr Anne Chotteau-Lelièvre et Dr Albin Pourtier) et deux doctorants. J'ai effectué ma thèse sous la co-direction du Pr Xavier Desbiens et du Dr Anne Chotteau-Lelièvre.

La thématique de recherche portait sur le modèle de la glande mammaire et l'importance du rôle joué par les facteurs ETS dans sa cancérisation et son développement. Cette équipe faisait partie du laboratoire de Biologie du Développement, qui comptait en plus deux autres équipes, l'une travaillant sur le rôle du NGF dans le cancer du sein et l'autre sur la régulation du cycle cellulaire.

A l'Institut de Biologie de Lille, ma thèse s'est déroulée au sein d'un laboratoire labellisé CNRS. Celui-ci est composé actuellement de 12 équipes (ce qui correspond à une centaine de personnes), travaillant sur divers sujets dans différentes disciplines (biologistes, chimistes, informaticiens). Notre équipe est composée d'une quinzaine de personnes sous la responsabilité du Pr Yvan de Launoit. Nous sommes quatre groupes de recherche dont trois travaillant sur les facteurs du groupe PEA3 (cancérisation et morphogénèse du sein, partenaires de ces molécules ou modifications des protéines). Ce laboratoire fait partie de la Cancéropôle Nord-Ouest.

Les facteurs du groupe PEA3 sont étudiés à l'heure actuelle par différentes équipes internationales. Beaucoup s'intéressent à leur implication dans la tumorigénèse. Elles travaillent dans le monde entier (liste non exhaustive) : les Etats-Unis, le Canada, le Royaume-Uni, la Norvège, le Japon, l'Espagne, la Suisse. L'équipe du Dr Hassell au Canada a un sujet de recherche proche du nôtre : elle s'intéresse aussi au modèle mammaire et à l'implication du facteur Pea3 dans la tumorigénèse et dans la morphogénèse. Cette équipe a un avantage sur nous, car elle possède tous les modèles nécessaires à cette étude, auxquels nous n'avons malheureusement pas accès, faute de moyens ou de personnel.

3- Ma place dans la thèse :

J'ai entrepris des études de biologie dans le but de faire de la recherche dans le domaine médical. J'ai fait un DEA, puis une thèse dans la recherche fondamentale sur le cancer du sein. J'ai été très intéressée pendant mes études par la biologie moléculaire (c'est-à-dire la régulation des gènes), et j'avais déjà effectué un stage avec le Dr Anne Chotteau-Lelièvre. J'ai donc commencé mon DEA, puis continué ma thèse dans ce laboratoire dont je fais toujours partie.

Au départ, j'ai choisi ce projet pour son originalité et parce qu'il m'offrait la possibilité de me spécialiser aussi bien en biologie moléculaire qu'en biologie cellulaire. De plus, les relations basées dans le groupe sur la confiance me convenaient parfaitement. Ce projet, à la base celui de ma directrice de thèse, a ensuite évolué au fil des discussions. J'ai commencé mon DEA encadrée par celle-ci et une post-doctorante. Après quoi j'ai pu apprendre d'autres techniques au sein du laboratoire ou dans d'autres laboratoires. Ainsi dirigée, je suis toujours restée très libre du programme de mes expérimentations.

II- Déroulement, gestion et coût du projet

1- Préparation et cadre du projet

Ce projet se basait sur des résultats obtenus précédemment et avait donc de bonnes chances d'aboutir, notamment à des publications. Une partie de mon travail de thèse consistait à mettre en évidence de nouvelles cibles moléculaires des facteurs du groupe PEA3. Avant mon arrivée dans le laboratoire, par une technique récente très performante, mais qui donnait beaucoup de faux positifs, plusieurs cibles potentielles avaient été mises en évidence. Cette partie du projet comportait peu de risques et présageait de donner rapidement des résultats exploitables. Effectivement, j'ai fait paraître une publication durant ma deuxième année de thèse.

L'autre partie de mon projet qui concerne le rôle des facteurs du groupe PEA3 dans la morphogénèse mammaire était beaucoup plus risquée du fait de la concurrence, du modèle d'étude et des moyens à notre disposition. Nous avons donc envisagé plusieurs approches.

Ce projet a été soutenu :

- pour mon financement : par la Ligue Nationale contre le Cancer et la Fondation pour la Recherche Médicale
- pour le projet : par la Ligue Nationale contre le Cancer et l'Association de Recherche contre le Cancer
- pour le laboratoire : par le CNRS et l'Université de Lille1.

Ainsi, pendant tout le temps de ma thèse, j'ai eu assez de facilité budgétaire pour mener les expériences nécessaires.

Nous avons bénéficié de l'aide de différentes personnes (Ingénieurs de Recherche ou Chargés de Recherche), de plusieurs laboratoires situés sur le site de l'Institut Pasteur de Lille, et nous avons eu accès à des technologies innovantes (appareil de PCR quantitative, puces à ADN, etc...) et à du matériel biologique.

2- Conduite du projet

Mon projet s'est fait en étroite relation avec ma directrice de thèse, que je voyais très régulièrement. Je l'ai toujours tenue au courant de mes résultats (pratiquement au jour le jour), ce qui a permis de réorienter rapidement mes recherches en cas de besoin. Toutes les semaines ou deux semaines, nous reprenions les résultats et décisions des expériences à poursuivre. Des réunions de travail étaient organisées environ tous les 3 mois pour faire le point et envisager d'éventuels changements de stratégie. Les réunions de groupe ont eu lieu tous les six mois, chaque personne du laboratoire présentant une partie spécifique de son travail. Pour valoriser mes travaux, j'ai eu l'occasion à plusieurs reprises de les présenter en congrès ou en séminaires.

Les problèmes rencontrés pendant la thèse ont été essentiellement techniques. Ils ont pour la plupart pu être réglés rapidement grâce à l'utilisation de techniques parallèles ou l'accès à d'autres plateformes technologiques. Mon projet n'aura donc été réorienté qu'une seule fois. J'ai obtenu des résultats très intéressants sur le modèle de la tumorigenèse, grâce à de nouvelles techniques d'étude mises au point. De plus, la concurrence sur le modèle de la morphogenèse mammaire se montrait de plus en plus importante. J'ai donc, au cours de ma deuxième année de thèse, mis en avant mes travaux sur la tumorigenèse de la glande mammaire par rapport à ceux sur le développement de la glande mammaire.

3- Evaluation et prise en charge du coût du projet

Mon projet se sera déroulé sur 4 ans. Il est estimé à 204.000 €. Le coût comprend les frais de fonctionnement, dont les prestations sociales et le coût des infrastructures, et le consommable de laboratoire.

Valorisation des compétences

	Dépenses	Recettes
<u>Ressources humaines :</u>		
Doctorante	60.000 €	
Personnel mobilisé	70.000 €	
<u>Matériels et Prestations :</u>		
Equipements	4.000 €	
Consommables	65.000 €	
<i>Dont culture cellulaire</i>	<i>5.000 €</i>	
<i>Plastiques</i>	<i>7.000 €</i>	
<i>PCR quantitative</i>	<i>3.500 €</i>	
Déplacements	1.000 €	
<u>Coût infrastructures :</u>		
Bâtiment, Entretien, Electricité, Eau, Téléphone,...	3.500 €	
Usure appareils	500 €	
<u>Subventions :</u>		
Contrats d'association		45.000 €
Subventionnements CNRS/Université		20.000 €
Total	204.000 €	65.000 €

Détail :

Ressources humaines

Doctorante : financement par la Ligue Nationale contre le Cancer et Fondation pour la Recherche Médicale

Personnel mobilisé : Pr Xavier Desbiens (Professeur)

Dr Anne Chotteau-Lelièvre (Maître de conférences)

Isabelle Damour (Technicienne)

Les 3 stagiaires au prorata du temps passé

Subventionnement de ma thèse :

J'ai tenu compte pour cette partie des différents contrats de la Ligue Nationale contre le Cancer et de l'Association de la Recherche contre le Cancer, au prorata du nombre de bénéficiaires. J'ai fait de même pour les subventions du CNRS et de l'Université.

III- Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles

1- Expertise scientifique

J'ai acquis au travers de ma thèse une expertise dans :

- la cancérisation et la métastatisation en particulier du modèle mammaire
- le développement des organes à morphogenèse de branchement tel le sein
- la biologie moléculaire, en particulier la régulation des gènes.

2- Expérience technique et appliquée

Comme ma thèse s'est déroulée sur deux sites, j'ai bénéficié d'une grande variété de techniques et de matériels. Mon sujet assez large et la veille technologique que j'ai menée, m'ont permis d'acquérir de nombreuses compétences scientifiques.

. Maîtrise des outils de biologie moléculaire, que sont la PCR, la RT-PCR, la PCR quantitative, le retard sur gel, le clonage et les techniques d'ARN interférence.

. Savoir-faire en transfection cellulaire, dans les tests morphogénétiques et phénotypiques (comme la culture tridimensionnelle ou les tests de migration cellulaire par exemple), dans la mesure où mon travail eut comme base un modèle de cellules en culture *in vitro*.

. Connaissance de techniques de biochimie comme le western blot.

. Collaboration en expérimentation animale chez la souris. Mon intervention s'est située en amont, avec la préparation du matériel biologique nécessaire pour ces manipulations, mais j'ai tout de même pu suivre le travail du début à la fin.

3- Compétences acquises

► **Organisation et adaptabilité**

Valorisation des compétences

. Disponibilité : Faire de la recherche en biologie sur un modèle cellulaire vivant signifie faire les expérimentations au moment où celles-ci sont en bonne condition, et gérer le temps de la manipulation.

. Sens de l'organisation : Travailler sur deux sites implique de gérer son emploi du temps, pour mener au mieux la recherche.

. Gestion de projet :

aussi bien en terme de temps que d'argent, c'est-à-dire :

- élaborer le projet en collaboration avec mon encadrante de thèse
- gérer la faisabilité de chaque expérience, en terme d'argent, de temps et de matériel
- analyser les résultats
- gérer les éventuelles réorientations de sujet.

► **Travail en équipe :**

Ma thèse a été l'occasion d'une véritable expérience de travail d'équipe. Ceci se traduit par :

- respecter l'une organisation interne,
- partager les « corvées »,
- gérer l'utilisation des appareils, c'est-à-dire respecter les créneaux de réservation des appareils
- gérer l'emploi du temps de chacun pour organiser les manipulations faites en collaboration.

Mon travail au sein de deux laboratoires de recherche, mais aussi en collaboration avec d'autres équipes, m'a montré l'importance des qualités relationnelles et de mon sens du contact.

► **Communication et valorisation des travaux :**

En recherche, la communication est l'un des outils les plus importants, que ce soit au niveau oral ou écrit :

- Présentation de mes travaux en congrès ou en séminaire, de façon claire et synthétique

Valorisation des compétences

- Rédaction de projets et demandes de subventions : ma thèse ayant été entièrement subventionnée par des libéralités d'association (Ligue Nationale contre le Cancer et Fondation pour la Recherche Médicale).
- Rédaction d'une partie des résultats de mes travaux pour publication.

► **Veille technologique et scientifique**

Grâce à une lecture régulière de la bibliographie internationale, à l'accès aux conférences scientifiques ou technologiques ou aux discussions avec nos partenaires, je me suis tenue au courant des nouvelles avancées dans mon domaine, mais aussi des avancées technologiques en général.

► **Qualités personnelles**

Je voudrais finir en développant certaines de mes qualités personnelles qui se sont avérées nécessaires durant mon travail de thèse et que j'ai aussi pu développer :

- l'autonomie : même si j'ai été très encadrée, j'ai géré mon emploi du temps et mes expériences de façon autonome à la paillasse
- la persévérance et le dynamisme : résister aux échecs très nombreux dans ce domaine et ne jamais baisser les bras.
- l'esprit de décision, particulièrement nécessaire dans les moments clés de la thèse (élaboration du projet, réorientation, rédaction).
- l'implication dans tout ce que j'entreprends, que ce soit dans les expériences ou dans la mise en place d'enseignement de travaux pratiques
- l'esprit critique : j'ai été rapporteur pour des mémoires de stage d'étudiants d'IUP
- la transmission d'un savoir de façon claire et compréhensive, lors des séances de Travaux Pratiques

IV- Résultats et impacts de la thèse

Grâce aux résultats que j'ai obtenus, j'ai pu apporter des éléments nouveaux sur l'implication des facteurs PEA3 dans la cancérogenèse et sur sa fonction. Mon projet a mis en évidence une nouvelle cible des facteurs du groupe PEA3, et montré leur implication dans des phénomènes comme la prolifération ou la migration des cellules cancéreuses du sein. Ce projet a donc participé à l'amélioration des connaissances fondamentales et à la compréhension du processus de cancérisation lié aux facteurs du groupe PEA3.

