



HAL
open science

Etude des conséquences fonctionnelles de la surexpression du facteur de transcription Sp1

Emmanuelle Deniaud

► **To cite this version:**

Emmanuelle Deniaud. Etude des conséquences fonctionnelles de la surexpression du facteur de transcription Sp1. Biologie cellulaire. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2008. Français. NNT: . tel-00288383

HAL Id: tel-00288383

<https://theses.hal.science/tel-00288383>

Submitted on 16 Jun 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 455

N° attribué par la bibliothèque : 07ENSL0455

THESE

Pour l'obtention du diplôme de
DOCTEUR DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON

Spécialité: Sciences de la Vie

Laboratoire INSERM U851 Immunité, Infection, Vaccination
Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire, Intégrée et Cellulaire

ETUDE DES CONSEQUENCES FONCTIONNELLES DE LA SUREXPRESSIION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION Sp1

Présentée et soutenue publiquement par

Emmanuelle DENIAUD

Le jeudi 20 mars 2008

Devant la Commission d'examen formée de :

Dr Béatrice EYMIN

Rapporteur

Dr Brigitte KAHN-PERLES

Rapporteur

Dr Jacqueline MARVEL

Directeur de thèse

Pr Bertrand MOLLEREAU

Examineur

REMERCIEMENTS

C'est au terme de ces quelques années que vient le temps pour moi d'adresser mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à ce travail.

Je voudrais remercier Béatrice Eymin, Brigitte Kahn-Perlès et Bertrand Mollereau de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Je voudrais aussi remercier La Ligue Nationale Contre le Cancer et l'Association pour la Recherche contre le Cancer d'avoir apporté le soutien financier nécessaire à la réalisation de ce travail.

Et puis, je souhaite remercier ceux qui ont travaillé directement sur le projet.

Je tiens d'abord à remercier Jacqueline de m'avoir accueillie dans son équipe. Merci à la scientifique pour m'avoir appris à analyser tous mes résultats avant de conclure trop rapidement, à être plus confiante et plus optimiste vis-à-vis de mon travail et pour toutes les idées. Merci aussi à la femme pour les débats de société que j'ai beaucoup appréciés.

Je tiens également à remercier Yann de m'avoir aidé à faire mes premiers pas dans la science, sur ce projet qui n'était pas forcément son expertise première et de m'avoir fait confiance. Merci au scientifique pour les nombreuses discussions, pour m'avoir appris à « peser chaque mot » et à « me mettre à la place du lecteur ». Merci aussi pour sa patience, sa disponibilité, sa diplomatie légendaire qui auront permis de préserver une unité lorsqu'il le fallait, et pour son humour : c'est tellement mieux la science en riant !

Et puis, évidemment, je voudrai remercier Joël, l'autre « force Sp1 » de l'équipe. Merci d'avoir mis au point tous ces outils (je n'aurai finalement pas pris le temps d'apprendre toute cette partie bio mol), de m'avoir appris de nombreuses techniques au cours de ces années et de tout ce travail en équipe qui aura permis de faire avancer le projet. Et qui sait, peut-être que « depuis Guillaume » deviendra « depuis Manu »...!

Je tiens aussi à remercier les stagiaires qui ont travaillé avec moi : Marie-Laure pour son énergie, son dynamisme et sa bonne humeur malgré les longues cinétiques et Roxane pour toutes les PCR réalisées avec une efficacité remarquable, en journée et parfois même en rêve (ou en cauchemar ?...).

Je souhaite remercier aussi les personnes qui ont apporté leur expertise concernant la cytométrie en flux, et en particulier Chantal avec qui j'ai eu le plaisir d'interagir, et Bariza toujours disponible pour nous guider dans le labyrinthe de la PCR en temps réel. Merci également aux personnes du PRABI, en particulier Claudette et Aurélie, pour leur aide sur l'analyse bioinformatique.

Et puis, je remercie chaleureusement tous les membres de l'équipe « Marvellienne » qui ont apporté cette bonne humeur si essentielle pour avancer ! Merci aux étudiants qui ont

accompagné mes débuts : Flo, ma collègue de DEA et ce docteur plein d'humanité ; Charlotte, fille au grand caractère qui aura eu le courage d'initier la PCR dans la tour ; Laurent, cet autre breton qui se veut baron mais qui est avant tout un homme au grand cœur ; Laurence, ma première « maman » qui a guidé ma découverte du monde mystérieux de la recherche ; Georgi, le bulgare qui préférerait les discussions à des heures tardives de la nuit ; Marie-Cécile, ou encore « la Marie » ou la « morue », la fille connue pour sa discrétion légendaire (!!!) débordante d'énergie qui m'apprend encore et toujours à faire confiance en la vie ; et bien sûr Tonio, mon « frère de thèse », ce compagnon de route, pour sa présence sur le chemin pendant la plupart des ces années, et à qui je n'ai toujours trouvé aucun défaut... un jour peut-être ! Merci à ceux qui ont accompagné cette fin de thèse : Raffaella, pour être ce rayon de soleil italien qui apporte bonne humeur et sourire même sur les tartes (ils sont forts ces italiens !) ; Martial pour sa grande sagesse qui rend philosophe même face aux obstacles les plus difficiles ; Charly pour son talent de conception des plus belles affiches de thèse de la tour ; Christelle pour sa gentillesse et sa bienveillance ; Erwan pour toutes ces blagues que je ne comprends pas mais surtout pour celles que je comprends (!!!) ; et Molly, la « p'tite nouvelle », pour toutes les petites fleurs colorées qu'elle va continuer de semer ! Et bien sûr, merci aux « statutaires » : notre Martaiiiiiiiiiiiiiiiiiine adorée, véritable pilier de l'équipe, pour son dynamisme et sa bonne humeur sans faille (excepté peut-être quand elle rate sa manip...) et Christophe, mélomane au grand coeur, pour sa générosité et ses précieux conseils scientifiques.

Je voudrai aussi remercier toutes les personnes de cette « tour infernale » avec qui j'ai eu plaisir de discuter de science ou autre, avec qui j'ai partagé des moments de pause dont ces fameux cafés-clopes (petit clin d'œil à Hélène), et parmi eux, les quelques personnes qui travaillent (ou ont travaillé !) sur l'apoptose : Laurent pour les explications détaillées du principe du Western Anne-Sophie, la deuxième Michallet de la tour pour notre plus grand plaisir ; et l'équipe « NBB », en particulier Nathalie et Marie-Claude pour leurs encouragements ; Anne-Laure dont le travail a été l'origine de ce projet (merci du cadeau !!!) ; et tout spécialement Gaëlle, collègue de cinétique, coéquipière et bien plus, pour avoir été là, pour la sincérité de son amitié et pour tout le reste pour lequel il n'y a pas vraiment de mots. « Si différentes et pourtant si proches » et inversement...

Et je tiens à remercier mes camarades du « loft DEA » et en particulier Laure, Céline et Flo, pour nos débats passionnés, toutes ces discussions sur le « pourquoi du comment », leur franchise et pour la « solidité » de leur amitié...

Merci à chacun de mes amis qu'ils soient ici ou ailleurs, à tous ceux que j'ai croisé sur le chemin, qui ont participé souvent sans le savoir à ce que cette histoire soit une réussite.

Et enfin, merci à ma famille pour leur amour inconditionnel et leur soutien dans les choix de vie, quoiqu'il arrive. C'est si important pour moi, et pour tout ça, merci...

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| TABLE DES MATIERES | 4 |
| ABREVIATIONS | 6 |
| FIGURES ET TABLEAUX | 8 |
| RESUME DE LA THESE | 9 |
| INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE | 11 |
| I Apoptose | 12 |
| I.1 Mécanismes | 12 |
| I.1.1 La famille Bcl-2 : les régulateurs | 14 |
| I.1.2 La famille des caspases : les exécuteurs | 16 |
| I.2 Signaux inducteurs d'apoptose | 17 |
| I.2.1 Les signaux extra-cellulaires | 18 |
| I.2.2 Les signaux intra-cellulaires | 20 |
| II Le facteur de transcription p53 et l'apoptose | 23 |
| II.1 Activité pro-apoptotique du facteur de transcription p53 | 24 |
| II.1.1 Mise en évidence de l'activité pro-apoptotique de p53 | 24 |
| II.1.2 Rôle de l'activité transcriptionnelle de p53 dans son activité pro-apoptotique | 24 |
| II.2 Les voies apoptotiques ciblées par p53 | 25 |
| II.2.1 Famille Bcl-2 | 25 |
| II.2.2 Récepteurs de mort | 26 |
| II.2.3 Autres cibles | 28 |
| II.3 Mécanismes régulant la sélectivité de l'activité transcriptionnelle de p53 | 29 |
| II.3.1 Modèle quantitatif | 29 |
| II.3.2 Influence du contexte cellulaire | 29 |
| II.3.3 Modèle de co-facteurs | 30 |
| II.3.4 Modèle des modifications post-traductionnelles | 30 |
| II.4 Activité apoptotique indépendante de la transcription | 31 |
| III Le facteur de transcription c-Myc et l'apoptose | 34 |
| III.1 c-Myc apporte des signaux contradictoires | 36 |
| III.2 Mécanismes de l'apoptose induite par c-Myc | 37 |
| III.2.1 Apoptose dépendante de p53 | 37 |
| III.2.2 Apoptose indépendante de p53 | 38 |
| III.3 Hypothèse d'une activité apoptotique non transcriptionnelle | 41 |
| III.3.1 Association de c-Myc à une grande fraction du génome | 41 |
| III.3.2 Induction d'un endommagement de l'ADN | 42 |
| IV Le facteur de transcription E2F-1 et l'apoptose | 44 |
| IV.1 E2F-1 est un oncogène et un suppresseur de tumeur | 45 |
| IV.2 Mécanismes de l'apoptose induite par E2F-1 | 46 |
| IV.2.1 Apoptose dépendante de p53 | 46 |
| IV.2.2 Apoptose indépendante de p53 | 47 |
| IV.3 Hypothèse d'une activité apoptotique non transcriptionnelle | 50 |
| V Le facteur de transcription Sp1 | 51 |
| V.1 Généralités | 51 |
| V.1.1 Structure | 51 |
| V.1.2 Propriétés transcriptionnelles | 54 |
| V.1.3 Fonctions biologiques <i>in vivo</i> (phénotype des souris déficientes pour les facteurs Sp) | 55 |
| V.2 Mécanismes de la régulation de la transcription par Sp1 | 57 |
| V.2.1 Séquence du site consensus | 57 |
| V.2.2 Localisation du site | 58 |
| V.2.3 Mécanisme d'action | 59 |
| V.3 Facteurs régulant Sp1 | 62 |
| V.3.1 Régulation de la quantité de Sp1 | 62 |

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| V.3.2 | Modifications post-traductionnelles _____ | 63 |
| V.4 | Sp1 et l'apoptose _____ | 67 |
| RESULTATS | | 71 |
| I | Résumé de l'Article n°1 _____ | 72 |
| II | Annexes _____ | 75 |
| II.1 | Annexe 1 _____ | 75 |
| II.2 | Annexe 2 _____ | 76 |
| III | Résumé de l'Article n°2 _____ | 77 |
| DISCUSSION | | 80 |
| I | La surexpression de Sp1 induit l'apoptose des cellules _____ | 81 |
| II | Etude des mécanismes de l'activité apoptotique _____ | 82 |
| II.1 | Les récepteurs de mort _____ | 82 |
| II.2 | Autres voies _____ | 83 |
| II.3 | Les caspases et les protéines Bcl-2 _____ | 83 |
| III | La surexpression de Sp1 induit une perturbation du cycle cellulaire _____ | 84 |
| III.1 | Rôle de Sp1 dans la régulation du cycle cellulaire _____ | 84 |
| III.2 | Etude des mécanismes de l'induction de l'accumulation des cellules en G1 _____ | 85 |
| IV | Importance de l'activité transcriptionnelle de Sp1 dans le phénotype observé suite à la surexpression de Sp1 _____ | 88 |
| IV.1 | Etude de formes mutées de Sp1 _____ | 90 |
| IV.2 | Etude de l'expression de gènes cibles de Sp1 connus _____ | 91 |
| IV.3 | Recherche des sites Sp1 dans le promoteur des gènes différentiellement exprimés _____ | 91 |
| IV.3.1 | Induction indépendante de l'activité transcriptionnelle de Sp1 _____ | 92 |
| IV.3.2 | Répression dépendante de l'activité transcriptionnelle de Sp1 _____ | 93 |
| V | Rôle de la surexpression de Sp1 dans la transformation _____ | 95 |
| REFERENCES | | 98 |

ABREVIATIONS

AIF : Apoptosis-inducing factor
ATM : Ataxia telangiectasia mutated
ATR : ATM and Rad3-related
BH : Bcl-2 homology
CARD : Caspase recruitment domain
Caspase : Cysteinyl aspartate-specific protease
CED : Cell death abnormal
Cdk : Cyclin-dependant kinase
Cdk_i : Cyclin-dependant kinase inhibitor
Chk1 ou 2 : Checkpoint kinase 1 ou 2
DD : Death domain
DED : Death effector domain
DISC : Death-inducing signaling complex
DSBs : Double strand breaks
EGF : Endothelial growth factor
EndoG : Endonuclease G
FADD : Fas-assoiated death domain
Fas-L : Fas-ligand
FLIP : FLICE-like inhibitory protein
GFP : Green fluorescent protein
HAT : Histones acetyltransferase
HDAC : Histones deacetylase
IAP : Inhibitor of apoptosis
IL-3 : Interleukine-3
Jak : Janus kinase
KLF : Kruppel like factor
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MEF : Mouse Embryo Fibroblast
NLS : Nuclear localization sequence
Omi/HtrA2 : High-temperature-requirement protein A2
p53AIP1 : p53-regulated Apoptosis-Inducible Protein 1
p53dinp1 : p53-dependent damage-inducible nuclear protein 1

PERP : p53 apoptosis effector related to PMP-22

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

Puma : p53 upregulated modulator of apoptosis

RE : Reticulum endoplasmique

Smac/ Diablo : Second mitochondria-derived activator of caspases / Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI

STAT : Signal transducer and activator of transcription

SV-40 : Simian virus 40

TAF : TBP-associated factor

TBP : TATA-box binding protein

TNF : Tumor necrosis factor

TNFR : Tumor necrosis factor receptor

TRAIL : TNF-related apoptosis inducing ligand

TRAF2 : TNF-receptor-associated factor 2

UPR : Unfolded protein response

VEGF : Vascular endothelial growth factor

ZnF : Zinc finger

FIGURES ET TABLEAUX

| | |
|--|-----------|
| <i>Figure 1 : Conservation de la machinerie apoptotique entre le nématode et les mammifères</i> | <i>13</i> |
| <i>Figure 2 : Modèles d'activation de Bax et Bak</i> | <i>15</i> |
| <i>Tableau 1 : Fonction des facteurs apoptogènes relargués de l'espace intermembranaire mitochondrial au cours de l'apoptose</i> | <i>15</i> |
| <i>Figure 3 : Complexes multiprotéiques conduisant à l'activation des caspases initiatrices</i> | <i>17</i> |
| <i>Figure 4 : Régulation de la survie des cellules par les facteurs extracellulaires</i> | <i>19</i> |
| <i>Tableau 2 : Gènes cibles de p53 impliqués dans son activité apoptotique.....</i> | <i>27</i> |
| <i>Figure 5 : Modèles de régulation de la sélectivité transcriptionnelle de p53 vis-à-vis de ses gènes cibles</i> | <i>31</i> |
| <i>Figure 6 : Modèles combinant l'activité nucléaire et cytoplasmique de p53 dans son activité apoptotique.....</i> | <i>33</i> |
| <i>Figure 7 : La régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur c-Myc.....</i> | <i>35</i> |
| <i>Figure 8 : Mécanismes d'activation de p53 par c-Myc</i> | <i>38</i> |
| <i>Figure 9 : Modèles de la régulation de l'apoptose par c-Myc</i> | <i>40</i> |
| <i>Figure 10 : Régulation de l'activité transcriptionnelle de E2F-1 par pRb</i> | <i>45</i> |
| <i>Figure 11 : Mécanismes d'activation de la voie p53 par E2F-1</i> | <i>47</i> |
| <i>Figure 12 : E2F-1 active de multiples voies apoptotiques</i> | <i>49</i> |
| <i>Figure 13 : Structure des facteurs Sp.....</i> | <i>53</i> |
| <i>Figure 14 : Modèle de reconnaissance du site GC par le domaine de liaison à l'ADN de Sp1</i> | <i>53</i> |
| <i>Tableau 3 : Phénotypes des souris hétérozygotes ou homozygotes pour la délétion des gènes codant pour les facteurs Sp</i> | <i>57</i> |
| <i>Tableau 4 : Régulation de l'activité transcriptionnelle de Sp1</i> | <i>60</i> |
| <i>Tableau 5 : Régulation de la phosphorylation de Sp1</i> | <i>64</i> |
| <i>Figure 15 : localisation des sites de phosphorylation de Sp1</i> | <i>64</i> |
| <i>Tableau 6 : Gènes cibles de Sp1 impliqués dans la régulation de l'apoptose</i> | <i>69</i> |
| <i>Figure 16 : Régulation de l'activité transcriptionnelle de Sp1</i> | <i>70</i> |
| <i>Figure 17 : Les différents modèles d'action de Sp1 possibles conduisant à l'induction de l'apoptose</i> | <i>89</i> |
| <i>Figure 18 : Modèle de l'implication de Sp1 dans la régulation de l'apoptose et dans la transformation.....</i> | <i>97</i> |

RESUME DE LA THESE

Sp1 est un facteur de transcription exprimé de façon ubiquitaire qui régule la transcription à partir des sites GC. Une multitude de voies de signalisation régule l'activité de Sp1 par modifications post-traductionnelles, interactions avec des facteurs de transcription ou avec des co-facteurs ne liant pas l'ADN. La complexité de la régulation de l'activité de Sp1 autorise une fine régulation de l'expression de certains gènes cibles de Sp1 de façon spécifique au type cellulaire spécifique et au stimulus. Les gènes cibles de Sp1 sont nombreux et impliqués dans la plupart des processus cellulaires incluant le métabolisme, l'angiogénèse, la prolifération et l'apoptose. Les données publiées sur le rôle de Sp1 dans la régulation de l'apoptose sont peu nombreuses et indiquent que Sp1 aurait un rôle bivalent dans la régulation de l'apoptose. Mon travail de thèse a consisté à caractériser les conséquences fonctionnelles de la surexpression de Sp1 et à en étudier les mécanismes.

Nous avons surexprimé Sp1 en utilisant des vecteurs rétroviraux ou des systèmes inductibles. Nous avons montré que la surexpression de Sp1 induisait l'apoptose de différentes lignées cellulaires non transformées. Cependant, les mécanismes de l'induction de l'apoptose par Sp1 sont différents selon le type cellulaire et au moins dans les cellules Baf-3, ils sont différents de ceux qui ont été décrits dans la littérature. La surexpression de formes mutées de Sp1 nous a permis de montrer que l'activité apoptotique de Sp1 requiert sa liaison à l'ADN et peut-être son activité transcriptionnelle. Plusieurs mécanismes peuvent être envisagés: soit Sp1 régule directement ou indirectement la transcription de certains de gènes responsables de l'induction de l'apoptose, soit un excès de Sp1 lié à l'ADN est un signal de stress suffisant pour induire l'apoptose de façon indépendante de son activité transcriptionnelle. A partir des résultats du transcriptome réalisé sur des cellules surexprimant ou non Sp1, nous avons observé que la fonction biologique sur-représentée parmi les gènes surexprimés correspond à la régulation de l'apoptose, ce qui corrèle avec l'activité observée pour Sp1. Ces résultats suggèrent que le ou les effecteur(s) de l'activité apoptotique de Sp1 pourrai(en)t être inclus dans le groupe de gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose. De plus, parmi les gènes surexprimés, la fréquence de gènes contenant au moins un site consensus de liaison à Sp1 (GGGGCGGG) dans leur promoteur n'est pas supérieure à celle d'un groupe des gènes non régulés et choisis aléatoirement, suggérant que l'induction de ces gènes pourrait être indépendante de l'activité transcriptionnelle de Sp1. Le groupe de gènes sous-exprimés suite à

la surexpression de Sp1, lui, inclut le gène *sp1* endogène et des gènes du cycle cellulaire. Ceci est en accord avec l'observation que la surexpression de Sp1 induit l'accumulation des cellules en phase G1 avant l'entrée des cellules en apoptose. Cet effet est dû à une perturbation spécifiquement de la phase G1 et pas des autres phases du cycle cellulaire et pourrait être dû à la diminution de l'expression de la cycline D2 que l'on observe suite à la surexpression de Sp1. De façon très intéressante, la population des gènes réprimés est enrichie en gènes contenant au moins un site consensus de liaison à Sp1 dans leur promoteur. Ces résultats suggèrent que l'expression d'au moins une partie des gènes sous-exprimés et probablement du gène *cycline D2*, serait dépendante de l'activité transcriptionnelle de Sp1.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I Apoptose

I.1 Mécanismes

L'apoptose est une forme de mort cellulaire conservée chez les métazoaires. Elle est caractérisée par des changements morphologiques incluant une atrophie cellulaire, un bourgeonnement de la membrane plasmique et une condensation de la chromatine. Biochimiquement, elle est caractérisée par une externalisation des phosphatidylsérines à la surface de la membrane plasmique, une diminution du potentiel membranaire mitochondrial, l'activation de protéases spécifiques et une fragmentation de l'ADN. Les organelles et la membrane plasmique sont maintenues intègres. Les corps apoptotiques sont rapidement reconnus, ingérés et dégradés par des macrophages ou des cellules voisines (Strasser et al., 2000).

L'apoptose est essentielle à une organogénèse réussie, au maintien de l'homéostasie cellulaire et permet l'élimination de cellules infectées ou dont l'ADN a été endommagé. Une dérégulation de l'apoptose est impliquée dans l'apparition de pathologies : alors qu'un excès d'apoptose participe au développement de maladies neurodégénératives, un défaut d'apoptose favorise l'apparition de cancers ou de maladies auto-immunes (Thompson, 1995).

L'apoptose est contrôlée génétiquement et l'étude du modèle animal *Caenorhabditis elegans* a largement contribué à l'identification des gènes codant pour les protéines régulatrices et exécutrices de cette mort cellulaire. Au cours de son développement, le nématode *C. elegans* hermaphrodite subit un patron spatio-temporel invariable de mort cellulaire. Des mutagénèses ont permis d'identifier deux gènes requis pour la mort de toutes les types cellulaires, *ced-3* et *ced-4* (*ced*= cell death abnormal), et un gène requis pour l'inhiber, *ced-9*. Dans la cellule, la protéine adaptatrice pro-apoptotique CED-4 est inactivée par interaction avec l'inhibiteur de l'apoptose CED-9 (figure 1). Suite à un stimulus apoptotique, CED-9 est séquestré et inactivé par EGL-1, libérant CED-4 qui peut alors activer la protéase CED-3 responsable de l'exécution du programme apoptotique. L'homologue de CED-9 chez les mammifères est Bcl-2. Bcl-2 est fonctionnel chez *C. elegans* montrant la conservation de la régulation de l'apoptose au cours de l'évolution. Les homologues de CED-3 et CED-4 sont respectivement les caspases et Apaf-1. La machinerie apoptotique chez les mammifères est néanmoins plus complexe dû à la présence de niveaux de régulation

supplémentaires et d'un plus grand nombre de protéines régulatrices ou exécutrices de l'apoptose (figure 1) (Danial and Korsmeyer, 2004).

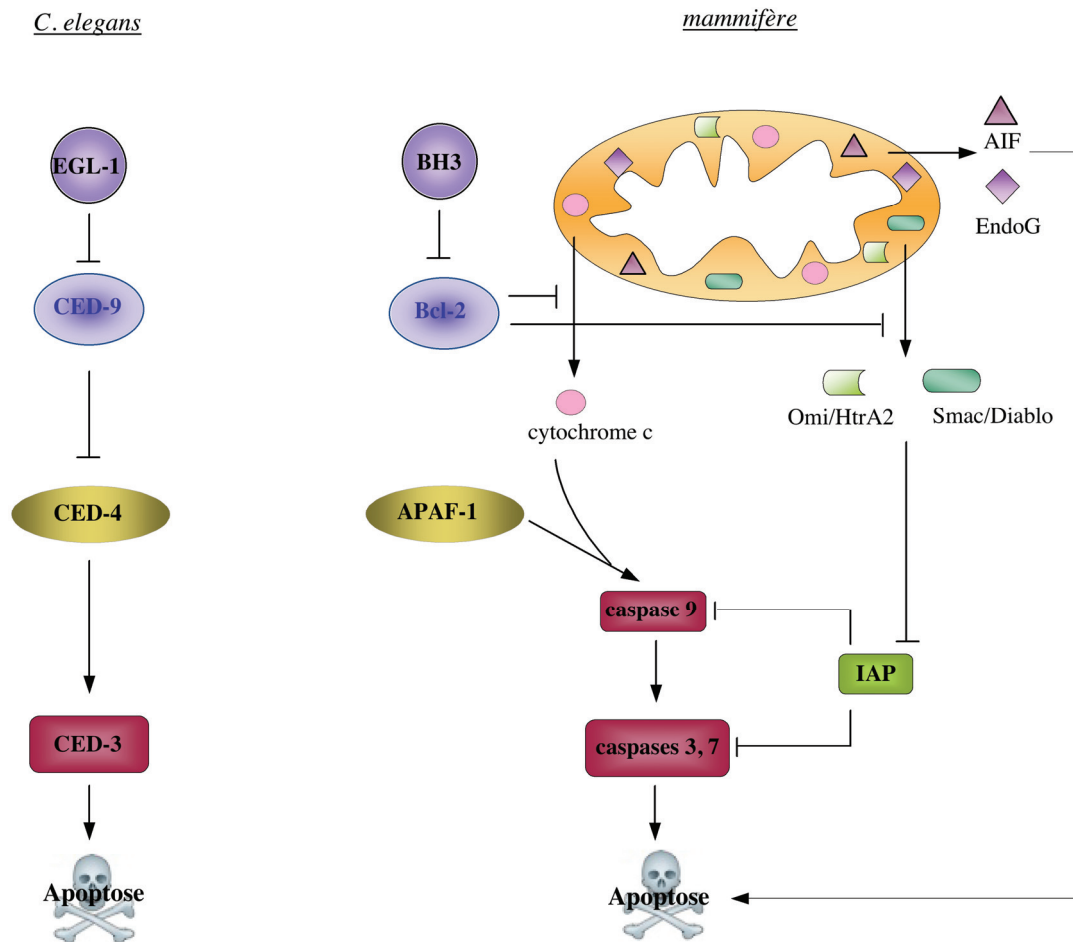


Figure 1 : Conservation de la machinerie apoptotique entre le nématode et les mammifères

I.1.1 La famille Bcl-2 : les régulateurs

Les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'apoptose vis-à-vis de la plupart des stimuli apoptotiques sauf, dans certains cas, suite à l'activation des récepteurs de mort. Elles sont au moins au nombre de 20 dans les cellules de mammifères et sont divisées en trois sous-familles en fonction de leur structure et de leur fonction (Cory and Adams, 2002). Les membres de la sous-famille des anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X, Bcl-w, A1 et Mcl-1) partagent une homologie de séquence pour 4 domaines BH (Bcl-2 homology). Ces protéines promeuvent la survie cellulaire en neutralisant l'activité des protéines Bak-like. Les membres de la sous-famille des pro-apoptotiques Bak-like (Bak, Bax, Bok) possèdent les domaines BH1, BH2 et BH3. Enfin, les protéines de la sous famille « BH3-only » (Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, Hrk, Noxa, Puma) ne possèdent que le domaine BH3, domaine absolument requis pour leur activité pro-apoptotique. Ce sont des protéines qualifiées de « sentinelles » qui détectent divers stress cellulaires. Par exemple, Noxa et Puma semblent être les médiateurs de l'apoptose induite par un stress génotoxique tandis que Bad est activée suite à une privation en facteurs de croissance. Elles s'associent et neutralisent la fonction des protéines anti-apoptotiques. Certaines de ces protéines (Bim, Puma, Bid) sont capables de s'associer avec toutes les protéines anti-apoptotiques constituant ainsi de puissants inducteurs d'apoptose. Les autres ne peuvent s'associer qu'avec certaines protéines anti-apoptotiques. Par exemple, Noxa s'associe uniquement avec Mcl-1 et A1 alors que Bad ne s'associe qu'avec Bcl-2, Bcl-X et Bcl-w.

Suite à un stress cellulaire, certaines protéines BH3-only sont activées et vont conduire à l'activation de Bak/Bax. Deux mécanismes d'activation de Bak/Bax par les BH3-only ont été proposés (figure 2). Le modèle d'activation directe est basé sur une association et activation directe de Bax/Bak par certains BH3-only. Dans ce modèle, les BH3-only sont divisés en deux sous-groupes en fonction de leur capacité à activer directement ou non les protéines Bax et Bak. Les « activateurs » tels que Bim ou tBid se lient directement avec Bax et Bak et les activent alors que les autres BH3-only « sensibilisateurs » ne peuvent lier que les protéines anti-apoptotiques. Suite à un stress, les « sensibilisateurs » s'associeraient et neutraliseraient les protéines anti-apoptotiques ce qui conduirait à la libération de tous les « activateurs » et à l'activation directe de Bak/Bax. Le deuxième modèle, le modèle d'activation indirecte, suggère que tous les BH3-only s'associeraient avec leurs partenaires anti-apoptotiques spécifiques et

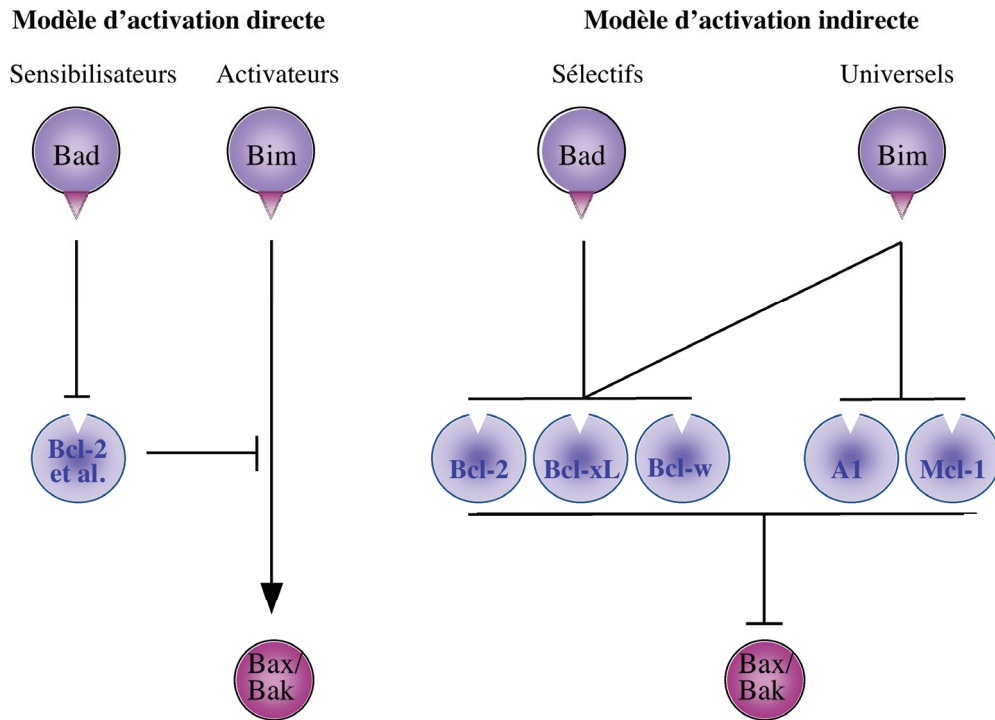


Figure 2 : Modèles d'activation de Bax et Bak

| Facteurs apoptogènes | Fonction |
|--|---|
| cytochrome c | co-facteur requis pour la formation de l'apoptosome |
| Smac/Diablo (Second mitochondria-derived activator of caspases) (Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI) | Inhibiteurs des IAP (Inhibitor of apoptosis) |
| Omi/Htra2(High-temperature-requirement protein A2) | |
| AIF (Apoptosis inducing factor) | condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN |
| EndoG (Endonucléase G) | |

Tableau 1 : Fonction des facteurs apoptogènes relargués de l'espace intermembranaire mitochondrial au cours de l'apoptose

induiraient l'apoptose en empêchant la neutralisation de l'activité de Bak/Bax par les protéines anti-apoptotiques. Dans ce modèle, Bim et tBid sont de puissants inducteurs de l'apoptose puisqu'ils sont capables d'antagoniser toutes les protéines anti-apoptotiques (Willis et al.,

2007). Quel que soit le modèle, une fois activées, Bak et Bax vont conduire, par un mécanisme qui reste encore débattu, au relarguage dans le cytoplasme de facteurs apoptogènes normalement séquestrés dans l'espace intermembranaire mitochondrial (tableau 1 et figure 1). Le relarguage de l'ensemble de ces facteurs contribue à induire efficacement l'apoptose des cellules.

I.1.2 La famille des caspases : les exécuteurs

Les caspases (Cysteinyl aspartate-specific proteases) sont des protéases à cystéines qui clivent leurs substrats après un résidu aspartate (Degterev et al., 2003). A ce jour, 11 caspases ont été identifiées chez l'homme, 10 chez la souris et au moins 8 d'entre elles jouent un rôle dans l'apoptose. Les pro-caspases sont synthétisées sous forme d'un zymogène inactif composé d'un prodomaine de longueur variable suivi d'une large sous-unité (p20) et d'une petite sous-unité (p10). Les pro-caspases sont activées par protéolyses successives au niveau de résidus aspartate spécifiques localisés dans le prodomaine et entre les sous-unités p20 et p10. Ceci résulte en la formation d'une caspase mature tétramérique composée de deux hétérodimères p20/p10 contenant deux sites catalytiques. Une fois active, chaque caspase reconnaît un motif spécifique de 4 acides aminés et clive après le résidu aspartate en C-terminal du motif.

Les caspases impliquées dans la régulation de l'apoptose sont divisées en deux grands groupes : les caspases initiatrices (caspase -2, -8, -9, -10, -12) qui possèdent un long prodomaine et les caspases effectrices (caspase -3, -6, -7) qui possèdent un court prodomaine (Lavrik et al., 2005). Le long prodomaine des pro-caspases initiatrices (>90 acides aminés) contient des motifs structuraux permettant des interactions homotypiques avec des protéines adaptatrices conduisant à la formation de complexes multiprotéiques et à l'auto-activation de la pro-caspase initiatrice engagée (figure 3). Par exemple, pour la caspase-9, le relarguage du cytochrome c dans le cytoplasme induit l'oligomérisation de molécules d'Apaf-1 en présence d'ATP. Par interaction homotypique de leur motif CARD (Caspase recruitment domain), la pro-caspase-9 s'associe avec Apaf-1 formant ainsi l'apoptosome et subit alors un changement de la conformation résultant en son auto-activation (figure 3a). Dans le cas de la caspase-8, suite à l'engagement d'un récepteur de mort, la molécule adaptatrice FADD (Fas-associated death domain) est recrutée via son domaine de mort DD (Death domain) au niveau du domaine DD localisé dans la partie cytoplasmique du récepteur. FADD possède aussi un domaine effecteur de mort DED (Death effector domain) ce qui permet le recrutement de la pro-

caspase-8 qui possède deux domaines DED dans son prodomaine. La formation du complexe protéique appelé DISC (Death-inducing signaling complex) conduit à une augmentation locale de la concentration des pro-caspases 8 permettant leur activation par auto-protéolyse (figure 3b) (Shi, 2006). Une fois activées, les caspases initiateuses vont cliver et activer les pro-caspases effectrices. Les caspases effectrices ainsi actives vont alors cliver un grand nombre de substrats essentiels à l'intégrité cellulaire (référencés dans la base de données <http://bioinf.gen.tcd.ie/casbah/>). L'activité des caspases 3, 7 et 9 peut être inhibée par les protéines de la famille IAP. Ces IAP sont elles-même inhibées par séquestration par les facteurs apoptogènes Smac/Diablo ou Omi/Htra2 (figure 1).

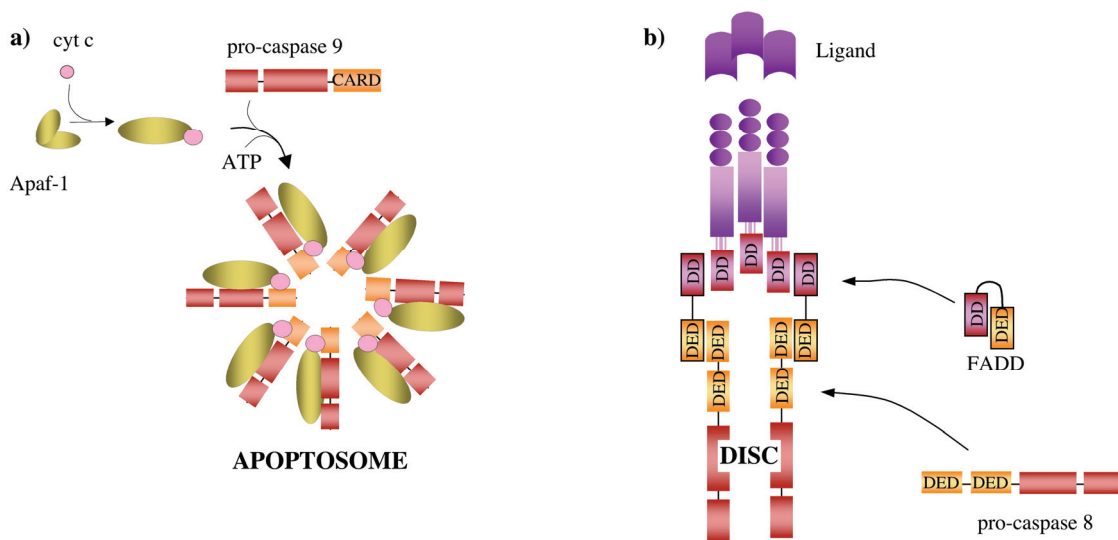


Figure 3 : Complexes multiprotéiques conduisant à l'activation des caspases initiateuses

I.2 Signaux inducteurs d'apoptose

La notion que l'apoptose est le destin cellulaire « par défaut » a été proposée par M. Raff dans les années 90 (Raff, 1992) et a été étayée entre autres par l'observation que toutes les cellules animales nucléées expriment de façon constitutive les composants de la machinerie apoptotique. La survie de la cellule dépend donc de la présence de signaux inhibiteurs de l'apoptose qui peuvent provenir des cellules voisines dans un organisme multi-cellulaire ou par les facteurs de croissance pour les cellules en culture. L'apoptose peut aussi être sous le

contrôle d'une régulation transcriptionnelle et peut être induite par une multitude de signaux qu'ils soient extra-cellulaires ou intra-cellulaires.