Valorisation des compétences

Au niveau professionnel, la thèse a été pour moi l'occasion de gérer un projet en tenant compte des contraintes de temps et d'argent, ainsi que de pratiques et d'éléments techniques. En la faisant, j'ai pris conscience de ma capacité d'autonomie et j'ai renforcé mon sens de la communication. Les objectifs imposés par la thèse ont été honorés en terme de réponses aux hypothèses posées et par rapport aux articles scientifiques réalisés ou à venir.

En terme de projet professionnel, mon premier choix serait d'occuper un poste où je pourrais utiliser au mieux l'expertise scientifique acquise, mon goût du travail d'équipe et mon aptitude à mener un projet. Cela pourrait se faire au sein d'un organisme de recherche publique comme l'Université ou le CNRS, ou au sein d'un service de Recherche & Développement dans une entreprise de biotechnologie ou pharmaceutique (ex : Genfit, Genoscreen ou Novartis).

Je suis intéressée par une ouverture disciplinaire vers d'autres aspects de la biologie (immunologie, virologie, etc...), ainsi que par la recherche appliquée.

Bibliographie

Bibliographie

- Adam, M., Schmidt, D., Wardelmann, E., Wernert, N. and Albers, P. (2003) Angiogenetic protooncogene ets-1 induced neovascularization is involved in the metastatic process of testicular germ cell tumors. *Eur Urol*, **44**, 329-336.
- Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A. and Pestell, R.G. (1995) Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem*, **270**, 23589-23597.
- Alipov, G., Nakayama, T., Ito, M., Kawai, K., Naito, S., Nakashima, M., Niino, D. and Sekine, I. (2005) Overexpression of Ets-1 proto-oncogene in latent and clinical prostatic carcinomas. *Histopathology*, **46**, 202-208.
- Alitalo, K., Tammela, T. and Petrova, T.V. (2005) Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*, **438**, 946-953.
- Andrianifahanana, M., Moniaux, N. and Batra, S.K. (2006) Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta*, **1765**, 189-222.
- Arber, S., Ladle, D.R., Lin, J.H., Frank, E. and Jessell, T.M. (2000) ETS gene Er81 controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons. *Cell*, **101**, 485-498.
- Ayadi, A., Zheng, H., Sobieszczuk, P., Buchwalter, G., Moerman, P., Alitalo, K. and Wasyluk, B. (2001) Net-targeted mutant mice develop a vascular phenotype and up-regulate egr-1. *Embo J*, **20**, 5139-5152.
- Baert, J.L., Beaudoin, C., Coutte, L. and de Launoit, Y. (2002) ERM transactivation is up-regulated by the repression of DNA binding after the PKA phosphorylation of a consensus site at the edge of the ETS domain. *J Biol Chem*, **277**, 1002-1012.
- Baert, J.L., Beaudoin, C., Monte, D., Degerny, C., Mauen, S. and de Launoit, Y. (2006) The 26S proteasome system degrades the ERM transcription factor and regulates its transcription-enhancing activity. *Oncogene*.
- Baert, J.L., Monte, D., Musgrove, E.A., Albagli, O., Sutherland, R.L. and de Launoit, Y. (1997) Expression of the PEA3 group of ETS-related transcription factors in human breast-cancer cells. *Int J Cancer*, **70**, 590-597.
- Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S., Spensberger, D., de Knecht, Y., Tang, M., Lowenberg, B. and Delwel, R. (2005) Somatic heterozygous mutations in ETV6 (TEL) and frequent absence of ETV6 protein in acute myeloid leukemia. *Oncogene*, **24**, 4129-4137.
- Barrett, J.M., Puglia, M.A., Singh, G. and Tozer, R.G. (2002) Expression of Ets-related transcription factors and matrix metalloproteinase genes in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, **72**, 227-232.
- Benz, C.C., O'Hagan, R.C., Richter, B., Scott, G.K., Chang, C.H., Xiong, X., Chew, K., Ljung, B.M., Edgerton, S., Thor, A. and Hassell, J.A. (1997) HER2/Neu and the Ets transcription activator PEA3 are coordinately upregulated in human breast cancer. *Oncogene*, **15**, 1513-1525.
- Bergers, G. and Benjamin, L.E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, **3**, 401-410.
- Bieche, I., Tozlu, S., Girault, I., Onody, P., Driouch, K., Vidaud, M. and Lidereau, R. (2004) Expression of PEA3/E1AF/ETV4, an Ets-related transcription factor, in breast tumors: positive links to MMP2, NRG1 and CGB expression. *Carcinogenesis*, **25**, 405-411.
- Billingsley, M.L., Yun, J., Reese, B.E., Davidson, C.E., Buck-Koehntop, B.A. and Veglia, G. (2006) Functional and structural properties of stannin: roles in cellular growth, selective toxicity, and mitochondrial responses to injury. *J Cell Biochem*, **98**, 243-250.

Bibliographie

- Block, K.L., Shou, Y. and Poncz, M. (1996) An Ets/Sp1 interaction in the 5'-flanking region of the megakaryocyte-specific alpha IIb gene appears to stabilize Sp1 binding and is essential for expression of this TATA-less gene. *Blood*, **88**, 2071-2080.
- Boedefeld, W.M., 2nd, Soong, R., Weiss, H., Diasio, R.B., Urist, M.M., Bland, K.I. and Heslin, M.J. (2005) E1A-F is overexpressed early in human colorectal neoplasia and associated with cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-7. *Mol Carcinog*, **43**, 13-17.
- Boehlk, S., Fessele, S., Mojaat, A., Miyamoto, N.G., Werner, T., Nelson, E.L., Schlondorff, D. and Nelson, P.J. (2000) ATF and Jun transcription factors, acting through an Ets/CRE promoter module, mediate lipopolysaccharide inducibility of the chemokine RANTES in monocytic Mono Mac 6 cells. *Eur J Immunol*, **30**, 1102-1112.
- Bohlander, S.K. (2005) ETV6: a versatile player in leukemogenesis. *Semin Cancer Biol*, **15**, 162-174.
- Boilly, B., Vercoutter-Edouart, A.S., Hondermarck, H., Nurcombe, V. and Le Bourhis, X. (2000) FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Rev*, **11**, 295-302.
- Bojovic, B.B. and Hassell, J.A. (2001) The PEA3 Ets transcription factor comprises multiple domains that regulate transactivation and DNA binding. *J Biol Chem*, **276**, 4509-4521.
- Bonner, A.E., Lemon, W.J., Devereux, T.R., Lubet, R.A. and You, M. (2004) Molecular profiling of mouse lung tumors: association with tumor progression, lung development, and human lung adenocarcinomas. *Oncogene*, **23**, 1166-1176.
- Bories, J.C., Willerford, D.M., Grevin, D., Davidson, L., Camus, A., Martin, P., Stehelin, D. and Alt, F.W. (1995) Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. *Nature*, **377**, 635-638.
- Bosc, D.G., Goueli, B.S. and Janknecht, R. (2001) HER2/Neu-mediated activation of the ETS transcription factor ER81 and its target gene MMP-1. *Oncogene*, **20**, 6215-6224.
- Bottinger, E.P., Shelley, C.S., Farokhzad, O.C. and Arnaout, M.A. (1994) The human beta 2 integrin CD18 promoter consists of two inverted Ets cis elements. *Mol Cell Biol*, **14**, 2604-2615.
- Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J. and Eilers, M. (1999) Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J*, **18**, 5321-5333.
- Boulon, S., Dantanel, J.C., Binet, V., Vie, A., Blanchard, J.M., Hipskind, R.A. and Philips, A. (2002) Oct-1 potentiates CREB-driven cyclin D1 promoter activation via a phospho-CREB- and CREB binding protein-independent mechanism. *Mol Cell Biol*, **22**, 7769-7779.
- Brent, A.E. and Tabin, C.J. (2004) FGF acts directly on the somitic tendon progenitors through the Ets transcription factors Pea3 and Erm to regulate scleraxis expression. *Development*, **131**, 3885-3896.
- Brown, L.A., Amores, A., Schilling, T.F., Jowett, T., Baert, J.L., de Launoit, Y. and Sharrocks, A.D. (1998) Molecular characterization of the zebrafish PEA3 ETS-domain transcription factor. *Oncogene*, **17**, 93-104.
- Brown, T.A. and McKnight, S.L. (1992) Specificities of protein-protein and protein-DNA interaction of GABP alpha and two newly defined ets-related proteins. *Genes Dev*, **6**, 2502-2512.
- Brysbaert G, Noth S, Benecke A: The ace.map microarray processor software. in preparation. see also: <http://www.iri.cnrs.fr/seg>.
- Buggy, Y., Maguire, T.M., McDermott, E., Hill, A.D., O'Higgins, N. and Duffy, M.J. (2006) Ets2 transcription factor in normal and neoplastic human breast tissue. *Eur J Cancer*, **42**, 485-491.

Bibliographie

- Buggy, Y., Maguire, T.M., McGreal, G., McDermott, E., Hill, A.D., O'Higgins, N. and Duffy, M.J. (2004) Overexpression of the Ets-1 transcription factor in human breast cancer. *Br J Cancer*, **91**, 1308-1315.
- Caldon, C.E., Daly, R.J., Sutherland, R.L. and Musgrove, E.A. (2006) Cell cycle control in breast cancer cells. *J Cell Biochem*, **97**, 261-274.
- Cao, Y., Dave, K.B., Doan, T.P. and Prescott, S.M. (2001) Fatty acid CoA ligase 4 is up-regulated in colon adenocarcinoma. *Cancer Res*, **61**, 8429-8434.
- Carbone, G.M., McGuffie, E.M., Collier, A. and Catapano, C.V. (2003) Selective inhibition of transcription of the Ets2 gene in prostate cancer cells by a triplex-forming oligonucleotide. *Nucleic Acids Res*, **31**, 833-843.
- Cataisson, C., Gordon, J., Roussiere, M., Abdalkhani, A., Lindemann, R., Dittmer, J., Foley, J. and Bouizar, Z. (2003) Ets-1 activates parathyroid hormone-related protein gene expression in tumorigenic breast epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol*, **204**, 155-168.
- Cesari, F., Brecht, S., Vintersten, K., Vuong, L.G., Hofmann, M., Klingel, K., Schnorr, J.J., Arsenian, S., Schild, H., Herdegen, T., Wiebel, F.F. and Nordheim, A. (2004) Mice deficient for the ets transcription factor elk-1 show normal immune responses and mildly impaired neuronal gene activation. *Mol Cell Biol*, **24**, 294-305.
- Chang, C.H., Scott, G.K., Kuo, W.L., Xiong, X., Suzdaltseva, Y., Park, J.W., Sayre, P., Erny, K., Collins, C., Gray, J.W. and Benz, C.C. (1997) ESX: a structurally unique Ets overexpressed early during human breast tumorigenesis. *Oncogene*, **14**, 1617-1622.
- Chang, K., Elledge, S.J. and Hannon, G.J. (2006) Lessons from Nature: microRNA-based shRNA libraries. *Nat Methods*, **3**, 707-714.
- Chauvet, S., Dessaud, E. and de Lapeyrière, O. (2004) Spécification des neurones moteurs spinaux des vertébrés supérieurs: une conversation à deux. *M/S : médecine sciences*, **20**, 135-158.
- Chen, C., Ouyang, W., Grigura, V., Zhou, Q., Carnes, K., Lim, H., Zhao, G.Q., Arber, S., Kurpios, N., Murphy, T.L., Cheng, A.M., Hassell, J.A., Chandrashekar, V., Hofmann, M.C., Hess, R.A. and Murphy, K.M. (2005) ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature*, **436**, 1030-1034.
- Chen, J.H., Vercamer, C., Li, Z., Paulin, D., Vandebunder, B. and Stehelin, D. (1996) PEA3 transactivates vimentin promoter in mammary epithelial and tumor cells. *Oncogene*, **13**, 1667-1675.
- Cheng, N., Janumyan, Y.M., Didion, L., Van Hofwegen, C., Yang, E. and Knudson, C.M. (2004) Bcl-2 inhibition of T-cell proliferation is related to prolonged T-cell survival. *Oncogene*, **23**, 3770-3780.
- Choi, J., Choi, K., Benveniste, E.N., Rho, S.B., Hong, Y.S., Lee, J.H., Kim, J. and Park, K. (2005) Bcl-2 promotes invasion and lung metastasis by inducing matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res*, **65**, 5554-5560.
- Chotteau-Lelievre, A., Desbiens, X., Pelczar, H., Defossez, P.A. and de Launoit, Y. (1997) Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development. *Oncogene*, **15**, 937-952.
- Chotteau-Lelievre, A., Dolle, P., Peronne, V., Coutte, L., de Launoit, Y. and Desbiens, X. (2001) Expression patterns of the Ets transcription factors from the PEA3 group during early stages of mouse development. *Mech Dev*, **108**, 191-195.
- Chotteau-Lelievre, A., Montesano, R., Soriano, J., Soulie, P., Desbiens, X. and de Launoit, Y. (2003) PEA3 transcription factors are expressed in tissues undergoing branching morphogenesis and promote formation of duct-like structures by mammary epithelial cells in vitro. *Dev Biol*, **259**, 241-257.

Bibliographie

- Chotteau-Lelievre, A., Revillion, F., Lhotellier, V., Hornez, L., Desbiens, X., Cabaret, V., de Launoit, Y. and Peyrat, J.P. (2004) Prognostic value of ERM gene expression in human primary breast cancers. *Clin Cancer Res*, **10**, 7297-7303.
- Christofori, G. (2006) New signals from the invasive front. *Nature*, **441**, 444-450.
- Cook, A.C., Chambers, A.F., Turley, E.A. and Tuck, A.B. (2006) Osteopontin induction of hyaluronan synthase 2 expression promotes breast cancer malignancy. *J Biol Chem*, **281**, 24381-24389.
- Cory, S., Huang, D.C. and Adams, J.M. (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, **22**, 8590-8607.
- Costello, P.S., Nicolas, R.H., Watanabe, Y., Rosewell, I. and Treisman, R. (2004) Ternary complex factor SAP-1 is required for Erk-mediated thymocyte positive selection. *Nat Immunol*, **5**, 289-298.
- Coutte, L., Monte, D., Imai, K., Pouilly, L., Dewitte, F., Vidaud, M., Adamski, J., Baert, J.L. and de Launoit, Y. (1999) Characterization of the human and mouse ETV1/ER81 transcription factor genes: role of the two alternatively spliced isoforms in the human. *Oncogene*, **18**, 6278-6286.
- Crawford, H.C., Fingleton, B., Gustavson, M.D., Kurpios, N., Wagenaar, R.A., Hassell, J.A. and Matrisian, L.M. (2001) The PEA3 subfamily of Ets transcription factors synergizes with beta-catenin-LEF-1 to activate matrilysin transcription in intestinal tumors. *Mol Cell Biol*, **21**, 1370-1383.
- Cullen, B.R. (2006) Viruses and microRNAs. *Nat Genet*, **38 Suppl**, S25-30.
- Davidson, B., Goldberg, I., Gotlieb, W.H., Kopolovic, J., Ben-Baruch, G. and Reich, R. (2003a) PEA3 is the second Ets family transcription factor involved in tumor progression in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, **9**, 1412-1419.
- Davidson, B., Goldberg, I., Gotlieb, W.H., Kopolovic, J., Risberg, B., Ben-Baruch, G. and Reich, R. (2003b) Coordinated expression of integrin subunits, matrix metalloproteinases (MMP), angiogenic genes and Ets transcription factors in advanced-stage ovarian carcinoma: a possible activation pathway? *Cancer Metastasis Rev*, **22**, 103-115.
- Davidson, B., Goldberg, I., Tell, L., Vigdorichik, S., Baekelandt, M., Berner, A., Kristensen, G.B., Reich, R. and Kopolovic, J. (2004a) The clinical role of the PEA3 transcription factor in ovarian and breast carcinoma in effusions. *Clin Exp Metastasis*, **21**, 191-199.
- Davidson, B., Konstantinovskiy, S., Nielsen, S., Dong, H.P., Berner, A., Vyberg, M. and Reich, R. (2004b) Altered expression of metastasis-associated and regulatory molecules in effusions from breast cancer patients: a novel model for tumor progression. *Clin Cancer Res*, **10**, 7335-7346.
- Davidson, B., Reich, R., Goldberg, I., Gotlieb, W.H., Kopolovic, J., Berner, A., Ben-Baruch, G., Bryne, M. and Nesland, J.M. (2001a) Ets-1 messenger RNA expression is a novel marker of poor survival in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, **7**, 551-557.
- Davidson, B., Risberg, B., Goldberg, I., Nesland, J.M., Berner, A., Trope, C.G., Kristensen, G.B., Bryne, M. and Reich, R. (2001b) Ets-1 mRNA expression in effusions of serous ovarian carcinoma patients is a marker of poor outcome. *Am J Surg Pathol*, **25**, 1493-1500.
- Davis, P.L., Miron, A., Andersen, L.M., Iglehart, J.D. and Marks, J.R. (1999) Isolation and initial characterization of the BRCA2 promoter. *Oncogene*, **18**, 6000-6012.
- de Launoit, Y., Audette, M., Pelczar, H., Plaza, S. and Baert, J.L. (1998) The transcription of the intercellular adhesion molecule-1 is regulated by Ets transcription factors. *Oncogene*, **16**, 2065-2073.

Bibliographie

- de Launoit, Y., Baert, J.L., Chotteau-Lelievre, A., Monte, D., Coutte, L., Mauen, S., Firlej, V., Degerny, C. and Verreman, K. (2006) The Ets transcription factors of the PEA3 group: Transcriptional regulators in metastasis. *Biochim Biophys Acta*.
- de Launoit, Y., Baert, J.L., Chotteau, A., Monte, D., Defossez, P.A., Coutte, L., Pelczar, H. and Leenders, F. (1997) Structure-function relationships of the PEA3 group of Ets-related transcription factors. *Biochem Mol Med*, **61**, 127-135.
- de Nigris, F., Mega, T., Berger, N., Barone, M.V., Santoro, M., Viglietto, G., Verde, P. and Fusco, A. (2001) Induction of ETS-1 and ETS-2 transcription factors is required for thyroid cell transformation. *Cancer Res*, **61**, 2267-2275.
- Defossez, P.A., Baert, J.L., Monnot, M. and de Launoit, Y. (1997) The ETS family member ERM contains an alpha-helical acidic activation domain that contacts TAFII60. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4455-4463.
- Degerny, C., Monte, D., Beaudoin, C., Jaffray, E., Portois, L., Hay, R.T., de Launoit, Y. and Baert, J.L. (2005) SUMO modification of the Ets-related transcription factor ERM inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem*, **280**, 24330-24338.
- Dimri, G.P. (2005) What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell*, **7**, 505-512.
- Disanza, A., Carlier, M.F., Stradal, T.E., Didry, D., Frittoli, E., Confalonieri, S., Croce, A., Wehland, J., Di Fiore, P.P. and Scita, G. (2004) Eps8 controls actin-based motility by capping the barbed ends of actin filaments. *Nat Cell Biol*, **6**, 1180-1188.
- Discenza, M.T., Vaz, D., Hassell, J.A. and Pelletier, J. (2004) Activation of the WT1 tumor suppressor gene promoter by Pea3. *FEBS Lett*, **560**, 183-191.
- Dittmer, J. (2003) The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol Cancer*, **2**, 29.
- Dowdy, S.C., Mariani, A. and Janknecht, R. (2003) HER2/Neu- and TAK1-mediated up-regulation of the transforming growth factor beta inhibitor Smad7 via the ETS protein ER81. *J Biol Chem*, **278**, 44377-44384.
- Drevet, J.R., Lareyre, J.J., Schwaab, V., Vernet, P. and Dufaure, J.P. (1998) The PEA3 protein of the Ets oncogene family is a putative transcriptional modulator of the mouse epididymis-specific glutathione peroxidase gene gpx5. *Mol Reprod Dev*, **49**, 131-140.
- Dube, A., Akbarali, Y., Sato, T.N., Libermann, T.A. and Oettgen, P. (1999) Role of the Ets transcription factors in the regulation of the vascular-specific Tie2 gene. *Circ Res*, **84**, 1177-1185.
- Dube, A., Thai, S., Gaspar, J., Rudders, S., Libermann, T.A., Iruela-Arispe, L. and Oettgen, P. (2001) Elf-1 is a transcriptional regulator of the Tie2 gene during vascular development. *Circ Res*, **88**, 237-244.
- Dunbar, M.E., Dann, P., Brown, C.W., Van Houton, J., Dreyer, B., Philbrick, W.P. and Wysolmerski, J.J. (2001) Temporally regulated overexpression of parathyroid hormone-related protein in the mammary gland reveals distinct fetal and pubertal phenotypes. *J Endocrinol*, **171**, 403-416.
- Egan, B.S., Lane, K.B. and Shepherd, V.L. (1999) PU.1 and USF are required for macrophage-specific mannose receptor promoter activity. *J Biol Chem*, **274**, 9098-9107.
- El-Tanani, M., Platt-Higgins, A., Rudland, P.S. and Campbell, F.C. (2004) Ets gene PEA3 cooperates with beta-catenin-Lef-1 and c-Jun in regulation of osteopontin transcription. *J Biol Chem*, **279**, 20794-20806.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Weber, K. and Tuschl, T. (2002) Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, **26**, 199-213.
- Emonard, H., Bellon, G., de Diesbach, P., Mettlen, M., Hornebeck, W. and Courtoy, P.J. (2005) Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) activity by the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP). A new function for an "old friend". *Biochimie*, **87**, 369-376.

Bibliographie

- Fang, G., Yu, H. and Kirschner, M.W. (1998) Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol Cell*, **2**, 163-171.
- Fata, J.E., Werb, Z. and Bissell, M.J. (2004) Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. *Breast Cancer Res*, **6**, 1-11.
- Fauquette, V., Perrais, M., Cerulis, S., Jonckheere, N., Ducourouble, M.P., Aubert, J.P., Pigny, P. and Van Seuningen, I. (2005) The antagonistic regulation of human MUC4 and ErbB-2 genes by the Ets protein PEA3 in pancreatic cancer cells: implications for the proliferation/differentiation balance in the cells. *Biochem J*, **386**, 35-45.
- Feldman, R.J., Sementchenko, V.I., Gayed, M., Fraig, M.M. and Watson, D.K. (2003) Pdef expression in human breast cancer is correlated with invasive potential and altered gene expression. *Cancer Res*, **63**, 4626-4631.
- Feng, Y., Goulet, A.C. and Nelson, M.A. (2004) Identification and characterization of the human Cdc212 gene promoter. *Gene*, **330**, 75-84.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Firlej, V., Bocquet, B., Desbiens, X., de Launoit, Y. and Chotteau-Lelievre, A. (2005) Pea3 transcription factor cooperates with USF-1 in regulation of the murine bax transcription without binding to an Ets-binding site. *J Biol Chem*, **280**, 887-898.
- Firnberg, N. and Neubuser, A. (2002) FGF signaling regulates expression of Tbx2, Erm, Pea3, and Pax3 in the early nasal region. *Dev Biol*, **247**, 237-250.
- Fleming, F.J., Myers, E., Kelly, G., Crotty, T.B., McDermott, E.W., O'Higgins, N.J., Hill, A.D. and Young, L.S. (2004) Expression of SRC-1, AIB1, and PEA3 in HER2 mediated endocrine resistant breast cancer; a predictive role for SRC-1. *J Clin Pathol*, **57**, 1069-1074.
- Fox, S.A., Yang, L. and Hinton, B.T. (2006) Identifying putative contraceptive targets by dissecting signal transduction networks in the epididymis using an in vivo electroporation (electrotransfer) approach. *Mol Cell Endocrinol*, **250**, 196-200.
- Fujimoto, J., Aoki, I., Toyoki, H., Khatun, S., Sato, E., Sakaguchi, H. and Tamaya, T. (2004) Clinical implications of expression of ETS-1 related to angiogenesis in metastatic lesions of ovarian cancers. *Oncology*, **66**, 420-428.
- Fukuma, M., Okita, H., Hata, J. and Umezawa, A. (2003) Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene*, **22**, 1-9.
- Funaoka, K., Shindoh, M., Yoshida, K., Hanzawa, M., Hida, K., Nishikata, S., Totsuka, Y. and Fujinaga, K. (1997) Activation of the p21(Waf1/Cip1) promoter by the ets oncogene family transcription factor E1AF. *Biochem Biophys Res Commun*, **236**, 79-82.
- Funato, Y., Terabayashi, T., Suenaga, N., Seiki, M., Takenawa, T. and Miki, H. (2004) IRSp53/Eps8 complex is important for positive regulation of Rac and cancer cell motility/invasiveness. *Cancer Res*, **64**, 5237-5244.
- Galang, C.K., Muller, W.J., Foos, G., Oshima, R.G. and Hauser, C.A. (2004) Changes in the expression of many Ets family transcription factors and of potential target genes in normal mammary tissue and tumors. *J Biol Chem*, **279**, 11281-11292.
- Gambarotta, G., Boccaccio, C., Giordano, S., Ando, M., Stella, M.C. and Comoglio, P.M. (1996) Ets up-regulates MET transcription. *Oncogene*, **13**, 1911-1917.
- Gavrilov, D., Kenzior, O., Evans, M., Calaluce, R. and Folk, W.R. (2001) Expression of urokinase plasminogen activator and receptor in conjunction with the ets family and