I.2.1 Les signaux extra-cellulaires

I.2.1.a L'absence de signaux de survie

Nous illustrerons la dépendance des cellules vis-à-vis des facteurs de survie en présentant l'IL-3 (Interleukine-3), facteur de survie pour certaines lignées hématopoïétiques (figure 4) (Plas et al., 2002) (Martinez-Moczygemba and Huston, 2003). La liaison de l'IL-3 à son récepteur exprimé à la surface des cellules conduit à l'activation de plusieurs voies de signalisation incluant les voies Jak (Janus kinase)/STAT (Signal transducer and activator of transcription), MAPK (Mitogen-activated protein kinase), ou PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt. La phosphorylation des Jak suite à la liaison de l'IL-3 à son récepteur permet l'activation du facteur de transcription STAT5 qui stimule la transcription de gènes anti-apoptotiques comme *bcl-2* et *bcl-x*. La transcription de ces gènes est aussi activée par la voie MAPK. Enfin, la voie PI3K/Akt joue aussi un rôle essentiel dans la régulation de la survie cellulaire. L'activation des PI3K par l'IL-3 conduit à la génération des messagers secondaires PIP₃ (Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate) qui permettent le recrutement de la kinase Akt à la membrane plasmique et son activation par phosphorylation. Une fois activée, la kinase Akt phosphoryle un grand nombre de substrats impliqués dans le contrôle du métabolisme cellulaire, de la traduction des protéines, de la prolifération et de l'apoptose. Akt phosphoryle la protéine Bad et inhibe son activité pro-apoptotique. En effet, la forme phosphorylée de Bad est sequestrée dans le cytoplasme par interaction avec la protéine chaperone 14-3-3. Un autre substrat d'Akt est la kinase GSK-3 (Glycogen synthase kinase-3) qui, sous sa forme non phosphorylée, active la dégradation de la protéine anti-apoptotique Mcl-1. Akt phosphoryle aussi les membres de la famille des facteurs de transcription Forkhead FOXO ce qui empêche leur translocation dans le noyau. Lorsqu'ils sont dans le noyau, ces facteurs exercent leur activité apoptotique en activant la transcription de gènes cibles pro-apoptotiques comme *fas-l* ou *bim*.

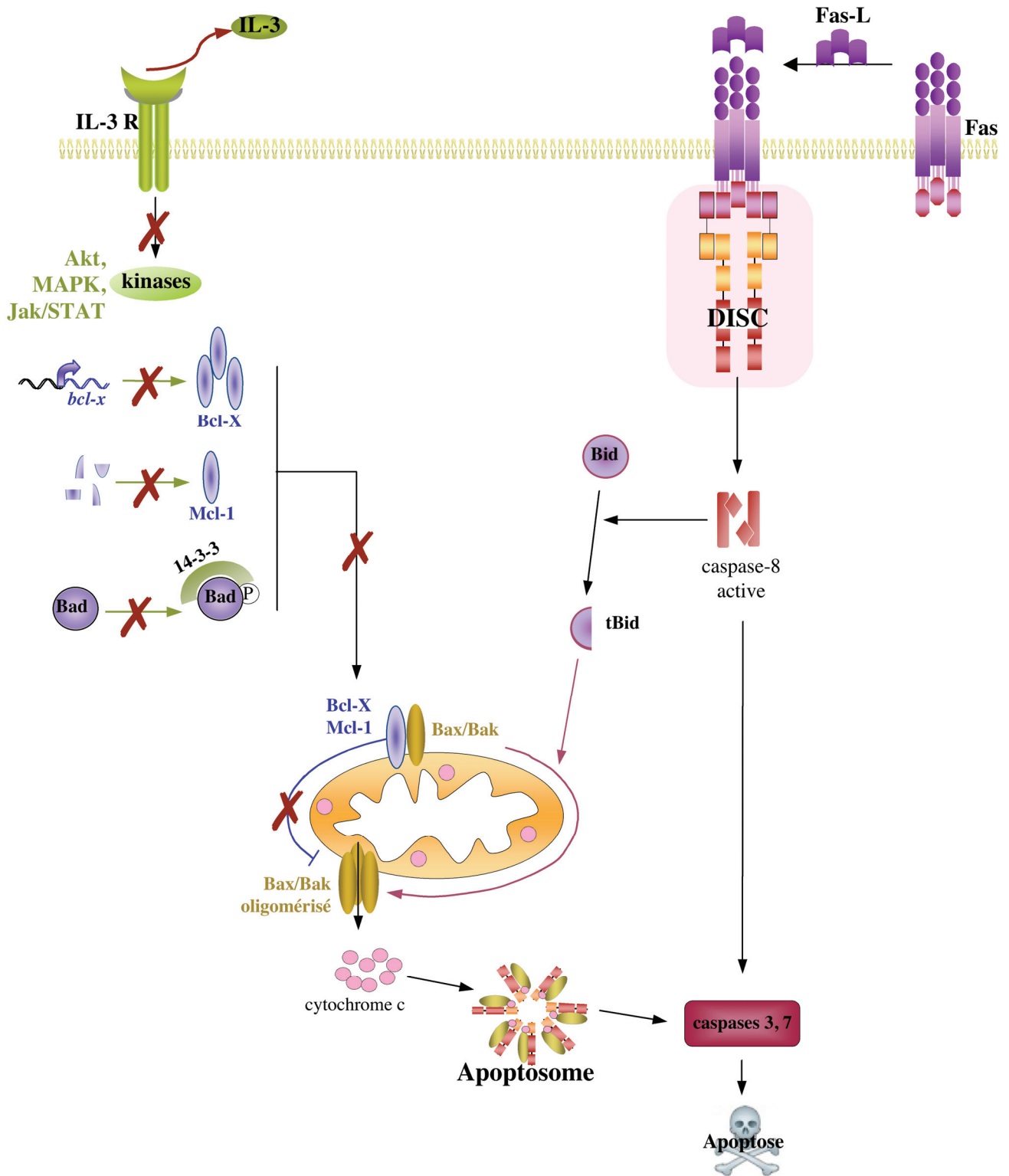


Figure 4 : Régulation de la survie des cellules par les facteurs extracellulaires

I.2.1.b L'activation des récepteurs de mort

La survie des cellules est aussi dictée par les facteurs pro-apoptotiques qui activent les récepteurs de mort (figure 4). Ces derniers appartiennent à la superfamille TNFR (Tumor necrosis factor receptor) et sont impliqués dans divers processus cellulaires et notamment la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Le membre de cette famille le mieux caractérisé est Fas. Fas est pré-assemblé en trimère à la surface des cellules. Suite à la liaison de son ligand Fas-L (Fas-ligand), Fas subit un changement conformationnel ce qui permet l'assemblage du complexe protéique DISC au niveau de la queue cytoplasmique du récepteur et l'activation de la caspase-8 (cf. paragraphe I.1.2). La caspase-8 peut alors cliver directement la caspase-3 et conduire à l'apoptose. Lorsque l'activation de la caspase-8 est trop limitée, une boucle d'amplification mitochondriale est requise pour induire l'apoptose. Dans ce cas, l'induction de l'apoptose dépend du clivage de la protéine BH3-only Bid par la caspase-8. Une fois clivé, tBid est transloqué à la mitochondrie conduisant à l'activation de Bax/Bak et à l'apoptose. Cette voie apoptotique possède des régulateurs négatifs comme la protéine FLIP (FLICE-like inhibitory protein) qui est un homologue de la caspase-8 dépourvu de site catalytique et qui peut être recruté au niveau du DISC et bloquer l'activation de la caspase-8.

Le mécanisme d'induction de l'apoptose par Fas peut être étendu à d'autres récepteurs de mort tel que DR4/DR5 suite à la liaison de leur ligand TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand). Par contre, dans le cas du récepteur TNFR1, la liaison du ligand TNF (Tumor necrosis factor) conduit à la formation d'un premier complexe protéique qui active la voie anti-apoptotique de NF- κ B suivi de la formation du DISC. Lorsque l'activation de NF- κ B est suffisante, FLIP, qui est un gène cible de NF- κ B, est suffisamment exprimé pour inhiber le recrutement de la caspase-8 au niveau du DISC. L'initiation de l'apoptose sera donc dépendante d'une balance entre l'activation des deux voies de signalisation antagonistes (Ashkenazi and Dixit, 1998).

I.2.2 Les signaux intra-cellulaires

I.2.2.a L'endommagement de l'ADN

L'ADN de la cellule est constamment sujet à des altérations qui peuvent se produire suite à une hydrolyse spontanée des bases ou au cours d'un stress naturel tel que l'inflammation ou suite à un stress d'origine externe, par exemple des génotoxines environnementales ou des drogues anti-cancéreuses. Ces différents stress peuvent résulter en l'apparition de lésions comme les cassures double brin d'ADN ou DSBs (Double strand breaks) reconnues par les protéines kinases ATM (Ataxia telangiectasia mutated) et son

homologue ATR (ATM and Rad3-related). Une fois activées, ces protéines vont activer la protéine p53 par phosphorylation directement ou indirectement via les protéines kinases Chk1 (Checkpoint kinase 1) et Chk2 (Checkpoint kinase 2) ou par stabilisation en inhibant l'ubiquitine ligase Mdm2, régulateur négatif de p53. ATM et ATR vont aussi phosphoryler des protéines de signalisation comme le variant d'histone H2AX qui est un élément des foyers nucléaires caractéristiques des DSBs. L'activation de p53 peut induire soit l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre à la cellule de réparer la lésion et entrer à nouveau dans le cycle cellulaire, soit l'apoptose lorsque le dommage est trop important. p53 est l'effecteur majeur de la réponse apoptotique suite à un endommagement de l'ADN même si d'autres protéines comme E2F-1 peuvent jouer un rôle (Roos and Kaina, 2006).

1.2.2.b Le stress du réticulum endoplasmique

Le RE (Reticulum endoplasmique) est le site principal de mise en conformation des protéines nouvellement synthétisées et de stockage du calcium. La perturbation de l'intégrité du réticulum endoplasmique peut se produire suite à l'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE et conduit à l'activation de la réponse UPR (Unfolded Protein Response). Cette réponse est médiée par 3 protéines senseurs exprimées à la surface du RE : les protéines kinases PERK et IRE1 et le facteur de transcription ATF6. En l'absence de stress, ces protéines sont maintenues inactives par leur association avec la protéine chaperone Grp78/BiP. L'accumulation de protéines mal conformées va conduire à la libération de leur association avec Grp78/BiP. Ces protéines vont alors initier la réponse UPR qui, dans une première phase, vise à réduire l'accumulation des protéines dans le RE et à restaurer les fonctions normales du RE. Cette réponse est caractérisée par la réduction de la traduction protéique, l'augmentation de la translocation et la dégradation des protéines mal conformées et l'augmentation de l'expression des protéines chaperones. Cependant, lorsque le stress est excessif ou maintenu, l'activation de la réponse UPR conduit à l'induction de l'apoptose. Dans ce cas, chacune des protéines senseurs active une voie apoptotique indépendante. Par exemple, Ire1 recrute la protéine adaptatrice TRAF2 (TNF-receptor-associated factor 2) qui peut à son tour recruter et activer la caspase-12 ou la protéine kinase de stress Ask1 (Apoptosis-signal-regulating kinase). PERK induit l'expression du facteur de transcription CHOP qui régule négativement la transcription du gène *bcl-2* (Rao et al., 2004).

L'apoptose peut être induite par la présence de facteurs de mort et/ou l'absence de facteurs de survie dans l'environnement extra-cellulaire. L'induction de l'apoptose peut aussi résulter d'une perturbation de l'homéostasie cellulaire. Cette perturbation est détectée et signalée comme un signal de stress à des effecteurs qui vont permettre l'induction d'une réponse appropriée : soit de s'adapter et de corriger le dommage subi, soit d'induire l'apoptose si le dommage est trop important. Ainsi, un endommagement de l'ADN ou un défaut de la fonction du réticulum endoplasmique sont des signaux de stress qui peuvent conduire à l'induction de l'apoptose. Une forte quantité de certains facteurs de transcription pourrait aussi constituer un signal de stress inducteur d'apoptose. C'est le cas, entre autres, des 3 facteurs de transcription largement étudiés : p53, c-Myc et E2F-1. Le facteur de transcription p53 représente l'effecteur de la réponse au stress génotoxique : il est fortement exprimé suite à un endommagement de l'ADN et une de ses fonctions principales est d'induire l'apoptose. En ce qui concerne le facteur de transcription c-Myc, un fort niveau d'expression n'est pas induit suite à un stress mais constitue le signal de stress. Enfin, le facteur de transcription E2F-1 peut être à la fois un signal de stress et un effecteur de la réponse au stress génotoxique. Nous allons présenter pour chacun de ces trois facteurs de transcription les mécanismes de leur activité apoptotique.

II Le facteur de transcription p53 et l'apoptose

Le facteur de transcription p53 est un des premiers suppresseurs de tumeur qui a été identifié. Sa fonction majeure est de protéger l'organisme de la progression maligne ce qui est illustré par l'observation que l'extinction du gène *p53* dans les souris conduit à l'augmentation de la fréquence d'apparition de tumeurs spontanées (Donehower et al., 1992) (Jacks et al., 1994). De plus, des mutations du gène *p53* sont observées dans la majorité des cancers humains et dans les cancers dans lesquels p53 n'est pas mutée, la voie de signalisation p53 est fréquemment inactivée (Parant and Lozano, 2003). p53 est une des protéines la plus intensément étudiée et appartient à la famille de facteurs de transcription comprenant aussi les facteurs moins étudiés p63 et p73. Au niveau cellulaire, p53 joue un rôle central dans le maintien de l'intégrité génomique en inhibant la prolifération des cellules en réponse à un stress. Une grande variété de signaux de stress tels qu'un endommagement de l'ADN, l'hypoxie, une privation en nucléotides, un stress oxydatif et l'activation oncogénique conduisent à l'activation fonctionnelle de p53. Ces différents stress utilisent différentes voies de signalisation pour activer p53, le plaçant ainsi en position centrale en tant qu'intégrateur des signaux de stress. L'activation de p53 peut être définie expérimentalement par sa stabilisation principalement dû à l'inhibition de son ubiquitine ligase Mdm2 et/ou par modifications post-traductionnelles. Une fois activée, p53 va réguler la transcription de nombreux gènes et induire différentes réponses cellulaires : un arrêt du cycle cellulaire transitoire afin de permettre à la cellule de réparer l'ADN ou l'élimination des cellules surtout par apoptose mais aussi par sénescence afin d'éviter la prolifération et la perpétuation de cellules anormales. p53 présente un intérêt particulier dans le sens où il est un des seuls et peut-être le seul facteur de transcription dont une de ses deux activités principales est d'induire l'apoptose. Ce chapitre a pour but de présenter les principaux mécanismes de l'induction de l'apoptose par p53 ainsi que quelques-uns des mécanismes de régulation de l'activité apoptotique de p53.

II.1 Activité pro-apoptotique du facteur de transcription p53

II.1.1 Mise en évidence de l'activité pro-apoptotique de p53

La capacité de p53 à induire l'apoptose a d'abord été mis en évidence dans des lignées cellulaires. L'expression ectopique de p53 dans une lignée cellulaire de leucémie myéloïde déficiente pour p53 est capable d'induire l'apoptose (Yonish-Rouach et al., 1991) et p53 est nécessaire à l'apoptose induite par un stress génotoxique des cellules MEF (Mouse Emryo Fibroblast) exprimant l'oncogène E1A (Lowe et al., 1993a). L'activité pro-apoptotique de p53 a ensuite été confirmée par l'étude de souris déficientes pour p53. Les thymocytes provenant de ces souris sont résistants à l'apoptose induite par un stress génotoxique mais restent sensibles à l'apoptose induite par d'autres traitements tel que les glucocorticoïdes (Clarke et al., 1993) (Lowe et al., 1993b). L'activité pro-apoptotique de p53 a ensuite été confirmée par de nombreux travaux utilisant des systèmes cellulaires variés et des stress génotoxiques différents placant ainsi p53 comme un régulateur central de l'apoptose suite à un stress génotoxique.

II.1.2 Rôle de l'activité transcriptionnelle de p53 dans son activité pro-apoptotique

De nombreux travaux montrent que l'activité transcriptionnelle de p53 est essentielle à son activité pro-apoptotique. Dans les souris transgéniques exprimant le gène rapporteur *lacZ* sous le contrôle d'un promoteur artificiel contenant 2 sites de liaison p53 différents, l'expression du transgène corrèle parfaitement avec l'accumulation de p53 et avec l'apoptose des tissus radiosensibles suite à une irradiation (Komarova et al., 1997). La démonstration que l'activité transcriptionnelle de p53 est nécessaire à sa fonction apoptotique a été apportée par l'étude de formes de p53 portant des mutations dans le domaine de transactivation, incapables d'induire l'apoptose. La restauration de l'activité transcriptionnelle des mutants de p53 par la substitution du domaine de transactivation de p53 par le domaine de transactivation du transactivateur viral VP16 est suffisante pour restaurer la fonction apoptotique de p53. Ces résultats montrent que l'activité pro-apoptotique de p53 requiert son activité transcriptionnelle plutôt que l'intégrité de son domaine de transactivation *per se* (Attardi et al., 1996). De plus, l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la protéine p53 endogène par introduction de mutations ponctuelles au niveau du gène *p53* sur deux résidus du domaine de transactivation rend résistantes les cellules embryonnaires souches et les thymocytes primaires à l'apoptose induite par des agents endommageant l'ADN (Chao et al., 2000) (Jimenez et al., 2000). Ces

études ont clairement montré que l'activité transcriptionnelle de p53 est requise pour son activité pro-apoptotique. Il faut néanmoins noter que p53 peut induire l'apoptose de façon indépendante de son activité transcriptionnelle (cf chapitre II.4). A ce jour, l'importance de l'activité cytoplasmique versus l'activité transcriptionnelle de p53 dans son activité apoptotique reste débattue même s'il semble que l'activité transcriptionnelle de p53 soit le mécanisme majeur de la fonction apoptotique de p53.

II.2 Les voies apoptotiques ciblées par p53

p53 est considéré comme un facteur de transcription régulant la transcription d'un nombre restreint de gènes cibles à la différence des facteurs de transcription Sp1 ou c-Myc. En effet, une étude combinant la précipitation de facteurs de transcription liés à l'ADN à des puces ADN qui couvrent l'intégralité des chromosomes humains 21 et 22 a identifié 353 et 756 sites de liaison pour Sp1 et c-Myc respectivement et seulement 48 sites de liaison pour p53 (Cawley et al., 2004). Parmi les gènes cibles de p53 identifiés par étude d'expression différentielle à grande échelle, un grand nombre est impliqué dans la régulation de l'apoptose et pour certains de ces gènes, leur contribution dans la réponse apoptotique de p53 a été montrée de façon convaincante (tableau 2).

II.2.1 Famille Bcl-2

Un lien majeur entre l'activité transcriptionnelle de p53 et l'apoptose est la capacité de p53 à activer la transcription des gènes pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.

bax fut le premier gène cible de p53 identifié (Miyashita et al., 1994). Sa contribution dans l'apoptose dépendante de p53 n'est pas universelle puisqu'il est requis pour l'apoptose dépendante de p53 dans la lignée cellulaire de cancer colorectal HCT116 induite par un agent anticancéreux (Zhang et al., 2000) mais pas dans les thymocytes suite à une irradiation (Knudson et al., 1995).

p53 peut aussi activer la transcription des protéines BH3-only Noxa, Puma et Bid. Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis) est un médiateur essentiel de l'apoptose dépendante de p53. En effet, la perte de Puma récapitule le phénotype de résistance à l'apoptose du thymus et du système nerveux en développement après irradiation observé dans les souris déficientes pour p53 (Villunger et al., 2003) (Jeffers et al., 2003). La contribution de Noxa dans l'apoptose dépendante de p53 dépend du type cellulaire puisque Noxa est

partiellement requis pour l'apoptose des cellules épithéliales de la crypte intestinale mais pas pour l'apoptose des thymocytes suite à l'irradiation des souris (Villunger et al., 2003) (Shibue et al., 2003). Finalement, p53 est aussi capable d'induire la transcription de Bid dans certains tissus radiosensibles comme la rate et le colon de façon dépendante de p53. Bid est au moins requis pour l'apoptose des MEF induite par des agents chimiothérapeutiques (Sax et al., 2002).

p53 pourrait aussi réguler l'activité des protéines anti-apoptotiques en activant la transcription de la protéine pro-apoptotique p53AIP1 (p53-regulated Apoptosis-Inducible Protein 1). p53AIP1 est une protéine mitochondriale capable d'interagir avec Bcl-2 et son expression ectopique est suffisante pour induire l'apoptose de différentes lignées cellulaires transformées (Matsuda et al., 2002). Elle est nécessaire pour l'apoptose induite par l'expression ectopique de p53 dans une lignée cellulaire de glioblastome (Oda et al., 2000). De façon très intéressante, l'induction de l'expression de p53AIP1 par p53 requiert la phosphorylation de p53 sur le résidu sérine 46 (Oda et al., 2000) qui n'est possible que lorsque l'expression du gène cible de p53 codant pour le co-facteur de kinase p53DINP1 (p53-dependent damage-inducible nuclear protein 1), est induite (Okamura et al., 2001).

II.2.2 Récepteurs de mort

p53 peut aussi induire la transcription des récepteurs de mort DR4, DR5 et Fas. Le gène codant pour DR5 est le gène cible apoptotique de p53 majoritairement induit après irradiation dans la rate et l'intestin suggérant un rôle important de ce gène dans la réponse p53 dans ces organes (Burns et al., 2001). Quant au récepteur Fas, p53 peut soit activer directement la transcription du gène (Muller et al., 1998) soit induire une relocalisation transitoire à la surface des cellules du récepteur Fas normalement stocké dans le Golgi (Bennett et al., 1998). La capacité de p53 à activer l'expression des récepteurs de mort à la surface des cellules corrèle avec le fait que l'induction de l'apoptose par p53 peut être atténuée par l'inhibition de la caspase-8 (Burns et al., 2001).

| Gène cible de p53 | Type cellulaire | Contribution | Références |
|-------------------------------|--|--------------|---------------------------------|
| Famille Bcl-2 | | | |
| Puma | thymocytes | ++++ | (Villunger et al., 2003) |
| | système nerveux en développement | ++++ | (Jeffers et al., 2003) |
| Noxa | cellules épithéliales de la crypte intestinale | ++ | (Shibue et al., 2003) |
| | thymocytes | - | (Villunger et al., 2003) |
| Bax | HCT116 (lignée de cancer colorectal) | ++++ | (Zhang et al., 2000) |
| | thymocytes | - | (Knudson et al., 1995) |
| Bid | MEF | ++++ | (Sax et al., 2002) |
| p53AIP1/p53DINP1 | | | |
| p53AIP1 | T98G (glioblastomes) | ++++ | (Oda et al., 2000) |
| | MCF7 (lignée de cancer du sein) | ++ | (Matsuda et al., 2002) |
| p53DINP1 | MCF7 (lignée de cancer du sein) | ++ | (Okamura et al., 2001) |
| Récepteurs de mort | | | |
| Fas, CD95, Apo-1 | MEF | ++ | (Bennett et al., 1998) |
| DR5 | Expression dans tissus radiosensibles | ? | (Burns et al., 2001) |
| Machinerie apoptotique | | | |
| Apaf-1 | MEF | ++++ | (Soengas et al., 1999) |
| caspase 6 | Lignées tumorales | ++ | (MacLachlan and El-Deiry, 2002) |
| PIDD | DP-16 (lignée transformée) | ++ | (Lin et al., 2000) |
| Voie de survie | | | |
| PTEN | MEF | ++++ | (Stambolic et al., 2001) |
| Autres | | | |
| PERP | thymocytes | ++++ | (Ihrie et al., 2003) |
| | MEF | - | |

Tableau 2 : Gènes cibles de p53 impliqués dans son activité apoptotique

La contribution des gènes cibles dans l'apoptose dépendante de p53 a été étudiée dans des cellules dans lesquelles l'expression du gène est absente ou diminuée. ++++ : le gène est totalement requis, ++ : le gène est partiellement requis, - : le gène n'est pas requis, ? : non testé.

II.2.3 Autres cibles

perp (p53 apoptosis effector related to PMP-22) appartient à la famille des protéines membranaires PMP-22/gas3. La contribution de PERP dans l'apoptose induite par p53 est dictée par le contexte cellulaire puisque PERP est totalement requis pour l'apoptose des thymocytes suite à une irradiation, partiellement requis pour l'apoptose du cerveau embryonnaire suite à une irradiation, et non requis pour l'apoptose induite par un stress génotoxique des MEF exprimant l'oncogène E1A (Ihrie et al., 2003).

p53 est aussi capable d'activer la transcription de gènes dont les produits font partie de la machinerie apoptotique ce qui pourrait fournir un mécanisme permettant de sensibiliser les cellules à l'apoptose suite à un endommagement de l'ADN. Ainsi, p53 induit l'expression de Apaf-1 (Kannan et al., 2001) (Moroni et al., 2001) (Soengas et al., 1999), de la caspase 6 (MacLachlan and El-Deiry, 2002) ou de PIDD qui fait du partie du complexe activateur de la caspase-2 (Lin et al., 2000).

p53 régule aussi négativement les voies de survie par exemple en induisant l'expression de la phosphatase PTEN qui régule négativement la voie de survie Akt. La perte de PTEN dans les MEF conduisant à l'activation constitutive d'Akt protège les cellules de l'apoptose induite par p53 (Stambolic et al., 2001).

Finalement, alors qu'il agit le plus souvent comme un activateur de la transcription, p53 est aussi capable de réprimer la transcription de gènes anti-apoptotiques comme c'est le cas pour le gène anti-apoptotique *bcl-2* (Wu et al., 2001) ou *galectin-3* (Cecchinelli et al., 2006).

Les gènes cibles de p53 contribuant à son activité apoptotique sont nombreux et couvrent les différentes étapes clef de la voie apoptotique : la famille Bcl-2, les récepteurs de mort ainsi que la machinerie apoptotique. Parmi les différents gènes cibles, aucun ne peut être défini comme le médiateur unique de l'apoptose dépendante de p53 puisque la perte d'aucun de ces gènes n'est suffisante pour récapituler complètement le phénotype des cellules ou souris déficientes pour p53. L'ensemble des études suggère que chacun des gènes cibles va contribuer à l'apoptose dépendante de p53 de façon spécifique au type cellulaire ou au stimulus ce qui peut constituer une stratégie pour assurer l'induction d'une apoptose rapide et efficace quel que soit le type cellulaire, le stimulus ou les conditions environnementales. Ceci est notamment illustré par le fait que leur induction par p53 est spécifique au type cellulaire et

corrèle avec la radiosensibilité de l'organe : Noxa et Puma sont induit dans le thymus, Bid dans le colon et p21 dans le foie (Fei et al., 2002).

II.3 Mécanismes régulant la sélectivité de l'activité transcriptionnelle de p53

L'étude de différents mutants de p53 a permis de montrer que l'induction de la réponse apoptotique est la conséquence directe de l'activation d'un programme d'expression distinct de celui activé lors de l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire (Ludwig et al., 1996) (Friedlander et al., 1996). Une question fascinante se pose alors : quels sont les mécanismes qui dictent l'induction par p53 de la transcription de gènes cibles apoptotiques et pas des autres gènes cibles (figure 5) ? Plusieurs paramètres non exclusifs et probablement coopératifs ont été décrits.

II.3.1 Modèle quantitatif

L'observation initiale que la quantité de p53 est déterminante dans le choix de la réponse biologique de p53 vient d'une étude utilisant les cellules Saos déficientes pour p53 et exprimant p53 sous le contrôle d'un promoteur inducible par la tétracycline. L'induction maximale de l'expression de p53 induit l'apoptose des cellules alors que l'induction d'un niveau modéré induit l'arrêt des cellules en phase G1, démontrant clairement que la réponse p53 des cellules Saos est dictée par la quantité de protéine cellulaire (Chen et al., 1996). Ce modèle (figure 5a) basé sur la quantité de p53 suppose deux principes : 1) l'accumulation de la protéine p53 dépend de la sévérité de l'endommagement de l'ADN subi par la cellule, 2) les promoteurs du sous-groupe de gènes régulant l'arrêt du cycle cellulaire possèdent des sites de liaison de forte affinité alors que les promoteurs du sous-groupe de gènes pro-apoptotiques possèdent des sites de liaison de faible affinité. Dans le contexte chromatinien, ce modèle n'est que partiellement vrai puisque p53 se lie avec une forte affinité au promoteur des gènes *p21*, *mdm2* mais aussi au promoteur du gène pro-apoptotique *puma* (Kaeser and Iggo, 2002).

II.3.2 Influence du contexte cellulaire

Le choix de la réponse p53 est aussi déterminé par le type cellulaire (figure 5b). Par exemple, en réponse à un stress génotoxique, p53 va induire l'apoptose des thymocytes (Clarke et al., 1993) (Lowe et al., 1993b) et l'arrêt du cycle cellulaire des fibroblastes (Lowe et al., 1993a). La présence de signaux additionnels endogènes ou exogènes peut influencer la

réponse p53. Par exemple, un signal oncogénique stimulant la prolifération cellulaire oriente la réponse p53 de fibroblastes primaires vers l'induction de l'apoptose au lieu de l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à une irradiation (Lowe et al., 1993a) alors que la présence de cytokines dans l'environnement extra-cellulaire peut inhiber l'apoptose induite par p53 (Yonish-Rouach et al., 1993).

II.3.3 Modèle de co-facteurs

De plus en plus d'études suggèrent que le choix de la réponse p53 est aussi déterminée par la présence de co-facteurs qui favoriseraient la transcription de gènes cibles spécifiques (figure 5c).

Certains co-facteurs sont requis pour orienter la réponse p53 vers l'induction de l'apoptose comme les protéines de la famille ASPP ou les autres membres de la famille de p53 comme p73 ou p63. Ces co-facteurs favorisent l'activation de la transcription des gènes pro-apoptotiques par p53 en stimulant la liaison de p53 spécifiquement aux promoteurs des gènes pro-apoptotiques mais pas à ceux des gènes régulant le cycle cellulaire (Samuels-Lev et al., 2001) (Flores et al., 2002). D'autres co-facteurs de p53 vont à l'inverse favoriser le choix de la réponse p53 vers l'arrêt du cycle cellulaire versus l'induction de l'apoptose. C'est le cas du facteur Hzf, lui même cible de p53, qui permet le recrutement de p53, avec Hzf, sur les promoteurs des gènes régulant le cycle cellulaire et pas des gènes pro-apoptotiques (Das et al., 2007). Le facteur de transcription YB1 est un autre co-facteur requis pour l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire par p53 en induisant la répression sélective de la transcription dépendante de p53 des promoteurs *bax* et *noxa* alors qu'il n'a pas d'effet sur celle de *p21* (Homer et al., 2005).

II.3.4 Modèle des modifications post-traductionnelles

La protéine p53 peut subir diverses modifications post-traductionnelles incluant la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination, et la sumoylation. Ces modifications vont influencer son activité transcriptionnelle et permettre la transcription sélective de certains gènes cibles (figure 5d). Par exemple, la phosphorylation de p53 sur la sérine 46 est requise pour l'activité apoptotique de p53 car elle est nécessaire à l'induction de la transcription du gène pro-apoptotique *p53aip1* (Oda et al., 2000) ainsi qu'à la répression du gène anti-apoptotique *galectin-3* (Cecchinelli et al., 2006) mais pas d'autres gènes cibles de p53 tels que *p21*, *noxa* ou *pig3*. p53 est aussi phosphorylée sur les résidus 15 et 20 (équivalent aux sérines

18 et 23 chez la souris) suite à un stress génotoxique et ces deux résidus sont essentiels à l'activité apoptotique de p53. En effet, le groupe de Y. Xu a généré des souris dont le gène endogène *p53* est muté ponctuellement au niveau de ces deux résidus. Cette forme de p53 est toujours capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire des MEF après irradiation mais pas l'apoptose des thymocytes (Chao et al., 2006).

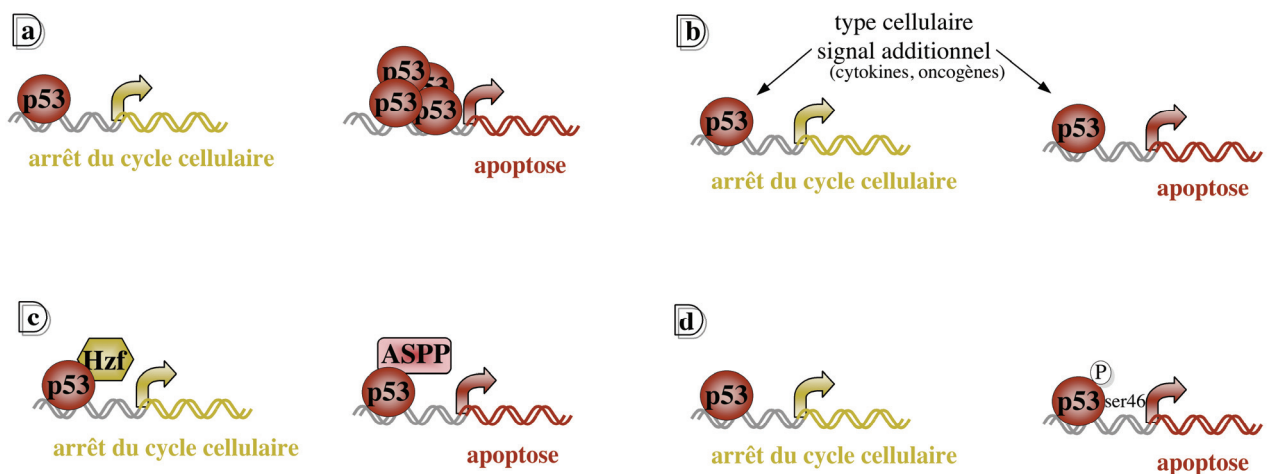


Figure 5 : Modèles de régulation de la sélectivité transcriptionnelle de p53 vis-à-vis de ses gènes cibles

II.4 Activité apoptotique indépendante de la transcription

Plus de 1 200 mutations non-sens distinctes du gène *p53* ont été identifiées dans les tumeurs. La plupart des mutations sont situées dans le domaine de liaison à l'ADN de p53 et inhibent son activité pro-apoptotique suggérant que l'activité transcriptionnelle de p53 est le mécanisme essentiel de son activité apoptotique. Cependant, une étude comparative de 179 mutants de p53 n'a pas montré de corrélation significative entre leur capacité à induire l'apoptose et leur capacité à activer la transcription de gènes cibles suggérant que l'activité transcriptionnelle de p53 ne joue pas toujours le rôle majeur dans l'apoptose induite par p53 (Kakudo et al., 2005).

La possibilité d'une activité apoptotique de p53 indépendante de son activité transcriptionnelle a été initialement suggérée par l'observation que p53 est capable d'induire

l'apoptose en présence d'inhibiteur de la transcription ou de la traduction (Caelles et al., 1994). Depuis, différentes études ont confirmé une activité apoptotique d'une forme cytoplasmique de p53 (Chipuk et al., 2004) (Leu et al., 2004). Son importance dans des conditions physiologiques a été récemment apportée par l'identification d'une petite molécule, PFT μ , qui inhibe spécifiquement l'apoptose induite par p53 des cellules Saos ou des thymocytes primaires sans affecter l'activité transcriptionnelle de p53 (Strom et al., 2006).

Une étude a montré que p53 peut induire l'apoptose en absence de synthèse de protéine *de novo* par relocalisation transitoire du récepteur de mort Fas, normalement stocké dans le Golgi, à la surface des cellules et ainsi permettre l'activation de la voie apoptotique extrinsèque (Bennett et al., 1998). Ce mécanisme ne semble pas être le mécanisme majeur puisque plusieurs études indépendantes montrent que p53 peut agir comme une protéine BH3-only. En effet, p53 est capable d'interagir directement avec Bax (Chipuk et al., 2004) ou Bak (Leu et al., 2004) et d'induire leur oligomérisation vraisemblablement en les libérant de leur association avec les protéines anti-apoptotiques comme c'est le cas pour le complexe Bak-Mcl-1 (Leu et al., 2004). p53 est également capable d'interagir avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-X ou Bcl-2 (Strom et al., 2006) (Chipuk et al., 2005) et l'inhibition de la formation de ces complexes est associée à l'inhibition de l'activité apoptotique mitochondriale de p53 (Strom et al., 2006).

p53 peut donc induire l'apoptose de façon indépendante de son activité transcriptionnelle. Il est concevable qu'une telle activité soit utilisée de concert avec des mécanismes dépendants de l'activité transcriptionnelle de p53 permettant ainsi de contrôler la cinétique et/ou l'efficacité de l'induction de l'apoptose (figure 6). Il est possible que p53 soit accumulé dans un premier temps à la mitochondrie où, par association avec les protéines anti-apoptotiques, il pourrait libérer rapidement les BH3-only de leur association inhibitrice avec ces protéines anti-apoptotiques. Dans un second temps, p53 serait accumulé dans le noyau où il induirait alors l'expression de gènes pro-apoptotiques (Erster et al., 2004). Un autre modèle a été proposé où p53 s'accumule à la fois dans le cytoplasme où il est séquestré par Bcl-X et à la fois dans le noyau. La protéine p53 nucléaire va activer la transcription de gènes pro-apoptotiques dont *puma*. Une fois exprimé, Puma va libérer la protéine p53 cytoplasmique de son association inhibitrice avec Bcl-X et p53 peut alors engager le signal de mort par activation de Bak/Bax et induire le relargage du cytochrome c (Chipuk et al., 2005).

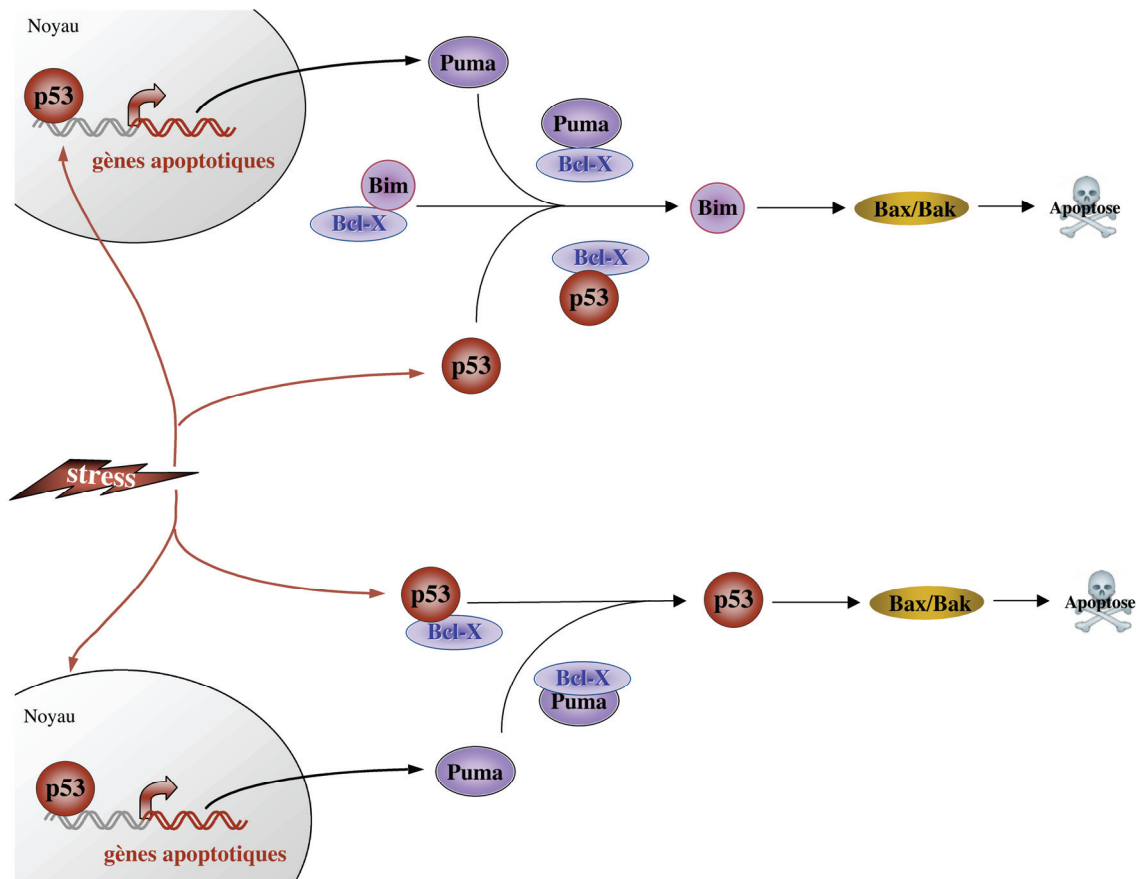


Figure 6 : Modèles combinant l'activité nucléaire et cytoplasmique de p53 dans son activité apoptotique

En conclusion, l'activité apoptotique de p53 est finement régulée par l'intensité et la nature du stress, le contexte cellulaire, l'environnement extra-cellulaire et le type cellulaire. Cette fine régulation permet la transcription spécifique de gènes cibles apoptotiques de p53 responsables de l'induction de l'apoptose. En plus d'une activité apoptotique transcriptionnelle clairement établie, p53 peut aussi induire l'apoptose de façon indépendante de son activité transcriptionnelle. En utilisant ces différents mécanismes, p53 est capable de cibler l'ensemble des voies apoptotiques ce qui le rend efficace pour induire l'apoptose dans toutes les cellules de l'organisme.

III Le facteur de transcription c-Myc et l'apoptose

c-Myc appartient à la famille des facteurs de transcription composée des 2 autres oncoprotéines N-Myc et L-Myc qui sont beaucoup moins étudiées. c-Myc s'associe avec son partenaire Max pour lier l'ADN au niveau des sites E-box et le dimère recrute divers cofacteurs incluant des HAT (Histones acétyltransférases) et des ATPases pour activer la transcription (figure 7). Le dimère peut aussi réprimer la transcription de gènes cibles spécifiques en inhibant des activateurs transcriptionnels tels que Miz. Max est aussi capable de former des homodimères ou des hétérodimères avec les protéines de la famille Mad ou Mnt. De la même façon que c-Myc, les protéines Mad et Mnt doivent se dimériser avec Max pour lier les sites E-box et réprimer la transcription en recrutant les co-répresseurs Sin3 ou HDAC (Histones déacétylases). Ainsi, les dimères Mad-Max sont capables d'antagoniser la plupart des fonctions de c-Myc-Max par compétition de liaison à l'ADN.

Le facteur de transcription c-Myc est un régulateur central d'un grand nombre de processus cellulaires ce qui corrèle avec l'observation que sa délétion dans les cellules souches embryonnaires conduit à une létalité embryonnaire au jour 9,5-10,5 du développement. Le facteur de transcription c-Myc est un régulateur transcriptionnel que l'on peut qualifier de général puisqu'il régule la transcription de gènes impliqués dans de nombreux processus cellulaires comme la progression du cycle cellulaire, la croissance cellulaire, la biogénèse des ribosomes, le métabolisme et l'apoptose. Néanmoins, une de ses fonctions biologiques clef est de contrôler la croissance cellulaire et d'activer la prolifération. Son expression est corrélée avec la prolifération cellulaire : dans les cellules quiescentes, l'expression de c-Myc est indétectable alors qu'elle est rapidement induite suite à une stimulation mitogénique.

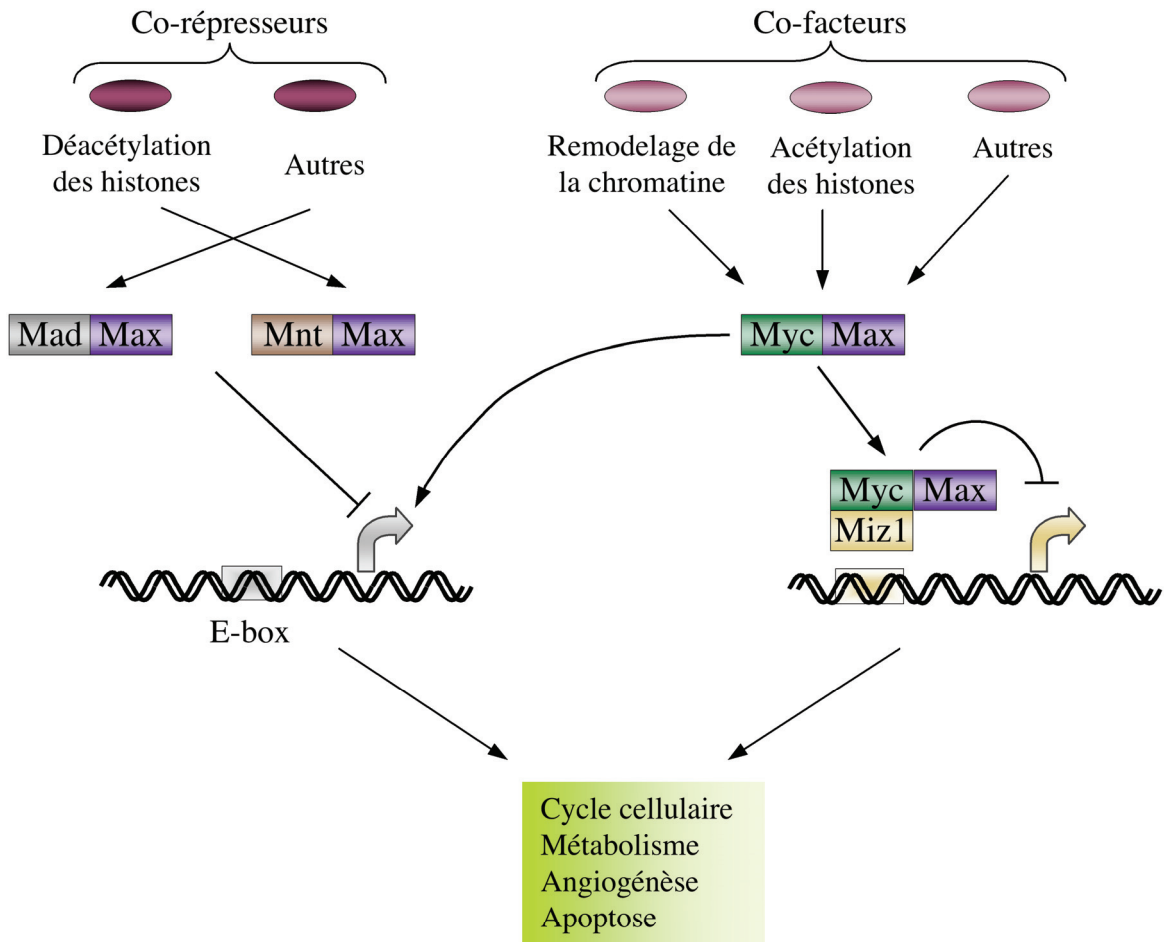


Figure 7 : La régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur c-Myc

III.1 c-Myc apporte des signaux contradictoires

En accord avec sa fonction proliférative, l'expression ectopique de c-Myc est suffisante pour stimuler la prolifération des fibroblastes rendus quiescents par privation en facteurs de croissance (Evan et al., 1992) (Hermeking and Eick, 1994). Cependant, l'expression ectopique de c-Myc induit aussi leur apoptose (Evan et al., 1992) (Hermeking and Eick, 1994) et c-Myc sensibilise les cellules vis-à-vis de nombreux stimuli apoptotiques (Hueber et al., 1997) (de Alboran et al., 2004). Ces observations ont apporté la notion d'un couplage entre la prolifération et l'apoptose d'abord pour c-Myc mais aussi pour d'autres oncoprotéines par la suite. Par contre, l'induction de l'apoptose par c-Myc est inhibée tant que des facteurs de survie dans l'environnement cellulaire délivrent des signaux anti-apoptotiques (Harrington et al., 1994). L'activation de c-Myc est observée dans un grand nombre de tumeurs et est considérée, au moins dans certains cas, comme un événement nécessaire à l'initiation de la transformation cellulaire vraisemblablement en rendant la prolifération des cellules indépendante à la présence des facteurs mitogéniques. Cependant, puisque l'activation de c-Myc induit l'apoptose, la survie de cellules ayant acquis une activation de c-Myc dépendra alors soit d'un apport continu de facteurs de survie, soit de l'acquisition d'une résistance à l'apoptose. Ce dernier principe a d'abord été vérifié par la mise en évidence d'une coopération entre c-Myc et Bcl-2 dans la tumorigénèse et a été ensuite généralisé pour l'inactivation de d'autres voies apoptotiques. Le modèle de souris transgéniques E μ -Myc a largement été utilisé pour étudier le rôle de c-Myc dans la transformation. Dans ce modèle, l'expression de c-Myc est sous le contrôle de l'enhancer de la chaîne lourde des immunoglobines et donc restreinte aux lymphocytes B. En utilisant ce modèle, des études ont montré que l'inhibition de l'apoptose par la surexpression de Bcl-2 (Strasser et al., 1990) (Eischen et al., 2001b) ou l'inhibition de la voie p53 (Eischen et al., 1999) (Wendel et al., 2004) accélère le développement des lymphomes. L'ensemble de ces observations a été vérifié dans un modèle très élégant de souris transgéniques adultes pour lesquelles l'expression de c-Myc peut être induite dans différents tissus. Dans les cellules β du pancréas, l'induction de l'expression ectopique de c-Myc stimule leur prolifération suivi de l'induction d'une apoptose massive. La co-expression de Bcl-X dans ces cellules inhibe l'activité apoptotique de c-Myc et conduit à l'apparition de tumeurs (Pelengaris et al., 2002). Par contre, dans les kératinocytes en cours de différenciation terminale, l'expression de c-Myc seul est un événement suffisant à la transformation (Pelengaris et al., 1999). Dans ce cas, l'absence d'apoptose est expliquée par la présence d'un excès de signaux de survie reçus par les kératinocytes. Ces études montrent ainsi

que les conséquences biologiques d'un fort niveau de c-Myc dépendront du type cellulaire et/ou de l'environnement extra-cellulaire.

III.2 Mécanismes de l'apoptose induite par c-Myc

c-Myc peut induire l'apoptose par deux voies de signalisation : la voie dépendante de p53 et la voie indépendante de p53. L'activité apoptotique de c-Myc requiert sa dimérisation avec Max (Amati et al., 1993) et sa liaison à l'ADN (Evan et al., 1992) suggérant que l'induction de l'apoptose par c-Myc requiert son activité transcriptionnelle. Cependant, ce n'est pas très clair puisque, au moins pour certains effecteurs de l'apoptose induite par c-Myc, il semble qu'ils ne soient pas des gènes cibles directs de c-Myc. Dans ce chapitre, nous détaillerons les effecteurs de l'apoptose induite par c-Myc et leur mécanisme d'activation lorsqu'il est connu.

III.2.1 Apoptose dépendante de p53

La voie Arf-p53 est définie comme la voie apoptotique majeure utilisée par c-Myc pour induire l'apoptose (figure 8). Lorsqu'elle est exprimée, la protéine Arf interagit et séquestre l'ubiquitine ligase Mdm2 bloquant ainsi la dégradation de p53. L'expression de Arf et de p53 est rapidement induite suite à l'expression ectopique de c-Myc et est au moins partiellement requise pour l'apoptose induite par c-Myc des MEF (Zindy et al., 1998), des cellules pre-B (Eischen et al., 1999) et des cellules de la peau (Russell et al., 2002). Le mécanisme par lequel c-Myc induit l'expression de Arf est encore mal connu. Il a été suggéré que c-Myc pouvait conduire à l'activation de la transcription de Arf via E2F-1 (Leone et al., 1997), E2F-1 étant un activateur direct de la transcription de Arf (Bates et al., 1998). Ceci corrèle avec l'observation que E2F-1 est requis pour l'induction de l'apoptose par c-Myc des MEF quiescents mais pas pour la stimulation de leur prolifération (Leone et al., 2001). Cependant, la contribution de E2F-1 dans l'activité apoptotique de c-Myc pourrait être spécifique à un type cellulaire ou dépendante des conditions expérimentales puisque dans les MEF exprimant c-Myc ou dans les cellules pré-B issues de souris E μ -Myc, la perte de E2F-1 n'affecte pas le niveau d'apoptose induite par c-Myc (Baudino et al., 2003).

c-Myc induit aussi l'accumulation de p53 de façon indépendante de Arf en induisant la phosphorylation de p53 par la kinase ATM (figure 8) (Lindstrom and Wiman, 2003) (Pusapati

et al., 2006) et en absence de ATM, l'induction de l'apoptose des cellules de la peau induite par c-Myc est partiellement inhibée (Pusapati et al., 2006).

Ces deux mécanismes utilisés par c-Myc pour activer et induire l'accumulation de p53 ne sont pas exclusifs et peuvent coopérer pour induire efficacement l'apoptose des cellules puisque l'inhibition de l'un de ces mécanismes protège seulement partiellement l'apoptose des cellules de la peau par c-Myc (Russell et al., 2002) (Pusapati et al., 2006).

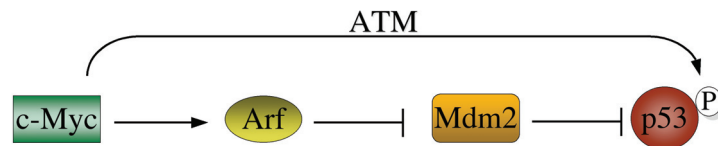


Figure 8 : Mécanismes d'activation de p53 par c-Myc

III.2.2 Apoptose indépendante de p53

L'expression de c-Myc sensibilise les cellules à l'apoptose par perturbation directe de l'intégrité mitochondriale qui conduit au relarguage du cytochrome c de façon indépendante de p53 et des caspases (Juin et al., 1999). Même s'il a été proposé que le gène *cytochrome c* pouvait être une cible directe de c-Myc (Morrish et al., 2003), c-Myc agit au niveau de la mitochondrie principalement en contrôlant le ratio et/ou l'activité des différentes protéines Bcl-2 (figure 9).

III.2.2.a Famille Bcl-2

La protéine pro-apoptotique Bax semble avoir un rôle critique dans l'apoptose induite par c-Myc puisque les MEF déficientes pour Bax sont résistantes à l'apoptose induite par c-Myc (Mitchell et al., 2000) (Juin et al., 2002). De façon surprenante, il semble que c-Myc cible spécifiquement Bax puisque la protéine Bak, qui est pourtant fonctionnellement redondante à Bax, n'est pas requise pour l'apoptose induite par c-Myc (Juin et al., 2002). Myc pourrait activer Bax par activation directe de sa transcription (Mitchell et al., 2000) ou par un mécanisme indirect probablement via l'activation des protéines BH3-only et/ou l'inhibition des protéines anti-apoptotiques (Juin et al., 2002).

Un des médiateurs essentiels de l'activité apoptotique de c-Myc qui pourrait être responsable de l'activation de Bax est la protéine BH3-only Bim. Dans le modèle de souris transgéniques Eμ-Myc, Bim est requise pour l'apoptose des cellules lymphocytaires B pré-

cancéreuses induite par c-Myc (Egle et al., 2004). Ces observations ont été vérifiées dans un modèle très élégant de transfert adoptif de cellules souches hématopoïétiques exprimant la forme sauvage de c-Myc ou deux mutants fréquemment exprimés dans les lymphomes. Alors que ces deux mutants de c-Myc sont toujours capables de stimuler la prolifération, ils sont incapables d'induire l'expression de Bim et présentent un défaut d'apoptose (Hemann et al., 2005). De plus, ces mutants conduisent au développement de lymphomes en présence de la voie p53 fonctionnelle suggérant que c-Myc peut induire l'apoptose au moins par deux voies apoptotiques indépendantes.

L'activation de Bax suite à l'expression de c-Myc pourrait aussi résulter de la diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-X ou Bcl-2. L'expression ectopique de c-Myc sensibilise les cellules hématopoïétiques à l'apoptose induite par privation en IL-3 en induisant la diminution de l'expression de Bcl-2 (Eischen et al., 2001a). De la même façon, c-Myc sensibilise les MEF à l'apoptose induite par un endommagement de l'ADN en induisant une diminution de l'expression de Bcl-X (Maclean et al., 2003). La surexpression de Bcl-2 ou Bcl-X dû à un défaut de l'activité répressive de Myc est observée dans un grand nombre de lymphomes provenant de souris transgéniques E μ -Myc et est indépendante de l'inactivation de la voie Arf/p53 indiquant que ces deux voies apoptotiques sont utilisées par c-Myc de façon indépendante (Eischen et al., 2001b).

III.2.2.b Autres voies

En plus de sa capacité à altérer la balance des membres de la famille Bcl-2, c-Myc peut aussi activer l'engagement des récepteurs de mort. La première étude établissant un lien entre c-Myc et les récepteurs de mort a été réalisée dans des fibroblastes murins quiescents pour lesquels l'apoptose induite par c-Myc requiert l'activation de la voie apoptotique de Fas-FasL (Hueber et al., 1997). L'expression de c-Myc sensibilise les cellules à l'apoptose induite par TRAIL spécifiquement via le récepteur DR5 vraisemblablement par activation indirecte de la transcription du gène codant pour le récepteur DR5 (Wang et al., 2004) ou par répression directe de la transcription du gène codant pour FLIP (Ricci et al., 2004).

c-Myc peut également inhiber la voie de survie NF- κ B et par conséquent l'expression de gènes cibles de NF- κ B comme la protéine anti-apoptotique A1 (You et al., 2002) ou encore l'enzyme anti-oxydante MnSOD (Manganèse superoxide dismutase) qui est suffisante pour protéger les cellules de l'apoptose induite par c-Myc (Tanaka et al., 2002).

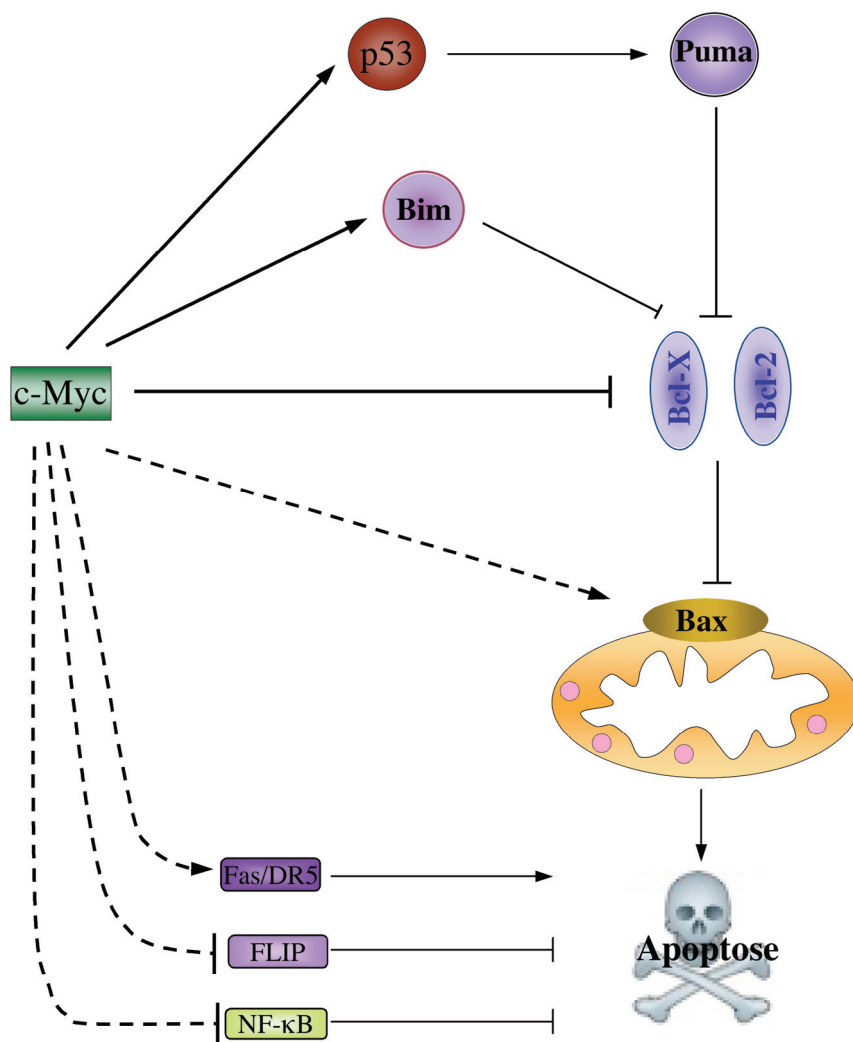


Figure 9 : Modèles de la régulation de l'apoptose par c-Myc

c-Myc peut utiliser plusieurs voies apoptotiques pour sensibiliser les cellules à l'apoptose : la voie Arf-p53 ou la modulation des protéines de la famille Bcl-2 par des mécanismes encore inconnus (figure 9). Il est clair que c-Myc utilise ces voies de façon indépendante puisque l'inactivation d'une seule de ces voies est suffisante pour l'induction de la transformation par c-Myc. De plus, c-Myc pourrait induire l'apoptose de façon indépendante de son activité transcriptionnelle. En effet, c-Myc ne semble pas capable d'activer directement la transcription du gène *bim* (Egle et al., 2004) et sa capacité à réprimer la transcription du gène *bcl-x* requiert la synthèse de protéines *de novo* (Eischen et al., 2001b). Enfin, parmi les nombreux gènes qui répondent transcriptionnellement à une dérégulation de c-Myc identifiés entre autres par des approches d'étude d'expression génique à grande échelle

(<http://www.myc-cancer-gene.org/site/mycTargetDB.asp>), aucun d'entre eux n'a été démontré à ce jour comme le médiateur unique responsable de l'apoptose induite par c-Myc. Récemment, des travaux ont montré que c-Myc est un régulateur de la structure de la chromatine et de l'intégrité génomique suggérant que la dérégulation de l'expression de c-Myc conduit à l'apoptose plutôt par induction d'un endommagement de l'ADN que par transcription directe de gènes apoptotiques.

III.3 Hypothèse d'une activité apoptotique non transcriptionnelle

III.3.1 Association de c-Myc à une grande fraction du génome

L'analyse de la liaison à l'ADN de c-Myc dans le génome a révélé de façon inattendue que le nombre de sites liés par c-Myc *in vivo* est exceptionnellement grand. Il a été estimé à environ 25 000 dans le génome humain (Cawley et al., 2004). Parmi les promoteurs des gènes annotés contenant au moins un site de liaison consensus à c-Myc, c-Myc est lié à environ 50% d'entre eux ce qui représente, par extrapolation, 11% de tous les promoteurs dans le génome (Fernandez et al., 2003). Par contre, en condition de surexpression, c-Myc est lié à tous les promoteurs ayant au moins un site consensus, ce qui représente 25% de tous les promoteurs du génome, ainsi qu'à une partie des promoteurs ne contenant pas de sites consensus (Fernandez et al., 2003). Par conséquent, c-Myc aurait le potentiel de réguler la transcription d'une fraction très significative de la totalité des gènes d'un organisme. Il est vraisemblable que la liaison de c-Myc ait été sous-estimée dans cette étude puisque l'analyse n'a été réalisée en ne tenant compte que du site de liaison consensus et pas des autres sites de liaison à Myc. De plus, l'étude n'a pris en compte que les gènes annotés. Or, une autre étude a montré que c-Myc est lié au niveau des promoteurs de gènes annotés mais également en 3' de gènes annotés, qui pourraient correspondre à la région promotrice d'ARN non codants, et au niveau de régions dépourvues de toute annotation (Cawley et al., 2004).

De façon étonnante, parmi une vingtaine de gènes pour lesquels la liaison de c-Myc au niveau du promoteur a été observée, il n'existe pas de corrélation évidente entre la liaison de c-Myc et la régulation de la transcription (Fernandez et al., 2003). Rétrospectivement, Patel et ses collègues ont recherché les gènes liés à c-Myc dans la base de données des gènes pour lesquels une réponse transcriptionnelle à c-Myc a été expérimentalement montrée. Cette analyse a révélé que, pour un grand nombre de gènes liés à c-Myc, il n'y a pas de corrélation entre la liaison de c-Myc et la transcription du gène (Patel et al., 2004).

En conclusion, l'ensemble de ces observations suggèrent que c-Myc pourrait avoir d'autres rôles que celui de réguler la transcription des gènes.

III.3.2 Induction d'un endommagement de l'ADN

Un des rôles de c-Myc proposé est de réguler l'intégrité génomique. Dans ce cas, il est concevable qu'une dérégulation de son expression conduise à une perturbation de la structure de l'ADN ce qui pourrait être à l'origine de l'apoptose des cellules. Une étude a montré que l'expression transitoire de c-Myc dans les fibroblastes de rat est suffisante pour induire une instabilité génomique et la transformation des cellules (Felsher and Bishop, 1999). Récemment, plusieurs études suggèrent que c-Myc induit l'apoptose en induisant un endommagement de l'ADN. En effet, l'expression de c-Myc induit la formation de foyers nucléaires caractéristiques d'une réponse à une cassure d'ADN double brin (Pusapati et al., 2006) (Karlsson et al., 2003) (Vafa et al., 2002). Puisque ces foyers sont aussi induits par c-Myc dans des fibroblastes quiescents, l'induction d'un endommagement de l'ADN ne résulte pas d'un défaut du processus de réplication mais bien de l'expression de c-Myc *per se* (Vafa et al., 2002) (Karlsson et al., 2003). Un lien direct entre l'induction d'un endommagement de l'ADN et l'activité apoptotique de c-Myc a été proposé et implique la production de radicaux oxygénés (Vafa et al., 2002).

La détection de cassures d'ADN doubles brin est assurée par ATM qui va, entre autres, phosphoryler p53 sur la sérine 15 conduisant ainsi à son accumulation et à l'activation de la réponse apoptotique. L'hypothèse selon laquelle c-Myc induirait l'apoptose en perturbant l'intégrité génomique est en accord avec les études qui montrent une contribution de la voie p53 dans l'apoptose induite par c-Myc (cf paragraphe III.2.1). Le lien direct a été démontré par l'observation que l'induction des foyers caractéristiques de cassures d'ADN double brin ainsi que l'induction de l'apoptose par c-Myc sont accompagnées de la phosphorylation de p53 sur la sérine 15 (Vafa et al., 2002).

A un niveau physiologique, le facteur de transcription c-Myc est lié à une grande fraction du génome ce qui corrèle avec le fait que c-Myc régule un grand nombre de processus biologiques dont la prolifération et la croissance cellulaire. Par contre, à un fort niveau d'expression, c-Myc sensibilise les cellules à l'apoptose vis-à-vis d'une multitude de signaux de stress ce qui représente un mécanisme de défense contre une prolifération cellulaire

inappropriée. c-Myc peut utiliser de multiples mécanismes indépendants pour sensibiliser les cellules à l'apoptose dont la voie p53 et les protéines de la famille Bcl-2. Il est possible que l'activation de ces différentes voies par c-Myc soit le résultat de la transcription de gènes cibles apoptotiques. Cependant, malgré le grand nombre de publications sur c-Myc, la contribution de l'activité transcriptionnelle de c-Myc dans son activité apoptotique n'est toujours pas clairement établie. Un nombre grandissant d'évidences suggèrent que c-Myc pourrait induire l'apoptose de façon indépendante de son activité transcriptionnelle. Dans ce contexte, la liaison de c-Myc à l'ADN pourrait avoir une fonction de régulateur de l'intégrité génomique plutôt que de régulateur transcriptionnel et un fort niveau de c-Myc induirait un endommagement de l'ADN conduisant à l'apoptose.

IV Le facteur de transcription E2F-1 et l'apoptose

Le facteur de transcription E2F-1 est le membre le plus étudié de la famille des facteurs de transcription E2F (E2F-1 à 8) qui sont des régulateurs essentiels de la progression du cycle cellulaire, en particulier de la transition G1-S. Les protéines E2F-1 à -6 requièrent la dimérisation avec une des protéines DP (DP1, DP2/3, DP4) pour former un facteur de transcription fonctionnel qui lie l'ADN avec grande affinité. Leur activité transcriptionnelle, sauf pour E2F-6, est contrôlée de manière dépendante du cycle cellulaire, principalement par association avec les membres de la famille des protéines à poche : pRb, p107 et p130. Les facteurs E2F-1, -2, -3a interagissent uniquement avec pRb et sont regroupés au sein d'un même groupe.

L'association de E2F avec pRb est contrôlée par la régulation cyclique de la phosphorylation de pRb par les complexes cyclin/cdk (cyclin-dépendant kinases) (figure 10). En phase G0 et au début de la phase G1 du cycle cellulaire, la forme non phosphorylée de pRb lie E2F. Le complexe pRb-E2F peut agir soit comme un répresseur passif en bloquant le recrutement de la machinerie de transcription basale par E2F soit comme un répresseur actif en recrutant des facteurs modifiant la chromatine ce qui induit sa « fermeture ». La stimulation des cellules par des facteurs mitogéniques active séquentiellement les complexes cdk4/6-cyclineD puis cdk2-cyclineE qui phosphorylent pRb en fin de phase G1. La forme phosphorylée de pRb se dissocie de E2F et E2F ainsi libéré va alors conduire à l'activation de la transcription d'un grand nombre de gènes notamment les gènes essentiels pour la réplication de l'ADN. A l'inverse, de nombreux signaux inhibiteurs de la croissance cellulaire par exemple le TGF- β (Transforming growth factor) ou la voie de signalisation p53/p21 bloquent la phosphorylation de pRb et inhibent l'activation de la transcription des gènes par E2F. Ainsi, pRb, et donc la régulation subséquente de l'activité de E2F, est un intégrateur des différents signaux négatifs et positifs de la croissance cellulaire afin de dicter à la cellule si elle doit se diviser ou non.

La protéine pRb est le suppresseur de tumeur, après p53, le plus fréquemment inactivé dans les cancers par mutation ou par augmentation de l'activité des Cdk qui phosphorylent pRb. Dans tous les cas, l'inactivation de pRb confère aux cellules un avantage prolifératif dû à la dérégulation de l'activité de E2F-1.

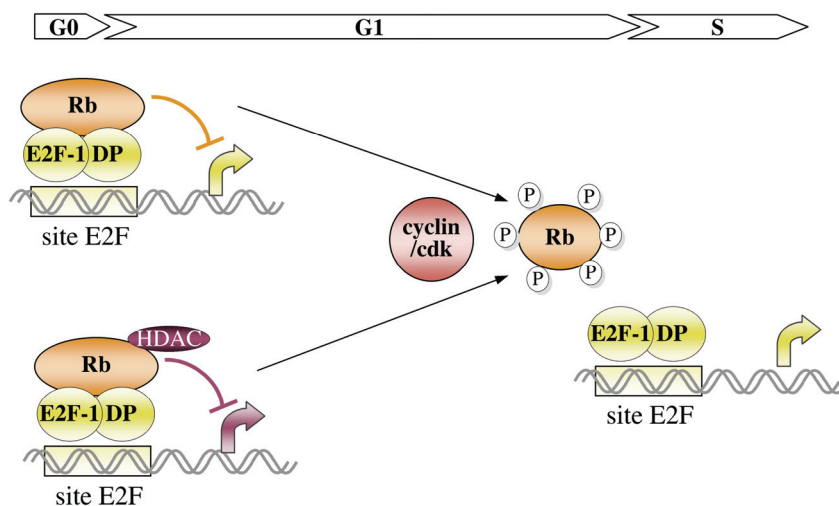


Figure 10 : Régulation de l'activité transcriptionnelle de E2F-1 par pRb

IV.1 E2F-1 est un oncogène et un suppresseur de tumeur

Etant donné la fréquence d'inactivation de pRb dans les cancers, le rôle de E2F-1 dans la transformation a été étudié. Ainsi, le modèle de double signal initialement proposé pour c-Myc qui couple les signaux prolifératif à l'apoptose est aussi vrai pour E2F-1. En effet, l'expression ectopique de E2F-1 est suffisante pour provoquer l'entrée des cellules quiescentes en phase S de façon indépendante des facteurs mitogéniques suivi de l'apoptose des cellules (Qin et al., 1994). L'activité apoptotique de E2F-1 est aussi inhibée par des signaux anti-apoptotiques comme la voie PI3K/Akt (Hallstrom and Nevins, 2003). Néanmoins, l'activité apoptotique de E2F-1 est différente de celle décrite pour c-Myc. En effet, E2F-1 peut aussi fonctionner comme un suppresseur de tumeur puisque la délétion du gène *e2f-1* dans les souris conduit à l'apparition de tumeurs dans différents tissus, principalement dans les organes reproducteurs et lymphoïdes (Yamasaki et al., 1996) (Field et al., 1996) en partie dû à un défaut d'apoptose des thymocytes (Field et al., 1996). De plus, E2F-1 est aussi un effecteur de la réponse apoptotique induite par un endommagement de l'ADN. En effet, dans différentes lignées cellulaires, E2F-1 est stabilisé suite à un stress génotoxique (Lin et al., 2001) (Blattner et al., 1999) résultant au moins en partie de sa phosphorylation par les kinases senseurs de l'endommagement de l'ADN ATM (Lin et al., 2001) et Chk2 (Stevens et al., 2003) et/ou de son acétylation (Ianari et al., 2004). Par contre, le rôle de E2F-1 dans l'apoptose induite par endommagement de l'ADN est ambigu. En effet, il semble que selon l'état de prolifération

et/ou le type cellulaire et l'environnement cellulaire, E2F-1 peut protéger les cellules de l'apoptose induite par endommagement de l'ADN comme cela a été observé chez la *Drosophile* (Moon et al., 2005) ou dans les kératinocytes (Wikonkal et al., 2003).

Les autres facteurs de la famille sont moins étudiés et on ne sait pas si ces propriétés sont uniques à E2F-1 ou vraies pour d'autres facteur E2F. Il semble néanmoins que E2F-3 possède aussi une activité apoptotique au moins dans les cellules du système nerveux. En effet, l'apoptose des cellules du système nerveux central observée chez les embryons de souris déficientes pour pRb requiert E2F-1 ou E2F-3 alors que l'apoptose du système nerveux périphérique requiert partiellement E2F-3 mais pas E2F-1 (Ziebold et al., 2001) (Tsai et al., 1998).

IV.2 Mécanismes de l'apoptose induite par E2F-1

Les études d'expression génique à grande échelle réalisées ont révélé qu'il existe un grand nombre de gènes cibles de E2F-1 et que ces gènes sont impliqués dans divers processus biologiques dont l'apoptose. Une étude combinant la technique d'immunoprécipitation de E2F-1 lié à l'ADN et des puces à ADN a estimé à 25 000 le nombre de sites E2F-1 dans le génome. De façon très intéressante, les sites E2F-1 sont localisés au niveau des promoteurs des gènes qui sont pour la plupart « actifs » c'est-à-dire pour lesquels la RNA polymérase est présente au niveau des promoteurs (Bieda et al., 2006). Ces résultats suggèrent que le facteur de transcription E2F-1 agit essentiellement via une activité transcriptionnelle. Nous allons décrire brièvement les mécanismes de l'activité apoptotique de E2F-1 dans ce paragraphe (figure 12).

IV.2.1 Apoptose dépendante de p53

Le lien entre E2F-1 et p53 dans la réponse apoptotique vient des observations montrant que la surexpression de E2F-1 oriente la réponse p53 vers l'induction de l'apoptose plutôt que l'arrêt du cycle cellulaire (Wu and Levine, 1994) et que l'expression de E2F-1 conduit à la stabilisation de p53 (Kowalik et al., 1998) (Russell et al., 2002) (Rogoff et al., 2004) (figure 11). E2F-1 peut soit activer directement la transcription du gène *p14arf* (Bates et al., 1998), soit induire la phosphorylation de p53 comme c'est le cas dans les cellules déficientes pour Arf (Russell et al., 2002) (Rogoff et al., 2002). Dans ce cas, E2F-1 active directement la transcription des kinases ATM et Chk2 (Rogoff et al., 2004) (Berkovich and Ginsberg, 2003)

qui sont requises pour la phosphorylation de p53 et l'induction de l'apoptose par E2F-1 (Powers et al., 2004) (Rogoff et al., 2004). Ces deux mécanismes ne sont pas exclusifs et il est possible que l'induction de l'expression de Arf par E2F-1 pourrait permettre d'amplifier la réponse apoptotique en augmentant la quantité de p53 disponible pour la phosphorylation. En parallèle, E2F-1 active la transcription de co-facteurs de p53 connus pour orienter la réponse p53 vers la réponse apoptotique comme les protéines de la famille ASPP (Hershko et al., 2005). Tous ces mécanismes contribuent à l'induction de l'apoptose par E2F-1 via l'activation de la réponse apoptotique de p53. Ce modèle est sûrement plus complexe puisque E2F-1 pourrait aussi être en aval de p53 (Wikonkal et al., 2003).

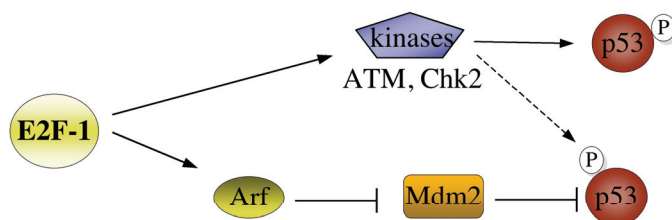


Figure 11 : Mécanismes d'activation de la voie p53 par E2F-1

IV.2.2 Apoptose indépendante de p53

E2F-1 peut aussi induire l'apoptose de façon indépendante de p53 puisque l'expression ectopique de E2F-1 induit l'apoptose des cellules Saos déficientes pour p53 et pRb (Stiewe and Putzer, 2000) (Irwin et al., 2000) (Hsieh et al., 1997) (Phillips et al., 1997). De plus, dans les souris transgéniques exprimant E2F-1 sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire, l'augmentation de l'apoptose des cellules de l'épithélium germinale qui cause une atrophie des testicules est indépendante de p53 (Holmberg et al., 1998).