Bibliographie

- AP-1 complex transcription factors in high grade prostate cancers. *Eur J Cancer*, **37**, 1033-1040.
- Ghadersohi, A., Pan, D., Fayazi, Z., Hicks, D.G., Winston, J.S. and Li, F. (2006) Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF) downregulates survivin expression and inhibits breast cancer cell growth in vitro and xenograft tumor formation in vivo. *Breast Cancer Res Treat.*
- Ghadersohi, A. and Sood, A.K. (2001) Prostate epithelium-derived Ets transcription factor mRNA is overexpressed in human breast tumors and is a candidate breast tumor marker and a breast tumor antigen. *Clin Cancer Res*, **7**, 2731-2738.
- Gocke, C.B., Yu, H. and Kang, J. (2005) Systematic identification and analysis of mammalian small ubiquitin-like modifier substrates. *J Biol Chem*, **280**, 5004-5012.
- Goel, A. and Janknecht, R. (2003) Acetylation-mediated transcriptional activation of the ETS protein ER81 by p300, P/CAF, and HER2/Neu. *Mol Cell Biol*, **23**, 6243-6254.
- Goel, A. and Janknecht, R. (2004) Concerted activation of ETS protein ER81 by p160 coactivators, the acetyltransferase p300 and the receptor tyrosine kinase HER2/Neu. *J Biol Chem*, **279**, 14909-14916.
- Goueli, B.S. and Janknecht, R. (2004) Upregulation of the Catalytic Telomerase Subunit by the Transcription Factor ER81 and Oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf. *Mol Cell Biol*, **24**, 25-35.
- Gouon-Evans, V., Lin, E.Y. and Pollard, J.W. (2002) Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines/chemokines for mammary gland development. *Breast Cancer Res*, **4**, 155-164.
- Greenall, A., Willingham, N., Cheung, E., Boam, D.S. and Sharrocks, A.D. (2001) DNA binding by the ETS-domain transcription factor PEA3 is regulated by intramolecular and intermolecular protein-protein interactions. *J Biol Chem*, **276**, 16207-16215.
- Gunawardane, R.N., Sgroi, D.C., Wrobel, C.N., Koh, E., Daley, G.Q. and Brugge, J.S. (2005) Novel role for PDEF in epithelial cell migration and invasion. *Cancer Res*, **65**, 11572-11580.
- Guo, B., Sallis, R.E., Greenall, A., Petit, M.M., Jansen, E., Young, L., Van de Ven, W.J. and Sharrocks, A.D. (2006) The LIM Domain Protein LPP Is a Coactivator for the ETS Domain Transcription Factor PEA3. *Mol Cell Biol*, **26**, 4529-4538.
- Gutman, A. and Wasylyk, B. (1990) The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *Embo J*, **9**, 2241-2246.
- Haase, G., Dessaud, E., Garces, A., de Bovis, B., Birling, M., Filippi, P., Schmalbruch, H., Arber, S. and deLapeyriere, O. (2002) GDNF acts through PEA3 to regulate cell body positioning and muscle innervation of specific motor neuron pools. *Neuron*, **35**, 893-905.
- Habelhah, H., Okada, F., Kobayashi, M., Nakai, K., Choi, S., Hamada, J., Moriuchi, T., Kaya, M., Yoshida, K., Fujinaga, K. and Hosokawa, M. (1999) Increased E1AF expression in mouse fibrosarcoma promotes metastasis through induction of MT1-MMP expression. *Oncogene*, **18**, 1771-1776.
- Hagedorn, L., Paratore, C., Brugnoli, G., Baert, J.L., Mercader, N., Suter, U. and Sommer, L. (2000) The Ets domain transcription factor Erm distinguishes rat satellite glia from Schwann cells and is regulated in satellite cells by neuregulin signaling. *Dev Biol*, **219**, 44-58.
- Hahne, J.C., Fuchs, T., Haddouti el, M., Okuducu, A.F., Bories, J.C. and Wernert, N. (2006) Expression pattern of matrix metalloproteinase and TIMP genes in fibroblasts derived from Ets-1 knock-out mice compared to wild-type mouse fibroblasts. *Int J Mol Med*, **18**, 153-159.

Bibliographie

- Hakuma, N., Kinoshita, I., Shimizu, Y., Yamazaki, K., Yoshida, K., Nishimura, M. and Dosaka-Akita, H. (2005) E1AF/PEA3 activates the Rho/Rho-associated kinase pathway to increase the malignancy potential of non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Res*, **65**, 10776-10782.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Hanzawa, M., Shindoh, M., Higashino, F., Yasuda, M., Inoue, N., Hida, K., Ono, M., Kohgo, T., Nakamura, M., Notani, K., Fukuda, H., Totsuka, Y., Yoshida, K. and Fujinaga, K. (2000) Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes. *Carcinogenesis*, **21**, 1079-1085.
- Hapke, S., Gawaz, M., Dehne, K., Kohler, J., Marshall, J.F., Graeff, H., Schmitt, M., Reuning, U. and Lengyel, E. (2001) beta(3)A-integrin downregulates the urokinase-type plasminogen activator receptor (u-PAR) through a PEA3/ets transcriptional silencing element in the u-PAR promoter. *Mol Cell Biol*, **21**, 2118-2132.
- Hart, A., Melet, F., Grossfeld, P., Chien, K., Jones, C., Tunnacliffe, A., Favier, R. and Bernstein, A. (2000a) Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygotously deleted in patients with thrombocytopenia. *Immunity*, **13**, 167-177.
- Hart, A.H., Reventar, R. and Bernstein, A. (2000b) Genetic analysis of ETS genes in *C. elegans*. *Oncogene*, **19**, 6400-6408.
- Hasegawa, H., Ashigaki, S., Takamatsu, M., Suzuki-Migishima, R., Ohbayashi, N., Itoh, N., Takada, S. and Tanabe, Y. (2004) Laminar patterning in the developing neocortex by temporally coordinated fibroblast growth factor signaling. *J Neurosci*, **24**, 8711-8719.
- Haugwitz, U., Tschop, K. and Engeland, K. (2004) SIRF--a novel regulator element controlling transcription from the p55Cdc/Fizzy promoter during the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun*, **320**, 951-960.
- Heckman, C.A., Wheeler, M.A. and Boxer, L.M. (2003) Regulation of Bcl-2 expression by C/EBP in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene*, **22**, 7891-7899.
- Helmbacher, F., Dessaud, E., Arber, S., deLapeyriere, O., Henderson, C.E., Klein, R. and Maina, F. (2003) Met signaling is required for recruitment of motor neurons to PEA3-positive motor pools. *Neuron*, **39**, 767-777.
- Hemler, M.E. (2005) Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 801-811.
- Hendricks, T., Francis, N., Fyodorov, D. and Deneris, E.S. (1999) The ETS domain factor Pet-1 is an early and precise marker of central serotonin neurons and interacts with a conserved element in serotonergic genes. *J Neurosci*, **19**, 10348-10356.
- Hens, J.R. and Wysolmerski, J.J. (2005) Key stages of mammary gland development: molecular mechanisms involved in the formation of the embryonic mammary gland. *Breast Cancer Res*, **7**, 220-224.
- Hesselbrock, D.R., Kurpios, N., Hassell, J.A., Watson, M.A. and Fleming, T.P. (2005) PEA3, AP-1, and a unique repetitive sequence all are involved in transcriptional regulation of the breast cancer-associated gene, mammaglobin. *Breast Cancer Res Treat*, **89**, 289-296.
- Hida, K., Shindoh, M., Yasuda, M., Hanzawa, M., Funaoka, K., Kohgo, T., Amemiya, A., Totsuka, Y., Yoshida, K. and Fujinaga, K. (1997a) Antisense E1AF transfection restrains oral cancer invasion by reducing matrix metalloproteinase activities. *Am J Pathol*, **150**, 2125-2132.
- Hida, K., Shindoh, M., Yoshida, K., Kudoh, A., Furaoka, K., Kohgo, T., Fujinaga, K. and Totsuka, Y. (1997b) Expression of E1AF, an ets-family transcription factor, is

Bibliographie

- correlated with the invasive phenotype of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, **33**, 426-430.
- Higashino, F., Yoshida, K., Fujinaga, Y., Kamio, K. and Fujinaga, K. (1993) Isolation of a cDNA encoding the adenovirus E1A enhancer binding protein: a new human member of the ets oncogene family. *Nucleic Acids Res*, **21**, 547-553.
- Higashino, F., Yoshida, K., Noumi, T., Seiki, M. and Fujinaga, K. (1995) Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters. *Oncogene*, **10**, 1461-1463.
- Hinck, L. and Silberstein, G.B. (2005) Key stages in mammary gland development: the mammary end bud as a motile organ. *Breast Cancer Res*, **7**, 245-251.
- Hippenmeyer, S., Shneider, N.A., Birchmeier, C., Burden, S.J., Jessell, T.M. and Arber, S. (2002) A role for neuregulin1 signaling in muscle spindle differentiation. *Neuron*, **36**, 1035-1049.
- Hiroumi, H., Dosaka-Akita, H., Yoshida, K., Shindoh, M., Ohbuchi, T., Fujinaga, K. and Nishimura, M. (2001) Expression of E1AF/PEA3, an Ets-related transcription factor in human non-small-cell lung cancers: its relevance in cell motility and invasion. *Int J Cancer*, **93**, 786-791.
- Horiuchi, S., Yamamoto, H., Min, Y., Adachi, Y., Itoh, F. and Imai, K. (2003) Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer. *J Pathol*, **200**, 568-576.
- Howe, L.R., Crawford, H.C., Subbaramaiah, K., Hassell, J.A., Dannenberg, A.J. and Brown, A.M. (2001) PEA3 is up-regulated in response to Wnt1 and activates the expression of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, **276**, 20108-20115.
- Howe, L.R., Watanabe, O., Leonard, J. and Brown, A.M. (2003) Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer Res*, **63**, 1906-1913.
- Hsu, T. and Schulz, R.A. (2000) Sequence and functional properties of Ets genes in the model organism *Drosophila*. *Oncogene*, **19**, 6409-6416.
- Hsu, T., Trojanowska, M. and Watson, D.K. (2004) Ets proteins in biological control and cancer. *J Cell Biochem*, **91**, 896-903.
- Hu, C.J., Rao, S., Ramirez-Bergeron, D.L., Garrett-Sinha, L.A., Gerondakis, S., Clark, M.R. and Simon, M.C. (2001) PU.1/Spi-B regulation of c-rel is essential for mature B cell survival. *Immunity*, **15**, 545-555.
- Huard, J.M., Forster, C.C., Carter, M.L., Sicinski, P. and Ross, M.E. (1999) Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2. *Development*, **126**, 1927-1935.
- Igata, E., Inoue, T., Ohtani-Fujita, N., Sowa, Y., Tsujimoto, Y. and Sakai, T. (1999) Molecular cloning and functional analysis of the murine bax gene promoter. *Gene*, **238**, 407-415.
- Iguchi, A., Kitajima, I., Yamakuchi, M., Ueno, S., Aikou, T., Kubo, T., Matsushima, K., Mukaida, N. and Maruyama, I. (2000) PEA3 and AP-1 are required for constitutive IL-8 gene expression in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **279**, 166-171.
- Im, Y.H., Kim, H.T., Lee, C., Poulin, D., Welford, S., Sorensen, P.H., Denny, C.T. and Kim, S.J. (2000) EWS-FLI1, EWS-ERG, and EWS-ETV1 oncoproteins of Ewing tumor family all suppress transcription of transforming growth factor beta type II receptor gene. *Cancer Res*, **60**, 1536-1540.
- Ishida, S., Higashino, F., Aoyagi, M., Takahashi, A., Suzuki, T., Shindoh, M., Fujinaga, K. and Yoshida, K. (2006) Genomic structure and promoter activity of the E1AF gene, a member of the ETS oncogene family. *Biochem Biophys Res Commun*, **339**, 325-330.