Un des mécanismes de l'induction de l'apoptose par E2F-1 indépendante de p53 implique la protéine p73 (figure 12). E2F-1 est capable d'activer directement la transcription du gène *p73* et p73 activerait alors la transcription des gènes cibles de p53 (Stiewe and Putzer, 2000). L'induction de l'apoptose par E2F-1 en absence de p53 requiert p73 dans plusieurs systèmes cellulaires soulignant l'importance de ce mécanisme dans l'activité apoptotique de E2F-1 (Stiewe and Putzer, 2000) (Irwin et al., 2000).

Les gènes codant pour les membres pro-apoptotiques BH3-only Puma, Noxa, Bim, Hrk/DP5 et Bik sont aussi des cibles directes de E2F-1 et, au moins pour Noxa et Puma, sont partiellement requis pour l'apoptose induite par E2F-1 (Hershko and Ginsberg, 2004) (Real et al., 2006). E2F-1 est aussi capable d'induire l'expression la protéine pro-apoptotique DIP (Death-inducible protein) qui est partiellement requise pour l'induction de l'apoptose par E2F-1 (Stanelle et al., 2005). E2F-1 peut aussi activer la transcription de gènes dont les produits sont des composants de la machinerie apoptotique comme Apaf-1, les caspases initiatrices -8 et -9 et effectrices -3, -7 (Nahle et al., 2002), et le facteur Smac/Diablo (Xie et al., 2006).

Les mécanismes de l'induction de l'apoptose par E2F-1 généralement décrits impliquent que E2F-1 fonctionne comme un activateur transcriptionnel. Cependant, des études ont montré que l'apoptose induite par E2F-1 de façon indépendante de p53 requiert sa liaison à l'ADN mais pas son domaine de transactivation suggérant que l'activité apoptotique de E2F-1 serait due à son activité transcriptionnelle répressive (Phillips et al., 1997) (Hsieh et al., 1997). Ceci corrèle avec la capacité de E2F-1 et d'un mutant dépourvu de son domaine de transactivation à réprimer directement la transcription du gène anti-apoptotique *mcl-1* (Croxtton et al., 2002). L'activité transcriptionnelle répressive de E2F-1 pourrait être généralisable à différents membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 puisque la transcription du gène *bcl-2* est inhibée suite à l'expression ectopique de E2F-1 de façon dépendante de sa liaison à l'ADN (Eischen et al., 2001a). E2F-1 est aussi capable d'inhiber au niveau post-transcriptionnel l'expression de l'isoforme courte FLIPs conduisant à l'augmentation de la formation du DISC et l'activation de la caspase-8 (Salon et al., 2006). E2F-1 pourrait aussi sensibiliser les cellules à l'apoptose de façon indépendante de son activité de transactivation en inhibant les voies de survie. Par exemple, l'expression de E2F-1 stimule la dégradation de la protéine adaptatrice TRAF2 qui est en amont de la voie anti-apoptotique NF- κ B et sensibilise les cellules à l'apoptose induite par le TNF- α (Phillips et al., 1999). Ainsi, la répression de signaux anti-apoptotiques pourrait contribuer à l'apoptose induite par E2F-1 de façon indépendante de la voie Arf/p53.

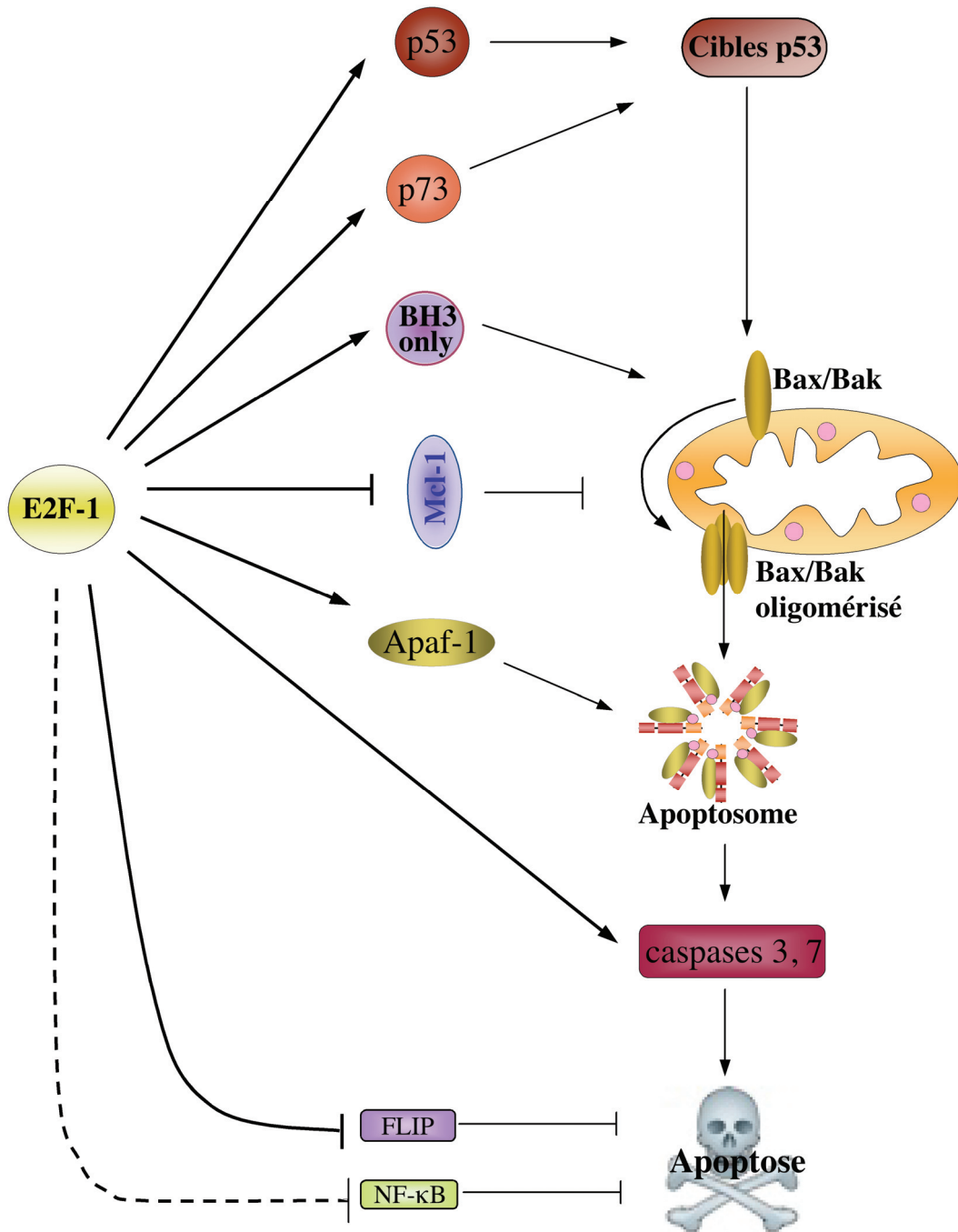


Figure 12 : E2F-1 active de multiples voies apoptotiques

IV.3 Hypothèse d'une activité apoptotique non transcriptionnelle

Nous avons vu précédemment que l'expression de c-Myc pourrait induire l'apoptose via une perturbation de l'intégrité génomique et un endommagement de l'ADN (cf III.3). Même si les évidences sont moins nombreuses, il est possible que cette hypothèse soit applicable aussi pour E2F-1. En effet, l'expression ectopique de E2F-1 induit la formation de foyers caractéristiques d'un endommagement de l'ADN (Frame et al., 2006) (Pickering and Kowalik, 2006) qui pourrait être à l'origine de l'activation de la voie p53 suivi de l'apoptose des cellules. De façon très surprenante, la formation de ces foyers ne requiert pas la liaison de E2F-1 à l'ADN (Frame et al., 2006). On peut donc supposer que l'apoptose des cellules ne résulte pas d'un excès de liaison de E2F-1 à la chromatine mais plutôt d'un stress apporté par un trop fort niveau d'expression de E2F-1. Ceci pourrait expliquer l'observation qu'une forme de E2F-1 comprenant uniquement le domaine de liaison à l'ADN, même portant une mutation ponctuelle le rendant incapable de lier l'ADN, induit toujours l'apoptose des cellules Saos (Bell et al., 2006).

Le facteur de transcription E2F-1 est largement connu pour son rôle essentiel dans la progression du cycle cellulaire. Par analogie avec c-Myc, son activité proliférative est couplée à une activité apoptotique ce qui représente un mécanisme de défense vis-à-vis d'une prolifération cellulaire incontrôlée. Cependant, E2F-1 est différent de c-Myc en cela que E2F-1 est aussi un effecteur de la réponse apoptotique au stress génotoxique. Pour induire l'apoptose, E2F-1 peut activer la voie p53 et/ou cibler les facteurs impliqués dans l'initiation et l'exécution de la voie apoptotique. Dans de nombreux cas, les effecteurs de l'activité apoptotique de E2F-1 ont été définis comme des gènes cibles directs de E2F-1. Pourtant, comme c-Myc, E2F-1 pourrait induire l'apoptose non pas par régulation transcriptionnelle mais par induction d'un endommagement de l'ADN.

V Le facteur de transcription Sp1

La protéine Sp1 pour Specificity protein 1 ou pour Sephacryl and phosphocellulose columns (en rapport avec la méthode de purification qui a permis de l'isoler) a été le premier facteur de transcription humain à avoir été cloné. Il a été isolé à partir d'extraits de cellules Hela comme un facteur capable d'activer du promoteur SV-40 (Simian Virus-40) via les sites GC (Dyanan and Tjian, 1983a, b). Depuis la découverte de Sp1, 8 autres facteurs de transcription Sp ont été identifiés et appartiennent à la famille plus large des facteurs de transcription Sp/KLF (Kruppel like factor) qui sont tous capables de lier les sites GC. Les premières études ont montré que Sp1 est impliqué dans la régulation de la transcription des gènes sans boîte TATA, dits « de ménage », exprimés constitutivement dans toutes les cellules ainsi que dans le maintien d'un état déméthylé des îlots CpG (Macleod et al., 1994). Ces observations ont conduit à la notion que Sp1 agit comme un facteur de transcription général requis pour la transcription des gènes cellulaires. Cependant, de nombreuses données montrent que Sp1 contrôle finement l'expression de gènes en réponse à des stimuli et de façon spécifique à un type cellulaire.

V.1 Généralités

V.1.1 Structure

Le clonage du cDNA de Sp1 humain partiel codant pour une protéine de 696 acides aminés a été obtenu en 1987 (Kadonaga et al., 1987). Par la suite, une forme de 778 acides aminés utilisant le deuxième codon méthionine du cadre de lecture du gène *sp1* a été obtenue et largement étudiée (Kadonaga et al., 1988). La séquence de protéine Sp1 humaine entière de 785 acides aminés a été obtenue en 2000 après le clonage du cDNA entier (Nicolas et al., 2001; Takahara et al., 2000).

Des études fonctionnelles de Sp1 ont révélé les différents domaines de la protéine Sp1 (figure 13). En N-terminal de la protéine, Sp1 possède un domaine inhibiteur responsable du recrutement de co-répresseurs (Murata et al., 1994) et qui contient la boîte Sp. Cette boîte, de séquence de 13 acides aminés S-P-L-A-L-L-A-A-T-C-S-R/K-I, est conservée chez tous les facteurs Sp. Il semble qu'elle participe à la régulation de la stabilité de la protéine Sp1 car elle contient le site d'endoclivage ciblé par le protéasome (Su et al., 1999). En aval de ce domaine

inhibiteur, Sp1 est constitué de 2 domaines de transactivation A et B riches en glutamines et capables de stimuler la transcription dépendante de Sp1 (Courey et al., 1989; Pascal and Tjian, 1991). Ils sont juxtaposés à une région riche en sérine thréonine qui pourrait être la cible de modifications post-traductionnelles. Ces domaines sont suivis par le domaine C composé d'acides aminés chargés et qui contient la boîte Btd. La boîte Btd de séquence CXCPXC est localisée en N-terminal du domaine de liaison à l'ADN. Cette séquence d'acides aminés a été identifiée à l'origine dans Buttonhead, l'homologue de Sp1 de la drosophile (Wimmer et al., 1993). Sa conservation inter-espèce et entre les différents facteurs Sp suggère un rôle important bien que sa fonction soit mal connue. Il semble qu'elle contribue au potentiel transactivateur de Sp1 puisqu'une délétion de cette région réduit l'activité de Sp1 *in vitro* (Courey and Tjian, 1988). En aval du domaine C est situé le domaine de liaison à l'ADN d'une longueur de 81 acides aminés dont la séquence est très conservée entre les différents membres de la famille (plus de 65% d'homologie). Il est constitué de trois doigts de zinc (ZnF pour Zinc Finger) de type Cys₍₂₎-His₍₂₎ similaires aux ZnF du régulateur du développement Krüppel chez la drosophile (Kadonaga et al., 1987). Ils sont constitués d'un feuillet β et d'une hélice α , maintenues ensemble par un atome de zinc, les deux cystéines du feuillet β et les deux histidines de l'hélice α chélatant le ion zinc (figure 14). La comparaison avec la structure cristallographique du complexe DNA-Zif268 (ou Egr-1), facteur de transcription qui contient aussi des ZnF, (Pavletich and Pabo, 1991) et des études *in vitro* (Oka et al., 2004) ont permis de proposer que chaque ZnF fait un contact avec un triplet de nucléotides sur le brin d'ADN riche en GC dans le sens 3'-5'. C'est dans ce domaine de liaison à l'ADN que sont localisées les séquences de localisation nucléaire (NLS pour Nuclear localization sequences) (Kuwahara et al., 1999) (Lomberk and Urrutia, 2005). Finalement, le domaine D à l'extrémité C-terminale de la protéine est nécessaire pour l'activité transcriptionnelle synergique de (cf V.1.2.a) (Courey et al., 1989).

Neuf facteurs de transcription Sp ont été identifiés à ce jour chez les mammifères (figure 13). Les facteurs Sp 5 à 9 forment un sous-groupe car ils ont un domaine N-terminal plus court et très différent de Sp1. Sp1, Sp3 et Sp4 ont une structure similaire et sont capables

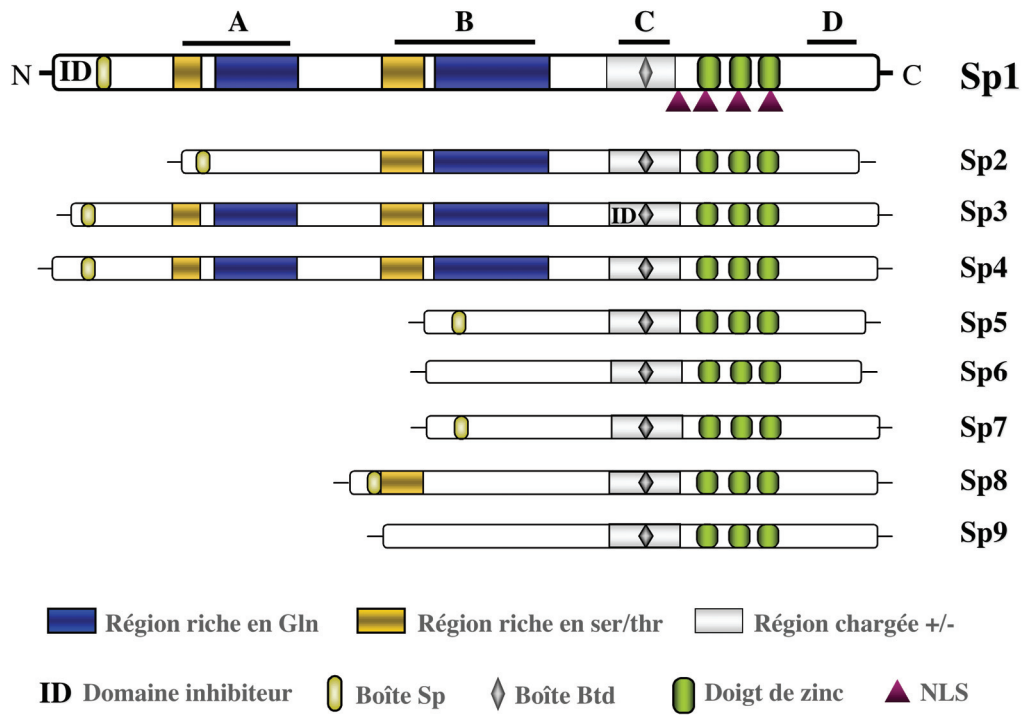


Figure 13 : Structure des facteurs Sp

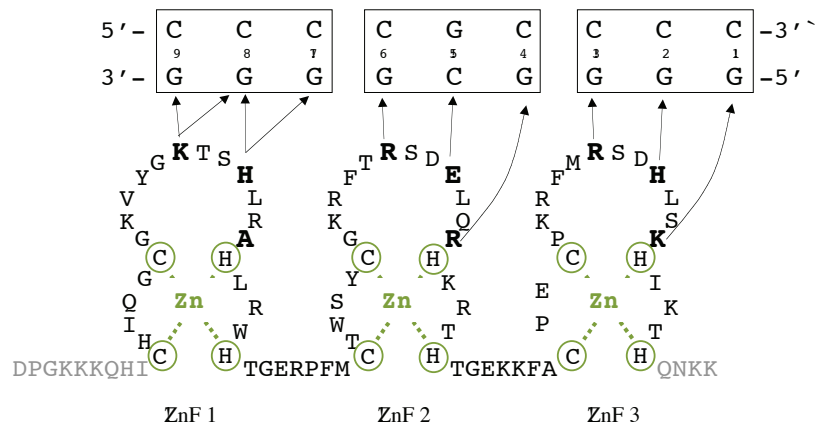


Figure 14 : Modèle de reconnaissance du site GC par le domaine de liaison à l'ADN de Sp1

de lier les sites GC et GT avec la même affinité. Sp2 est différent à la fois structurellement puisqu'il n'a pas le domaine de transactivation A et à la fois fonctionnellement puisqu'il lie les sites GC avec une affinité moindre (Hagen et al., 1992) (Kingsley and Winoto, 1992). Enfin, basée sur la séquence de leur domaine de liaison à l'ADN, Sp1, Sp3 et Sp4 sont regroupés au sein d'un même groupe phylogénétique. Nous nous intéresserons par la suite plus particulièrement à ces 3 facteurs.

V.1.2 Propriétés transcriptionnelles

L'activité transcriptionnelle des facteurs Sp a largement été étudiée dans les cellules SL2 de *Drosophila* dépourvues de facteurs Sp endogènes ou dans des cellules de mammifères exprimant basalement les facteurs Sp rendant l'interprétation des résultats plus difficile. Nous allons dans ce paragraphe définir brièvement les fonctions transcriptionnelles des facteurs Sp1, Sp3 et Sp4.

V.1.2.a Sp1

Sp1 est exprimé de façon ubiquitaire (Saffer et al., 1991). Sp1 est généralement décrit comme un activateur de la transcription. Il est capable d'activer des promoteurs contenant un seul site Sp1 et d'agir en synergie au niveau de promoteurs contenant de multiples sites Sp1. Son activité transcriptionnelle synergique à partir de multiples sites Sp1 est observée que les sites soient proximaux ou distaux (Pascal and Tjian, 1991) (Hagen et al., 1995) (Courey et al., 1989). L'activité synergique de Sp1 implique la capacité de Sp1 à s'oligomériser en un ou plusieurs tétramères et requiert les domaines de transactivation A et B ainsi que le domaine D (Pascal and Tjian, 1991). Lorsque les sites sont distants, l'oligomérisation de Sp1 conduit à la formation d'une boucle d'ADN par rapprochement physique des sites (Mastrangelo et al., 1991) (Su et al., 1991). Finalement, des formes de Sp1 incapables de lier l'ADN sont capables d'augmenter l'activité transcriptionnelle d'une forme entière de Sp1 au niveau de promoteurs contenant de multiples sites Sp1. Ce phénomène appelé superactivation requiert les domaines A et B (Pascal and Tjian, 1991).

Plusieurs études décrivent aussi Sp1 comme un répresseur de la transcription (Lee et al., 2005) (Pagliuca et al., 1998) (Won et al., 2002) (Zaid et al., 2001). L'activité répressive de Sp1 a été associée dans certains cas au recrutement de co-répresseurs connus tels que SMRT, NCoR, BCoR (Lee et al., 2005) ou inconnus (Murata et al., 1994) par le domaine inhibiteur de Sp1.

L'activité transcriptionnelle de Sp1 est finement régulée et les mécanismes mis en jeu seront présentés dans le chapitre suivant.

V.1.2.b Sp3

Bien que Sp3 active de nombreux promoteurs dans des cellules SL2 et aussi dans les cellules de mammifères (Kennett et al., 1997) (Bigger et al., 1997) (Castoldi and Chu, 2002) (Noti, 1997), il peut aussi être un activateur faible ou inactif (Hagen et al., 1994) (Xu et al., 2000) (Hata et al., 1998). Son activité pour un promoteur donné dépend à la fois du type cellulaire (Sjottem et al., 1996) et du nombre de sites GC présents dans un promoteur donné. En effet, Sp3 est un activateur pour les promoteurs ayant un seul site et un répresseur pour les promoteurs contenant de multiples sites (Majello et al., 1997).

Sp3 est aussi capable de réprimer la transcription dépendante de Sp1 de nombreux promoteurs (Dennig et al., 1995) (Hagen et al., 1994) (Hata et al., 1998) (Discher et al., 1998) de façon dépendante de son activité de liaison à l'ADN (Hagen et al., 1994). Sp3 est incapable de s'oligomériser mais peut former des complexes très stables avec l'ADN en présence de plusieurs sites Sp et peut déplacer les facteurs Sp1 liés à l'ADN (Yu et al., 2003).

V.1.2.c Sp4

Sp4 a une expression restreinte principalement dans le système nerveux central (Hagen et al., 1992). Ses domaines de transactivation A et B sont de puissants activateurs de la transcription. L'activité transcriptionnelle de Sp4 peut aussi être superactivée par une forme de Sp1 incapable de lier l'ADN et réprimée par Sp3. En revanche, à la différence de Sp1, Sp4 est incapable d'activer de façon synergique la transcription à partir de multiples sites GC adjacents (Hagen et al., 1995).

V.1.3 Fonctions biologiques *in vivo* (phénotype des souris déficientes pour les facteurs Sp)

Une des questions encore non résolue concernant les facteurs Sp est de déterminer quelles sont les fonctions spécifiques de chacun de ces facteurs *in vivo*. Cette question est particulièrement intéressante pour Sp1 et Sp3 puisqu'ils sont exprimés dans toutes les cellules. Des souris déficientes pour chacun de ces gènes ont été décrites et chacune présente un phénotype distinct.

Sp1 est absolument requis pour le développement embryonnaire. En effet, la croissance des embryons délétés pour le gène *sp1* est sévèrement retardée et ces embryons meurent après le 10ème jour du développement (Marin et al., 1997). Etant donné que Sp1 est impliqué dans

l'activation de gènes de ménage ainsi que des gènes spécifiques d'un tissu ou encore des gènes du cycle cellulaire, on aurait pu s'attendre à ce qu'une cellule déficiente pour Sp1 ne soit pas viable. Ce n'est pourtant pas le cas puisque les cellules embryonnaires souches (ES) déficientes pour Sp1 sont viables et ont une croissance normale (Marin et al., 1997). De plus, ni le statut de méthylation des îlots CpG ni l'expression de certains gènes décrits comme des gènes cibles de Sp1 ne sont affectés dans les embryons déficients pour Sp1 (Marin et al., 1997).

Les embryons délétés pour *sp3* ou *sp4* ne présentent pas d'anormalités évidentes du développement (Bouwman et al., 2000) (Gollner et al., 2001a). Les souris déficientes pour Sp3 meurent quelques minutes après la naissance à cause d'un défaut respiratoire et les nouveau-nés montrent un défaut prononcé de la formation des dents (Bouwman et al., 2000). Sp3 est aussi requis au développement hématopoïétique (Van Loo et al., 2003) et aux stades tardifs du développement osseux (Gollner et al., 2001b). La perte de Sp4 conduit à une augmentation de la mortalité post-natale et à des défauts de reproduction parmi les souris qui survivent (Gollner et al., 2001a) (Supp et al., 1996).

Le phénotype des souris déficientes pour Sp1, Sp3 ou Sp4 est distinct ce qui démontre que chacun de ces facteurs a une fonction physiologique unique (tableau 3). Néanmoins, les facteurs Sp1 et Sp3 présentent une redondance fonctionnelle ce qui a été montré par le phénotype des souris hétérozygotes pour la délétion de *sp1* et *sp3* (Kruger et al., 2007). En effet, alors que les souris hétérozygotes simples sont viables et fertiles, les embryons *sp1^{+/-}sp3^{+/-}* meurent aux stades tardifs du développement embryonnaire et présentent un phénotype similaire à celui des embryons déficients pour Sp3 : un défaut d'ossification et un défaut d'érythropoïèse. Afin de mieux clarifier la fonction de chacun des facteurs Sp *in vivo*, il paraît essentiel d'étudier le phénotype et les conséquences de leur invalidation conditionnelle dans différents tissus et à différents stades du développement.

| | Sp1 ^{+/-} | Sp1 ^{-/-} | Sp3 ^{+/-} | Sp3 ^{-/-} | Sp1 ^{+/-} Sp3 ^{+/-} | Sp4 ^{-/-} |
|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---|---------------------------------------|--|
| <i>Viabilité</i> | viable | létal à J10,5 | viable | létal post-natale | létal entre J16,5 et J18,5 | augmentation de la mortalité post-natale |
| <i>Défauts</i> | | • multiples | | • formation des dents • hématopoïèse • ossification | • ossification • érythropoïèse | • reproduction |

Tableau 3 : Phénotypes des souris hétérozygotes ou homozygotes pour la délétion des gènes codant pour les facteurs Sp

J : jour du développement embryonnaire

V.2 Mécanismes de la régulation de la transcription par Sp1

Un gène cible de Sp1 est défini par la présence dans le promoteur d'un site GC capable de lier Sp1 et dont la transcription est régulée par Sp1. Les approches classiques que sont le gel retard ou l'étude de l'activité d'un gène rapporteur ont permis d'identifier un très grand nombre de gènes cibles de Sp1. Cependant, ces études utilisent des systèmes cellulaires différents dans un environnement particulier. Les analyses à grande échelle par les techniques plus récentes permettront d'identifier l'ensemble des gènes cibles de Sp1 dans un seul contexte cellulaire.

V.2.1 Séquence du site consensus

Historiquement, Sp1 a été identifié par sa capacité à lier les sites GGGCGG présents en tandem dans le promoteur de SV-40 (Dynam and Tjian, 1983b). La séquence consensus du site reconnu par Sp1 a d'abord été déterminée par des expériences *in vitro* comme un décanucléotide GGGG(C/A)GGGG (Letovsky and Dynam, 1989). Par comparaison de différents sites connus de haute affinité, la séquence consensus du site a ensuite été définie comme (G/T)GGG(C/A)GG(G/A)(G/A)(C/T) (Bucher, 1990) (Kriwacki et al., 1992). Une grande variabilité de séquence est tolérée au niveau du triplet situé en 3', normalement reconnu par le ZnF 1. Cette tolérance est expliquée par la présence, dans le ZnF 1, d'acides aminés

différents de ceux présents dans le ZnF 2 ou 3 alors qu'ils sont en position critique pour établir le contact avec l'ADN (Marco et al., 2003) (Yokono et al., 1998).

De façon surprenante, Sp1 peut lier des sites dont la séquence est très éloignée de celle du site consensus : TCCTCCTCCTCC (Cohen et al., 1997) ou GGGTGACCCC (Hirano et al., 1998) avec une affinité similaire que pour le site Sp1 consensus. L'affinité de liaison de Sp1 à l'ADN ne dépend donc pas seulement de la séquence du site mais aussi du contexte chromatinien. En effet, une étude a montré que l'affinité de liaison de Sp1 à l'ADN nu est 10 fois plus grande que son affinité de liaison à l'ADN nucléosomal (Li et al., 1994). De plus, une analyse directe très élégante utilisant une combinaison de précipitation de facteurs de transcription liés à l'ADN avec des puces ADN couvrant l'intégralité des chromosomes humains 21 et 22 a identifié les sites liés à Sp1 *in vivo*. Parmi ces sites, environ 20% des sites liés à Sp1 *in vivo* ne correspondent pas à la séquence consensus qui, dans cette étude, est définie par GG(G/T) G(C/T)G GG (Cawley et al., 2004). Il pourrait être très intéressant de compiler l'ensemble des séquences des fragments d'ADN liés à Sp1 identifiés par cette étude et essayer d'en dégager une séquence consensus du site GC.

V.2.2 Localisation du site

Les sites de liaison à Sp1, lorsqu'ils sont situés dans le promoteur de gènes codants, sont majoritairement localisés dans la partie proximale du promoteur. Ainsi, une analyse bioinformatique des promoteurs de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire a montré une localisation préférentielle des sites Sp1 400 pb en amont du site d'initiation de la transcription (Elkon et al., 2003). La localisation des sites Sp1 dans le promoteur semble influencer la régulation de la transcription par Sp1.

Les gènes ne contenant pas de boîte TATA dans leur promoteur ont des sites GC environ 50 pb en amont du site d'initiation de la transcription et ces sites peuvent remplacer fonctionnellement la boîte TATA (Blake et al., 1990) (Lu et al., 1994) (Kollmar et al., 1994) en permettant le recrutement de la machinerie de transcription basale comme nous le verrons dans le prochain paragraphe. Dans les promoteurs sans boîte TATA, la localisation des sites GC proximaux par rapport au site d'initiation est essentielle puisque l'augmentation de la distance entre les sites GC et le site d'initiation est corrélée à une diminution de la transcription à partir des sites majeurs d'initiation et à une augmentation de la transcription à partir de sites mineurs d'initiation situés plus en amont (Lu et al., 1994) (Kollmar et al., 1994).

Si les sites proximaux contrôlent l'initiation de la transcription, les sites GC plus distaux sont impliqués dans la régulation de l'efficacité de la transcription (Patel and DiMario, 2001).

V.2.3 Mécanisme d'action

V.2.3.a Recrutement de la machinerie de transcription basale

L'initiation de la transcription par la RNA pol II nécessite l'assemblage coordonné de multiples facteurs généraux constituant la machinerie de transcription basale pour contrôler efficacement la synthèse des ARN. La boîte TATA au niveau d'un promoteur est reconnue par un complexe multiprotéique appelé TFIID qui est responsable du recrutement de la RNA pol II. Le complexe TFIID contient des TBP (TATA-box binding protein) et des co-facteurs nommés TAF (TBP-associated factor). En absence de boîte TATA, Sp1 facilite le recrutement de TFIID au promoteur (Smale et al., 1990) par interaction directe avec TBP ainsi que des TAF (tableau 4). De plus, Ryu et al. ont identifié un complexe CRSP (Co-factor required for Sp1) constitué de neuf protéines requis pour l'activation efficace de la transcription par Sp1 en coopération avec le complexe TFIID *in vitro* (Ryu et al., 1999). Ainsi en absence de boîte TATA, Sp1 va permettre l'initiation de la transcription (Blake et al., 1990) (Lu et al., 1994) (Kollmar et al., 1994). La capacité de Sp1 à recruter constitutivement la machinerie de transcription basale peut aussi permettre la stimulation rapide d'un promoteur en réponse à un stimulus comme c'est le cas pour le promoteur A20 en réponse au TNF- α (Ainbinder et al., 2002).

V.2.3.b Recrutement d'enzymes modifiant la chromatine

L'activité transcriptionnelle de Sp1 dépend aussi de l'état de compaction de la chromatine qui est régulé notamment par acétylation/déacétylation des histones par le système enzymatique HAT/HDAC. Sp1 peut interagir directement avec des HAT ou des HDAC généralement via son domaine de liaison à l'ADN (tableau 4).

L'association du domaine de liaison à l'ADN de Sp1 avec p300 augmente la capacité de Sp1 à lier l'ADN de façon indépendante de l'activité acétyltransférase de p300 (Suzuki et al., 2000). Par contre, l'association de Sp1 avec HDAC corrèle avec l'inhibition de son activité

| Facteur interagissant avec Sp1 | domaine de Sp1 impliqué dans l'interaction | références |
|--|---|---|
| <i>Machinerie de transcription basale</i> | | |
| dTAF110 | transactivation B | (Gill et al., 1994) |
| hTAF _{II} 130 | transactivation A et B | (Tanese et al., 1996) |
| hTAF _{II} 55 | C-terminal | (Chiang and Roeder, 1995) |
| CRSP | | (Ryu et al., 1999) |
| TBP | | (Emili et al., 1994) |
| <i>Enzymes modifiant la chromatine</i> | | |
| HDAC1 | domaine de liaison à ADN | (Doetzlhofer et al., 1999) (Kang et al., 2005) |
| HDAC2 | N-terminal | (Won et al., 2002) |
| HDAC3 | | (Huang et al., 2006) |
| p300 (HAT) | domaine de liaison à ADN | (Suzuki et al., 2000) |
| <i>Facteurs de transcription</i> | | |
| c-Myc | C-terminal | (Gartel et al., 2001) |
| E2F-1 | domaine de liaison à ADN | (Rotheneder et al., 1999) (Lin et al., 1996) |
| KLF6 | C-terminal | (Botella et al., 2002) |
| Oct-1 | transactivation B | (Strom et al., 1996) |
| p53 | transactivation A ou B ou domaine de liaison à ADN | (Ohlsson et al., 1998) |
| p65 de NFκB | domaine de liaison à ADN | (Perkins et al., 1994) |
| Smad -2, -3 et -4 | transactivation B | (Feng et al., 2000) (Datta et al., 2000) |
| YY1 | C-terminal | (Lee et al., 1993) |
| GATA-1 | domaine de liaison à ADN | (Merika and Orkin, 1995) |
| MEF-2 | | (Krainc et al., 1998) |
| Facteur viral E2 | | (Li et al., 1991) |
| <i>Autres facteurs cellulaires ne liant pas l'ADN</i> | | |
| BcoR, NcoR et SMRT | N-terminal ID domaine de liaison à ADN | (Lee et al., 2005) |
| mdm2 | domaine de liaison à ADN | (Johnson-Pais et al., 2001) |
| p74 | dom N-terminal | (Murata et al., 1994) |
| PML | domaine C-terminal | (Vallian et al., 1998) |
| protéine pocket p107 | | (Parakati and DiMario, 2005) |

Tableau 4 : Régulation de l'activité transcriptionnelle de Sp1

L'association du domaine de liaison à l'ADN de Sp1 avec p300 augmente la capacité de Sp1 à lier l'ADN de façon indépendante de l'activité acétyltransférase de p300 (Suzuki et al., 2000). Par contre, l'association de Sp1 avec HDAC corrèle avec l'inhibition de son activité transcriptionnelle (Doetzlhofer et al., 1999; Kang et al., 2005). Deux mécanismes ont été

proposé : soit les HDAC se lient au niveau du domaine de liaison de l'ADN de Sp1 et inhibent sa liaison à l'ADN (Kang et al., 2005), soit les HDAC se lient au niveau de la région N-terminale de Sp1 mais n'affectent pas sa liaison à l'ADN (Won et al., 2002). Dans ce dernier cas, les mécanismes d'inhibition de l'activité transcriptionnelle de Sp1 pourraient impliquer le recrutement des HDAC au niveau des promoteurs et une déacétylation locale de la chromatine.

V.2.3.c Co-facteurs

(i) *Facteurs liant l'ADN*

Sp1 peut réguler la transcription par coopération avec d'autres protéines dont la plupart sont des facteurs de transcription. Certains sont des facteurs de transcription exprimés ubiquitairement, d'autres des facteurs spécifiques à certains tissus tels que GATA-1 ou MEF-2 ou des facteurs viraux tels que le facteur enhanceur viral E2 du virus BPV-1 (Bovine Papillomavirus type 1) (tableau 4). Le domaine d'interaction de Sp1 avec ces facteurs a parfois été identifié et il s'agit principalement du domaine C-terminal de Sp1 qui inclut son domaine de liaison à l'ADN et son domaine de transactivation D (tableau 4).

L'association de Sp1 avec ces facteurs de transcription peut activer en synergie la transcription des gènes par différents mécanismes. En utilisant un système de gène rapporteur, une étude élégante les a décrits comme mécanismes utilisés par Sp1 et le facteur viral E2 pour activer la transcription en synergie dans différents contextes de promoteurs (Li et al., 1991). Lorsque les sites de Sp1 et du facteur viral E2 sont dans la partie proximale du promoteur, Sp1 peut faciliter la liaison de E2 au niveau de son site pour lequel il a normalement une faible affinité. L'activité transcriptionnelle de Sp1 peut aussi être stimulée par le facteur E2 de façon indépendante de la liaison de E2 à l'ADN. Par contre, lorsque le site du facteur E2 est localisé en aval du gène rapporteur, l'activation de la transcription par E2 requiert la présence de sites GC dans la partie proximale du promoteur. Dans ce cas, Sp1 et le facteur enhanceur distal E2 interagissent physiquement pour former une boucle d'ADN (Li et al., 1991).

Cependant, l'association de Sp1 avec des facteurs de transcription n'est pas toujours synonyme d'activation synergique de la transcription. Sp1 peut inhiber l'activité d'un autre facteur de transcription et réciproquement. Par exemple, l'expression ectopique de Sp1 inhibe

la répression de la transcription du promoteur *IGF-I* (Insulin-like Growth Factor) par p53 (Ohlsson et al., 1998). Au contraire, l'expression de c-Myc réprime le promoteur *p21* alors que celui-ci ne contient pas de sites de liaison à c-Myc. Puisque c-Myc s'associe avec le domaine de liaison de Sp1, il est possible dans ce cas que c-Myc séquestre Sp1 inhibant ainsi son activité transcriptionnelle (Gartel et al., 2001).

(ii) *Autres facteurs*

Finalelement, Sp1 est aussi capable d'interagir avec des protéines cellulaires qui ne lient pas l'ADN (Tableau 4) et avec des protéines cellulaires non identifiées de 74 kDa (p74) (Murata et al., 1994) ou de 20 kDa nommée Sp1-I (Chen et al., 1994). L'association de Sp1 avec ces facteurs inhibe l'activité transcriptionnelle de Sp1 vraisemblablement par inhibition de sa liaison à l'ADN (Parakati and DiMario, 2005) (Chen et al., 1994) (Johnson-Pais et al., 2001).

V.3 Facteurs régulant Sp1

V.3.1 Régulation de la quantité de Sp1

La quantité de Sp1 est cependant finement régulée au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel ou post-translationnel.

La variation de la quantité de protéines Sp1 observée dans les différents tissus de souris adulte est parfaitement corrélée à une variation de la quantité de son ARNm suggérant une régulation transcriptionnelle de la quantité de Sp1 en fonction du type cellulaire (Saffer et al., 1991). La variation de la quantité de Sp1 par régulation transcriptionnelle est aussi observée en réponse à des signaux endogènes ou exogènes (Saffer et al., 1990) (Yurochko et al., 1997) (Hamanaka et al., 1992). Les facteurs régulant la transcription basale du gène *sp1* sont les facteurs de transcription ubiquitaires NF-Y, E2F, Sp3 et Sp1 lui-même, formant ainsi une boucle d'auto-régulation positive (Nicolas et al., 2001) (Nicolas et al., 2003).