Bibliographie

- Ito, T., Nakayama, T., Ito, M., Naito, S., Kanematsu, T. and Sekine, I. (1998) Expression of the ets-1 proto-oncogene in human pancreatic carcinoma. *Mod Pathol*, **11**, 209-215.
- Ito, Y., Miyoshi, E., Takeda, T., Sakon, M., Ihara, S., Tsujimoto, M. and Matsuura, N. (2002a) Ets-2 overexpression contributes to progression of pancreatic adenocarcinoma. *Oncol Rep*, **9**, 853-857.
- Ito, Y., Miyoshi, E., Takeda, T., Sakon, M., Noda, K., Tsujimoto, M., Monden, M., Taniguchi, N. and Matsuura, N. (2000a) Expression and possible role of ets-1 in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol*, **114**, 719-725.
- Ito, Y., Miyoshi, E., Takeda, T., Sakon, M., Tsujimoto, M., Yokosaki, Y., Monden, M. and Matsuura, N. (2000b) ets-1 expression in extrahepatic bile duct carcinoma and cholangiocellular carcinoma. *Oncology*, **58**, 248-252.
- Ito, Y., Takeda, T., Okada, M. and Matsuura, N. (2002b) Expression of ets-1 and ets-2 in colonic neoplasms. *Anticancer Res*, **22**, 1581-1584.
- Iwama, A., Zhang, P., Darlington, G.J., McKercher, S.R., Maki, R. and Tenen, D.G. (1998) Use of RDA analysis of knockout mice to identify myeloid genes regulated in vivo by PU.1 and C/EBPalpha. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3034-3043.
- Iwasaki, M., Nishikawa, A., Akutagawa, N., Fujimoto, T., Teramoto, M., Sakaguchi, Y., Kato, H., Ito, M., Yoshida, K. and Kudo, R. (2004) E1AF/PEA3 reduces the invasiveness of SiHa cervical cancer cells by activating serine proteinase inhibitor squamous cell carcinoma antigen. *Exp Cell Res*, **299**, 525-532.
- Izumiyama, Y., Ohiro, Y., Higashino, F., Yoshida, K., Taguchi, K., Todo, S., Kohgo, T., Totsuka, Y. and Shindoh, M. (2005) E1AF expression is closely correlated with malignant phenotype of tongue squamous cell carcinoma through activation of MT1-MMP gene promoters. *Oncol Rep*, **13**, 715-720.
- Jackson-Fisher, A.J., Bellinger, G., Ramabhadran, R., Morris, J.K., Lee, K.F. and Stern, D.F. (2004) ErbB2 is required for ductal morphogenesis of the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 17138-17143.
- Janknecht, R. (1996) Analysis of the ERK-stimulated ETS transcription factor ER81. *Mol Cell Biol*, **16**, 1550-1556.
- Janknecht, R. (2003) Regulation of the ER81 transcription factor and its coactivators by mitogen- and stress-activated protein kinase 1 (MSK1). *Oncogene*, **22**, 746-755.
- Janknecht, R. (2005) EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors. *Gene*, **363**, 1-14.
- Janknecht, R., Monte, D., Baert, J.L. and de Launoit, Y. (1996) The ETS-related transcription factor ERM is a nuclear target of signaling cascades involving MAPK and PKA. *Oncogene*, **13**, 1745-1754.
- Jeon, I.S., Davis, J.N., Braun, B.S., Sublett, J.E., Roussel, M.F., Denny, C.T. and Shapiro, D.N. (1995) A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene*, **10**, 1229-1234.
- Jiang, Y., Xu, W., Lu, J., He, F. and Yang, X. (2001) Invasiveness of hepatocellular carcinoma cell lines: contribution of hepatocyte growth factor, c-met, and transcription factor Ets-1. *Biochem Biophys Res Commun*, **286**, 1123-1130.
- Jun, D.Y., Kim, M.K., Kim, I.G. and Kim, Y.H. (1997) Characterization of the murine cyclin D2 gene: exon/intron organization and promoter activity. *Mol Cells*, **7**, 537-543.
- Kahle, A., Feng, Y. and M, A.N. (2005) Isolation and characterization of the human Cdc2L1 gene promoter. *Gene*, **344**, 53-60.
- Kaneko, Y., Yoshida, K., Handa, M., Toyoda, Y., Nishihira, H., Tanaka, Y., Sasaki, Y., Ishida, S., Higashino, F. and Fujinaga, K. (1996) Fusion of an ETS-family gene, E1AF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chromosomes Cancer*, **15**, 115-121.

Bibliographie

- Kang, Y., Siegel, P.M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S.M., Cordon-Cardo, C., Guise, T.A. and Massague, J. (2003) A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, **3**, 537-549.
- Karim, F.D., Urness, L.D., Thummel, C.S., Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Celada, A., Van Beveren, C., Maki, R.A., Gunther, C.V., Nye, J.A. and et al. (1990) The ETS-domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence. *Genes Dev*, **4**, 1451-1453.
- Katabami, K., Kato, T., Sano, R., Ogura, M., Mizuno, H., Itoh, S. and Tsuji, T. (2006) Characterization of the promoter for the alpha3 integrin gene in various tumor cell lines: roles of the Ets- and Sp-family of transcription factors. *J Cell Biochem*, **97**, 530-543.
- Katayama, S., Nakayama, T., Ito, M., Naito, S. and Sekine, I. (2005) Expression of the ets-1 proto-oncogene in human breast carcinoma: differential expression with histological grading and growth pattern. *Histol Histopathol*, **20**, 119-126.
- Kathuria, H., Cao, Y.X., Ramirez, M.I. and Williams, M.C. (2004) Transcription of the caveolin-1 gene is differentially regulated in lung type I epithelial and endothelial cell lines. A role for ETS proteins in epithelial cell expression. *J Biol Chem*, **279**, 30028-30036.
- Kavurma, M.M., Bobryshev, Y. and Khachigian, L.M. (2002) Ets-1 positively regulates Fas ligand transcription via cooperative interactions with Sp1. *J Biol Chem*, **277**, 36244-36252.
- Kaya, M., Yoshida, K., Higashino, F., Mitaka, T., Ishii, S. and Fujinaga, K. (1996) A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells. *Oncogene*, **12**, 221-227.
- Kerbel, R.S. (2000) Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*, **21**, 505-515.
- Khatun, S., Fujimoto, J., Toyoki, H. and Tamaya, T. (2003) Clinical implications of expression of ETS-1 in relation to angiogenesis in ovarian cancers. *Cancer Sci*, **94**, 769-773.
- Kim, C.A., Phillips, M.L., Kim, W., Gingery, M., Tran, H.H., Robinson, M.A., Faham, S. and Bowie, J.U. (2001) Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression. *Embo J*, **20**, 4173-4182.
- Kinoshita, J., Kitamura, K., Tanaka, S., Sugimachi, K., Ishida, M. and Saeki, H. (2002) Clinical significance of PEA3 in human breast cancer. *Surgery*, **131**, S222-225.
- Kita, D., Takino, T., Nakada, M., Takahashi, T., Yamashita, J. and Sato, H. (2001) Expression of dominant-negative form of Ets-1 suppresses fibronectin-stimulated cell adhesion and migration through down-regulation of integrin alpha5 expression in U251 glioma cell line. *Cancer Res*, **61**, 7985-7991.
- Koo, S.J. and Pfaff, S.L. (2002) Fine-tuning motor neuron properties: signaling from the periphery. *Neuron*, **35**, 823-826.
- Koo, T.B., Song, H., Moon, I., Han, K., Chen, C., Murphy, K. and Lim, H. (2005) Differential expression of the PEA3 subfamily of ETS transcription factors in the mouse ovary and peri-implantation uterus. *Reproduction*, **129**, 651-657.
- Kopfstein, L. and Christofori, G. (2006) Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 449-468.
- Kopp, J.L., Wilder, P.J., Desler, M., Kim, J.H., Hou, J., Nowling, T. and Rizzino, A. (2004) Unique and selective effects of five Ets family members, Elf3, Ets1, Ets2, PEA3 and PU.1, on the promoter of the type II TGF-beta receptor gene. *J Biol Chem*.

Bibliographie

- Kozar, K., Ciemerych, M.A., Rebel, V.I., Shigematsu, H., Zagozdzon, A., Sicinska, E., Geng, Y., Yu, Q., Bhattacharya, S., Bronson, R.T., Akashi, K. and Sicinski, P. (2004) Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell*, **118**, 477-491.
- Krneta, J., Kroll, J., Alves, F., Prahst, C., Sananbenesi, F., Dullin, C., Kimmina, S., Phillips, D.J. and Augustin, H.G. (2006) Dissociation of angiogenesis and tumorigenesis in follistatin- and activin-expressing tumors. *Cancer Res*, **66**, 5686-5695.
- Kucera, J., Cooney, W., Que, A., Szeder, V., Stancz-Szeder, H. and Walro, J. (2002) Formation of supernumerary muscle spindles at the expense of Golgi tendon organs in ER81-deficient mice. *Dev Dyn*, **223**, 389-401.
- Kurokawa, Y., Matoba, R., Nakamori, S., Takemasa, I., Nagano, H., Dono, K., Umeshita, K., Sakon, M., Monden, M. and Kato, K. (2004) PCR-array gene expression profiling of hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, **23**, 135-141.
- Kwon, J.H., Keates, S., Simeonidis, S., Grall, F., Libermann, T.A. and Keates, A.C. (2003) ESE-1, an enterocyte-specific Ets transcription factor, regulates MIP-3alpha gene expression in Caco-2 human colonic epithelial cells. *J Biol Chem*, **278**, 875-884.
- Ladle, D.R. and Frank, E. (2002) The role of the ETS gene PEA3 in the development of motor and sensory neurons. *Physiol Behav*, **77**, 571-576.
- Lacorazza, H.D., Miyazaki, Y., Di Cristofano, A., Deblasio, A., Hedvat, C., Zhang, J., Cordon-Cardo, C., Mao, S., Pandolfi, P.P. and Nimer, S.D. (2002) The ETS protein MEF plays a critical role in perforin gene expression and the development of natural killer and NK-T cells. *Immunity*, **17**, 437-449.
- Lacorazza, H.D. and Nimer, S.D. (2003) The emerging role of the myeloid Elf-1 like transcription factor in hematopoiesis. *Blood Cells Mol Dis*, **31**, 342-350.
- Laget, M.P., Defosse, P.A., Albagli, O., Baert, J.L., Dewitte, F., Stehelin, D. and de Launoit, Y. (1996) Two functionally distinct domains responsible for transactivation by the Ets family member ERM. *Oncogene*, **12**, 1325-1336.
- Laing, M.A., Coonrod, S., Hinton, B.T., Downie, J.W., Tozer, R., Rudnicki, M.A. and Hassell, J.A. (2000) Male sexual dysfunction in mice bearing targeted mutant alleles of the PEA3 ets gene. *Mol Cell Biol*, **20**, 9337-9345.
- Lam, E.W., Glassford, J., Banerji, L., Thomas, N.S., Sicinski, P. and Klaus, G.G. (2000) Cyclin D3 compensates for loss of cyclin D2 in mouse B-lymphocytes activated via the antigen receptor and CD40. *J Biol Chem*, **275**, 3479-3484.
- Lan, Z.J., Lye, R.J., Holic, N., Labus, J.C. and Hinton, B.T. (1999) Involvement of polyomavirus enhancer activator 3 in the regulation of expression of gamma-glutamyl transpeptidase messenger ribonucleic acid-IV in the rat epididymis. *Biol Reprod*, **60**, 664-673.
- Laudet, V., Hanni, C., Stehelin, D. and Duterque-Coquillaud, M. (1999) Molecular phylogeny of the ETS gene family. *Oncogene*, **18**, 1351-1359.
- Lee, J.M., Dedhar, S., Kalluri, R. and Thompson, E.W. (2006) The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol*, **172**, 973-981.
- Lefrancois-Martinez, A.M., Martinez, A., Antoine, B., Raymondjean, M. and Kahn, A. (1995) Upstream stimulatory factor proteins are major components of the glucose response complex of the L-type pyruvate kinase gene promoter. *J Biol Chem*, **270**, 2640-2643.
- Lelievre, E., Mattot, V., Huber, P., Vandembunder, B. and Soncin, F. (2000) ETS1 lowers capillary endothelial cell density at confluence and induces the expression of VE-cadherin. *Oncogene*, **19**, 2438-2446.
- Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C. and Stehelin, D. (1983) A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature*, **306**, 395-397.