Une diminution de la quantité de la protéine Sp1 entière peut aussi refléter la présence d'ARN ayant subi des épissages alternatifs comme c'est le cas au cours de la spermatogénèse (Thomas et al., 2005) (Persengiev et al., 1996). Certains des transcrits alternatifs détectés codent pour des protéines tronquées en N-terminal dont l'une active toujours moins efficacement la transcription.

Enfin, de nombreux signaux extracellulaires vont modifier rapidement la quantité cellulaire de Sp1 en stimulant sa dégradation. Suite à une privation en glucose accompagné

d'une augmentation d'AMPc, Sp1 est rapidement dégradé de façon dépendante du protéasome au niveau de la boîte Sp ce qui conduit à la génération d'un peptide N-terminal qui reste stable (Su et al., 1999). Des peptides de la partie C-terminale de Sp1 peuvent aussi être générés par protéolyse par la caspase-3 (Rickers et al., 1999) ou par la myoblastine présente dans les cellules myéloïdes non différenciées. La différenciation des cellules en monocyte est associée à la diminution de l'expression de la myoblastine et l'apparition de la forme entière de Sp1 (Rao et al., 1998). Sp1 peut aussi être la cible de la protéase SPase dont les caractéristiques biochimiques ressemblent à celles de la protéase à cystéine cathépsine-B (Nishinaka et al., 1997) ou d'une protéase à cystéine non identifiée dont l'expression est induite par l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Mortensen et al., 1997).

Une variation de la quantité de la protéine Sp1 entière influence la transcription dépendante de Sp1. En effet, l'activation du promoteur *SV-40* est, *in vitro*, directement corrélée à la quantité de Sp1. Dans les cellules SL2, qui n'expriment aucun facteur Sp, l'activation de la transcription par Sp1 de nombreux promoteurs contenant des sites Sp est dépendante de la quantité de Sp1 exprimée (Hagen et al., 1994) (Yurochko et al., 1997) (Saffer et al., 1990) (Feng et al., 2000). Par contre, au-delà d'un certain seuil, Sp1 stimulera moins efficacement la transcription comme c'est le cas pour le promoteur du gène *fibulin-1* (Castoldi and Chu, 2002).

V.3.2 Modifications post-traductionnelles

Lors la découverte de Sp1, le groupe de Tjian a remarqué que la protéine Sp1 purifiée migrerait sur gel de polyacrylamide sous la forme d'un doublet de protéines de poids moléculaires de 95kDa et 105 kDa. Ces deux formes protéiques résultent d'une modification post-traductionnelle différentielle de la même protéine (Kadonaga et al., 1987). Depuis, de nombreux travaux ont montré que Sp1 est la cible de diverses modifications post-traductionnelles.

V.3.2.a Phosphorylation largement décrite

Le groupe de Tjian a montré que la forme de Sp1 à migration électrophorétique lente correspondait à une forme phosphorylée par la kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK), principalement sur des résidus sérine (Jackson et al., 1990). Depuis, de nombreuses études ont montré qu'en réponse à divers stimuli, de multiples kinases ou phosphatases régulent l'activité

| <i>stimulus</i> | <i>modification</i> | <i>médiateur</i> | <i>domaines et/ou résidus modifiés</i> | <i>liaison à l'ADN</i> | <i>activité transcriptionnelle</i> | <i>références</i> |
|---|---------------------|-------------------------|---|------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| EGF (Epidermal Growth Factor) | P° | Ras-Erk 2 | | ++ | ++ | (Merchant et al., 1999) |
| | P° | | thr 355 (dom B) | ND | ++ | (Zheng et al., 2001) |
| HGF (Hepatocyte Growth Factor) | P° | | sérines | = | ++ | (Reisinger et al., 2003) |
| Glucose | déP° | PP1 | | ++ | ++ | (Daniel et al., 1996) |
| Insuline | P° | | ser 613, thr 641, ser 642, ser 699 ou ser 703 | ND | ++ | (Majumdar et al., 2006) |
| Infection par HSV-1 (Herpes simplex virus) | P° | ATM | ser 101 | ND | = | (Iwahori et al., 2007) |
| stimulation lymphocytes T | déP° | PP2A | | ND | ++ | (Lacroix et al., 2002) |
| stimulation TCR | déP° | | | ++ | ++ | (Wu et al., 2005) |
| | P° | cycline A-CDK | ser 59 (N-term) | ++ | ++ | (Fojas de Borja et al., 2001) |
| | P° | Casein Kinase II | thr 668 (DBD) | - | ND | (Armstrong et al., 1997) |
| | P° | DNA PK | ser 131 (dom A) | ND | ++ | (Chun et al., 1998) |
| | P° | MAPK p42/p44 | thr 453 (dom B) et thr 739 (dom D) | ++ | ++ | (Milanini et al., 1998) |
| | P° | PKC zeta | DBD | ND | ++ | (Pal et al., 1998) |

Tableau 5 : Régulation de la phosphorylation de Sp1

P° : phosphorylation, déP° : déphosphorylation, dom : domaine, DBD : domaine de liaison à l'ADN ++ : activation, - : inhibition, = : pas d'effet, ND : non déterminé

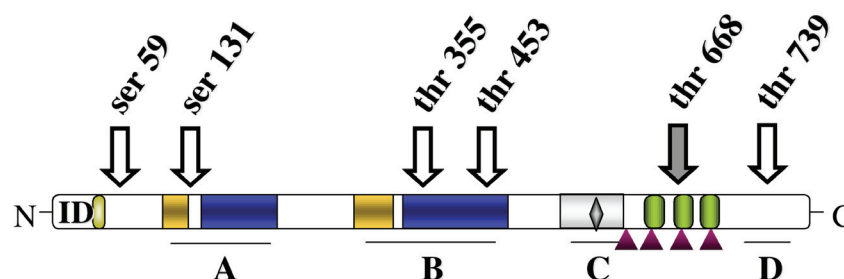


Figure 15 : localisation des sites de phosphorylation de Sp1

Les flèches blanches représentent les phosphorylations activatrices de Sp1 alors que la flèche grise représente une phosphorylation inhibitrice.

transcriptionnelle de Sp1. De plus, l'état de phosphorylation de Sp1 est modifié en réponse à de nombreux stimuli extra-cellulaires, par de nombreuses kinases ou phosphatases (tableau 5).

La localisation des résidus dans la protéine Sp1 semble être déterminante quant à l'effet de leur phosphorylation sur la régulation de la liaison de Sp1 à l'ADN (Figure 15). La phosphorylation de Sp1 dans les domaines de transactivation semble augmenter la liaison de Sp1 à l'ADN. En effet, la phosphorylation de la sérine 59 dans le domaine N-terminal par le complexe cycline A-cdk2 induit une augmentation de la liaison de Sp1 au promoteur *dhfr* et sa transcription (Fojas de Borja et al., 2001). La phosphorylation des résidus thréonine 453 et 739 par la MAPK p42/p44, respectivement localisés dans les domaines de transactivation B et D, augmente la liaison de Sp1 au promoteur *vegf* (Vascular endothelial growth factor) et est nécessaire à sa transcription induite par MAPK (Milanini et al., 1998). De la même façon, la thréonine 355, située dans le domaine B, est essentielle à la stimulation de la transcription du promoteur *apolipoprotein A-I* médiée par Erk (Zheng et al., 2001). Par contre, la phosphorylation de Sp1 au niveau de son domaine de liaison à l'ADN empêcherait sa liaison à l'ADN. En effet, la phosphorylation de Sp1 par la CKII sur la thréonine 668 située dans le deuxième doigt de zinc de Sp1 est essentielle pour inhiber la liaison de Sp1 à l'ADN (Armstrong et al., 1997). Ce n'est pourtant pas la règle absolue puisque la phosphorylation de Sp1 par PKC ζ au niveau du domaine de liaison à l'ADN stimule la transcription du promoteur *vegf* (Pal et al., 1998).

L'effet de la phosphorylation de Sp1 sur son activité de liaison à l'ADN pourra aussi dépendre, entre autre, du contexte du promoteur. En effet, à partir des mêmes extraits cellulaires, des gels retards utilisant deux sondes contenant un site Sp ont été réalisés. En condition contrôle, Sp1 lie de façon plus affine le site CCCC GCCC du promoteur du gène de la *cycline D3* comparé au site CCCC GCCCT du promoteur α -EnaC2. Lorsque les cellules ont été traitées au préalable avec l'acide okadaïque, un inhibiteur des phosphatases, qui aura pour conséquence d'augmenter la phosphorylation de Sp1, l'affinité de la forme phosphorylée de Sp1 pour ces deux sites est inversée (Chu and Ferro, 2005).

Finalement, la phosphorylation de Sp1 peut modifier son activité transcriptionnelle sans altérer sa liaison à l'ADN. Dans les kératinocytes, la phosphorylation de Sp1 induite par le HGF résulte en l'activation de la transcription du promoteur *vegf* et ne modifie pas l'affinité de Sp1 à l'ADN (Reisinger et al., 2003). Il est possible que l'effet de la phosphorylation modifie

l'interaction de Sp1 avec les co-facteurs présents dans la cellule régulant ainsi la transcription de certains gènes.

V.3.2.b Glycosylation

Sp1 est une protéine glycosylée sur de multiples résidus sérine et thréonine (Jackson and Tjian, 1988). Il semble que la glycosylation de Sp1 reflète la disponibilité du glucose dans l'environnement ce qui pourrait permettre de coupler l'état métabolique de la cellule et le contrôle de la transcription (Du et al., 2000) (Han and Kudlow, 1997) (Kang et al., 2003).

La glycosylation de Sp1 peut activer son activité transcriptionnelle et différents mécanismes ont été proposés. D'une part, la glycosylation de Sp1 en condition physiologique empêche sa dégradation par le protéasome (Han and Kudlow, 1997). D'autre part, la glycosylation de Sp1 pourrait favoriser la translocation de Sp1 dans le noyau et ainsi stimuler la transcription dépendante de Sp1 (Brasse-Lagnel et al., 2003). La glycosylation de Sp1 peut aussi inhiber son activité transcriptionnelle. En effet, la glycosylation au niveau du domaine de transactivation B empêche *in vitro* l'homodimérisation de Sp1 et l'interaction de Sp1 avec TAF110, composé de TFIID de la Drosophile (Roos et al., 1997) et inhibe son activité transcriptionnelle *in vivo* (Yang et al., 2001).

V.3.2.c Acetylation

Des études montrent que l'acétylation de Sp1 est régulée dynamiquement par des signaux extra-cellulaires (Huang et al., 2005) (Ryu et al., 2003a) (Hung et al., 2006). Comme nous l'avons vu précédemment, Sp1 peut interagir physiquement via son domaine de liaison à l'ADN avec p300 qui contient une activité HAT ou avec les HDAC (tableau 4). Dans la plupart des études, l'acétylation de Sp1 est accompagnée d'une augmentation de son activité transcriptionnelle (Huang et al., 2005) (Ryu et al., 2003a) vraisemblablement en augmentant sa liaison à l'ADN (Ryu et al., 2003a). Cependant, une étude récente montre que la déacétylation de Sp1 peut aussi être activatrice de la transcription. En effet, la stimulation des cellules par le PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) induit la déacétylation, par HDAC1, de Sp1 au niveau de la lysine 703 de son domaine de liaison à l'ADN ce qui conduit à un changement dynamique des complexes recrutés au niveau du promoteur *12(S) lipoxygenase* et à sa transcription (Hung et al., 2006). Les auteurs de cette étude proposent que des modifications dynamiques de l'état d'acétylation de Sp1 vont influencer le recrutement du système HAT/HDAC au niveau de la chromatine permettant ainsi de moduler localement l'acétylation des histones et réguler la transcription.

V.3.2.d Sumoylation

Récemment, il a été montré que Sp1 pouvait être sumoylé sur la lysine 16 qui fait partie d'un site consensus de sumoylation au niveau du domaine inhibiteur en N-terminal *in vivo*. Alors que la sumoylation de Sp1 bloque sa dégradation par le protéasome, la forme sumoylée de Sp1 est moins efficace pour activer la transcription (Spengler and Brattain, 2006).

Finalement, quelques études montrent qu'il existe une compétition entre la glycosylation et la phosphorylation sur les mêmes résidus de Sp1 (Du et al., 2000) (Haltiwanger et al., 1998). Par exemple, le traitement des cellules à l'insuline va conduire à une glycosylation transitoire de certains résidus Sp1 qui est remplacée par la phosphorylation de ces mêmes résidus (Majumdar et al., 2006). L'activité transcriptionnelle de Sp1 est donc régulée non pas par une seule mais un ensemble coordonné et dynamique de modifications post-traductionnelles.

V.4 Sp1 et l'apoptose

Sp1 est impliqué dans la régulation de nombreux processus cellulaires dont l'apoptose. Cependant, son rôle dans la régulation de l'apoptose n'est toujours pas clairement établi.

Un rôle anti-apoptotique a été décrit pour Sp1. Cela est suggéré par l'observation que Sp1 est rapidement clivé par les caspases au cours de l'apoptose induite par différents stimuli (Piedrafita and Pfahl, 1997) (Rickers et al., 1999). Le rôle anti-apoptotique de Sp1 est bien démontré dans les neurones. En effet, l'augmentation de l'activité de Sp1 par acétylation ou surexpression protège les neurones de l'apoptose induite par un stress oxydatif (Ryu et al., 2003a) (Ryu et al., 2003b). De façon très intéressante, la liaison de Sp1 à l'ADN est augmentée rapidement après application d'un stress oxydatif ce qui peut être interprété comme un mécanisme de compensation visant à neutraliser les effets du stress au moins dans les temps précoces (Ryu et al., 2003b). Le rôle anti-apoptotique de Sp1 dans les cellules neuronales a aussi été suggéré dans la maladie neurodégénérative de Huntington qui est causée par l'expansion de la queue polyglutamine de la protéine Huntingtine. En effet, il a été observé que la toxicité des mutants Huntingtine est associée à l'inhibition de la liaison de Sp1 à l'ADN et donc de la transcription dépendante de Sp1 (Dunah et al., 2002). La restauration de l'activité de Sp1 par surexpression, seul ou en coopération avec le facteur général TAFII130, protège la

lignée cellulaire HEK 293 et les neurones de la toxicité des mutants Huntingtine (Dunah et al., 2002) (Li et al., 2002).

Sp1 peut aussi avoir une activité pro-apoptotique. En effet, l'expression ectopique de Sp1 dans les cellules de muscle lisse de chiots induit l'apoptose des cellules via la répression de l'expression du gène codant pour le Cdk_i p21 (Cyclin-dependent kinase inhibitor) (Kavurma and Khachigian, 2003). Dans ces cellules, l'apoptose induite par endommagement de l'ADN qui requiert la voie Fas est aussi associée à l'activation de la transcription du gène *fas-l* par Sp1 (Kavurma et al., 2001).

En accord avec un rôle bivalent de Sp1 dans la régulation de l'apoptose, des sites GC ont été identifiés à la fois dans les promoteurs de gènes pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques (tableau 6). Comme les autres facteurs de transcription décrits précédemment, ces gènes appartiennent aux familles de gènes des différentes étapes du programme apoptotique comme la famille des récepteurs de mort, la famille Bcl-2, la famille des caspases ou la famille des IAP. Pour certains de ces gènes, les sites GC sont nécessaires à la transcription basale ou inductible.

Sp1 peut donc être ajouté à la liste des facteurs de transcription régulant l'apoptose. Il peut être anti ou pro-apoptotique selon le type cellulaire et/ou l'environnement extra-cellulaire. Cependant, même s'il est capable de cibler de nombreux effecteurs de l'apoptose, les mécanismes par lesquels il régule l'apoptose ne sont toujours pas bien connus.

Contribution du site GC dans la transcription

| Gène cible de Sp1 | basale | inductible | Références |
|-------------------------------|--------|------------|---|
| Famille Bcl-2 | | | |
| <i>bax</i> | +++ | +++ | (Thornborrow and Manfredi, 2001) (Igata et al., 1999) |
| <i>bcl-x</i> | ND | ND | (Grillot et al., 1997) |
| Récepteurs de mort | | | |
| <i>fas-l</i> | +++ | +++ | (McClure et al., 1999) (Xiao et al., 1999) (Kavurma et al., 2001) |
| <i>trail</i> | +++ | +++ | (Nebbioso et al., 2005) (Wang et al., 2000) |
| <i>dr5</i> | | +++ | (Higuchi et al., 2004) |
| Machinerie apoptotique | | | |
| <i>caspase-3</i> | ND | ND | (Liu et al., 2002) |
| <i>caspase-8</i> | +++ | ND | (Liedtke et al., 2003) |
| IAP | | | |
| <i>survivin</i> | +++ | ND | (Li and Altieri, 1999) (Xu et al., 2007) |
| <i>xiap</i> | +++ | ND | (Lee et al., 1993) |

Tableau 6 : Gènes cibles de Sp1 impliqués dans la régulation de l'apoptose

+++ : nécessaire à la transcription, ND : non déterminé

En conclusion, Sp1 est un facteur de transcription ubiquitaire qui régule la transcription via les sites GC. Il joue un rôle essentiel dans la transcription constitutive des gènes dits « de ménage » qui n'ont pas de boîte TATA en permettant le recrutement de la machinerie de transcription basale. Les études présentées dans ce chapitre montrent que Sp1 est aussi un facteur de transcription situé en aval de multiples cascades de signalisation. Son activité transcriptionnelle est régulée très finement par modulation de sa quantité, par association possible avec des facteurs impliqués dans la structure chromatinienne ou des facteurs de transcription et surtout par les nombreuses modifications post-traductionnelles (Figure 16). La régulation fine de l'activité transcriptionnelle de Sp1 pourra conduire à la modification de l'expression d'un patron spécifique de gènes cibles de Sp1 adapté à un type cellulaire et à un contexte environnemental donné. Il est clair que Sp1 est impliqué dans la régulation de très nombreux processus cellulaires et nous nous sommes intéressés à son rôle dans la régulation de l'apoptose.

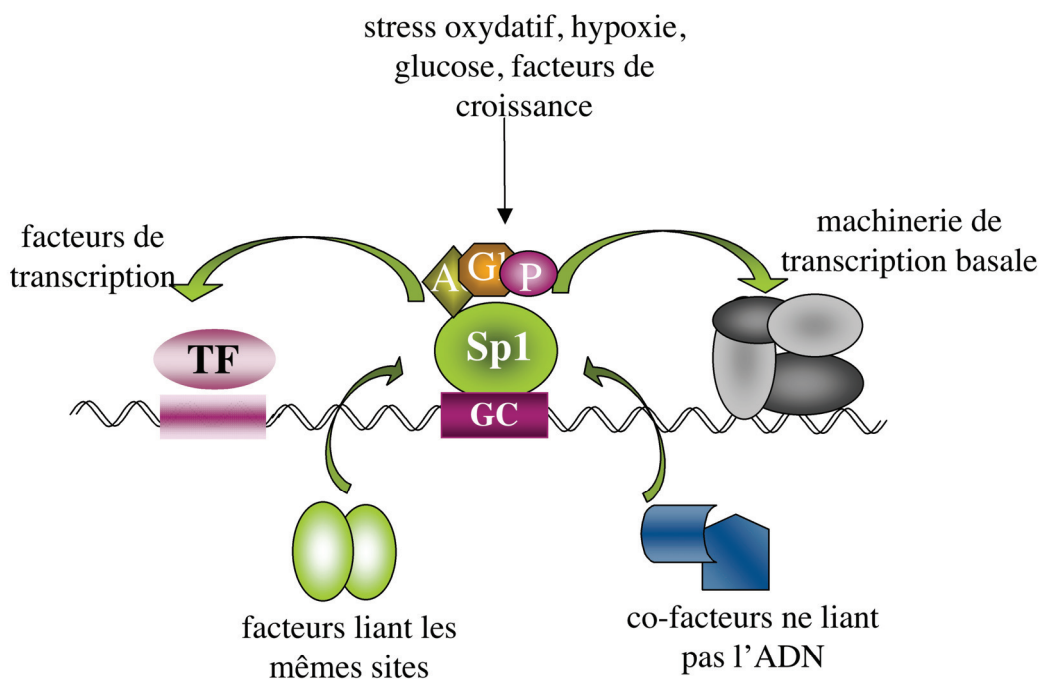


Figure 16 : Régulation de l'activité transcriptionnelle de Sp1

RESULTATS

I Résumé de l'Article n°1

Article 1 :

Overexpression of Sp1 transcription factor induces apoptosis

Deniaud E, Baguet J, Mathieu AL, Pages G, Marvel J and Leverrier Y.

Oncogene. 25(53):7096-105. (2006)

Le but de ce travail a été d'étudier le rôle de Sp1 dans la régulation de l'apoptose. Pour cela, nous avons exprimé Sp1 de façon ectopique via : 1) l'infection des cellules par un rétrovirus bicistronique codant pour Sp1 et pour le marqueur membranaire CD2 en aval d'un IRES (Internal ribosome entry site) et 2) l'utilisation de systèmes inductibles pour l'expression de Sp1 et de la GFP (Green fluorescent protein)

Dans un premier temps, nous avons infecté les cellules hématopoïétiques Baf-3 par un rétrovirus contrôle ou par des rétrovirus codant pour Sp1 et nous avons suivi le devenir des cellules infectées, c'est-à-dire exprimant CD2, au cours du temps. Nous avons observé que la surexpression de Sp1 dans sa forme entière, et de la forme dépourvue des 7 premiers acides aminés couramment utilisée dans la littérature (Sp1 778), conduit à disparition des cellules environ 48 heures après infection (figure 1 a-b). L'effet délétère de la surexpression de Sp1 n'est pas spécifique aux cellules Baf-3 puisqu'il a aussi été observé dans les fibroblastes 3T3 (figure 1c). La disparition des cellules Baf-3 surexprimant Sp1 est due à l'induction de leur apoptose (externalisation des phosphatidylsérines (figure 2a) et activation de la caspase-3 (figure 2b)). L'apoptose induite par la surexpression de Sp1 est dépendante des caspases (figure 2c) et peut être retardée par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (figure 2d). L'induction de l'apoptose par la surexpression de Sp1 a aussi été observée dans les fibroblastes de hamster WT2 qui surexpriment Sp1 de façon inductible (figure 3 a-b). Ces résultats montrent que la surexpression de Sp1 induit l'apoptose de différents types cellulaires non transformés.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la voie apoptotique activée par Sp1. Puisqu'un lien entre Sp1 et la voie des récepteurs de mort a été décrit dans la littérature, nous avons testé la contribution de la caspase-8 dans l'apoptose induite par Sp1. Dans les fibroblastes de hamster, la surexpression de Sp1 induit l'apoptose de façon dépendante de la caspase-8 et donc, vraisemblablement, via l'activation de la voie des récepteurs de mort (figure 4b). Par contre, dans les cellules Baf-3, l'apoptose induite par Sp1 n'est pas dépendante de la

caspase-8 (figure 4a). Les mécanismes de l'apoptose induite par Sp1 sont donc différents selon le type cellulaire et, au moins pour les cellules Baf-3, sont différents de ceux décrits dans la littérature.

Nous avons ensuite voulu tester si l'induction de l'apoptose par Sp1 requiert sa localisation nucléaire et/ou sa liaison à l'ADN et/ou son activité transcriptionnelle. Pour cela, nous avons généré des rétrovirus codant pour différents mutants de Sp1. La forme de Sp1 dépourvue du domaine de liaison à l'ADN (Sp1 Δ Zn), qui est localisée dans le cytoplasme (fig 5 a-c), n'induit plus l'apoptose lorsqu'elle est surexprimée dans les cellules Baf-3 (fig 5d). L'activité pro-apoptotique de Sp1 requiert donc au moins sa localisation nucléaire. Nous avons aussi construit des formes de Sp1 mutées ponctuellement sur un ou plusieurs doigts de zinc (annexe 1a) qui sont localisées dans le noyau mais incapables de lier l'ADN ni d'activer la transcription. La caractérisation de l'une d'elles, Sp1^{Zn2,3}, est présentée dans l'article n°2. Lorsqu'elles sont surexprimées, ces formes n'induisent plus l'apoptose des cellules Baf-3 (annexe 1b). Ces résultats montrent que l'activité pro-apoptotique de Sp1 requiert sa liaison à l'ADN et peut-être aussi son activité transcriptionnelle.

Afin de caractériser les mécanismes de l'apoptose induite par Sp1 dans les cellules Baf-3, nous avons souhaité analyser les modifications éventuelles de l'expression de gènes contrôlant les différentes étapes du programme apoptotique. Pour cela, nous avons généré des cellules Baf-3 exprimant Sp1 et la GFP de façon inductible dans les cellules Baf-3. A partir du premier système Tet-Off que nous avons utilisé, nous avons obtenu quelques clones qui entraînent en apoptose suite au retrait de la doxycycline. Cependant, leur inductibilité a été perdue au bout de quelques semaines de culture. Nous avons donc utilisé un deuxième système Tet-Off, basé sur des vecteurs pour lesquels les promoteurs LTR (Long Terminal Repeat) ont été inactivés, qui nous a permis d'obtenir plusieurs clones inductibles. La caractérisation détaillée de l'un d'eux (Baf-3-Sp1) est présentée dans l'annexe 2. Suite au retrait de la doxycycline, la cinétique d'induction de l'expression de Sp1 corrèle parfaitement avec celle de la GFP : leur expression est détectée dès 8h suite au retrait de la doxycycline et est maximale vers 20h (annexe 2a). Les premières cellules meurent par apoptose environ 30h après le retrait de la doxycycline (annexe 2a). Dans ce clone, le niveau d'expression de Sp1 de la population cellulaire totale dépend de la dose de doxycycline utilisée (annexe 2b). Ceci pourrait être dû à l'induction de différentes quantités de Sp1 dans chaque cellule, ou d'une proportion différente de cellules dans lesquelles l'expression de Sp1 est induite. Nous avons observé que le traitement des cellules avec des doses décroissantes de doxycycline induit une augmentation

de la proportion de cellules dans laquelle l'expression de la GFP, et donc de Sp1, est induite (annexe 2c). Par contre, quelle que soit la dose utilisée, dans les cellules exprimant la GFP (GFP +), Sp1 est surexprimé à un niveau équivalent (annexe 2d). Ces résultats indiquent que l'induction de l'expression de Sp1 dans le clone Baf-3-Sp1 suit la loi du tout ou rien. Deux autres clones inductibles ont été obtenus et sont présentés dans l'article 2. Pour au moins un de ces clones, l'induction de l'expression de Sp1 suit aussi la loi du tout ou rien (données non montrées) suggérant que c'est une règle plutôt qu'une exception. Dans le clone Baf-3-Sp1, l'expression des gènes de la famille des récepteurs de mort, de la famille Bcl-2 et de la famille des caspases a été analysée par protection à la RNase à différents temps après l'expression ectopique de Sp1 (figure 6 a et b). Nous n'avons pas observé de modification majeure de l'expression des différents gènes, sauf une diminution d'un facteur 2 de l'expression de Bax et de Bcl-X et une augmentation tardive de la caspase-11 inflammatoire (figure 6 c).

Dans cette étude, nous avons donc montré que la surexpression du facteur Sp1 induit l'apoptose de différentes lignées cellulaires non transformées. Les mécanismes de l'apoptose induite par Sp1 sont spécifiques au type cellulaire : vraisemblablement via la voie des récepteurs de mort dans les fibroblastes et par des mécanismes non identifiés dans les cellules hématopoïétiques Baf-3. Nous avons montré que, dans ces cellules, l'activité apoptotique de Sp1 requiert sa localisation nucléaire, sa liaison à l'ADN et peut-être son activité transcriptionnelle. Les mécanismes de l'induction de l'apoptose par Sp1 restent à identifier puisque nous n'avons pas identifié de modification majeure de l'expression de régulateurs connus de l'apoptose suite à la surexpression de Sp1.

ORIGINAL ARTICLE

Overexpression of Sp1 transcription factor induces apoptosisE Deniaud^{1,2,3,5}, J Baguet^{1,2,3,5}, A-L Mathieu^{1,2,3}, G Pagès⁴, J Marvel^{1,2,3} and Y Leverrier^{1,2,3}¹Inserm, U503, Lyon, France; ²IFR128, BioSciences Lyon-Gerland, Lyon, France; ³Université Lyon 1, Lyon, France and ⁴Centre Antoine Lacassagne, UMR CNRS 6543, Université de Nice Sophia Antipolis, Nice, France

Transcription factor Sp1 has recently been shown to be overexpressed in a number of human cancers and its overexpression contributes to malignant transformation. Sp1 regulates the expression of a number of genes participating in multiple aspects of tumorigenesis such as angiogenesis, cell growth and apoptosis resistance. To better understand the role of increased Sp1 levels on apoptosis regulation we have used retroviruses to overexpress this protein in haematopoietic Baf-3 cells and in 3T3 fibroblasts. We have also used inducible expression systems to control ectopic Sp1 levels in different cell types. Surprisingly, Sp1 overexpression on its own induces apoptosis in all the cellular models tested. The apoptotic pathways induced by Sp1 overexpression are cell type specific. Finally, using a truncated form of Sp1, we show that Sp1-induced apoptosis requires its DNA-binding domain. Our results highlight that Sp1 levels in untransformed cells must be tightly regulated as Sp1 overexpression leads to the induction of apoptosis. Our results also suggest that cancer cells overexpressing Sp1 can avoid Sp1-induced apoptosis.

Oncogene advance online publication, 22 May 2006;
doi:10.1038/sj.onc.1209696

Keywords: apoptosis; Sp1; transcription factor

Introduction

Transcription factor Sp1 is a zinc-finger protein and was the first member identified of the growing Sp/XKLF family that binds GC-rich elements (Philipsen and Suske, 1999). GC-rich sequences are common regulatory elements in promoters of housekeeping genes as well as many tissue-specific genes. Sp1 has traditionally been considered as a constitutive transcription factor regulating basal promoters activity because it is expressed in all cell types and Sp1-binding sites are found in the promoters of many housekeeping genes. However, it is becoming increasingly clear that Sp1 is also involved in

tissue-specific gene expression, its activity being finely modulated by a variety of stimuli through multiple post-translational modifications (Bouwman and Philipsen, 2002).

Tumorigenesis is a multistep process involving cell proliferation, apoptosis resistance and angiogenesis. In that respect, it is interesting to note that Sp1 participates in the regulation of genes involved in all these aspects of tumorigenesis (Black *et al.*, 2001). Moreover, numerous studies have documented that Sp1 activity and/or Sp1 expression levels are elevated in various human cancers. Elevated levels of Sp1 protein have been observed in human primary gastric tumours, in pancreatic adenocarcinomas and in thyroid tumours but not in normal tissues (Shi *et al.*, 2001; Chiefari *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). In gastric cancer, elevated Sp1 expression levels have been correlated with a poor survival (Yao *et al.*, 2004). Sp1-binding activity was shown to be higher in human breast carcinomas and in hepatocellular carcinomas than in corresponding normal tissues (Lietard *et al.*, 1997; Zannetti *et al.*, 2000). In mice, both Sp1 mRNA level and Sp1-binding activity were shown to be increased during skin tumour progression (Kumar and Butler, 1999). Recently, a link between alterations of Sp1 expression/activity and transformation has been demonstrated. Indeed, inhibition of Sp1 overexpression in human fibrosarcoma cell lines leads to reduced tumours formation in athymic mice and to a decreased ability to form colonies in agarose (Lou *et al.*, 2005). These findings confirm previous data where transfection of lung cancer and glioma cell lines with dominant-negative Sp1 decoy oligonucleotides inhibited their proliferation and their invasiveness *in vitro* (Ishibashi *et al.*, 2000). All together, these findings show that Sp1 is overexpressed or overactivated in a number of cancers and that its activity plays a role in late stage of carcinogenesis.

Cancer progression requires resistance to apoptosis and accumulating evidence suggests that Sp1 is involved in the regulation of apoptosis. The promoters of many antiapoptotic genes (*bcl-2*, *bcl-x*, *survivin*) as well as many proapoptotic genes (*bax*, *trail*, *fas*, *fas-ligand*, *caspase-8* and *caspase-3*) contain Sp1-binding sites (Black *et al.*, 2001). Although embryonic stem cells with inactivated Sp1 are viable, and grow and differentiate normally, Sp1 deficient embryos are retarded in development and die after day 10 of gestation (Marin *et al.*, 1997). Sp1 deficiency causes a cell autonomous defect as when injected into wild-type blastocysts, Sp1-deficient

Correspondence: Dr J Marvel and Dr Y Leverrier, Inserm, U503, 21 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France.
E-mails: marvel@cervi-lyon.inserm.fr and leverrier@cervi-lyon.inserm.fr

⁵These two authors contributed equally to this work.

Received 29 July 2005; revised 16 March 2006; accepted 12 April 2006

embryonic stem cells contribute to every tissue of chimeras but only until day 10. These results suggest that Sp1 is required for cell survival and/or proliferation (Marin *et al.*, 1997). Accordingly, sustained expression of Sp1 protects primary cortical neurons from cell death induced by oxidative stress or DNA damage (Ryu *et al.*, 2003b). In the same cells, acetylation of Sp1 has recently been associated with increased Sp1-dependent transcription and resistance of neurons to oxidative stress-induced death *in vitro* and *in vivo* (Ryu *et al.*, 2003a). However, Sp1 has also been associated with apoptosis induction. Hence, Sp1 phosphorylation regulates smooth muscle cells apoptosis via extracellular Fas-Ligand-Fas engagement (Kavurma *et al.*, 2001). In the same cells, Sp1 transfection induces cell death by a mechanism that involves the repression of the cell cycle inhibitor p21 expression (Kavurma and Khachigian, 2003). Finally, inhibitors of histone deacetylases selectively induce the apoptosis of tumour cells via the induction of tumour-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression (Nebbio *et al.*, 2005). This process is dependent on the acetylation and the recruitment of Sp1 and Sp3 to the *trail* promoter. Collectively, these results suggest an important role for Sp1 in the regulation of apoptosis that needs, however, to be better defined.

To establish the effect of Sp1 on the regulation of apoptosis we have overexpressed this protein in various cell lines. Our work demonstrates that Sp1 overexpression leads to the activation of a program of apoptosis in immortalized nontransformed mouse and hamster fibroblasts and in mouse pro-B cell line. The apoptotic pathways induced by Sp1 overexpression are cell type specific and require its DNA-binding domain. Finally, by monitoring the expression of apoptosis regulatory genes we show that the apoptotic pathway induced by Sp1 in Baf-3 cells is different from the ones previously described.

Results

Sp1 overexpression is detrimental

To test the effect of Sp1 on apoptosis regulation we have ectopically expressed human Sp1 in interleukin-3 (IL-3)-dependent haematopoietic Baf-3 cells. We have used a bicistronic retrovirus coding for full-length flagged Sp1 and the cell surface marker CD2 to identify transduced cells. Within 1 day of culture with retroviruses, a substantial proportion of Baf-3 cells were infected as revealed by CD2 expression (Figure 1a). Transduction of cells with full-length flagged Sp1 encoding retrovirus resulted in Sp1 protein overexpression as visualized in Sp1-infected cells purified by magnetic selection with anti-CD2 antibody (Figure 1b). Surprisingly, 2 days after infection with retrovirus coding for full-length flagged Sp1, the proportion of CD2-positive cells started to decrease (Figure 1a) and 1 day later almost all CD2-positive cells were lost. In contrast, the percentage of CD2-expressing cells in the population infected by the

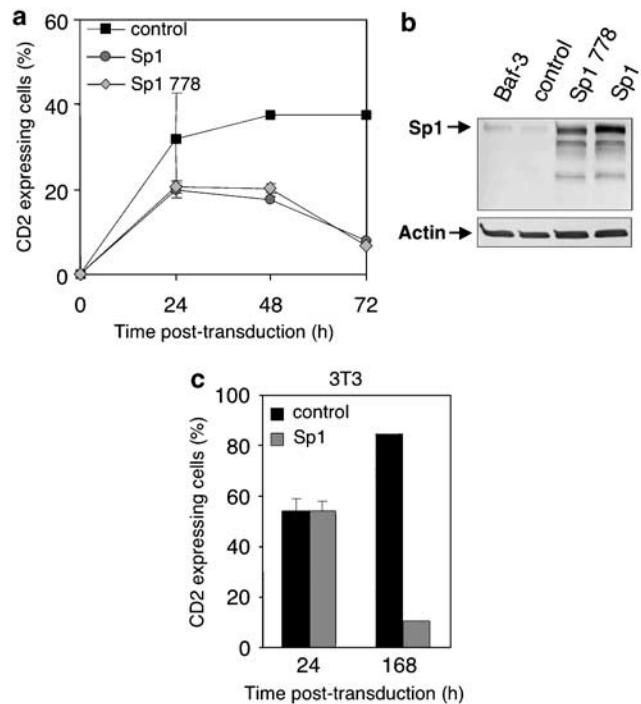


Figure 1 Sp1 overexpression is detrimental. (a) Baf-3 cells were cultured with either control pMX-IRES-CD2 retrovirus (control) or retroviruses coding for full-length flagged Sp1 (Sp1) or for unflagged Sp1 lacking the seven NH₂-terminal amino-acid residues (Sp1 778). The percentage of infected cells (CD2 positive) was measured at different time points by FACS analysis. Results show the means \pm s.d. of triplicate samples. Results are representative of more than three independent experiments. (b) Western blot analysis of Sp1 protein levels in parental Baf-3 cells and in Baf-3 cells transduced with either a control retrovirus or retroviruses coding for Sp1 778 or full-length flagged Sp1. Thirty hours postinfection, transduced cells were purified by magnetic selection with anti-CD2 antibody. Proteins (50 μ g) from whole-cell lysates were separated on 10% SDS-PAGE. Blots were probed with polyclonal rabbit anti-Sp1 antibody and reprobbed with anti-actin antibody in order to verify equal loading. (c) 3T3 fibroblasts were infected with either control retrovirus or a retrovirus coding for full-length flagged Sp1. The percentage of infected cells (CD2 positive) was measured 24 and 168 h after infection. Results show the means \pm s.d. of two independent experiments.

control retrovirus was maintained over time and cells could be grown for long period of time (Figure 1a and data not shown). These results suggest that elevation of Sp1 levels in Baf-3 cells is detrimental for their growth in culture.

The full-length flagged Sp1 we have used codes for the complete amino sequence of Sp1 (785 amino acids long) (Takahara *et al.*, 2000). As most studies on Sp1 to date have been performed using a truncated form lacking the seven NH₂-terminal residues (Sp1 778) (Suske, 1999), we have also studied the effect of Sp1 778. Twenty-four hours post-transduction a similar proportion of Baf-3 cells were transduced by retroviruses coding for the different Sp1 constructs (Figure 1a). However, 2 days later almost all Sp1-infected cells were lost indicating that the detrimental effect of Sp1 is not isoform specific.