Bibliographie

- Lesault, I., Quang, C.T., Frampton, J. and Ghysdael, J. (2002) Direct regulation of BCL-2 by FLI-1 is involved in the survival of FLI-1-transformed erythroblasts. *Embo J*, **21**, 694-703.
- Li, R., Pei, H. and Watson, D.K. (2000) Regulation of Ets function by protein - protein interactions. *Oncogene*, **19**, 6514-6523.
- Lin, J.H., Saito, T., Anderson, D.J., Lance-Jones, C., Jessell, T.M. and Arber, S. (1998) Functionally related motor neuron pool and muscle sensory afferent subtypes defined by coordinate ETS gene expression. *Cell*, **95**, 393-407.
- Lin, M., Chang, J.K., Shankar, D. and Sakamoto, K.M. (2003) The role of p53 in cell cycle control and mammalian cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Exp Mol Pathol*, **74**, 123-128.
- Lindemann, R.K., Braig, M., Hauser, C.A., Nordheim, A. and Dittmer, J. (2003) Ets2 and protein kinase C epsilon are important regulators of parathyroid hormone-related protein expression in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem J*, **372**, 787-797.
- Liu, Y., Borchert, G.L. and Phang, J.M. (2004) Polyoma enhancer activator 3, an ets transcription factor, mediates the induction of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in colorectal cancer cells. *J Biol Chem*, **279**, 18694-18700.
- Liu, Y., Jiang, H., Crawford, H.C. and Hogan, B.L. (2003) Role for ETS domain transcription factors Pea3/Erm in mouse lung development. *Dev Biol*, **261**, 10-24.
- Livet, J., Sigrist, M., Stroebel, S., De Paola, V., Price, S.R., Henderson, C.E., Jessell, T.M. and Arber, S. (2002) ETS gene Pea3 controls the central position and terminal arborization of specific motor neuron pools. *Neuron*, **35**, 877-892.
- Lu, N., Heuchel, R., Barczyk, M., Zhang, W.M. and Gullberg, D. (2006) Tandem Sp1/Sp3 sites together with an Ets-1 site cooperate to mediate alpha11 integrin chain expression in mesenchymal cells. *Matrix Biol*, **25**, 118-129.
- Lu, W.C., Liu, Y.N., Kang, B.B. and Chen, J.H. (2003) Trans-activation of heparanase promoter by ETS transcription factors. *Oncogene*, **22**, 919-923.
- Lynch, C.C., Crawford, H.C., Matrisian, L.M. and McDonnell, S. (2004) Epidermal growth factor upregulates matrix metalloproteinase-7 expression through activation of PEA3 transcription factors. *Int J Oncol*, **24**, 1565-1572.
- Mareel, M. and Leroy, A. (2003) Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev*, **83**, 337-376.
- Mattot, V., Vercamer, C., Soncin, F., Fafeur, V. and Vandembunder, B. (1999) [Transcription factors of the Ets family and morphogenesis of the vascular tree]. *J Soc Biol*, **193**, 147-153.
- McCabe, K.L., McGuire, C. and Reh, T.A. (2006) Pea3 expression is regulated by FGF signaling in developing retina. *Dev Dyn*, **235**, 327-335.
- McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G.E., Paige, C.J. and Maki, R.A. (1996) Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo J*, **15**, 5647-5658.
- McLaughlin, F., Ludbrook, V.J., Kola, I., Campbell, C.J. and Randi, A.M. (1999) Characterisation of the tumour necrosis factor (TNF)-(alpha) response elements in the human ICAM-2 promoter. *J Cell Sci*, **112 (Pt 24)**, 4695-4703.
- Medcalf, R.L. and Stasinopoulos, S.J. (2005) The undecided serpin. The ins and outs of plasminogen activator inhibitor type 2. *FEBS J*, **272**, 4858-4867.
- Minn, A.J., Gupta, G.P., Siegel, P.M., Bos, P.D., Shu, W., Giri, D.D., Viale, A., Olshen, A.B., Gerald, W.L. and Massague, J. (2005) Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, **436**, 518-524.

Bibliographie

- Miyashita, T. and Reed, J.C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, **80**, 293-299.
- Monte, D., Baert, J.L., Defossez, P.A., de Launoit, Y. and Stehelin, D. (1994) Molecular cloning and characterization of human ERM, a new member of the Ets family closely related to mouse PEA3 and ER81 transcription factors. *Oncogene*, **9**, 1397-1406.
- Monte, D., Coutte, L., Baert, J.L., Angeli, I., Stehelin, D. and de Launoit, Y. (1995) Molecular characterization of the ets-related human transcription factor ER81. *Oncogene*, **11**, 771-779.
- Monte, D., Coutte, L., Dewitte, F., Defossez, P.A., Le Coniat, M., Stehelin, D., Berger, R. and de Launoit, Y. (1996) Genomic organization of the human ERM (ETV5) gene, a PEA3 group member of ETS transcription factors. *Genomics*, **35**, 236-240.
- Moon, C., Soria, J.C., Jang, S.J., Lee, J., Obaidul Hoque, M., Sibony, M., Trink, B., Chang, Y.S., Sidransky, D. and Mao, L. (2003) Involvement of aquaporins in colorectal carcinogenesis. *Oncogene*, **22**, 6699-6703.
- Moss, A.C., Lawlor, G., Murray, D., Tighe, D., Madden, S.F., Mulligan, A.M., Keane, C.O., Brady, H.R., Doran, P.P. and Macmathuna, P. (2006) ETV4 and Myeov knockdown impairs colon cancer cell line proliferation and invasion. *Biochem Biophys Res Commun*, **345**, 216-221.
- Mueller, B.U., Pabst, T., Osato, M., Asou, N., Johansen, L.M., Minden, M.D., Behre, G., Hiddemann, W., Ito, Y. and Tenen, D.G. (2002) Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood*, **100**, 998-1007.
- Munchberg, S.R. and Steinbeisser, H. (1999) The Xenopus Ets transcription factor XER81 is a target of the FGF signaling pathway. *Mech Dev*, **80**, 53-65.
- Muthusamy, N., Barton, K. and Leiden, J.M. (1995) Defective activation and survival of T cells lacking the Ets-1 transcription factor. *Nature*, **377**, 639-642.
- Myers, E., Hill, A.D., Kelly, G., McDermott, E.W., O'Higgins, N.J., Buggy, Y. and Young, L.S. (2005) Associations and interactions between Ets-1 and Ets-2 and coregulatory proteins, SRC-1, AIB1, and NCoR in breast cancer. *Clin Cancer Res*, **11**, 2111-2122.
- Nakae, K., Nakajima, K., Inazawa, J., Kitaoka, T. and Hirano, T. (1995) ERM, a PEA3 subfamily of Ets transcription factors, can cooperate with c-Jun. *J Biol Chem*, **270**, 23795-23800.
- Nakatani, F., Tanaka, K., Sakimura, R., Matsumoto, Y., Matsunobu, T., Li, X., Hanada, M., Okada, T. and Iwamoto, Y. (2003) Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. *J Biol Chem*, **278**, 15105-15115.
- Nakatsuka, H., Sokabe, T., Yamamoto, K., Sato, Y., Hatakeyama, K., Kamiya, A. and Ando, J. (2006) Shear stress induces hepatocyte PAI-1 gene expression through cooperative Sp1/Ets-1 activation of transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **291**, G26-34.
- Nakayama, T., Ito, M., Ohtsuru, A., Naito, S., Nakashima, M. and Sekine, I. (1999) Expression of the ets-1 proto-oncogene in human thyroid tumor. *Mod Pathol*, **12**, 61-68.
- Netzer, S., Leenders, F., Dumont, P., Baert, J.L. and de Launoit, Y. (2002) Ectopic expression of the ets transcription factor ER81 in transgenic mouse mammary gland enhances both urokinase plasminogen activator and stromelysin-1 transcription. *Transgenic Res*, **11**, 123-131.
- Nosho, K., Yamamoto, H., Adachi, Y., Endo, T., Hinoda, Y. and Imai, K. (2005a) Gene expression profiling of colorectal adenomas and early invasive carcinomas by cDNA array analysis. *Br J Cancer*, **92**, 1193-1200.
- Nosho, K., Yoshida, M., Yamamoto, H., Taniguchi, H., Adachi, Y., Mikami, M., Hinoda, Y. and Imai, K. (2005b) Association of Ets-related transcriptional factor E1AF

Bibliographie

- expression with overexpression of matrix metalloproteinases, COX-2 and iNOS in the early stage of colorectal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **26**, 892-899.
- Noth, S. and Benecke, A. (2005) Avoiding inconsistencies over time and tracking difficulties in Applied Biosystems AB1700/Panther probe-to-gene annotations. *BMC Bioinformatics*, **6**, 307.
- Noth, S., Brysbaert, G. and Benecke, A. (2006) Normalization using weighted negative second order exponential error functions (NeONORM) provides robustness against asymmetries in comparative transcriptome profiles and avoids false calls. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **4**, 90-109.
- Nye, J.A., Petersen, J.M., Gunther, C.V., Jonsen, M.D. and Graves, B.J. (1992) Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes Dev*, **6**, 975-990.
- O'Hagan, R.C., Tozer, R.G., Symons, M., McCormick, F. and Hassell, J.A. (1996) The activity of the Ets transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades. *Oncogene*, **13**, 1323-1333.
- Oda, N., Abe, M. and Sato, Y. (1999) ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta3. *J Cell Physiol*, **178**, 121-132.
- Oettgen, P., Finger, E., Sun, Z., Akbarali, Y., Thamrongsak, U., Boltax, J., Grall, F., Dube, A., Weiss, A., Brown, L., Quinn, G., Kas, K., Endress, G., Kunsch, C. and Libermann, T.A. (2000) PDEF, a novel prostate epithelium-specific ets transcription factor, interacts with the androgen receptor and activates prostate-specific antigen gene expression. *J Biol Chem*, **275**, 1216-1225.
- Oikawa, T. and Yamada, T. (2003) Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene*, **303**, 11-34.
- Oritani, K. and Kanakura, Y. (2005) IFN-zeta/ limitin: a member of type I IFN with mild lympho-myelosuppression. *J Cell Mol Med*, **9**, 244-254.
- Papoutsopoulou, S. and Janknecht, R. (2000) Phosphorylation of ETS transcription factor ER81 in a complex with its coactivators CREB-binding protein and p300. *Mol Cell Biol*, **20**, 7300-7310.
- Paratore, C., Brugnoli, G., Lee, H.Y., Suter, U. and Sommer, L. (2002) The role of the Ets domain transcription factor Erm in modulating differentiation of neural crest stem cells. *Dev Biol*, **250**, 168-180.
- Parkinson, D.B., Langner, K., Namini, S.S., Jessen, K.R. and Mirsky, R. (2002) beta-Neuregulin and autocrine mediated survival of Schwann cells requires activity of Ets family transcription factors. *Mol Cell Neurosci*, **20**, 154-167.
- Pastorcic, M. and Das, H.K. (2003a) An abbreviated procedure for the cloning and identification of Ets transcription factors regulating the expression of the human presenilin 1 gene. *Brain Res Brain Res Protoc*, **12**, 35-40.
- Pastorcic, M. and Das, H.K. (2003b) Ets transcription factors ER81 and Elk1 regulate the transcription of the human presenilin 1 gene promoter. *Brain Res Mol Brain Res*, **113**, 57-66.
- Pastorcic, M. and Das, H.K. (2004) Alternative initiation of transcription of the human presenilin 1 gene in SH-SY5Y and SK-N-SH cells. The role of Ets factors in the regulation of presenilin 1. *Eur J Biochem*, **271**, 4485-4494.
- Patel, T.D., Kramer, I., Kucera, J., Niederkofler, V., Jessell, T.M., Arber, S. and Snider, W.D. (2003) Peripheral NT3 signaling is required for ETS protein expression and central patterning of proprioceptive sensory afferents. *Neuron*, **38**, 403-416.

Bibliographie

- Pei, H., Li, C., Adereth, Y., Hsu, T., Watson, D.K. and Li, R. (2005) Caspase-1 is a direct target gene of ETS1 and plays a role in ETS1-induced apoptosis. *Cancer Res*, **65**, 7205-7213.
- Pei, Y. and Tuschl, T. (2006) On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat Methods*, **3**, 670-676.
- Perez, A., Barco, R., Fernandez, I., Price-Schiavi, S.A. and Carraway, K.L. (2003) PEA3 transactivates the Muc4/sialomucin complex promoter in mammary epithelial and tumor cells. *J Biol Chem*, **278**, 36942-36952.
- Planaguma, J., Abal, M., Gil-Moreno, A., Diaz-Fuertes, M., Monge, M., Garcia, A., Baro, T., Xercavins, J., Reventos, J. and Alameda, F. (2005) Up-regulation of ERM/ETV5 correlates with the degree of myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma. *J Pathol*, **207**, 422-429.
- Pommier, Y., Sordet, O., Antony, S., Hayward, R.L. and Kohn, K.W. (2004) Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene*, **23**, 2934-2949.
- Prescott, J.D., Koto, K.S., Singh, M. and Gutierrez-Hartmann, A. (2004) The ETS transcription factor ESE-1 transforms MCF-12A human mammary epithelial cells via a novel cytoplasmic mechanism. *Mol Cell Biol*, **24**, 5548-5564.
- Price, S.R., De Marco Garcia, N.V., Ranscht, B. and Jessell, T.M. (2002) Regulation of motor neuron pool sorting by differential expression of type II cadherins. *Cell*, **109**, 205-216.
- Radisky, D.C., Hirai, Y. and Bissell, M.J. (2003) Delivering the message: epimorphin and mammary epithelial morphogenesis. *Trends Cell Biol*, **13**, 426-434.
- Raible, F. and Brand, M. (2001) Tight transcriptional control of the ETS domain factors Erm and Pea3 by Fgf signaling during early zebrafish development. *Mech Dev*, **107**, 105-117.
- Ristevski, S., O'Leary, D.A., Thornell, A.P., Owen, M.J., Kola, I. and Hertzog, P.J. (2004) The ETS transcription factor GABPalph is essential for early embryogenesis. *Mol Cell Biol*, **24**, 5844-5849.
- Roehl, H. and Nusslein-Volhard, C. (2001) Zebrafish *pea3* and *erm* are general targets of FGF8 signaling. *Curr Biol*, **11**, 503-507.
- Rosario, M. and Birchmeier, W. (2003) How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends Cell Biol*, **13**, 328-335.
- Rothhammer, T., Hahne, J.C., Florin, A., Poser, I., Soncin, F., Wernert, N. and Bosserhoff, A.K. (2004) The Ets-1 transcription factor is involved in the development and invasion of malignant melanoma. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 118-128.
- Roussigne, M. and Blader, P. (2006) Divergence in regulation of the PEA3 family of ETS transcription factors. *Gene Expr Patterns*.
- Roy, J., Audette, M. and Tremblay, M.J. (2001) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene expression in human T cells is regulated by phosphotyrosyl phosphatase activity. Involvement of NF-kappaB, Ets, and palindromic interferon-gamma-responsive element-binding sites. *J Biol Chem*, **276**, 14553-14561.
- Sasaki, H., Yukiue, H., Moiriyama, S., Kobayashi, Y., Nakashima, Y., Kaji, M., Kiriya, M., Fukai, I., Yamakawa, Y. and Fujii, Y. (2001) Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 and Ets-1 gene expression in patients with lung cancer. *J Surg Res*, **101**, 242-247.
- Schedin, P.J., Eckel-Mahan, K.L., McDaniel, S.M., Prescott, J.D., Brodsky, K.S., Tentler, J.J. and Gutierrez-Hartmann, A. (2004) ESX induces transformation and functional epithelial to mesenchymal transition in MCF-12A mammary epithelial cells. *Oncogene*, **23**, 1766-1779.