The results were extended to another cell type, the murine 3T3 fibroblast cell line. Although at early time point a high proportion of 3T3 expressed CD2 following transduction with control or Sp1 encoding retroviruses, the percentage of cells expressing CD2 was drastically reduced 7 days after transduction with Sp1 (Figure 1c). Therefore, the loss of Sp1 overexpressing cells is a general phenomenon.

Sp1 overexpression induces apoptosis

The detrimental effect of Sp1 on cell maintenance in culture could be due to at least two mechanisms, that is, cell cycle arrest or cell death. To investigate the latter possibility, we have analysed several markers of apoptosis on Sp1-infected Baf-3 cells. Two days after infection, Sp1-transduced Baf-3 cells displayed a profound increase in annexin V staining, reflecting the phosphatidylserine externalization at the plasma membrane, an event occurring at an early stage of apoptosis (Figure 2a). Notably, time course studies of phosphatidylserine externalization mirrored the loss of CD2-expressing cells. Moreover, caspase-3 was activated in Sp1-transduced Baf-3 cells but not in control-infected cells as revealed by intracellular staining (Figure 2b). Consistently, incubation of Sp1-transduced cells with pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK inhibited Sp1-induced phosphatidylserine externalization in a dose-dependent manner (Figure 2c). Maximal inhibition of Sp1-induced apoptosis occurred at 500 μ M of Z-VAD-FMK. This is similar to the dose required to inhibit apoptosis induced by IL-3 starvation in Baf-3 cells (Leverrier *et al.*, 1999). Altogether, these results indicate that Sp1 overexpression induces a caspase-dependent apoptosis.

Overexpression of antiapoptotic genes from the Bcl-2 family (such as *bcl-x* or *nr-13*) delays apoptosis commitment induced by a large number of apoptotic stimuli (Mangeny *et al.*, 1996). Therefore, we have tested the effect of antiapoptotic genes *bcl-X* and *nr-13* expression on Sp1-induced apoptosis in Baf-3 cells. Two days after infection, Sp1-transduced Baf-3 cells overexpressing *bcl-X* or *nr-13* genes (Mangeny *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1998) displayed reduced phosphatidylserine externalization compared to Sp1-transduced parental Baf-3 cells (Figure 2d). Therefore, Sp1 activates an apoptotic pathway in Baf-3 cells that is sensitive to inhibition by Bcl-2 family members.

The results were extended to another cell line, a subclone of the CCL39 hamster fibroblast cell line (CCL39 WT2 clone) in which overexpression of full-length human Sp1 is induced with tetracycline (Milani-Mongiati *et al.*, 2002). We took advantage of the CCL39 WT2 cells in which induction of different levels of Sp1 were obtained by addition of tetracycline in a dose-dependent fashion (Figure 3a). Ectopic Sp1 expression was detectable by incubating the cells for 48 h with 0.01 μ g/ml tetracycline and was maximal with 1 μ g/ml tetracycline. Figure 3b shows that addition of high doses of tetracycline (0.1–1 μ g/ml) to CCL39 WT2 cells resulted in apoptosis as detected by phosphatidyl-

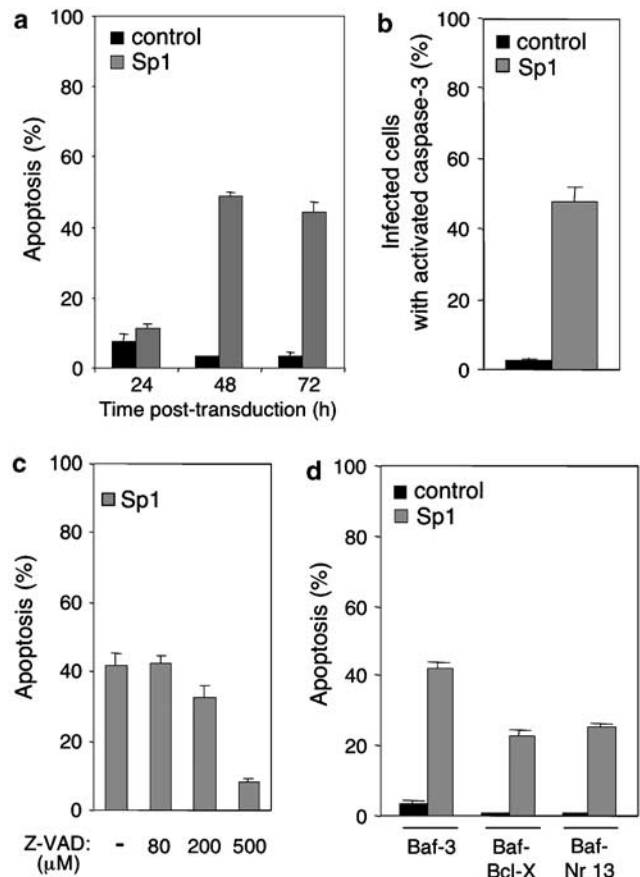


Figure 2 Sp1 overexpression induces Baf-3 cell apoptosis. Baf-3 cells were infected with control retrovirus (control) or full-length flagged Sp1 encoding retrovirus (Sp1). (a) The percentage of apoptotic cells (annexin V positive) was measured at various time points among infected cells (CD2 positive). (b) Staining for activated caspase-3 was performed and analysed by FACS among CD2-positive cells 72 h postinfection ($n=3$ independent experiments, mean \pm s.d.). (c) At 30 h after infection cells were incubated with various concentrations of pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK. The percentage of apoptotic cells (annexin V positive) was measured 18 h later among infected cells (CD2 positive). Results show the means \pm s.d. of triplicate samples. Results are representative of three independent experiments. (d) Baf-3 cells and Baf-3 cells overexpressing *bcl-x* (Baf-Bcl-X) or *nr-13* (Baf-Nr-13) genes were infected with control retrovirus (control) or full-length flagged Sp1 encoding retrovirus (Sp1). The percentage of apoptotic cells (annexin V positive) was measured 48 h later among infected cells (CD2 positive). Results show the means \pm s.d. of triplicate samples. Results are representative of three independent experiments.

serine externalization, whereas addition of low dose of tetracycline (0.01 μ g/ml) did not. These results confirm that deregulated expression of high doses of Sp1 leads to apoptotic cell death.

Apoptotic pathways activated by Sp1 overexpression are cell type specific

A recent work has revealed that a subtype of smooth muscle cells expressing abundant levels of Sp1 undergoes greater spontaneous apoptosis that is correlated with the production of the death agonist Fas-ligand

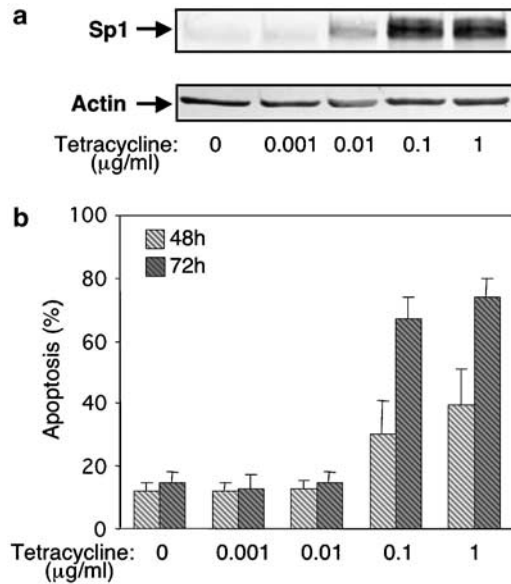


Figure 3 Regulation of apoptosis by Sp1 in CCL39 fibroblasts. (a) CCL39 WT2 cells expressing tetracycline-inducible Sp1 were grown with the indicated tetracycline concentrations. Medium was replaced 24 h later and the cells were further incubated with the same concentration of tetracycline for 24 h. Western blot analysis of Sp1 and actin protein levels was performed as described in Figure 1. (b) The percentage of apoptosis was measured by annexin V staining 48 h ($n=3$) and 72 h ($n=2$) after tetracycline addition. Results show the means of n independent experiments \pm s.d.

(Kavurma *et al.*, 2001). This prompted us to investigate whether the Fas pathway was involved in Sp1-induced apoptosis in Baf-3 cells. Baf-3 cells express Fas/CD95 constitutively albeit at very low level and can be killed through Fas by a caspase-8-dependent mechanism (Munoz-Pinedo *et al.*, 2001). Pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK and caspase-8 inhibitor Z-IETD-FMK both inhibited Fas-induced apoptosis of control-infected Baf-3 cells (Figure 4a). In contrast, Z-VAD-FMK but not Z-IETD-FMK inhibited Sp1-induced apoptosis in Baf-3 cells. These results show that in Baf-3 cells whereas Fas-induced apoptosis is caspase-8 dependent, Sp1-induced apoptosis is caspase-8 independent.

In contrast to Baf-3 cells, both pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK and caspase-8 inhibitor Z-IETD-FMK inhibited Sp1-induced apoptosis of CCL39 WT2 fibroblasts (Figure 4b). Altogether these results indicate that Sp1-induced apoptotic pathways are caspase-8 dependent in CCL39 WT2 cells but caspase-8 independent in Baf-3 cells suggesting a cell type-specific death-induced pathway.

Induction of apoptosis by Sp1 requires its DNA-binding domain

Recent studies have highlighted that some transcription factors such as p53 or papillomavirus E2 can induce apoptosis independently of their transcriptional activities (Demeret *et al.*, 2003; Chipuk *et al.*, 2004). In the case of p53, cytosolic localization of endogenous

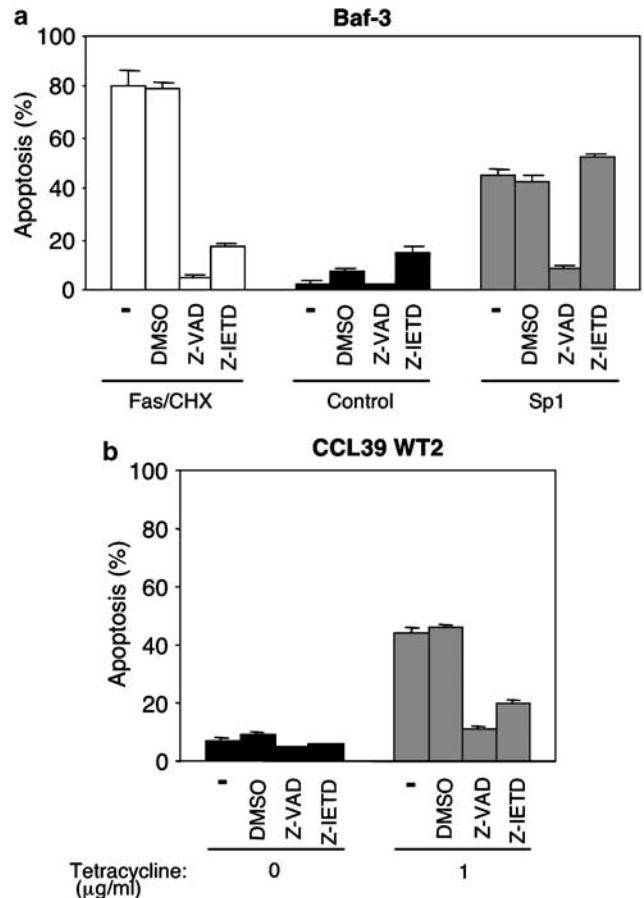


Figure 4 Apoptotic pathways activated by Sp1 overexpression are cell type specific. (a) Baf-3 cells were infected with control retrovirus (control) or retrovirus coding for full-length flagged Sp1 (Sp1). Thirty hours postinfection, cells were left untreated or incubated with DMSO or 500 μ M Z-VAD-FMK or 500 μ M Z-IETD-FMK. Fas-induced apoptosis was induced in the presence of cycloheximide (CHX) as described in the Materials and methods. Before Fas stimulation, control-infected cells were preincubated for 30 min with caspases inhibitors. The percentage of apoptotic cells (annexin V positive) was measured 18 h later among infected cells (CD2 positive). (b) CCL39 WT2 cells expressing tetracycline-inducible Sp1 were incubated for 24 h with or without tetracycline 1 μ g/ml. Medium was replaced 24 h later and caspases inhibitors (500 μ M Z-VAD-FMK or 500 μ M Z-IETD-FMK) were added. The percentage of apoptotic cells (annexin V positive) was measured 24 h later. Results (mean \pm s.d. of triplicate samples) are representative of at least two independent experiments.

wild-type protein is sufficient for apoptosis induction. We then asked whether this could be the case for Sp1. We have constructed a truncated form of Sp1 (Sp1 Δ Zn) lacking its DNA-binding domain that consists in 3 zinc-fingers (Philipsen and Suske, 1999). Baf-3 cells were transduced with either full-length Sp1 or Sp1 Δ Zn and examined thirty hours later. Transduced full-length Sp1 was transcriptionally active as purified Sp1-infected cells showed increased mRNA levels coding for lactate dehydrogenase (LDH) A (Figure 5a), a gene which basal expression level is regulated by Sp1 (Short *et al.*, 1994). As expected, transduced Sp1 Δ Zn did not induce LDH-A transcription although the protein expression

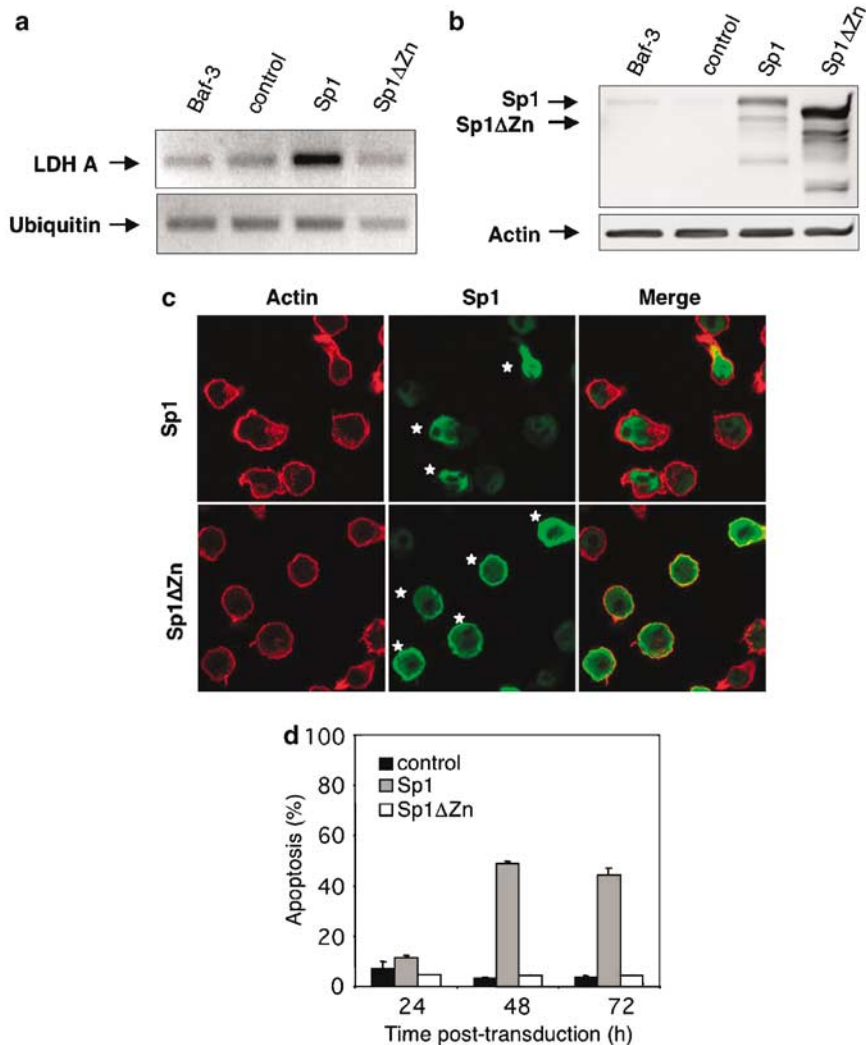


Figure 5 Sp1 lacking its DNA-binding domain does not induce apoptosis. Baf-3 cells were infected with control retrovirus, full-length flagged Sp1 encoding retrovirus (Sp1) or Sp1ΔZn encoding retrovirus (Sp1ΔZn) lacking the DNA-binding domain. Cells were analysed 30 h postinfection. **(a)** CD2-expressing cells were purified and LDH A and ubiquitin transcripts were amplified by RT-PCR (27 and 30 cycles, respectively). **(b)** Western blot analysis of Sp1 and actin protein levels was performed on CD2-expressing cells as described in Figure 1. **(c)** Cells were costained for actin (right panel) and Sp1 (middle panel) and analysed by confocal microscopy. Asterisks indicate transduced cells. **(d)** The percentage of apoptotic cells (annexin V positive) was measured at various time points among infected cells (CD2 positive). Results show the means \pm s.d. of triplicate samples. One representative experiment out of two is shown.

levels of Sp1ΔZn were higher than Sp1 expression levels (Figure 5b). When the cells were examined by confocal fluorescent microscopy full-length Sp1 was detected in the nucleus of transduced cells (Figure 5c), whereas Sp1ΔZn accumulated preferentially in the cytoplasm. This confirms a previous report indicating that the nuclear localization sequences of Sp1 are included in its DNA-binding domain (Lomberk and Urrutia, 2005). We then analysed the viability of transduced cells and observed that Sp1 induced apoptosis, whereas Sp1ΔZn did not (Figure 5d). This was not due to delayed apoptosis associated with Sp1ΔZn as Sp1ΔZn-transduced cells could be grown for long period of time (data not shown). Altogether, these results indicate that Sp1 proapoptotic activity is linked to its nuclear localization and/or to its DNA-binding activity. The latter would

indicate that Sp1 induces Baf-3 cells apoptosis through a transcription-dependent mechanism.

Gene expression in Sp1 overexpressing Baf-3 cells

To further investigate the mechanisms of apoptosis induction by Sp1, we introduced an inducible tetracycline (tet)-off expression system in Baf-3 cells (see Materials and methods). In the absence of doxycycline, expression of the ectopic full-length Sp1 was rapidly induced as detected at the mRNA and protein levels (Figure 6a and b). At 30 h after doxycycline removal, Baf-3-Sp1 cells entered apoptosis as revealed by loss of plasma membrane integrity, phosphatidylserine externalization and loss of mitochondrial membrane potential (Figure 6a and data not shown), confirming that Sp1

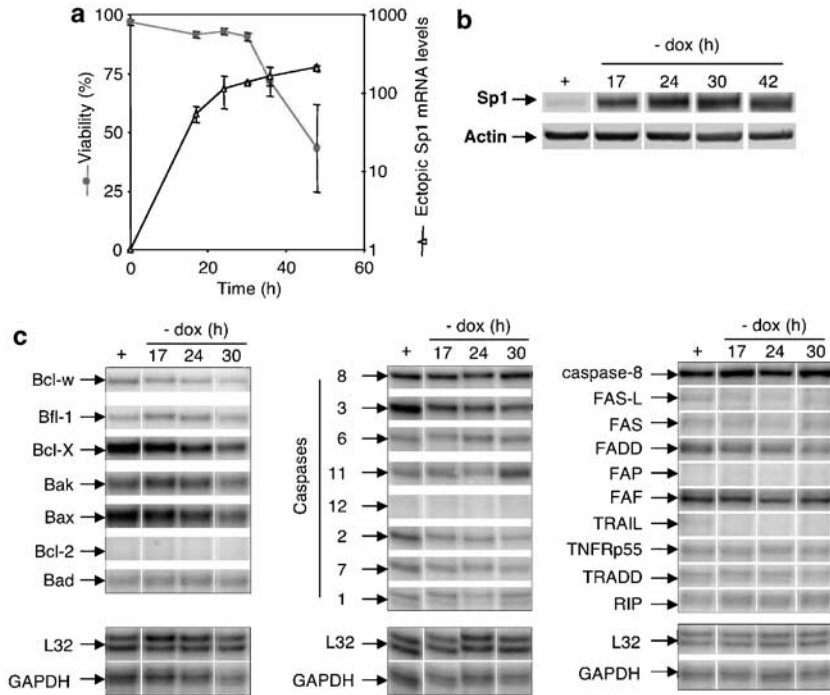


Figure 6 Apoptosis induction and gene expression analysis in Baf-3 cells following Sp1 overexpression. Baf-3 cells expressing Sp1 under an inducible promoter were grown in the presence or in the absence of doxycycline for the indicated time. (a) The percentage of apoptosis was measured by propidium iodide staining. The relative levels of ectopic Sp1 mRNA were quantified following reverse transcription by real-time PCR. Results show the mean \pm s.d. of three independent experiments. (b) Western blot analysis of Sp1 and actin protein levels was performed as described in Figure 1. (c) Levels of mRNA coding for Bcl-2 family members, caspases and death receptor family. Baf-3-Sp1 cells were grown in the presence (+) or in the absence of doxycycline for 17, 24 or 30 h. Gene expression was monitored by RPA. One representative experiment out of three is shown.

overexpression induces apoptosis. We subsequently analysed the expression of a panel of genes involved in the regulation of apoptosis (Bcl-2 family), in the induction of apoptosis (death receptors family) or in the effector phase of apoptosis (caspases family) (Figure 6c). Gene expression was monitored at different time points (17, 24 and 30 h following doxycycline removal) when cells already expressed high levels of Sp1 protein but before the onset of apoptosis. Cells grown in the presence of doxycycline were used as controls. Upon Sp1 induction, among the transcripts analysed, the one that showed the strongest variation are the one coding for the antiapoptotic protein Bcl-X_L (2.1-fold decrease \pm 0.8 30 hours after doxycycline removal, $n=3$ independent experiments) and for the proapoptotic protein Bax (1.7-fold decrease \pm 0.5). The other transcripts from the Bcl-2 family, the caspases family and the death receptors that were expressed in Baf-3 cells did not show any significant variation in their expression levels following Sp1 induction. Some genes previously linked with Sp1-induced apoptosis such as Fas-Ligand or TRAIL were not detected in Baf-3 cells and were not induced by Sp1 upregulation.

Discussion

Many transcription factors have been implicated in the induction or the inhibition of apoptosis. Some

transcription factors such as ATF α seem to have purely antiapoptotic activities (Persengiev *et al.*, 2002). E2F-1 has both activities as it is required for T-cell apoptosis *in vivo* and its overexpression induces apoptosis in a number of cell lines but inhibits apoptosis in others such as Baf-3 cells (Field *et al.*, 1996; Gala *et al.*, 2001). However, increased activity of many transcription factors such as c-Jun, c-Fos, E2F-1, p75 c-Myb, FKH-L1, c-Myc and p53 induces apoptosis or sensitises the cells to proapoptotic stimuli (Harrington *et al.*, 1994; Qin *et al.*, 1994; Lassus *et al.*, 1996; Preston *et al.*, 1996; Bossy-Wetzel *et al.*, 1997; Dijkers *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2003). Our study shows that this is also the case for Sp1. We also show that Sp1-induced apoptosis in contrast to other transcription factors such as c-Myc occurs even in the presence of growth factors such as IL-3 or serum. As a matter of fact, although deregulated expression of c-Myc induces apoptosis, it does so in low serum and c-Myc-induced apoptosis is inhibited by survival factor such as IGF-1 (Harrington *et al.*, 1994). Therefore, Sp1 regulation of apoptosis seems to differ from c-Myc regulation of apoptosis. Some transcription factors such as p53 and human papillomavirus HPV E2 have been shown to exert their proapoptotic activity independently of transcription. (Demeret *et al.*, 2003; Chipuk *et al.*, 2004). In the case of p53, cytosolic localization of endogenous wild-type protein is sufficient for apoptosis induction. Our results show that this is not the case for Sp1 as a truncated Sp1, deleted from its

DNA-binding domain that is mainly localized in the cytoplasm, does not induce Baf-3 cells apoptosis. Therefore, Sp1 proapoptotic activity is either linked to its nuclear localization and/or to its DNA-binding activity. The latter hypothesis would indicate that Sp1 induces Baf-3 cells apoptosis through a transcription-dependent mechanism. However, further investigations using forms of Sp1 unable to activate transcription but still localized in the nucleus will be required to determine whether this is the case.

Sp1-binding sites are present in the promoters of many proapoptotic genes such as *bax*, *fas*, *fas-ligand*, *trail*, *caspase-8* and *caspase-3* (Black *et al.*, 2001). Sp1-dependent expression of Fas-Ligand and TRAIL has been shown to be involved in the induction of apoptosis in different cell types (Kavurma *et al.*, 2001; Nebbioso *et al.*, 2005). In hamster CCL39 fibroblasts, Sp1-induced apoptosis might involve a death receptor-activated pathway as it is inhibited by caspase-8 inhibitor. However, the expression of Fas or TRAIL could not be monitored as hamster-specific tools are currently not available. In contrast, in Baf-3 cells, Fas-Ligand and TRAIL are not detected at the mRNA level and their expression is not induced before the onset of Sp1-triggered apoptosis (Figure 6c). Accordingly, although Fas-induced apoptosis in Baf-3 is inhibited by caspase-8 inhibitor, Sp1-induced apoptosis is not. In acute myeloid leukaemia cells Sp1-induced TRAIL upregulation is dependent on increased levels of histone acetylation leading to a greater accessibility of the *trail* promoter. Hence, as in Baf-3 cells TRAIL and Fas-Ligand are not expressed, it is likely that their promoters are in an inactive conformation. Under these conditions, Sp1 overexpression on its own is not sufficient to induce their expression. Altogether, our result indicate that the mechanism by which Sp1 induces apoptosis in Baf-3 cells appears to be distinct from the ones previously described in other cell types.

Among the transcripts analysed by RNase protection assay (RPA), Bcl-X show the highest change in its levels of expression. *bcl-x* gene has Sp1-binding sites in its promoter (Grillot *et al.*, 1997) and has been shown to be tightly regulated in Baf-3 cells (Leverrier *et al.*, 1999; Rosa Santos *et al.*, 2000). Although the decrease of Bcl-X might sensitize the cells to apoptosis, this decrease is unlikely to be the cause of Baf-3 cell death as it has been previously shown that they can remain viable with minimal Bcl-X expression levels (Low *et al.*, 2001). Therefore, if Sp1-induced apoptosis proceeds through a transcriptional mechanism, the molecular targets involved remain to be identified in Baf-3 cells.

It has become increasingly evident that Sp1 plays a role in cancer. Firstly, Sp1 activity is increased following phosphorylation by oncogenic signalling pathways such as the RAS/RAF/MAPK and the PI3K/Akt pathways (Kivinen *et al.*, 1999; Milanini-Mongiat *et al.*, 2002; Pore *et al.*, 2004). Secondly, Sp1 is overexpressed and/or hyperactivated in a number of human tumours (Lietard *et al.*, 1997; Zannetti *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2001; Chiefari *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Thirdly, Sp1

overexpression is required for the maintenance of the transformed phenotype as its downregulation in human fibrosarcoma cell lines inhibits their tumorigenicity (Lou *et al.*, 2005). This indicates that Sp1 overexpression or overactivation contributes to transformation. This effect could be achieved via the Sp1-dependent regulation of growth-promoting oncogenes such as *IEX-1* and *TCL1* (Im *et al.*, 2002; French *et al.*, 2003). Involvement of Sp1 in cancer cell growth regulation is also strongly suggested by the growth inhibitory effect of dominant-negative Sp1 or Sp1-decoy oligodeoxynucleotides (Chen *et al.*, 2000; Ishibashi *et al.*, 2000; Chae *et al.*, 2004). Sp1 also favours cell transformation via the regulation of *VEGF* expression, a gene overexpressed in many tumours and that contributes to their neovascularization. Indeed, Sp1 overexpression consistently correlates with angiogenic potential in pancreatic adenocarcinoma (Shi *et al.*, 2001). Although Sp1 overexpression might be beneficial for tumour cells, our results highlight that high levels of Sp1 are detrimental in various untransformed cell lines. Therefore, it is tempting to speculate that tumour cells can only survive elevated Sp1 levels after they have acquired mechanisms that counteract Sp1 induction of apoptosis. This is supported by our data showing that Bcl-2 family members inhibit the apoptotic program activated by Sp1. This is also in agreement with experimental data showing that levels of Sp1 slowly increase during the process of transformation in a fibrosarcoma transformation model (Lou *et al.*, 2005).

Materials and methods

Materials

Caspase-8 inhibitor Z-Ile-Glu(Ome)-Thr-DL-Asp(Ome)-fluoromethylketone (Z-IETD-FMK, Bachem distribution, Weil am Rhein, Germany) and pan-caspase inhibitor Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone (Z-VAD-FMK, Bachem) were resuspended in dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau, France). Polyclonal rabbit antiserum was raised against recombinant full-length human Sp1 that has been histidine-tagged. Briefly, Sp1 cDNA was cloned in-frame into pQE32 plasmid (Qiagen SA, Courtaboeuf, France) and the histidine-Sp1 fusion protein was expressed and purified from *Escherichia coli* according to the manufacturer's protocol (Qiagen). Polyclonal rabbit serum was generated by Covalab (Lyon, France).

Cell culture

The murine bone marrow-derived IL-3-dependent Baf-3 cell line (Rodriguez-Tarduchy *et al.*, 1990) was maintained in DMEM (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) containing 6% foetal bovine serum (FBS, Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Germany), 2 mM L-glutamine (Gibco) and 5% WEHI 3B cell-conditioned medium as a source of IL-3. Baf-3 cells overexpressing the antiapoptotic genes *bcl-x* (Baf-Bcl-X) and *nr-13* (Baf-Nr-13) have been characterized previously (Mangeny *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1998). 3T3 fibroblasts and the retrovirus packaging Phoenix cell line (GC Promotech Sarl, Molsheim, France) were maintained in DMEM containing 10% FCS and 2 mM L-glutamine. Hamster CCL39 fibroblast subclone (CCL39 WT2) expressing a tetracycline-

inducible human full-length Sp1 has been described in details in (Milanini-Mongiati *et al.*, 2002). CCL39 WT2 cells were cultured in DMEM without phenol red containing 7.5% FBS and maintained under antibiotics selection. Twenty-four hours before tetracycline (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) stimulation, CCL39 WT2 cells were seeded in six- or 24-multiwell cell culture plate (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) at a density of 10^4 cells/cm².

To induce Fas-triggered apoptosis, Baf-3 cells were cultured for 18 h onto plastic wells coated with $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of biotinylated Fas antibody (JO2, BD Biosciences) in the presence of cycloheximide $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma).

Retroviral constructions, transfections and transductions

The human Sp1 cDNA was excised as a 2.4 kb. *XbaI/XmaI* fragment from the plasmid pBS-Sp1-fl (a kind gift from Brian B Rudkin, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France) and was inserted into pBluescript II SK(+). This form of Sp1 codes for Sp1 778 a form lacking the first seven amino acids in the N-terminal region. The entire human Sp1 protein consists of 785 amino acids (Bouwman and Philipson, 2002). Therefore, we have generated a construct coding for a full-length human Sp1 protein identical to the one described in the databases (accession no. P08047). To do so, the N-terminal sequence of Sp1 from pBSK-Sp1 was replaced using polymerase chain reaction (PCR) by the following sequence 5'-TGA GCT GCC ACC ATG TCC GAC CAA GAT CAC TCC ATG GAC GAA ATG ACA GCT GTG GTG-3' to give pBSK-Sp1 AN. The sequence was chosen so as to replace the potential out of frame 'start codon' (position 26) and to optimize the kozak sequence without affecting the protein sequence. A FLAG-encoding sequence was inserted at the C-terminus of Sp1 into the pBSK-Sp1 AN plasmid by PCR at the *BamHI/SalI* site. A truncated form of Sp1 (Sp1 Δ Zn) lacking its DNA-binding domain that consists in three zinc-fingers (amino acids 621–708) was obtained by PCR-mediated deletion. The various constructs were sequenced before cloning into the bicistronic retroviral expression vector pMX-IRES-CD2 (a kind gift from Xuedong Liu, Boulder, CO, USA) (Liu *et al.*, 2000). The resulting constructs code for Sp1 followed by an internal ribosomal entry site and a truncated cell surface marker (CD2) to identify transduced cells. Tet-responsive enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression construct was made by cloning *EcoRI* restriction fragments of full-length cDNA of EGFP into pBABE SIN CMV 15–1 vector (a kind gift of Dr Turham, Paris, France) (Hofmann *et al.*, 1996). Full-length flagged human Sp1 AN cDNA was cloned into *EcoRI* sites of pRTP vector. pRTP (a kind gift of Dr Heinrich, Zurich, Switzerland) is a derivative of pBABE SIN CMV 15–1 vector carrying puromycin resistance gene (Heinrich *et al.*, 2000).

Ecotropic retroviral vectors were made by transfecting $10 \mu\text{g}$ of DNA into 2×10^6 Phoenix packaging cells plated in a 60-mm tissue culture dish using a standard calcium phosphate transfection method. Twenty-four hours post-transfection the culture medium was replaced and supernatants containing the retroviruses were collected 48 h later and filtered through $0.45 \mu\text{m}$ filter.

Baf-3 or 3T3 cells were transduced by centrifugating (1100g) 1.5×10^5 cells for 90 min at room temperature in 0.5 ml of viral supernatants supplemented with $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ polybrene (Sigma) and $25 \mu\text{l}$ WEHI 3B cell-conditioned medium in the case of Baf-3 cells. After completion of the spin, 1 ml of culture medium with polybrene was added. Twenty-four hours postinfection, cells were washed and cultured for the indicated times.

Inducible Baf-3-Sp1 cell line

Baf-3 cells were first transduced with self-inactivating EGFP-IRES-tTA retroviruses. Cells that had low background EGFP in the presence of doxycycline ($30 \text{ ng}/\text{ml}$, Sigma) and homogeneous high EGFP induction in the absence of doxycycline were selected by cell sorting (fluorescence-activated cell sorting (FACS)-Vantage, Becton-Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) and then cloned by limiting dilution. One clone was transduced by pRTP Sp1-IRES-tTA retrovirus and selected with $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ of puromycin. Single clones were obtained by limiting dilution and screened by PCR for pRTP Sp1-IRES-tTA retroviral integration into the genome and inducible Sp1 expression upon doxycycline removal.

FACS analysis

To detect cell surface expression of CD2, cells were incubated for 30 min with $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ PE-coupled monoclonal antibody against murine CD2 (Pharmingen) in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% FBS. After one wash, 10 000 cells were counted on a FACScalibur (Becton-Dickinson) and analysed using the CellQuest software. Annexin V staining was performed as recommended by the manufacturers. Baf-3 cells were stained with annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) (Pharmingen). Floating and adherent CCL39 cells were collected, pooled and stained with annexin V – Alexa568 (Roche). Caspase-3 activation was measured by FACS analysis as described previously (Gonin-Giraud *et al.*, 2002) using a polyclonal rabbit antiactive caspase-3 antiserum (Pharmingen) and donkey anti-rabbit antiserum coupled to FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA). When required, cells were first stained with anti-CD2-PE as indicated above followed by staining with annexin V-FITC or antiactive caspase-3 antibody.

Immunofluorescence microscopy

Thirty hours after transduction, Baf-3 cells were seeded on polylysine-coated 12-mm glass coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde (BDH) in PBS then permeabilized with 0.25% Triton X-100 (BDH) in PBS. Specimens were then incubated for 120 min with 1:50 anti-Sp1 polyclonal rabbit followed by 30 min with biotin-conjugated goat anti-rabbit antibody ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$, Jackson ImmunoResearch). Specimens were then incubated 30 min with FITC-conjugated streptavidin ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$, Becton-Dickinson) and rhodamine-conjugated phalloidin ($0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma). Slides were mounted with ProLong antifade (Invitrogen SARL). Images of cells (single sections) were obtained using a Zeiss LSM 510 confocal laser-scanning microscope.

Magnetic selection and reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR)

Thirty hours after transduction, cells were incubated with $5 \mu\text{g}$ biotinylated-anti-CD2 antibody (Pharmingen) per 10^7 cells and CD2-expressing cells were purified by magnetic selection using streptavidin microbeads according to the manufacturer's recommendations (Miltenyi Biotec, Paris, France).

Total cellular RNA was extracted using the RNA Now method (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) according to the manufacturer's instructions. RNA ($1 \mu\text{g}$) was incubated with 7 U of DNase I (Amersham). After addition of ethylenediamine-*N*, *N*, *N'*, *N'*-tetraacetic acid (EDTA) $2.5 \mu\text{M}$, samples were incubated at 65°C for 15 min, then cooled at 4°C for 5 min. Reverse transcription was performed with 200 U of Superscript II reverse transcriptase according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen). LDH A

and ubiquitin were amplified by incubating 2 μ l of a 1:10 dilution of the reverse transcribed cDNA with 0.6U Taq polymerase (Roche Diagnostics, France), 200 μ M dNTP (MBI Fermentas GmbH, St Leon-Rot, Germany), 100 nM of forward and reverse primers with a Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France, 2400 Thermal Cycler. The PCR reaction was loaded onto 1.7% agarose gel containing ethidium bromide and observed under ultraviolet illumination. The sequences of the primers used are: LDH A forward primer: 5'-TCTGGGTGATGGGAGAAGAG-3'; LDH A reverse primer 5'-AGGTGTGGGTGTACGTGTAG-3'; ubiquitin forward primer 5'-AAGAATTCAGATCGGATGACACACT-3'; ubiquitin reverse primer 5'-GCCACTTGGAGGTTGACACTTT-3'.

Western blot analysis

Cells were washed in cold PBS and lysed as described (Mathieu *et al.*, 2001). Proteins, 50 μ g, were separated on 10% Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to PVDF membranes (Millipore SAS, Molsheim, France). The membranes were incubated with 1/1000 rabbit anti-Sp1 serum or 1/2000 mouse antiactin antibody (Sigma) for 16 h at 4°C. Blots were then incubated with anti-rabbit-Cy5 or anti-mouse-Cy3 (Amersham) and the fluorescence was measured using a Typhoon 8600 (Amersham Biosciences, Orsay, France).

Multiprobe RPA

Total cellular RNA was isolated by the RNA Now method (Ozyme) according to the manufacturer's instructions. mRNA levels were measured by RPA using the Riboquant kit (Pharmingen) following the supplier's instructions. The quantity of protected RNA was determined using the PhosphorImager Typhoon 8600 and the ImageQuant software (both from Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

References

- Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. (2001). *J Cell Physiol* **188**: 143–160.
- Bossy-Wetzel E, Bakiri L, Yaniv M. (1997). *EMBO J* **16**: 1695–1709.
- Bouwman P, Philipsen S. (2002). *Mol Cell Endocrinol* **195**: 27–38.
- Chae YM, Park KK, Magae J, Lee IS, Kim CH, Kim HC *et al.* (2004). *Biochem Biophys Res Commun* **319**: 550–555.
- Chen F, Zhang F, Rao J, Studzinski GP. (2000). *Anticancer Res* **20**: 661–667.
- Chiefari E, Brunetti A, Arturi F, Bidart JM, Russo D, Schlumberger M *et al.* (2002). *BMC Cancer* **2**: 35.
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M *et al.* (2004). *Science* **303**: 1010–1014.
- Demeret C, Garcia-Carranca A, Thierry F. (2003). *Oncogene* **22**: 168–175.
- Dijkers PF, Medema RH, Pals C, Banerji L, Thomas NS, Lam EW *et al.* (2000). *Mol Cell Biol* **20**: 9138–9148.
- Field SJ, Tsai FY, Kuo F, Zubiaga AM, Kaelin Jr WG, Livingston DM *et al.* (1996). *Cell* **85**: 549–561.
- French SW, Malone CS, Shen RR, Renard M, Henson SE, Miner MD *et al.* (2003). *J Biol Chem* **278**: 948–955.
- Gala S, Marreiros A, Stewart GJ, Williamson P. (2001). *Blood* **97**: 227–234.
- Gonin-Giraud S, Mathieu AL, Diocou S, Tomkowiak M, Delorme G, Marvel J. (2002). *Cell Death Differ* **9**: 1147–1157.

Relative mRNA level was normalized using the internal control L32 mRNA.

Quantification by real-time PCR

Real-time PCR analysis was carried out using Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG kit (Invitrogen) on an ABI Prism 7700 (Perkin-Elmer). Mix were as follow: 10 μ l platinum mix, 0.8 μ l primer (10 μ M), 0.6 μ l Rox reference dye, 3.6 μ l H₂O and template in 5 μ l. The following program was used, samples were incubated at 50°C for 2 min, followed by 10 min at 95°C, followed by 40 cycles (95°C 10 s, 60°C 1 min). The dissociation curve was measured for each sample. Relative level of the Sp1 sequence against the reference sequences (HPRT and ubiquitin) was calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method with calculated real efficiencies. The sequences of primers used are: Sp1 forward primer: GCCTCCAGACCATTAACCTCAGT, Sp1 reverse primer: GCTCCATGATCACCTGGGGCA; HPRT forward primer TCATTA TGCCGAGGAT TTGGA; HPRT reverse primer: CAGAGGGCCA CAATGTGATG; ubiquitin forward primer: AAG AAT TCA GAT CGG ATG ACA CAC T, ubiquitin reverse primer: GCC ACT TGG AGG TTG ACA CTT T.

Acknowledgements

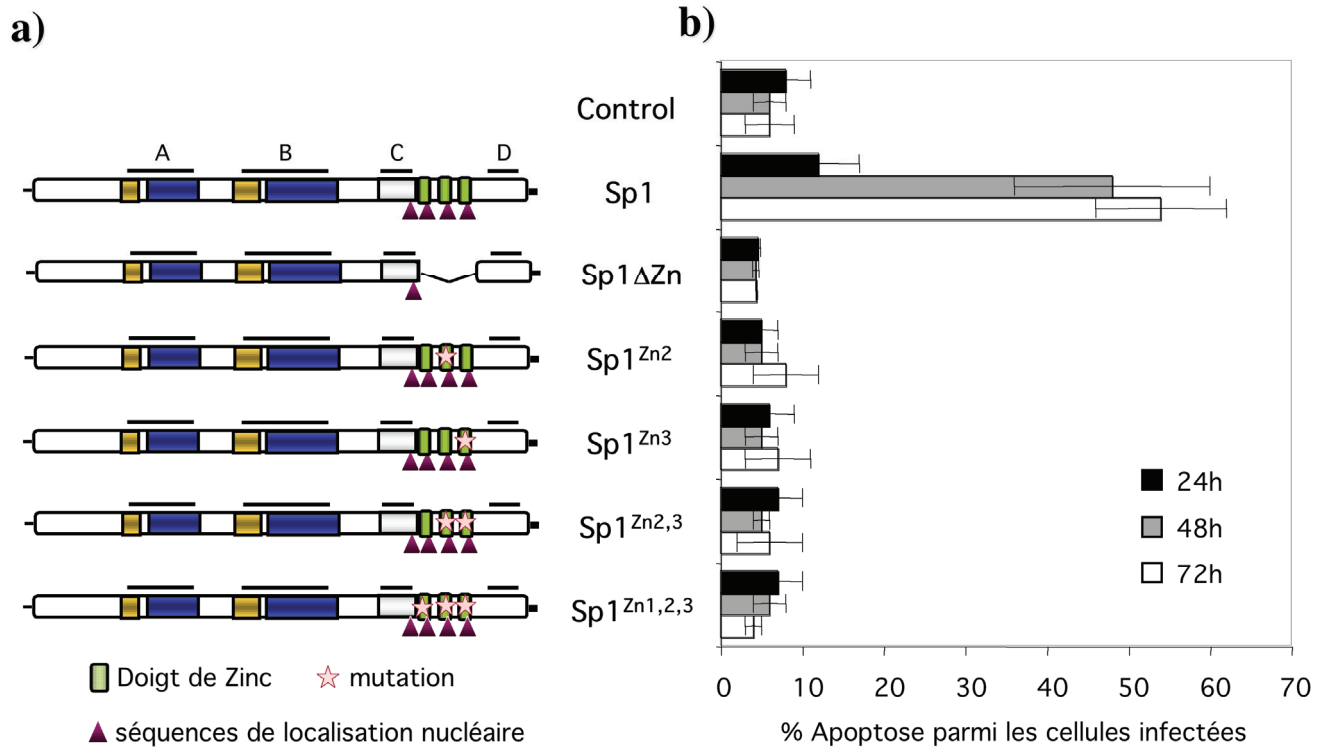
We thank Dr Kahn-Perlès for critical advice and Chantal Bella from the Plateau de Cytométrie (IFR 128) for technical assistance. We thank Dr Arpin for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Inserm, Association pour la Recherche contre le Cancer, Ligue du Rhône, Région Rhône-Alpes, Cancéropole national and Université Claude Bernard Lyon 1. ED is supported by a fellowship from the Ligue Nationale contre le Cancer.

- Grillot DA, Gonzalez-Garcia M, Ekhterae D, Duan L, Inohara N, Ohta S *et al.* (1997). *J Immunol* **158**: 4750–4757.
- Harrington EA, Bennett MR, Fanidi A, Evan GI. (1994). *EMBO J* **13**: 3286–3295.
- Heinrich J, Bosse M, Eickhoff H, Nietfeld W, Reinhardt R, Lehrach H *et al.* (2000). *J Mol Med* **78**: 380–388.
- Hofmann A, Nolan GP, Blau HM. (1996). *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5185–5190.
- Im HJ, Pittelkow MR, Kumar R. (2002). *J Biol Chem* **277**: 14612–14621.
- Ishibashi H, Nakagawa K, Onimaru M, Castellanos EJ, Kaneda Y, Nakashima Y *et al.* (2000). *Cancer Res* **60**: 6531–6536.
- Kavurma MM, Khachigian LM. (2003). *J Biol Chem* **278**: 32537–32543.
- Kavurma MM, Santiago FS, Bonfoco E, Khachigian LM. (2001). *J Biol Chem* **276**: 4964–4971.
- Kivinen L, Tsubari M, Haapajarvi T, Datto MB, Wang XF, Laiho M. (1999). *Oncogene* **18**: 6252–6261.
- Kumar A, Baker SJ, Lee CM, Reddy EP. (2003). *Mol Cell Biol* **23**: 6631–6645.
- Kumar AP, Butler AP. (1999). *Cancer Lett* **137**: 159–165.
- Lassus P, Ferlin M, Piette J, Hibner U. (1996). *EMBO J* **15**: 4566–4573.
- Leverrier Y, Thomas J, Mathieu AL, Low W, Blanquier B, Marvel J. (1999). *Cell Death Differ* **6**: 290–296.
- Lietard J, Musso O, Theret N, L'Helgoualc'h A, Campion JP, Yamada Y *et al.* (1997). *Am J Pathol* **151**: 1663–1672.

- Liu X, Constantinescu SN, Sun Y, Bogan JS, Hirsch D, Weinberg RA *et al.* (2000). *Anal Biochem* **280**: 20–28.
- Lomberk G, Urrutia R. (2005). *Biochem J* **392**: 1–11.
- Lou Z, O'Reilly S, Liang H, Maher VM, Sleight SD, McCormick JJ. (2005). *Cancer Res* **65**: 1007–1017.
- Low W, Olmos-Centenera G, Madsen C, Leverrier Y, Collins MK. (2001). *Oncogene* **20**: 4476–4483.
- Mangeny M, Schmitt JR, Leverrier Y, Thomas J, Marvel J, Brun G *et al.* (1996). *Oncogene* **13**: 1441–1446.
- Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F, Philipsen S. (1997). *Cell* **89**: 619–628.
- Mathieu AL, Gonin S, Leverrier Y, Blanquier B, Thomas J, Dantin C *et al.* (2001). *J Biol Chem* **276**: 10935–10942.
- Milanini-Mongiat J, Pouyssegur J, Pages G. (2002). *J Biol Chem* **277**: 20631–20639.
- Munoz-Pinedo C, Oliver FJ, Lopez-Rivas A. (2001). *Biochem J* **353**: 101–108.
- Nebbio A, Clarke N, Voltz E, Germain E, Ambrosino C, Bontempo P *et al.* (2005). *Nat Med* **11**: 77–84.
- Persengiev SP, Devireddy LR, Green MR. (2002). *Genes Dev* **16**: 1806–1814.
- Philipsen S, Suske G. (1999). *Nucleic Acids Res* **27**: 2991–3000.
- Pore N, Liu S, Shu HK, Li B, Haas-Kogan D, Stokoe D *et al.* (2004). *Mol Biol Cell* **15**: 4841–4853.
- Preston GA, Lyon TT, Yin Y, Lang JE, Solomon G, Annab L *et al.* (1996). *Mol Cell Biol* **16**: 211–218.
- Qin XQ, Livingston DM, Kaelin Jr WG, Adams PD. (1994). *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10918–10922.
- Rodriguez-Tarduchy G, Collins M, Lopez-Rivas A. (1990). *EMBO J* **9**: 2997–3002.
- Rosa Santos SC, Dumon S, Mayeux P, Gisselbrecht S, Gouilleux F. (2000). *Oncogene* **19**: 1164–1172.
- Ryu H, Lee J, Olofsson BA, Mwidau A, Deodeoglu A, Escudero M *et al.* (2003a). *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 4281–4286.
- Ryu H, Lee J, Zaman K, Kubilis J, Ferrante RJ, Ross BD *et al.* (2003b). *J Neurosci* **23**: 3597–3606.
- Shi Q, Le X, Abbruzzese JL, Peng Z, Qian CN, Tang H *et al.* (2001). *Cancer Res* **61**: 4143–4154.
- Short ML, Huang D, Milkowski DM, Short S, Kunstman K, Soong CJ *et al.* (1994). *Biochem J* **304**: 391–398.
- Suske G. (1999). *Gene* **238**: 291–300.
- Takahara T, Kanazu SI, Yanagisawa S, Akanuma H. (2000). *J Biol Chem* **275**: 38067–38072.
- Thomas J, Leverrier Y, Marvel J. (1998). *Oncogene* **16**: 1399–1408.
- Wang L, Wei D, Huang S, Peng Z, Le X, Wu TT *et al.* (2003). *Clin Cancer Res* **9**: 6371–6380.
- Yao JC, Wang L, Wei D, Gong W, Hassan M, Wu TT *et al.* (2004). *Clin Cancer Res* **10**: 4109–4117.
- Zannetti A, Del Vecchio S, Carriero MV, Fonti R, Franco P, Botti G *et al.* (2000). *Cancer Res* **60**: 1546–1551.

II Annexes

II.1 Annexe 1

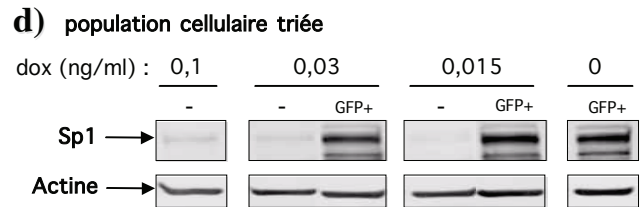
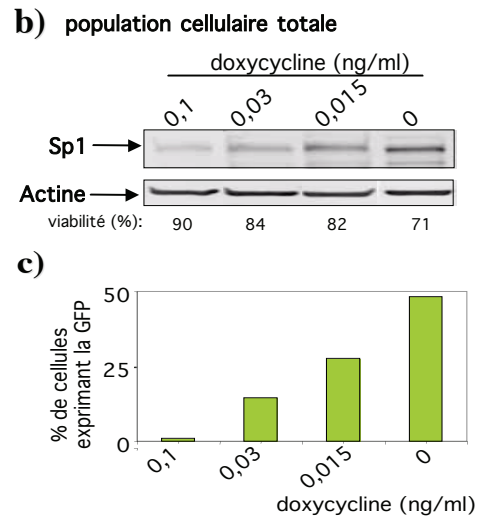
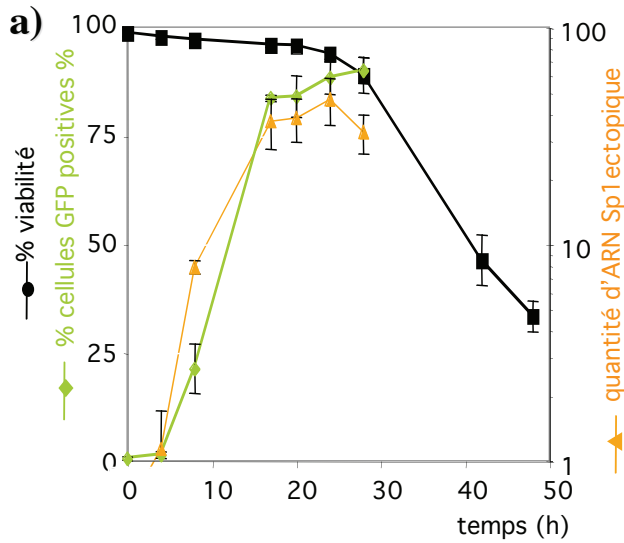


Annexe 1: L'induction de l'apoptose par Sp1 requiert sa liaison à l'ADN

a) Schéma des différentes constructions de Sp1. Sp1 Δ Zn est dépourvu de la totalité du domaine de liaison à l'ADN. Les formes Sp1^{Zn} portent des mutations ponctuelles au niveau des cystéines de un ou plusieurs doigts de zinc du domaine de liaison à l'ADN. Les étoiles indiquent les doigts de zinc portant la mutation.

b) La surexpression des différentes formes mutées de Sp1 n'induit pas l'apoptose des cellules Baf-3. Les cellules Baf-3 ont été infectées par les rétrovirus bicistroniques codant pour chacune des formes mutées de Sp1 et codant pour le marqueur CD2. Aux temps indiqués après infection, l'apoptose a été mesurée parmi les cellules infectées par double marquage Annexine V / anti-CD2 par cytométrie en flux. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes.

II.2 Annexe 2



Annexe 2: Caractérisation du clone Baf-3-Sp1 qui exprime Sp1 et la GFP sous le contrôle d'un promoteur inductible réprimé par la doxycycline

a) Les cinétiques d'induction de l'expression de la GFP et de Sp1 ont le même profil. Suite au retrait de la doxycycline du milieu de culture, le pourcentage de viabilité (noir), déterminé par coloration à l'iodure de propidium, et le pourcentage de cellules exprimant la GFP (vert) ont été mesurés par cytométrie en flux aux différents temps indiqués. Le niveau d'ARN Sp1 humain induit (orange) a été mesuré par RT-PCR en temps réel et normalisé par rapport à l'ubiquitine. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes. L'expression de Sp1 et de la GFP est détectable dès 8h et atteint un maximum dès 20h environ après le retrait de la doxycycline. L'induction de l'apoptose est observée environ 30h après le retrait de la doxycycline.

b) Le niveau d'expression de Sp1 de la population cellulaire totale dépend de la concentration de doxycycline. Le clone Baf-3-Sp1 a été cultivé en présence de différentes concentrations de doxycycline pendant 43 h. Les niveaux protéiques de Sp1 et de l'actine ont été mesurés par Western Blot. La viabilité (indiquée en pourcentage) a été analysée par coloration à l'iodure de propidium par cytométrie en flux pour vérifier l'absence d'induction d'apoptose.

c) Le pourcentage de cellules dans lesquelles l'expression de la GFP est induite varie en fonction de la concentration de doxycycline. L'expression de la GFP a été mesurée par cytométrie en flux. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

d) L'expression de Sp1 est induite uniquement dans les cellules exprimant la GFP et le niveau d'expression induit est équivalent quelle que soit la concentration de doxycycline. Le clone Baf-3-Sp1 a été cultivé en présence de différentes concentrations de doxycycline pendant 43 h. Les cellules exprimant la GFP (GFP+) et celles n'exprimant la GFP (-) ont été triées par cytométrie en flux. Les niveaux protéiques de Sp1 et de l'actine ont été mesurés par Western Blot pour chaque population cellulaire. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

III Résumé de l'Article n°2

Article 2 :

Transcriptional perturbations and cell cycle inhibition by overexpressed transcription factor Sp1

Deniaud E, Baguet J, Chalard R, Blanquier B, Brinza L, Ah-Soon C, Laugraud A, Castellazi M, Gautier C, Marvel J and Leverrier Y.

En préparation.

Dans l'article n°1, nous avons montré que Sp1, en condition de surexpression, induit l'apoptose des cellules non transformées. Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de la surexpression de Sp1 sur la progression du cycle cellulaire des cellules Baf-3, avant leur entrée en apoptose. Pour surexprimer Sp1, nous avons utilisé les mêmes outils que ceux présentés dans l'article n°1 : un système inductible ou des rétrovirus bicistroniques codant pour Sp1 (la forme sauvage ou des formes mutées) et pour le marqueur CD2.

Nous avons montré que la surexpression de Sp1, induite par retrait de la doxycycline dans deux clones inductibles indépendants (figure 1 a,b) ou après infection des cellules Baf-3 par un rétrovirus codant pour Sp1 (figure 1c), induit une accumulation des cellules en phase G1. Cette accumulation résulte d'un ralentissement de la progression des cellules en phase G1 mais pas dans les autres phases du cycle cellulaire (figure 2). Un rôle inhibiteur de la prolifération avait déjà été décrit pour Sp1, impliquant la modulation de l'expression d'un de ses gènes cibles p21. Nous avons donc testé l'expression de ce gène ainsi que d'autres gènes cibles connus de Sp1 suite à l'induction de la surexpression de Sp1. De façon surprenante, nous n'avons pas observé de modification de leur expression et, lorsque c'est le cas, elle est détectée une dizaine d'heure après l'induction maximale de Sp1 (figure 3) indiquant que c'est un événement secondaire. Ces résultats suggèrent que la surexpression de Sp1 pourrait inhiber le cycle cellulaire soit via la transcription de gènes spécifiques non étudiés soit de façon indépendante de son activité transcriptionnelle.

Nous avons alors testé l'importance de la localisation nucléaire et/ou de l'activité de liaison à l'ADN et/ou de l'activité transcriptionnelle de Sp1 dans le ralentissement de la progression de la phase G1. Pour cela, nous avons surexprimé différentes formes mutées de Sp1. Dans un premier temps, nous avons utilisé un clone inductible dans lequel la forme de

Sp1 induite est tronquée et cytoplasmique (tSp1) (figure 4 a et b) car elle est dépourvue du domaine de liaison à l'ADN et de l'extrémité C-terminale. La surexpression de cette forme n'induit aucune perturbation du cycle cellulaire (figure 4c) indiquant que le défaut de progression dans la phase G1 induit par Sp1 requiert sa localisation nucléaire et/ou sa liaison à l'ADN. Nous avons ensuite infecté les cellules Baf-3 par un rétrovirus codant pour une forme de Sp1 mutée ponctuellement sur le deuxième et troisième doigt de zinc (Sp1^{Zn2,3}). Cette forme est toujours localisée dans le noyau comme la forme sauvage Sp1 (figure 5a) mais n'est plus capable ni de lier l'ADN (figure 5 b et c) ni d'activer la transcription dépendante de Sp1 dans des cellules déficientes pour les facteurs Sp, les cellules SL2 de Drosophile (figure 5d). La surexpression de cette forme mutée de Sp1 dans les cellules Baf-3 n'induit pas non plus de perturbation du cycle cellulaire (figure 5e). Ces résultats montrent que le ralentissement de la progression en phase G1 induit par Sp1 requiert sa liaison à l'ADN et peut-être son activité transcriptionnelle.

Afin de déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels Sp1 induit le ralentissement de la progression en phase G1, nous avons réalisé une étude du transcriptome de cellules surexprimant ou non Sp1. Nous avons alors analysé l'expression des différents régulateurs du cycle cellulaire et identifié une diminution de l'expression de la Cycline D2 ainsi qu'une augmentation de la Cycline G2 et de p18 suite à la surexpression de Sp1 (figure 6 a-c). Nous avons alors étudié leur expression, par RT-PCR en temps réel, en cinétique après induction de l'expression de Sp1 dans le clone inductible et dans les cellules infectées par les différents rétrovirus (figure 7). Ceci a permis de confirmer la diminution de l'expression de la cycline D2, dès 17h après l'induction de l'expression de Sp1 (figure 7a). L'augmentation de l'expression de p18 ou Cycline G2 est, par contre, très faible. Tout comme l'induction du ralentissement de la progression en phase G1 induit par la surexpression de Sp1, la diminution de l'expression de la Cycline D2 requiert sa liaison à l'ADN (figure 7b), et peut-être son activité transcriptionnelle.

Afin de déterminer la contribution de l'activité transcriptionnelle de Sp1, nous avons recherché la présence du site consensus de liaison à Sp1 (GGGGCGGGG) dans le promoteur des gènes identifiés comme différentiellement exprimés à partir de l'étude transcriptomique, suite à la surexpression de Sp1. Parmi les gènes surexprimés, nous n'avons pas observé d'enrichissement mais, au contraire, un appauvrissement de gènes contenant au moins un site consensus de liaison à Sp1 dans leur promoteur comparé à un groupe des gènes non régulés et choisis aléatoirement (table 1). Ceci suggère que l'induction de la transcription de ces gènes est indépendante de l'activité transcriptionnelle de Sp1. Au contraire, le groupe de gènes sous-

exprimés est enrichi en gènes contenant au moins un site consensus de liaison à Sp1 dans leur promoteur comparé au groupe des gènes non régulés et choisis aléatoirement. Ces résultats suggèrent que la répression transcriptionnelle d'au moins une partie de ces gènes dépend de l'activité transcriptionnelle de Sp1 (table 1). De façon très intéressante, parmi ces gènes, on retrouve le gène *sp1* endogène suggérant l'existence d'une boucle de rétrocontrôle négatif. Par RT-PCR en temps réel, nous avons confirmé que l'expression du gène *sp1* endogène était réprimée suite à la surexpression de Sp1. La cinétique de sa répression transcriptionnelle corrèle parfaitement avec celle d'induction de l'expression du Sp1 ectopique (figure 8a) et requiert la liaison de Sp1 à l'ADN (figure 8b). L'ensemble de ces résultats supportent l'hypothèse que la répression transcriptionnelle observée suite à la surexpression de Sp1, dont le gène *sp1* et le gène *cycline D2*, est une conséquence directe de la surexpression de Sp1.

Dans cette étude, nous avons montré que la surexpression de Sp1 induit un ralentissement de la progression de la phase G1 et de la transition G1-S via des mécanismes différents de ceux qui ont été décrits. L'analyse transcriptomique a révélé que l'inhibition du cycle cellulaire est accompagnée d'une diminution de la transcription du gène *cycline D2*. Nous avons montré que ces effets requièrent la localisation nucléaire de Sp1 et sa liaison à l'ADN, et peut-être son activité transcriptionnelle. L'ensemble des résultats combiné à l'analyse bioinformatique suggèrent que l'activation transcriptionnelle observée suite à la surexpression de Sp1 ne serait pas dépendante de l'activité transcriptionnelle de Sp1 mais plutôt une réponse secondaire à un excès de Sp1 lié à l'ADN. Par contre, la répression transcriptionnelle observée suite à la surexpression de Sp1, dont le gène *cycline D2* ainsi que le gène *sp1* endogène, pourrait être la conséquence directe de la surexpression de Sp1.

Title: Transcriptional Perturbations and Cell Cycle Inhibition by Overexpressed Transcription Factor Sp1

Running title: Cell cycle and Transcriptional perturbations by Sp1

Emmanuelle Deniaud^{1,2,3}, Joël Baguet^{1,2,3}, Roxane Chalard^{1,2,3}, Bariza Blanquier^{2,3}, Lilia Brinza^{1,2,3}, Claudette Ah-Soon^{3,5}, Aurélie Laugraud^{3,5}, Marc Castellazzi^{2,3,4}, Christian Gautier^{3,5}, Jacqueline Marvel^{1,2,3}, Yann Leverrier^{1,2,3}

¹ Inserm, U851, Lyon, F-69007 France; ² IFR128, BioSciences Lyon-Gerland, Lyon, F-69007 France; ³ Université Lyon 1, Villeurbanne, F-69622 France; ⁴ Inserm, U758, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, F-69007 France; ⁵ PRABI, Villeurbanne, F-69622 France

Corresponding authors:

Mailing address: Inserm U851, 21 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France

Telephone : + 33 (0) 4 3728 2350. *Fax* + 33 (0) 4 3728 2341

E-mail : marvel@cervi-lyon.inserm.fr, leverrier@cervi-lyon.inserm.fr

Keywords: Sp1, transcription, transcription factor, cell cycle

ABSTRACT

Transcription factor Sp1 binds GC-rich sequences that are common regulatory elements in promoters. In this study we show that Sp1 overexpression inhibits cell cycle progression of hematopoietic Baf-3 cells. This inhibition requires Sp1 binding to DNA suggesting a transcriptional mechanism. Surprisingly, it occurs without any modification of the levels of cyclin-dependent kinase inhibitor *p21/cdkn1a/cdkn1a* gene or other described Sp1 target genes although overexpressed Sp1 is transcriptionally active in *Drosophila* SL-2 cells. This prompted us to perform a genome-wide expression profiling to identify a set of genes that are affected by overexpression of Sp1 to get a better insight into the molecular perturbations induced by Sp1 overexpression. Microarray data analysis combined with promoter analysis revealed that Sp1 overexpression was associated with a modest modification of transcription profiles and importantly that only down regulated genes were significantly enriched in genes containing Sp1 binding sites in their promoters. Quantitative real-time PCR on selected genes following overexpression of wild-type Sp1 or DNA-binding deficient Sp1 showed that overexpressed Sp1 induces an almost immediate inhibition of endogenous Sp1 transcription requiring its binding to DNA. This is followed by an inhibition of the expression of *cyclin D2* that precedes the cell cycle inhibition. Altogether these results suggest that an excess of DNA-bound Sp1 induces a transcriptional negative feedback loop characterised by a rapid repression of endogenous Sp1 gene expression itself followed by a down regulation of the expression of genes containing Sp1 binding sites in their promoters.

Here we show that the deregulated transcription factor Sp1 through its binding to DNA induces cellular perturbations that are mainly independent of its direct effect on transcription.

INTRODUCTION

Cellular homeostasis maintenance as well as responses to changes in the environment depend mainly on gene transcription. Much of the control of transcription occurs at the promoters where transcription factors bind to specific nucleotidic sequences and affect the rate of transcription by recruiting other transcription factors, stimulating the basal transcription machinery, enhancing DNA accessibility through chromatin remodelling (Villard J. *Swiss Med Wkly.* 2004 Oct 2;134 p39).

Transcription factor Sp1 was the first member identified of the Sp/XKLF family that binds GC-rich elements (Philipsen and Suske, 1999). GC-rich sequences are common regulatory elements in promoters of housekeeping genes as well as many tissue-specific genes. Sp1 has traditionally been considered as a constitutive transcription factor regulating basal promoters activity because it is expressed in all cell types and Sp1 binding sites are found in the promoters of many housekeeping genes. However, it is clear that Sp1 is also involved in tissue specific gene expression, its activity being finely modulated by a variety of stimuli through multiple post-translational modifications (Bouwman and Philipsen, 2002). Sp1 protein comprises several domains of which the DNA binding domain is the most conserved among Sp family. The DNA binding domain of Sp1 consists of three contiguous Cys2His2 zinc fingers and mutational analysis has revealed that Zinc fingers 2 and 3 are essential for Sp1 DNA binding activity (Song et al., 2001). Sp1 binds to the consensus sequence GGGCGGGG although several variants have been described.

Regulation of gene expression by Sp1 is highly complex, being governed by multiple variables. Sp1 binds individual Sp1 binding sites as a multimer and is capable of synergic activation on promoters containing multiple binding sites (Mastrangelo et al., 1991). Sp1 regulates transcription by dynamically recruiting and forming complexes with many factors associated with transcription (Li et al., 2004). Sp1 interacts with nuclear proteins such as TATA-box-binding protein (TBP), TBP –associated factors and Cofactors required for Sp1 activation (CRSP). Sp1 also interacts with other transcription factors such as E2F and p53 and with chromatin remodelling factors. Although Sp1 has been described as a transcriptional activator it can also act as a repressor. Activation or repression of transcription by Sp1 depends on the promoter it binds to and on the co regulator it interacts with. Hence Sp1 can activate transcription by recruiting histone acetyltransferase p300/CBP whereas it represses transcription by recruiting HDAC1 (Doetzlhofer et al., 1999). Sp1 is also subject to intense post-translational modifications that can influence its transcriptional activity. Transcriptional

activation by Sp1 has been reported to be inhibited by glycosylation (Yang et al., 2001) whereas it can be activated or inhibited by phosphorylation (Dovat et al., 2002) (Fojas de Borja et al., 2001). Therefore the regulation of transcription by Sp1 is a finely tuned process depending on Sp1 quantity, post-translational modifications, interactions with other nuclear proteins but also on the promoter it binds to and on the cellular context.

An unbiased mapping of occupied Sp1 binding sites *in vivo* by combining chromatin immunoprecipitation and oligonucleotides arrays has led to the estimation that the human genome contains at least 12,000 Sp1 binding sites (Cawley et al., 2004). Therefore it is not surprising that Sp1 has been implicated in the regulation of the expression of numerous genes involved in many aspects of cellular life such as metabolism, cell growth, differentiation, angiogenesis and apoptosis regulation. However many studies exploring the role of Sp1 in the regulation of a given gene have used transient reporter gene assays which may not exactly reflect the *in situ* situation. Indeed, the affinity of Sp1 for a site in nucleosomal DNA is considerably reduced compared to naked DNA (Li et al., 1994). Therefore many Sp1 target genes remain to be confirmed. Moreover many Sp1 binding sites are localised next to non coding RNA genes (Cawley et al., 2004). Sp1 has also been shown to localize within subnuclear foci that infrequently overlap with sites of transcription REF He, MBC 2005. Therefore Sp1 might also regulate non coding RNA but also chromatin structure.

Among the genes reported as being potentially regulated by Sp1 are apoptosis regulating genes. This is consistent the observation that Sp1 can regulate apoptosis. As a matter of fact, we and others have previously shown that deregulation of Sp1 expression on its own induces apoptosis of several untransformed cell lines (Kavurma and Khachigian, 2003) (Deniaud et al., 2006). Sp1 can induce apoptosis through multiples pathways. Indeed, Sp1-induced apoptosis is dependent on the Fas/caspase-8 pathway in vascular smooth muscle cells (Kavurma et al., 2001) and in hamster fibroblasts whereas this pathway is not involved in the Sp1-induced apoptosis in Baf-3 cells (Deniaud et al., 2006). Overexpressed Sp1 was also shown to induce apoptosis of vascular smooth muscle cells via the repression of *p21/cdkn1a* expression (Kavurma and Khachigian, 2003). These result show that the apoptotic pathways activated by Sp1 overexpression are diverse and apparently cell type specific.

Sp1 has also been linked with cell cycle progression. A computational approach comparing a set of promoters of cell cycle regulated genes revealed that Sp1 binding sequences are significantly enriched in promoters of genes that are expressed in G1/S (Elkon et al., 2003). Levels of Sp1 vary throughout the cell cycle in some cells types but not others.

This could be due to its cleavage by SPase a nuclear and cytoplasmic cathepsin L-like cysteine protease that cleaves Sp1 specifically and which has high levels of activity at the G1/S transition (Fu et al., 1998). Transcriptional activity of Sp1 is modulated in a cell cycle dependent manner through its phosphorylation by cyclin A-cdk complexes (Fojas de Borja et al., 2001). Finally reducing Sp1 levels reduces carcinoma cell proliferation (Ishibashi et al., 2000) whereas Sp1 overexpression inhibits vascular smooth muscle cells proliferation via the repression of p21/cdkn1a expression (Kavurma and Khachigian, 2003).

In this study we show that Sp1 overexpression inhibits cell cycle progression of hematopoietic Baf-3 cells. This inhibition requires Sp1 binding to DNA suggesting a transcriptional mechanism. Surprisingly, it occurs without any modification of p21/cdkn1a mRNA levels or other described Sp1 target genes. This prompted us to perform a genome-wide expression profiling to identify set of genes that are affected by overexpression of Sp1 to get a better insight into the molecular perturbations induced by Sp1 overexpression. Microarray data analysis combined with promoter analysis revealed that Sp1 overexpression was associated with a modest modification of transcription profiles and importantly that only down regulated genes were significantly enriched in genes containing Sp1 binding sites in their promoters. Quantitative real time PCR on selected genes following overexpression of wild-type Sp1 or DNA-binding deficient Sp1 showed that overexpressed Sp1 induces an almost immediate inhibition of endogenous Sp1 transcription requiring its binding to DNA. This is followed by an inhibition of the expression of *cyclin D2* that precedes the cell cycle inhibition. Altogether these results suggest that an excess of DNA-bound Sp1 induces a transcriptional negative feedback loop characterised by a rapid repression of endogenous Sp1 gene expression itself followed by a down regulation of the expression of genes containing Sp1 binding sites in their promoters.

RESULTS

Sp1 overexpression induces accumulation of cells in the G1 phase of the cell cycle

In order to assess the effect of Sp1 on cell cycle regulation, we have expressed human Sp1 in IL-3 dependent pro-B haematopoietic Baf-3 cells using an inducible tetracycline (tet)-off expression system (Deniaud et al., 2006). In Baf-Sp1 clone1, expression of the ectopic full-length wild-type Sp1 protein was rapidly induced following the removal of doxycycline (Fig.1a). Distribution of the cells through the different phases of the cell cycle was studied by flow cytometry after a BrdU pulse. Twenty-eight hours after Sp1 induction the percentage of cells in the G1 phase was increased whereas the percentage of cells in the S phase was decreased in comparison to control condition. Similar results were obtained when studying a second inducible clone (Baf-Sp1 clone 2) in which Sp1 induction is slower (fig.1.b). To confirm the observation in a polyclonal population we have repeated the experiment using a bicistronic retrovirus coding for full-length flagged Sp1 and the cell surface marker CD2 to identify transduced cells. Transduction of Baf-3 cells resulted in Sp1 protein overexpression and in G1 phase accumulation when cells were transduced with Sp1 encoding retrovirus but not with control retrovirus (Fig.1c). Altogether, these results indicate that Sp1 overexpression interferes with cell cycle progression of Baf-3 cells.

To investigate in more detail the perturbations in the cell cycle induced by Sp1 overexpression, we performed a more refined analysis of the cell cycle progression. Baf-Sp1 clone 1 was cultured with or without of doxycycline for 22h, a 20 minutes pulse-chase with BrdU was performed and the cells were harvested at different times thereafter (Fig.2). Cell cycle progression over time was analysed among BrdU negative cells (i.e. cells in G1 or G2/M phases at the time of the pulse) and BrdU positive cells (i.e. cells in S phase at the time of the pulse). Results show that the cells in the G1 phase enter the S phase more slowly when overexpressing Sp1 compared to control cells. In contrast, cells already in the S phase progress normally through the cell cycle whether overexpressing Sp1 or not. These results indicates that Sp1 overexpression delays progression from the G1 to the S phase.

Sp1 overexpression in Baf-3 cells does not modify p21/cdkn1a expression

Cell cycle inhibitor p21/cdkn1a has been implicated in Sp1-induced inhibition of proliferation in vascular smooth muscle cells (Kavurma and Khachigian, 2003). *p21/cdkn1a* gene expression has also been shown to be induced by Sp1 in transient transfection assays (Pagliuca et al., 2000). This prompted us to investigate whether p21/cdkn1a could be involved

in Sp1-induced cell cycle arrest in Baf-3 cells. p21/cdkn1a mRNA levels were monitored by quantitative real-time PCR in Baf-3-Sp1 clone1 (Fig.3). This clone was cultured in the presence or the absence of doxycycline. mRNAs were extracted from cells at different time points when they already express high levels of Sp1. Upon Sp1 induction there is no significant variation of p21/cdkn1a mRNA levels. Therefore we also monitored the expression levels of several transcripts that have been described as being regulated by Sp1 or to possess Sp1 binding sequences in their promoters REF. Surprisingly following Sp1 overexpression we did not detect any significant changes in the levels of caspase-8 or PGK mRNAs and only a modest and late deregulation of LDH and survivin (Fig.3). Based on these unexpected observations we next wondered whether the DNA binding activity was important for Sp1-induced inhibition of the cell cycle.

Inhibition of cell cycle by Sp1 requires its binding to DNA

Among the Sp1 inducible clones we have generated, one was characterised by the inducible expression of a truncated form of Sp1 (tSp1) (Fig.4a) due to the integration into the genome of retrovirus coding for a truncated Sp1 (data not shown). tSp1 is composed of the first 418 amino acids and therefore is devoided of DNA binding domain. Following doxycycline removal, tSp1 accumulates in the cytoplasm of the cells (Fig.4b) consistent with the loss of the nuclear localisation sequences that are located within the DNA-binding domain. tSp1 accumulation does not affect the distribution of the cells through the different phases of the cell cycle (Fig.4c) indicating that Sp1 has to localize in the nucleus to inhibit cell proliferation.

The second and the third zinc finger of Sp1 are essential for binding to DNA (Song et al., 2001). Therefore, we have constructed a bicistronic retrovirus coding for the cell surface marker CD2 and a form of Sp1 carrying point mutations on the Zinc fingers two and three (Sp1^{Zn2,3}). Endogenous Sp1 as well as overexpressed wild-type Sp1 and Sp1^{Zn2,3} mutant all localise into the nucleus of Baf-3 cells (Fig.5a). We next questioned whether Sp1^{Zn2,3} was DNA bound using triton extraction on live cells to remove soluble proteins but not DNA-associated proteins followed by immunostaining and quantification of Sp1 staining. Endogenous and wild-type ectopic Sp1 are triton resistant confirming their association with DNA whereas Sp1^{Zn2,3} is triton soluble suggesting a lack of or a loose association with DNA (Fig.5b). This correlates with the inability of Sp1^{Zn2,3} to bind Sp1-binding consensus sequence as revealed by EMSA analysis (Fig.5c). The transactivation potential of Sp1^{Zn2,3} mutant was investigated in Drosophila Schneider SL2 cells since these cells are devoided of Sp-like

activities. In SL2 cell line, wild-type Sp1 transactivates a promoter carrying Sp1 binding sites (Fig.5d) confirming that this form is transcriptionally active. However Sp1^{Zn2,3} does not transactivate the very same promoter. These results show that although Sp1^{Zn2,3} accumulates in the nucleus it does not bind DNA and is devoided of transactivation activity. When overexpressed in Baf-3 cells, Sp1^{Zn2,3} mutant doesn't affect the distribution of the cell through the different phases of the cell cycle (Fig. 5e) and does not induce cell death (data not shown). Altogether, these results show that Sp1-induced inhibition of the cell cycle requires its DNA-binding and suggest that a transcriptional process is involved in this inhibition process.