Bibliographie

- Schmidt, T., Korner, K., Karsunky, H., Korsmeyer, S., Muller, R. and Moroy, T. (1999) The activity of the murine Bax promoter is regulated by Sp1/3 and E-box binding proteins but not by p53. *Cell Death Differ*, **6**, 873-882.
- Scott, E.W., Fisher, R.C., Olson, M.C., Kehrl, E.W., Simon, M.C. and Singh, H. (1997) PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity*, **6**, 437-447.
- Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J. and Singh, H. (1994) Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*, **265**, 1573-1577.
- Sedy, J., Tseng, S., Walro, J.M., Grim, M. and Kucera, J. (2006) ETS transcription factor ER81 is required for the Pacinian corpuscle development. *Dev Dyn*, **235**, 1081-1089.
- Sementchenko, V.I., Schweinfest, C.W., Papas, T.S. and Watson, D.K. (1998) ETS2 function is required to maintain the transformed state of human prostate cancer cells. *Oncogene*, **17**, 2883-2888.
- Sementchenko, V.I. and Watson, D.K. (2000) Ets target genes: past, present and future. *Oncogene*, **19**, 6533-6548.
- Seth, A., Giunta, S., Franceschi, C., Kola, I. and Venanzoni, M.C. (1999) Regulation of the human stress response gene GADD153 expression: role of ETS1 and FLI-1 gene products. *Cell Death Differ*, **6**, 902-907.
- Seth, A. and Watson, D.K. (2005) ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer*, **41**, 2462-2478.
- Sevilla, L., Aperlo, C., Dulic, V., Chambard, J.C., Boutonnet, C., Pasquier, O., Pognonec, P. and Boulukos, K.E. (1999) The Ets2 transcription factor inhibits apoptosis induced by colony-stimulating factor 1 deprivation of macrophages through a Bcl-xL-dependent mechanism. *Mol Cell Biol*, **19**, 2624-2634.
- Sevilla, L., Zaldumbide, A., Carlotti, F., Dayem, M.A., Pognonec, P. and Boulukos, K.E. (2001) Bcl-XL expression correlates with primary macrophage differentiation, activation of functional competence, and survival and results from synergistic transcriptional activation by Ets2 and PU.1. *J Biol Chem*, **276**, 17800-17807.
- Shepherd, T.G., Kockeritz, L., Szrajber, M.R., Muller, W.J. and Hassell, J.A. (2001) The pea3 subfamily ets genes are required for HER2/Neu-mediated mammary oncogenesis. *Curr Biol*, **11**, 1739-1748.
- Shindoh, M., Higashino, F., Kaya, M., Yasuda, M., Funaoaka, K., Hanzawa, M., Hida, K., Kohgo, T., Amemiya, A., Yoshida, K. and Fujinaga, K. (1996) Correlated expression of matrix metalloproteinases and ets family transcription factor E1A-F in invasive oral squamous-cell-carcinoma-derived cell lines. *Am J Pathol*, **148**, 693-700.
- Shou, Z., Yamada, K., Inazu, T., Kawata, H., Hirano, S., Mizutani, T., Yazawa, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Kajitani, T., Okada, K. and Miyamoto, K. (2003) Genomic structure and analysis of transcriptional regulation of the mouse zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1) gene. *Gene*, **302**, 83-94.
- Sicinski, P., Donaher, J.L., Geng, Y., Parker, S.B., Gardner, H., Park, M.Y., Robker, R.L., Richards, J.S., McGinnis, L.K., Biggers, J.D., Eppig, J.J., Bronson, R.T., Elledge, S.J. and Weinberg, R.A. (1996) Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature*, **384**, 470-474.
- Sieweke, M.H., Tekotte, H., Jarosch, U. and Graf, T. (1998) Cooperative interaction of ets-1 with USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells. *Embo J*, **17**, 1728-1739.
- Simpson, S., Woodworth, C.D. and DiPaolo, J.A. (1997) Altered expression of Erg and Ets-2 transcription factors is associated with genetic changes at 21q22.2-22.3 in immortal and cervical carcinoma cell lines. *Oncogene*, **14**, 2149-2157.

Bibliographie

- Sledge, G.W., Jr. and Miller, K.D. (2003) Exploiting the hallmarks of cancer: the future conquest of breast cancer. *Eur J Cancer*, **39**, 1668-1675.
- Snove, O., Jr. and Rossi, J.J. (2006) Expressing short hairpin RNAs in vivo. *Nat Methods*, **3**, 689-695.
- Soldatenkov, V.A., Albor, A., Patel, B.K., Dreszer, R., Dritschilo, A. and Notario, V. (1999) Regulation of the human poly(ADP-ribose) polymerase promoter by the ETS transcription factor. *Oncogene*, **18**, 3954-3962.
- Solvason, N., Wu, W.W., Parry, D., Mahony, D., Lam, E.W., Glassford, J., Klaus, G.G., Sicinski, P., Weinberg, R., Liu, Y.J., Howard, M. and Lees, E. (2000) Cyclin D2 is essential for BCR-mediated proliferation and CD5 B cell development. *Int Immunol*, **12**, 631-638.
- Soriano, J.V., Pepper, M.S., Nakamura, T., Orci, L. and Montesano, R. (1995) Hepatocyte growth factor stimulates extensive development of branching duct-like structures by cloned mammary gland epithelial cells. *J Cell Sci*, **108**, 413-430.
- Span, P.N., Manders, P., Heuvel, J.J., Thomas, C.M., Bosch, R.R., Beex, L.V. and Sweep, C.G. (2002) Expression of the transcription factor Ets-1 is an independent prognostic marker for relapse-free survival in breast cancer. *Oncogene*, **21**, 8506-8509.
- Spyropoulos, D.D., Pharr, P.N., Lavenburg, K.R., Jackers, P., Papas, T.S., Ogawa, M. and Watson, D.K. (2000) Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Mol Cell Biol*, **20**, 5643-5652.
- Sternlicht, M.D. (2006) Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res*, **8**, 201.
- Su, Z., Shi, Y., Friedman, R., Qiao, L., McKinstry, R., Hinman, D., Dent, P. and Fisher, P.B. (2001) PEA3 sites within the progression elevated gene-3 (PEG-3) promoter and mitogen-activated protein kinase contribute to differential PEG-3 expression in Ha-ras and v-raf oncogene transformed rat embryo cells. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1661-1671.
- Su, G.H., Chen, H.M., Muthusamy, N., Garrett-Sinha, L.A., Baunoch, D., Tenen, D.G. and Simon, M.C. (1997) Defective B cell receptor-mediated responses in mice lacking the Ets protein, Spi-B. *Embo J*, **16**, 7118-7129.
- Subbaramaiah, K., Norton, L., Gerald, W. and Dannenberg, A.J. (2002) Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol Chem*, **277**, 18649-18657.
- T'Sas, F., Brenner, C., Mauen, S., Putmans, P., Monte, D., Van Lint, C., Moser, M., Baert, J.L. and de Launoit, Y. (2005) Expression of the Ets transcription factor Erm is regulated through a conventional PKC signaling pathway in the Molt4 lymphoblastic cell line. *FEBS Lett*, **579**, 66-70.
- Tajima, A., Miyamoto, Y., Kadowaki, H. and Hayashi, M. (2000) Mouse integrin alpha v promoter is regulated by transcriptional factors Ets and Sp1 in melanoma cells. *Biochim Biophys Acta*, **1492**, 377-384.
- Takahashi, A., Higashino, F., Aoyagi, M., Yoshida, K., Itoh, M., Kobayashi, M., Totsuka, Y., Kohgo, T. and Shindoh, M. (2005) E1AF degradation by a ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, **327**, 575-580.
- Takahashi, A., Higashino, F., Aoyagi, M., Yoshida, K., Itoh, M., Kyo, S., Ohno, T., Taira, T., Ariga, H., Nakajima, K., Hatta, M., Kobayashi, M., Sano, H., Kohgo, T. and Shindoh, M. (2003) EWS/ETS fusions activate telomerase in Ewing's tumors. *Cancer Res*, **63**, 8338-8344.
- Takai, N., Miyazaki, T., Nishida, M., Nasu, K. and Miyakawa, I. (2002) c-Ets1 is a promising marker in epithelial ovarian cancer. *Int J Mol Med*, **9**, 287-292.

Bibliographie

- Takai, N., Miyazaki, T., Nishida, M., Nasu, K. and Miyakawa, I. (2003) The significance of Elf-1 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Int J Mol Med*, **12**, 349-354.
- Takanami, I., Takeuchi, K. and Karuke, M. (2001) Expression of ETS-1 is correlated with urokinase-type plasminogen activator and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Tumour Biol*, **22**, 205-210.
- Takaoka, A.S., Yamada, T., Gotoh, M., Kanai, Y., Imai, K. and Hirohashi, S. (1998) Cloning and characterization of the human beta4-integrin gene promoter and enhancers. *J Biol Chem*, **273**, 33848-33855.
- Telliez, A., Furman, C., Pommery, N. and Henichart, J.P. (2006) Mechanisms leading to COX-2 expression and COX-2 induced tumorigenesis: topical therapeutic strategies targeting COX-2 expression and activity. *Anticancer Agents Med Chem*, **6**, 187-208.
- Thiery, J.P. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, **2**, 442-454.
- Tomlins, S.A., Mehra, R., Rhodes, D.R., Smith, L.R., Roulston, D., Helgeson, B.E., Cao, X., Wei, J.T., Rubin, M.A., Shah, R.B. and Chinnaiyan, A.M. (2006) TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res*, **66**, 3396-3400.
- Tomlins, S.A., Rhodes, D.R., Perner, S., Dhanasekaran, S.M., Mehra, R., Sun, X.W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., Lee, C., Montie, J.E., Shah, R.B., Pienta, K.J., Rubin, M.A. and Chinnaiyan, A.M. (2005) Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*, **310**, 644-648.
- Trimble, M.S., Xin, J.H., Guy, C.T., Muller, W.J. and Hassell, J.A. (1993) PEA3 is overexpressed in mouse metastatic mammary adenocarcinomas. *Oncogene*, **8**, 3037-3042.
- Tymms, M.J., Ng, A.Y., Thomas, R.S., Schutte, B.C., Zhou, J., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., Seth, A., Rosenberg, M., Papas, T., Debouck, C. and Kola, I. (1997) A novel epithelial-expressed ETS gene, ELF3: human and murine cDNA sequences, murine genomic organization, human mapping to 1q32.2 and expression in tissues and cancer. *Oncogene*, **15**, 2449-2462.
- Udabage, L., Brownlee, G.R., Nilsson, S.K. and Brown, T.J. (2005a) The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. *Exp Cell Res*, **310**, 205-217.
- Udabage, L., Brownlee, G.R., Waltham, M., Blick, T., Walker, E.C., Heldin, P., Nilsson, S.K., Thompson, E.W. and Brown, T.J. (2005b) Antisense-mediated suppression of hyaluronan synthase 2 inhibits the tumorigenesis and progression of breast cancer. *Cancer Res*, **65**, 6139-6150.
- Upadhyay, S., Liu, C., Chatterjee, A., Hoque, M.O., Kim, M.S., Engles, J., Westra, W., Trink, B., Ratovitski, E. and Sidransky, D. (2006) LKB1/STK11 Suppresses Cyclooxygenase-2 Induction and Cellular Invasion through PEA3 in Lung Cancer. *Cancer Res*, **66**, 7870-7879.
- Valter, M.M., Hugel, A., Huang, H.J., Cavenee, W.K., Wiestler, O.D., Pietsch, T. and Wernert, N. (1999) 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**, 5608-5614.
- Veltmaat, J.M., Mailleux, A.A., Thiery, J.P. and Bellusci, S. (2003) Mouse embryonic mammaryogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation*, **71**, 1-17.
- Vermot, J., Schuhbaur, B., Le Mouellic, H., McCaffery, P., Garnier, J.M., Hentsch, D., Brulet, P., Niederreither, K., Chambon, P., Dolle, P. and Le Roux, I. (2005) Retinaldehyde

Bibliographie

- dehydrogenase 2 and Hoxc8 are required in the murine brachial spinal cord for the specification of Lim1+ motoneurons and the correct distribution of Islet1+ motoneurons. *Development*, **132**, 1611-1621.
- Vicari, L., Eramo, A., Manzella, L., Malaguarnera, L., Iannolo, G., Gulisano, M., De Maria, R., Messina, A. and Vigneri, P. (2006) The PU.1 transcription factor induces cyclin D2 expression in U937 cells. *Leukemia*.
- Vincent-Salomon, A. and Thiery, J.P. (2003) Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development. *Breast Cancer Res*, **5**, 101-106.
- Viollet, B., Lefrancois-Martinez, A.M., Henrion, A., Kahn, A., Raymondjean, M. and Martinez, A. (1996) Immunochemical characterization and transacting properties of upstream stimulatory factor isoforms. *J Biol Chem*, **271**, 1405-1415.
- Visvader, J.E. and Lindeman, G.J. (2003) Transcriptional regulators in mammary gland development and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 1034-1051.
- Wai, P.Y. and Kuo, P.C. (2004) The role of Osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res*, **121**, 228-241.
- Wai, P.Y., Mi, Z., Gao, C., Guo, H., Marroquin, C. and Kuo, P.C. (2006) Ets-1 and Runx2 regulate transcription of a metastatic gene, osteopontin, in murine colorectal cancer cells. *J Biol Chem*.
- Wakiya, K., Begue, A., Stehelin, D. and Shibuya, M. (1996) 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*, **271**, 30823-30828.
- Wang, L.C., Kuo, F., Fujiwara, Y., Gilliland, D.G., Golub, T.R. and Orkin, S.H. (1997) Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *Embo J*, **16**, 4374-4383.
- Wang, G. and Scott, S.A. (2004) An early broad competence of motoneurons to express ER81 is later sculpted by the periphery. *J Neurosci*, **24**, 9789-9798.
- Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D. and Stehelin, D. (1990) The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature*, **346**, 191-193.
- Weinstein, J., Karim, J., Geschwind, D.H., Nelson, S.F., Krumm, J. and Sakamoto, K.M. (1998) Genomic organization, 5' flanking enhancer region, and chromosomal assignment of the cell cycle gene, p55Cdc. *Mol Genet Metab*, **64**, 52-57.
- Wen, S.C., Ku, D.H., De Luca, A., Claudio, P.P., Giordano, A. and Calabretta, B. (1995) ets-2 regulates cdc2 kinase activity in mammalian cells: coordinated expression of cdc2 and cyclin A. *Exp Cell Res*, **217**, 8-14.
- Whitesell, L. and Lindquist, S.L. (2005) HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer*, **5**, 761-772.
- Wick, W., Grimm, C., Wild-Bode, C., Platten, M., Arpin, M. and Weller, M. (2001) Ezrin-dependent promotion of glioma cell clonogenicity, motility, and invasion mediated by BCL-2 and transforming growth factor-beta2. *J Neurosci*, **21**, 3360-3368.
- Wick, W., Wagner, S., Kerkau, S., Dichgans, J., Tonn, J.C. and Weller, M. (1998) BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. *FEBS Lett*, **440**, 419-424.
- Wu, J. and Janknecht, R. (2002) Regulation of the ETS transcription factor ER81 by the 90-kDa ribosomal S6 kinase 1 and protein kinase A. *J Biol Chem*, **277**, 42669-42679.
- Xia, W.Y., Lien, H.C., Wang, S.C., Pan, Y., Sahin, A., Kuo, Y.H., Chang, K.J., Zhou, X., Wang, H., Yu, Z., Hortobagyi, G., Shi, D.R. and Hung, M.C. (2006) Expression of PEA3 and Lack of Correlation Between PEA3 and HER-2/neu Expression in Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat*.

Bibliographie

- Xin, J.H., Cowie, A., Lachance, P. and Hassell, J.A. (1992) Molecular cloning and characterization of PEA3, a new member of the Ets oncogene family that is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Genes Dev*, **6**, 481-496.
- Xing, X., Wang, S.C., Xia, W., Zou, Y., Shao, R., Kwong, K.Y., Yu, Z., Zhang, S., Miller, S., Huang, L. and Hung, M.C. (2000) The ets protein PEA3 suppresses HER-2/neu overexpression and inhibits tumorigenesis. *Nat Med*, **6**, 189-195.
- Yamamoto, H., Flannery, M.L., Kupriyanov, S., Pearce, J., McKercher, S.R., Henkel, G.W., Maki, R.A., Werb, Z. and Oshima, R.G. (1998) Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2. *Genes Dev*, **12**, 1315-1326.
- Yamamoto, H., Horiuchi, S., Adachi, Y., Taniguchi, H., Noshio, K., Min, Y. and Imai, K. (2004) Expression of ets-related transcriptional factor E1AF is associated with tumor progression and over-expression of matrilysin in human gastric cancer. *Carcinogenesis*, **25**, 325-332.
- Yan, S., Jane, D.T., Dufresne, M.J. and Sloane, B.F. (2003) Transcription of cathepsin B in glioma cells: regulation by an E-box adjacent to the transcription initiation site. *Biol Chem*, **384**, 1421-1427.
- Yang, L., Fox, S.A., Kirby, J.L., Troan, B.V. and Hinton, B.T. (2006) Putative regulation of expression of members of the Ets variant 4 transcription factor family and their downstream targets in the rat epididymis. *Biol Reprod*, **74**, 714-720.
- Yin, X.M. (2006) Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene*, **369**, 7-19.
- Yoneshima, H., Yamasaki, S., Voelker, C.C., Molnar, Z., Christophe, E., Audinat, E., Takemoto, M., Nishiwaki, M., Tsuji, S., Fujita, I. and Yamamoto, N. (2006) Er81 is expressed in a subpopulation of layer 5 neurons in rodent and primate neocortices. *Neuroscience*, **137**, 401-412.
- Yu, Z., Xia, W., Wang, H.Y., Wang, S.C., Pan, Y., Kwong, K.Y., Hortobagyi, G.N. and Hung, M.C. (2006) Antitumor activity of an Ets protein, PEA3, in breast cancer cell lines MDA-MB-361DYT2 and BT474M1. *Mol Carcinog*.
- Zhang, C., Kavurma, M.M., Lai, A. and Khachigian, L.M. (2003) Ets-1 protects vascular smooth muscle cells from undergoing apoptosis by activating p21WAF1/Cip1: ETS-1 regulates basal and and inducible p21WAF1/Cip: ETS-1 regulates basal and inducible p21WAF1/Cip1 transcription via distinct cis-acting elements in the p21WAF1/Cip1 promoter. *J Biol Chem*, **278**, 27903-27909.
- Zhang, L., Fogg, D.K. and Waisman, D.M. (2004) RNA interference-mediated silencing of the S100A10 gene attenuates plasmin generation and invasiveness of Colo 222 colorectal cancer cells. *J Biol Chem*, **279**, 2053-2062.
- Zhou, J., Chehab, R., Tkalcevic, J., Naylor, M.J., Harris, J., Wilson, T.J., Tsao, S., Tellis, I., Zavarsek, S., Xu, D., Lapinskas, E.J., Visvader, J., Lindeman, G.J., Thomas, R., Ormandy, C.J., Hertzog, P.J., Kola, I. and Pritchard, M.A. (2005) Elf5 is essential for early embryogenesis and mammary gland development during pregnancy and lactation. *Embo J*, **24**, 635-644.
- Zhu, X., Jiang, J., Shen, H., Wang, H., Zong, H., Li, Z., Yang, Y., Niu, Z., Liu, W., Chen, X., Hu, Y. and Gu, J. (2005) Elevated beta1,4-galactosyltransferase I in highly metastatic human lung cancer cells. Identification of E1AF as important transcription activator. *J Biol Chem*, **280**, 12503-12516.

Annexes

Revue (de Launoit et al., 2006) :

De Launoit Y., Baert J.L., Chotteau-Lelievre A., Monte D., Coutte L., Mauen S., Firlej V., Degerny C. and Verreman K. The Ets transcription factors of the PEA3 group: Transcriptional regulators in metastasis, BBA reviews on cancer, 2006 Aug;1766(1):79-87.

Abbreviations

ABL: v-abl Abelson murine leukemia oncogene
ADAM: a disintegrin metalloproteinase domain
ADN: acide désoxyribonucléique
ARNdb: ARN double brin
BCA: bicinchoninic acid
BLAST: basic local alignment search tool
BRCA: breast cancer gene
CAM: cell adhesion molecule
Cox: cyclooxygenase
Cdc2L2: cell division control 2 like 2
CDK: cyclin dependant kinase
C/EBP:CCAAT/enhancer-binding protein
CMV: cytomégalovirus
CTGF: connective-tissue growth factor
CREB: cAMP response element binding protein
CXCR: CXC chemokine receptor
CXCL: chemokine (motif CXC) ligand
DDR1: discoidin domain receptor
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF: epithelial growth factor
EGFR: EGF receptor
ELF: E74 like factor
EMMPRIN: extracellular matrix metalloproteinase inducer
EMT: epithelial mesenchymal transition (transition Epithélio-Mésenchymateuse)
Erm : Ets related molecule
ER: estrogen receptor
ERF: Ets2 repressor factor
ERG: early response gene
ESE: epithelium specific ets
Ets : E-twenty six
Etv: Ets variant
FAK: focal adhesion kinase
FGF: fibroblast growth factor
FGFR: FGF receptor
FOXC: forkhead box C
Gadd: growth arrest and DNA damage
GDNF: glial derived neurotrophic factor
GH: growth hormone (hormone de croissance)
GSK: glycogen synthase kinase
H1: ARN H1, composant de la RNase P
HER: human epidermal growth factor receptor
HGF/SF: hepatocyte growth factor/ scattor factor
Id: Inhibitor of DNA binding
IGF: insulin-like growth factor
IGFR: IGF receptor

IL: interleukine
ILK : Integrin-linked kinase
JAK: janus kinase
LAL : leucémie aigue lymphoblastiques
LAM : leucémie aigue myéloblastiques
LEF: lymphoïd enhancing factor
LMMC : leucémie myélomonocytaire chronique
MEC : matrice extracellulaire
MIP : macrophage inflammatory protein
MMP : matrix metalloproteinase
MSX: muscle segment homeobox
NGF: nerve growth factor
NFkB: nuclear factor kB
NTRK: neurotrophic tyrosine kinase
PAF: paraformaldéhyde
PAI : plasminogene activator inhibitor
PBS: Phosphate buffer saline
PCNA: proliferating cell nuclear antigen
PDEF: prostate epithelium-derived Ets transcription factor
PDGFR: platelet-derived growth factor receptor
Pea3 : polyomavirus enhancer activator
PKB: protein kinase B
pTEN: phosphatase and tensin homolog
PTHrP: parathyroid hormone-related protein
SPARC: secreted protein acidic rich-cysteine
RANTES: regulated on activation normal T cell expressed and secreted
Rb: retinoblastome
miRNA: micro RNA
RISC: RNA induced silencing complex
SDS: sodium dodecyl sulfate
siRNA: small interferent RNA
shRNA: small hairpin RNA
Smad: mothers against DPP homolog
SSC: sodium saline citrate
SUMO: small ubiquitin-related modifier
SVF: serum de veau foetal
Syk: spleen tyrosine kinase
TCF: ternary complex factor
TEB : terminal end bud
TEL: translocation Ets Leukemia
TERT: telomerase reverse transcriptase
TGFβ: transforming growth factor
TIMP: tissue inhibitor metalloproteinase
TNF: tumor necrosis factor
TNFR: TNF receptor
TORU: TPA oncogene response unit
TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand
uPA: urokinase plasminogen activator
VCAM: vascular cell adhesion molecule
VEGF: vascular endothelial growth factor