Expression of cell cycle regulating genes following Sp1 overexpression

To have a better insight into the molecular perturbations induced by Sp1 overexpression, we subsequently performed a genome-wide expression profiling to identify set of genes that are affected by overexpression of Sp1. Expression profiling was conducted comparing Baf-Sp1 clone1 grown in the presence of doxycycline for 28h as control and the same clone cultured 28h without doxycycline when cells already expressed high levels of Sp1 protein but before the onset of apoptosis (Deniaud et al., 2006) (data not shown).

Following Sp1 accumulation, 1773 probesets corresponding to 1503 genes with unique gene symbol identifiers were found to be differently expressed. Among them, the expression of 631 genes was increased by at least 1.3 fold whereas the expression of 410 genes was decreased by at least 1.3 fold.

As Sp1 overexpression induces an inhibition of the cell cycle we have focused our attention on genes associated with the progression through the cell cycle such as cyclins, cyclin-dependent protein kinases and cyclin-dependent kinase inhibitors. Microarray datas indicate that among those genes the one that showed the strongest variations are the one coding for cyclin D2 (1.7-fold decrease), cyclin G2 (1.9-fold increase) and p18 (2.0-fold increased) (Fig.6). The expression pattern of these genes was verified using quantitative real-time PCR. In inducible Baf-3-Sp1 clone 1 following ectopic Sp1 induction there is an early down regulation of cyclin D2 expression (Fig.7). This down regulation is also observed in Baf-3 cells transduced with wild type Sp1 but not Sp1^{Zn2,3} indicating that it requires Sp1 binding to DNA. However, the upregulation of cyclin G2 and p18 were not confirmed. Altogether these results show that the cell cycle arrest observed following Sp1 overexpression correlates with an early cyclin D2 down regulation.

Genes with consensus binding Sp1 site in their promoters are enriched among down regulated genes

To determine whether the transcriptional response we observed could be dependent on a direct effect of overexpressed Sp1 on transcription, we determined whether the set of Sp1-modified genes was enriched for the presence of the consensus Sp1 binding motif in their promoters. Consensus Sp1 binding motif is GGGGCGGGG as defined by TRANSFAC 7.0 (V\$SP1_Q6) and hereafter is referred as Sp1 site. The presence of the Sp1 site was searched using a computational approach in the promoter regions consisting of 2000 pb upstream from the transcription start site. Sp1 site was found to be present in 15.3% of the promoters of a control list of genes whose expression is not modified by Sp1 (Table 1). There was no enrichment for the presence of Sp1 site among the genes whose expression was increased by Sp1. However, Sp1 site was present in 20.3% of the promoters of the set of genes whose expression was decreased by Sp1. Therefore genes with Sp1 site in their promoter are significantly enriched among genes that are down-regulated following Sp1 overexpression.

Sp1 has been implicated in the regulation of the expression of numerous genes. Therefore we focused our attention on the expression levels of a set of 15 genes that are expressed in Baf-3 cells and that have been shown to be regulated by Sp1 in mammalian cells using Sp1 deficient mice (MeCP2, TK), Sp1 overexpression (cytochrome C, HDAC4, KLF6, PKR, SOD1, Sp1, Survivin), Sp1 RNAi (ATPA2) or promoters carrying mutated Sp1 sites (DAF-1, Glut-1, Glut-3, VEGFA). Among those 15 genes, only 4 showed a deregulation of their expression following Sp1 overexpression (supplementary data), one being upregulated (KLF6) whereas three are downregulated (Sp1, MeCP2 and HDAC4). These results indicate a lack of major deregulation of the expression of Sp1-regulated genes following Sp1 overexpression in Baf-3 cells. These results are in accordance with the promoter analysis indicating that Sp1-regulated genes are down regulated following ectopic Sp1 expression.

Endogenous Sp1 is down regulated early following Sp1 overexpression

One of the most downregulated gene on the arrays following overexpression of Sp1 is the endogenous *sp1* gene (2.3-fold decrease, supplementary Figure B). Sp1 promoter has been shown to contain Sp1 binding sites and the Sp1 protein has been shown to autoregulate its own expression (Nicolas et al., 2001). As Baf-3-Sp1 clone 1 express human Sp1 as well as GFP in an inducible way we monitored in parallel GFP protein expression by flow cytometry and both endogenous murine and ectopic human Sp1 mRNA levels using specific primers. Kinetic studies showed that the first GFP expressing cells are detected 8 hours after

doxycycline removal (Fig.8a). This correlates with the expression of ectopic Sp1 at the mRNA and protein levels (Fig.8a and data not shown). Importantly down regulation of endogenous *sp1* gene transcription is also observed as early as 8 hours after doxycycline removal (Fig.8a). This down regulation is also observed in Baf-3 cells transduced with wild-type Sp1 but is not observed in cells transduced with Sp1^{Zn2,3} indicating that it requires Sp1 binding to DNA (Fig.8b). Altogether these result indicate that an excess of DNA-bound Sp1 induces a rapid repression of endogenous *sp1* gene expression, revealing a transcriptional negative feedback loop .

DISCUSSION

Our results show that Sp1 overexpression inhibits hematopoietic pro-B cell line Baf-3 cells proliferation by inducing the accumulation of cells in G1 phase without affecting the progression through the other phases of the cell cycle. This effect is dependent on Sp1 binding to DNA suggesting a transcriptional activity. A number of observations have linked Sp1 and cell growth (BLACK). However, both positive and negative effects of Sp1 on cell growth have been reported. This is consistent with the regulation of both growth promoting genes (*vegf*) as well as growth inhibitory genes (*p21/cdkn1a*) by Sp1. Hence, inhibition of all proteins able to bind Sp1 sites using decoy oligonucleotides inhibits tumor cell line proliferation whereas Sp1 overexpression in vascular smooth muscle cells inhibits their proliferation (Kavurma and Khachigian, 2003). By performing genome-wide expression profiling following Sp1 expression we identified genes regulating the cell cycle progression affected by overexpressed Sp1. The only one downregulated by Sp1 that could be validated by quantitative real-time PCR is the cyclin D2. D-cyclins bind and activate cyclin-dependent kinases such as CDK4, CDK6 and CDK2. Levels of D-cyclins are controlled by the extracellular environment and are believed to serve as a link between the extracellular environment and the core cell cycle machinery. Although mouse embryos lacking all cyclins D have an almost normal morphogenesis, expansion of hematopoietic stem cells is impaired (Kozar et al., 2004). Interestingly Cyclin D2 seems to be specifically required for the triggered-induced proliferation of B cells and for controlling the numbers of B cell precursors (Lam et al., 2000) (Mohamedali et al., 2003). Although we did not find a consensus Sp1 binding site in the murine cyclin D2 promoter, it has been reported that in T lymphocytes, Sp1 binds to a non consensus sequence on the *cyclin D2* gene and depends on adjacent Stat5 binding site for transcriptional activity (Martino et al., 2001). In Baf-3 cells, Interleukin-3 induces cyclin D2 mRNA expression (Parada et al., 2001). Moreover, ectopic expression of cyclin D2 is sufficient to abolish cell cycle arrest and apoptosis following IL-3 removal. Altogether, these observations suggest that cyclin D2 down regulation might be one of the mechanisms underlying Sp1 inhibition of the cell cycle progression we observed in Baf-3 cells .

Another aspect of this study was to show that elevation of Sp1 levels is almost immediately followed by a decrease of *sp1* gene transcription. As a matter of fact, endogenous Sp1 mRNA levels start to decrease as soon as 8 hours after doxycycline removal. At this time point, only 20% of the cells express the GFP marker that is also under the control

of an inducible promoter and ectopic Sp1 mRNA starts to be detected. Transient transfections of Sp1 and a minimal Sp1 promoter and luciferase assays have revealed that Sp1 autoregulates positively its own transcription (Nicolas et al., 2001). Our results indicate that Sp1 autoregulates its own transcription *in vivo* but that its overexpression represses its transcription.

The human genome contains more than 12000 occupied Sp1 binding sites (exact Sp1 consensus binding site and many slightly weaker variants) (Cawley et al., 2004). Moreover, a study that performed a search for overrepresented motifs in a set of 723 human promoters has revealed that 15% of them contains an Sp1 binding site (ggGGcGGG) in the 500 pb promoter region (Xi et al., 2007). This is consistent with our observation that 15% of a set of 1145 mouse genes contain the consensus Sp1 binding site. Surprisingly, the genome-wide expression profiling in Baf-3 cells following Sp1 overexpression revealed an absence of a massive change in transcription. Indeed, only a modest proportion of the genes show a modification of their transcription following Sp1 overexpression. Moreover, except endogenous Sp1, many of the deregulated genes we have monitored over time show a late deregulation of their expression. Among a selection of 15 genes described as being induced by Sp1 in mammalian cells and expressed in Baf-3 cells only 4 showed a deregulation of their expression following ectopic expression. Among the 4 deregulated genes, one is upregulated whereas three are downregulated in accordance with the promoter analysis of deregulated genes showing an enrichment for Sp1 containing promoters in the down-regulated genes. This lack of major deregulation of the expression of Sp1 regulated genes is surprising as the form of Sp1 that was expressed in Baf-3 cells is transcriptionally active, at least in drosophila SL-2 cells, and is tightly associated with DNA (Fig 4). This could suggest that in Baf-3 cells the number of Sp1-responsive genes is low and that Sp1 is mainly a repressor of transcription. Moreover this reinforces the notion that many Sp1 binding sites in the nucleus are not associated with transcriptional activity (He et al., 2005) and are located next to non coding RNA (Cawley et al., 2004). An alternative explanation for the lack of major deregulation of the expression of Sp1 regulated genes would be that overexpressed Sp1 is rapidly inactivated. Sp1 activity is influenced by post-translational modifications such as phosphorylation (Chu Ferro Gene 2005). Phosphorylation of Sp1 can influence negatively or positively Sp1 activity through modification of its binding to DNA, promoter activation and association with other nuclear factors. Whatever the mechanism is, given the pleiotropic activities attributed to Sp1 such inactivation could be a mechanism to prevent uncontrolled gene expression.

DNA binding capacity of Sp1 is necessary to observe the inhibition of the cell cycle progression and the induction of cell death induced by Sp1 overexpression. The precise mechanisms involved in these cellular perturbations remain to be elucidated. Although they could be transcriptional they could also be linked to a perturbation of chromatin structure as recently reported for c-Myc transcription factor.

REFERENCES

- Bouwman, P., and Philipsen, S. (2002). Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Molecular and cellular endocrinology* *195*, 27-38.
- Cawley, S., Bekiranov, S., Ng, H.H., Kapranov, P., Sekinger, E.A., Kampa, D., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Cheng, J., Williams, A.J., *et al.* (2004). Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* *116*, 499-509.
- Chamboredon, S., and Castellazzi, M. (2005). v-Jun downregulates the alpha 2 (I) collagen target gene indirectly through Sp1/3. *Oncogene* *24*, 2547-2557.
- Deniaud, E., Baguet, J., Mathieu, A.L., Pages, G., Marvel, J., and Leverrier, Y. (2006). Overexpression of Sp1 transcription factor induces apoptosis. *Oncogene* *25*, 7096-7105.
- Doetzlhofer, A., Rotheneder, H., Lagger, G., Koranda, M., Kurtev, V., Brosch, G., Wintersberger, E., and Seiser, C. (1999). Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Molecular and cellular biology* *19*, 5504-5511.
- Dovat, S., Ronni, T., Russell, D., Ferrini, R., Cobb, B.S., and Smale, S.T. (2002). A common mechanism for mitotic inactivation of C2H2 zinc finger DNA-binding domains. *Genes & development* *16*, 2985-2990.
- Elkon, R., Linhart, C., Sharan, R., Shamir, R., and Shiloh, Y. (2003). Genome-wide in silico identification of transcriptional regulators controlling the cell cycle in human cells. *Genome research* *13*, 773-780.
- Fojas de Borja, P., Collins, N.K., Du, P., Azizkhan-Clifford, J., and Mudryj, M. (2001). Cyclin A-CDK phosphorylates Sp1 and enhances Sp1-mediated transcription. *The EMBO journal* *20*, 5737-5747.
- Fu, Y.H., Nishinaka, T., Yokoyama, K., and Chiu, R. (1998). A retinoblastoma susceptibility gene product, RB, targeting protease is regulated through the cell cycle. *FEBS letters* *421*, 89-93.

He, S., Sun, J.M., Li, L., and Davie, J.R. (2005). Differential intranuclear organization of transcription factors Sp1 and Sp3. *Molecular biology of the cell* 16, 4073-4083.

Ishibashi, H., Nakagawa, K., Onimaru, M., Castellanos, E.J., Kaneda, Y., Nakashima, Y., Shirasuna, K., and Sueishi, K. (2000). Sp1 decoy transfected to carcinoma cells suppresses the expression of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor beta1, and tissue factor and also cell growth and invasion activities. *Cancer research* 60, 6531-6536.

Kavurma, M.M., and Khachigian, L.M. (2003). Sp1 inhibits proliferation and induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by repressing p21WAF1/Cip1 transcription and cyclin D1-Cdk4-p21WAF1/Cip1 complex formation. *The Journal of biological chemistry* 278, 32537-32543.

Kavurma, M.M., Santiago, F.S., Bonfoco, E., and Khachigian, L.M. (2001). Sp1 phosphorylation regulates apoptosis via extracellular FasL-Fas engagement. *The Journal of biological chemistry* 276, 4964-4971.

Kozar, K., Ciemerych, M.A., Rebel, V.I., Shigematsu, H., Zagozdzon, A., Sicinska, E., Geng, Y., Yu, Q., Bhattacharya, S., Bronson, R.T., *et al.* (2004). Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 118, 477-491.

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. *The Journal of biological chemistry* 275, 3479-3484.

Lee, J.A., Suh, D.C., Kang, J.E., Kim, M.H., Park, H., Lee, M.N., Kim, J.M., Jeon, B.N., Roh, H.E., Yu, M.Y., *et al.* (2005). Transcriptional activity of Sp1 is regulated by molecular interactions between the zinc finger DNA binding domain and the inhibitory domain with corepressors, and this interaction is modulated by MEK. *The Journal of biological chemistry* 280, 28061-28071.

Li, B., Adams, C.C., and Workman, J.L. (1994). Nucleosome binding by the constitutive transcription factor Sp1. *The Journal of biological chemistry* 269, 7756-7763.

Li, L., He, S., Sun, J.M., and Davie, J.R. (2004). Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 82, 460-471.

Martino, A., Holmes, J.H.t., Lord, J.D., Moon, J.J., and Nelson, B.H. (2001). Stat5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response to IL-2. *J Immunol* 166, 1723-1729.

Mastrangelo, I.A., Courey, A.J., Wall, J.S., Jackson, S.P., and Hough, P.V. (1991). DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5670-5674.

Mohamedali, A., Soeiro, I., Lea, N.C., Glassford, J., Banerji, L., Mufti, G.J., Lam, E.W., and Thomas, N.S. (2003). Cyclin D2 controls B cell progenitor numbers. *Journal of leukocyte biology* 74, 1139-1143.

Nicolas, M., Noe, V., Jensen, K.B., and Ciudad, C.J. (2001). Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human transcription factor Sp1 gene. *The Journal of biological chemistry* 276, 22126-22132.

Pagliuca, A., Gallo, P., and Lania, L. (2000). Differential role for Sp1/Sp3 transcription factors in the regulation of the promoter activity of multiple cyclin-dependent kinase inhibitor genes. *Journal of cellular biochemistry* 76, 360-367.

Parada, Y., Banerji, L., Glassford, J., Lea, N.C., Collado, M., Rivas, C., Lewis, J.L., Gordon, M.Y., Thomas, N.S., and Lam, E.W. (2001). BCR-ABL and interleukin 3 promote haematopoietic cell proliferation and survival through modulation of cyclin D2 and p27Kip1 expression. *The Journal of biological chemistry* 276, 23572-23580.

Philipsen, S., and Suske, G. (1999). A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic acids research* 27, 2991-3000.

Song, J., Ugai, H., Ogawa, K., Wang, Y., Sarai, A., Obata, Y., Kanazawa, I., Sun, K., Itakura, K., and Yokoyama, K.K. (2001). Two consecutive zinc fingers in Sp1 and in MAZ are essential for interactions with cis-elements. *The Journal of biological chemistry* 276, 30429-30434.

Xi, H., Yu, Y., Fu, Y., Foley, J., Halees, A., and Weng, Z. (2007). Analysis of overrepresented motifs in human core promoters reveals dual regulatory roles of YY1. *Genome research* 17, 798-806.

Yang, X., Su, K., Roos, M.D., Chang, Q., Paterson, A.J., and Kudlow, J.E. (2001). O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 6611-6616.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

The murine bone marrow-derived IL-3 dependent Baf-3 cell line was maintained in DMEM (Gibco) containing 6% Fetal Bovine Serum (FBS, Pan Biotech GmbH) and 5% WEHI 3B cell-conditioned medium as a source of IL-3. The retrovirus packaging Phoenix cell line (American Type Culture Collection) were maintained in DMEM containing 10% FBS. *Drosophila* Schneider's SL2 cells were cultured in *Drosophila* medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS at 28°C.

Inducible Baf-3-Sp1 clones

Inducible Baf-3-Sp1 clone 2 and Baf-3-tSp1 clone were obtained as described previously (Deniaud et al., 2006). Cells were grown in the presence of doxycycline (30 ng/ml, Sigma). To induce Sp1 and GFP expression cells were washed 3 times and cultured without doxycycline. Baf-3-tSp1 clone express a truncated form of Sp1. Western blot analysis of Sp1 and actin levels was performed as described (Deniaud et al., 2006).

Retroviral constructions, transfections and transductions

The retroviruses coding for the full-length human Sp1 protein (785 amino acids) followed by an internal ribosomal entry site and a truncated cell surface marker (CD2) to identify transduced cells were described in details previously (Deniaud et al., 2006). A form of Sp1 (Sp1^{Zn2,3}) carrying mutations of the second and the third Zinc Finger was obtained by PCR-mediated site directed mutagenesis using pCMX-Gal4NSp1ZFM2 vector (a kind gift of Dr Hur MW, Seoul, Korea) encoding the DNA binding domain (amino acids 622-720) mutated for the second Zinc Finger (Lee et al., 2005). Mutation of the third zinc finger, was obtained using the following oligonucleotides 5'-CCTCATGAAGCGCTTAGGACTCTCAGGGCTGGCAAATTTCTTCTCACCTGTGTGTGTACGTTTGTGCCTCTGTAGCTCATCGGTGAGAAGAAATTTGCCAGCCCTGAGTGTCTTAAG-3', BamHI site: 5'-CCGCGGATCCTGGCAAAAAGAAACAGC-3'. The BamHI/EcoR47III cDNA PCR fragments were then subcloned into pBSK-Sp1 to give pBSK-Sp1Zn2,3. The EcoRI-XhoI fragments was then sequenced before subcloning into pMX-IRES-CD2 described previously (Deniaud et al., 2006). *Drosophila* expression vectors were obtained by cloning Sp1 or Sp1Zn2,3 or EGFP cDNA under the *Drosophila* actin AC5 promoter into pAc5.1/V5-HisA vector (Invitrogen). The pGL2 derivative carrying the tata-

Sp1 promoter was described previously (Chamboredon and Castellazzi, 2005). Transfections, transductions, magnetic selection of CD2-expressing cells and western blot analysis of Sp1 protein levels were performed as described (Deniaud et al., 2006).

Drosophila SL2 cells were seeded in 6 well plates at a density of 2.10⁶ cells/well. After 18 to 20 h, cells were gently washed and incubated in fresh medium. Transfection was performed with 5 µg of tata-Sp1 reporter plasmid and 0,5 µg of Drosophila expression vector pPac, pPacSp1 or pPacSp1Zn2,3 and 0.5 µg of pPac-EGFP to quantify transfection efficiency. Luciferase assays were performed 48 h after transfection.

Luciferase assays

Fourty-eight hours after transfection, cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and lysed with 100 µl of Reporter Lysis Buffer (Promega) for 10 min. Samples were frozen at -80° for at least 1 h. Luciferase assay was performed with Luciferase Assay System (Promega) following manufacturer's recommendations using a luminometer. Luciferase activity was normalized to the protein amount measured by the Bradford method and to the transfection efficiency determined as percentage of EGFP positive cells counted on a FACScalibur (Becton-Dickinson). Results are expressed as relative light units (RLUs).

Electrophoretic mobility shift assay

Proteins Sp1 or Sp1Zn2,3 were synthesized in vitro using a reticulocyte coupled with transcription/translation system (Promega) and dialyzed against binding buffer (20mM HEPES pH 7.9, 60mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 17,5% glycerol, 6.6mM DTT and antiproteases) using a Sephadex G50 column. The oligonucleotide probe carrying the Sp1 consensus sequence (upper strand sequence: 5'-ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3') (Promega Corp.) was ³²P end-labeled with T4 DNA polynucleotide kinase. The binding reaction was performed in a 15 µl volume of binding buffer containing 2,5 µl of protein in vitro, 1,5 µg poly dI-dC and oligonucleotide probe for 30 min at room temperature. Gels were run for 5 h at room temperature at a current of 7 mA/gel

Cell-cycle flow cytometry assay ou Analysis of BrdU-Labeled cells

Cell cycle was analysed using a Flow Cytometry Kit as described by the manufacturer with our own modifications (BD Biosciences Pharmingen). Briefly, prior to assay, cells were seeded at an initial concentration of 2.10⁵ cells/ml. After 16 hours culture, cells were labeled

with 32 μM of BrdU for 20 min. Transduced cells were first incubated for 30 min with 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PE-coupled monoclonal antibody against murine CD2. Cells were then fixed and permeabilised by Cytotfix/Cytoperm kit and treated with DNase for 1 hour at 37°C. Cells were then stained with Allophycocyanin (APC) conjugated anti-BrdU at a final concentration of 1/100. Washed cells were resuspended in 7-amino-actinomycin D (7-AAD). BrdU incorporation (FL4-H), 7-AAD (FL3-H) and CD2 expression (FL2-H) when required was recorded using a FACScalibur (Becton Dickinson) and analysed using the CellQuest software.

For pulse chase experiments, cells were grown in presence or absence of doxycycline for 22 hours prior incubation with BrdU for 20 min. Cells were then washed once and allowed to grow for indicated times before anti-BrdU and 7-AAD staining. Statistical analysis was performed by two-tailed Student's t-test for paired observations.

Immunofluorescence microscopy

Cells seeded on 12-mm glass coverslips coated with 0.01% polylysine (Sigma) were fixed with 4% paraformaldehyde (BDH) in PBS for 5 minutes then permeabilised with 0.25% Triton X-100 (BDH) in PBS for 5 minutes. Sp1 was detected using anti-Sp1 polyclonal rabbit antibody (1:100, 120 minutes) followed by biotin-conjugated goat anti-rabbit antibody (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Jackson ImmunoResearch, 30 minutes) and either FITC-conjugated streptavidin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Becton-Dickinson, 30 minutes) or rhodamine-conjugated streptavidin (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Jackson ImmunoResearch, 30 minutes). Actin was labelled with rhodamine-conjugated phalloidin (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma, 30 minutes). Slides were mounted with ProLong anti-fade (Molecular Probes) containing DRAQ5 (1 :500, Alexis corporation) to counterstain DNA. Images of cells (single sections) were obtained using a Zeiss LSM 510 confocal laser-scanning microscope.

Detergent Triton X-100 was used to remove soluble proteins while leaving more tightly bound protein (Martini JCB 1998). Thirty hours after transduction, 106 cells were stained for 45 minutes with 0.5 μg biotinylated anti-CD2 antibody (Pharmingen) and with 0.75 μg rhodamine-conjugated streptavidin for 20 minutes (Jackson ImmunoResearch). Cells were then washed in PBS containing 0.5 mM MgCl_2 and 0.5 mM CaCl_2 , incubated for 5 minutes in CSK buffer (10 mM Pipes-KOH, pH 7.0, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl_2) and incubated for 3 minutes in CSK buffer containing 0.02% Triton X-100. A 10 times excess of CSK buffer was added and cells were loaded on Poly-L-lysine coated

coverslips and fixed immediately with 4% paraformaldehyde. Specimens were stained with 1:100 anti-Sp1 antibody for 2 hours followed by Alexa488 conjugated anti-rabbit antibody (Molecular Probes). Actin Staining was performed in parallel to confirm the efficiency of triton removal of soluble proteins (not shown). Slides were mounted with ProLong anti-fade containing DRAQ5 and observed using Zeiss LSM 510 confocal microscope. Sp1 staining in CD2-positive cells was quantified using Image J software. The ratio of Sp1 signal in transduced CD2 positive cells versus non transduced neighboring cells was calculated.

Quantification by Real Time PCR

RNA extraction and reverse transcription were performed as previously described (Deniaud et al., 2006). Real Time PCR analysis was carried out using Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG kit (Invitrogen) on an ABI Prism 7700 (Perkin Elmer). Mix were as follow: 6 μ l Platinum Mix, 0.48 μ l primer (10 μ M), 0.52 μ l Rox reference dye and template in 5 μ l of water. The following program was used, samples were incubated at 50°C for 2 min, followed by 10 min at 95°C, followed by 40 cycles (95°C 10 s, 60°C 1 min). The dissociation curve was measured for each sample. relative level of the target sequence against the reference sequence (ubiquitin) was calculated using the $\Delta\Delta$ Ct method with calculated real efficiencies. The sequences of primers used are: caspase-8 forward : TCCAGACAATGCCAGATTTCTCC, caspase-8 reverse : TCAAGCAGGCTCAAGTCATCTTCC ; cyclin D2 forward : TTCATTGAGCACATCCTTCGC, cyclin D2 reverse : AAGTCGGTAGCGCACAGAGC ; cyclin G2 forward : GCCGAGTTGTCTTCTCCAAAGC, cyclin G2 reverse : AAGCAAGAGAATTTCCAGCAGTTCC ; LDH forward : TCTGGGTGATGGGAGAAGAG, LDH reverse : AGGTCTCCGTGTACGTGTAG ; PGK forward : ATCAAGGCTGCTGTTCCAAG, PGK reverse : GGAGTACTTGTCAGGCATGG ; p18 forward : GTCCTTCTGTCAGCCTCCGATG, p18 reverse : TCGGCCATTCTTTAGGGTCCTG ; p21/cdkn1a forward : GGTGTCAGAGTCTAGGGGAATTGG, p21/cdkn1a reverse : CCACGGGACCGAAGAGACAAC ; Sp1 ectopic forward : GCCTCCAGACCATTAACCTCAGT, Sp1 ectopic reverse primer : GCTCCATGATCACCTGGGGCAT ; Sp1 endogenous forward : TCATGGATCTGGTGGTGATGGG, Sp1 endogenous reverse : GCTCTTCCCTCACTGTCTTTGC ; Ubiquitin forward :

AAGAATTCAGATCGGATGACACACT,
GCCACTTGGAGGTTGACACTTT.

Ubiquitin

reverse :

Microarray analysis of gene expression

Inducible Baf-3-Sp1 clone 1 was grown in presence or absence of doxycycline for 28 hours. Three independent experiments were performed. RNA extraction, reverse transcription and microarray hybridization on Affymetrix mouse DNA microarray (Mouse Genome 430.2 array) were carried out by ProfilXpert Neurobiotec Service (Lyon, France). Data were analysed using GeneSpring GX 7.3 expression analysis software (Agilent). Differential probesets expression following Sp1 overexpression relative to control was determined using GeneSpring GX 7.3 statistical analysis module ANOVA 1 way test, assuming variance not equal, choosing a false discovery rate of 5% with multiple testing correction (Benjamini and Hochberg). This gave a list of 1770 differentially expressed probesets. A control list of 1700 probesets was generated randomly that fulfils two criterias: no change in their expression levels following Sp1 overexpression and an overall distribution of expression similar to the differentially expressed probesets list.

Computational promoter analysis

For promoter analysis, promoter sequences (2000 nucleotides upstream of the transcriptional start site) were retrieved using Biomart service of the Ensembl project. Sp1 binding motif GGGGCGGGG (V\$SP1_Q6 as defined by TRANFAC 7.0) was searched in promoters using Bioconductor service. Two sided binomial tests were conducted to determine whether there were significant differences in the percentage of promoters containing Sp1 binding site between the different gene lists.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the staff from the Plateau de Cytométrie and the Plateau d'Imagerie (IFR 128) for technical assistance. This work was supported by grants from the Inserm, Association pour la Recherche contre le Cancer, Ligue du Rhône, Ligue de la Savoie, Région Rhône-Alpes, Cancéropole national and Université Claude Bernard Lyon 1. E.D. is supported by a fellowship from the Association pour la Recherche contre le Cancer.

LEGEND

Fig. 1. Sp1 overexpression induces accumulation of Baf-3 cells in G1 phase.

(a) Baf-3-Sp1 clone 1 was grown in presence of doxycycline (+) or in absence of doxycycline (- dox). *Left* Analysis of Sp1 and actin protein levels by Western Blot. *Middle* Cells grown in presence or absence of doxycycline for 28 hours were pulsed with BrdU for 20 minutes. Cells were then harvested and processed for BrdU labeling and DNA content staining as described in the Methods. Cell cycle distribution was analysed by flow cytometry. *Right* The percentage of cells in the different phase of cell cycle is indicated. Results show the mean \pm sd of 3 independent experiments. (b) Baf-3-Sp1 clone 2 was analysed as indicated in (a). *Left* Sp1 and actin protein levels. *Right* Cell cycle distribution at 72 hours. Results show the mean \pm sd of 3 independent experiments. (c) Baf-3 cells were transduced by full-length human Sp1 encoding retrovirus (Sp1) or control retrovirus (control). Cells were analysed 30 hours post-infection as indicated in (a). *Left* Sp1 protein levels in parental Baf-3 cells and in transduced cells purified by magnetic selection with anti-CD2 antibody. *Right* Cell cycle distribution among transduced cells (CD2 positive cells). Results show the mean \pm sd of 2 independent experiments.

Fig. 2. Sp1 overexpression delays progression from G1 to S phase.

Baf-3-Sp1 clone 1 grown in the presence (+ dox) or absence (- dox) of doxycycline for 22 hours was pulsed with BrdU for 20 minutes. After removal of BrdU from media, cells were grown for an additional 0, 3, 6 or 9 hours period before harvesting and subsequent staining as indicated in figure 1. Cell cycle distribution was monitored by analysing DNA content profiles by flow cytometry. (a) Progression through the cell cycle over time of the BrdU negative population (ie cells in G1 or G2/M phases at the time of the pulse). Histogram plot shows the mean percentage of cells in G1 phase among BrdU negative cells \pm sd of 3 independent experiments (** $p < 0.05$) (b) Progression through the cell cycle of BrdU positive population (ie cells in S phases at the time of the pulse). Histogram plot shows the mean percentage of cells in S phase among BrdU positive cells \pm sd of 3 independent experiments.

Fig. 3. Sp1 overexpression does not affect p21/cdkn1a transcription

Baf-3-Sp1 clone 1 was grown in the presence (+) or absence of doxycycline for the indicated time. mRNA levels of p21/cdkn1a, caspase-8, survivin, PGK and LDH were quantified by quantitative real-time PCR. mRNA levels were normalized to ubiquitin levels and set up as 1 in the presence of doxycycline. Data are the average of 3 independent experiments \pm sd.

Fig. 4. A cytoplasmic form of Sp1 does not induce a G1 accumulation

Inducible clone Baf-3-tSp1 was grown with (+) or without (-dox) doxycycline for the indicated time. **(a)** Western blot analysis of Sp1 and actin protein levels was performed as described in figure 1. tSp1: truncated Sp1. **(b)** Cells were costained for DNA (blue) and Sp1 (red) and analysed by confocal microscopy. Scale bar 10 μ m **(c)** Cell cycle distribution was analysed after 72 hours as described in figure 1. Results show the mean \pm sd of 3 independent experiments.

Fig. 5. Cell cycle arrest induced by Sp1 requires its binding to DNA.

(a) Baf-3 cells were transduced with retroviruses encoding wild-type Sp1 (Sp1) or mutant Sp1 carrying point mutations on zinc fingers 2 and 3 (Sp1^{Zn2,3}) and analysed 30 hours later. Cells were costained for actin (red), Sp1 (green) and DNA (blue) and analysed by confocal microscopy. Arrowheads indicate transduced cells. Scale bar, 10 μ m **(b)** Quantification of DNA-bound Sp1. Twenty-four hours post-infection with control, Sp1 or Sp1^{Zn2,3} carrying retroviruses, cells were stained for CD2, submitted to extraction with triton (Triton resistant) to remove soluble nuclear proteins and fixed. Cells were then stained for Sp1. The intensity of Sp1 staining was quantified in transduced CD2-positive cells (n) as well as in non-transduced neighbouring cells. The ratio of Sp1 signals in transduced versus non-transduced cells is presented **(c)** EMSA without (-) or with *in vitro* produced Sp1 and Sp1^{Zn2,3} using ³²P-labeled oligonucleotide carrying the Sp1 consensus as a probe. Arrowhead indicates the DNA-protein complex. **(d)** Drosophila SL2 cells were transiently co-transfected with luciferase reporter plasmid pGL2 driven by the *tata-Sp1* promoter, and plasmids pAC encoding wild-type Sp1 or mutated Sp1Zn^{2,3}. Empty vector was used as control and pPac-EGFP as transfection control. Luciferase activity was assayed 48h after transfection. Results are the mean \pm sd of triplicate samples and are representative of at least 2 independent experiments. **(e)** *Left* Western blot analysis of Sp1 protein levels in parental Baf-3 cells and in cells transduced with either control or Sp1^{Zn2,3} retroviruses purified with anti-CD2 antibody 30 hours post-infection. *Right*

Percentage of cells in the different phases of the cell cycle was assessed as described in figure 1 among CD2 positive cells. Results show the mean of \pm sd of 2 independent experiments.

Fig. 6. Effect of Sp1 overexpression on the expression of cell cycle regulating genes

Microarrays data of the fold change of gene expression in Sp1 overexpressing cells compared to non expressing cells. (a) Cyclins, (b) Cyclin-dependent kinases (Cdk) and (c) Cyclin-dependent kinases inhibitors (Cdk i) expression ratios. Data are from 3 independent experiments.

Fig. 7. Sp1 overexpression induces the downregulation of cyclinD2 mRNA levels but does not affect p18 and cyclinG2 mRNA levels

(a) Baf-3-Sp1 clone 1 was grown in presence (+ dox) or in absence (- dox). At indicated times, cells were harvested and mRNA levels of cyclinD2, p18 and cyclinG2 were measured by real-time PCR and normalized to ubiquitin mRNA levels. Results show the ratio of the mRNA levels measured in the absence of doxycycline relative to mRNA levels measured in the presence of doxycycline at each time point. (b) mRNA levels of cyclinD2, p18 and cyclinG2 were measured in Baf-3 cells 30 hours after transduction with control retrovirus (control), full length Sp1 encoding retrovirus (Sp1) and Sp1^{Zn2,3} encoding retrovirus (Sp1^{Zn2,3}). Transduced cells were purified by magnetic selection with anti-CD2 antibody. Results show the means of \pm sd of 2 independent experiments.

Fig. 8. Endogenous Sp1 mRNA levels are down-regulated following Sp1 overexpression

(a) Baf-3-Sp1 clone 1 was grown in presence (+ dox) or in absence (- dox). At indicated times, the percentage of GFP expressing cells was measured by FACS and the mRNA levels of ectopic Sp1 and endogenous Sp1 were measured by real-time PCR and normalized to ubiquitin. For endogenous Sp1, results show the ratio of the mRNA levels measured in the absence versus the presence of doxycycline at each time point (b) mRNA levels of ectopic Sp1 and endogenous Sp1 in Baf-3 cells transduced with control retrovirus (control), full length wild-type Sp1 encoding retrovirus (Sp1) or Sp1^{Zn2,3} encoding retrovirus (Sp1^{Zn2,3}) as described in fig. 7. Results show the means \pm sd of 2 independent experiments.

Table 1. Frequency of Sp1 consensus binding sites in the promoters of genes affected by Sp1 overexpression

Differential gene expression following Sp1 overexpression relative to control was determined using GeneSpring GX 7.3 statistical analysis module ANOVA. PatternN was used to search for Sp1 consensus binding site (GGGGCGGGG) among the first 2000 nucleotides of promoters.

- (a) Control list of non-regulated genes generated randomly as described in methods.
- (b) Up regulated genes from differentially expressed gene list (> 1.3 fold)
- (c) Down regulated genes from differentially expressed gene list (< 1.3 fold)
- (d) Statistical significance calculated as described in the Methods.

FIGURES

FIG. 1.

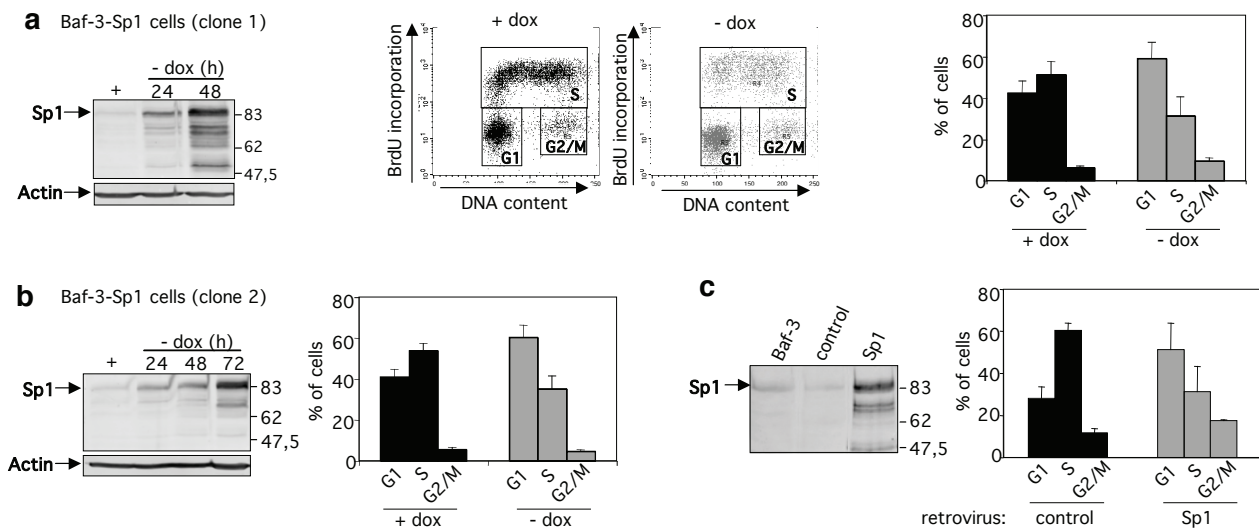


FIG. 2.

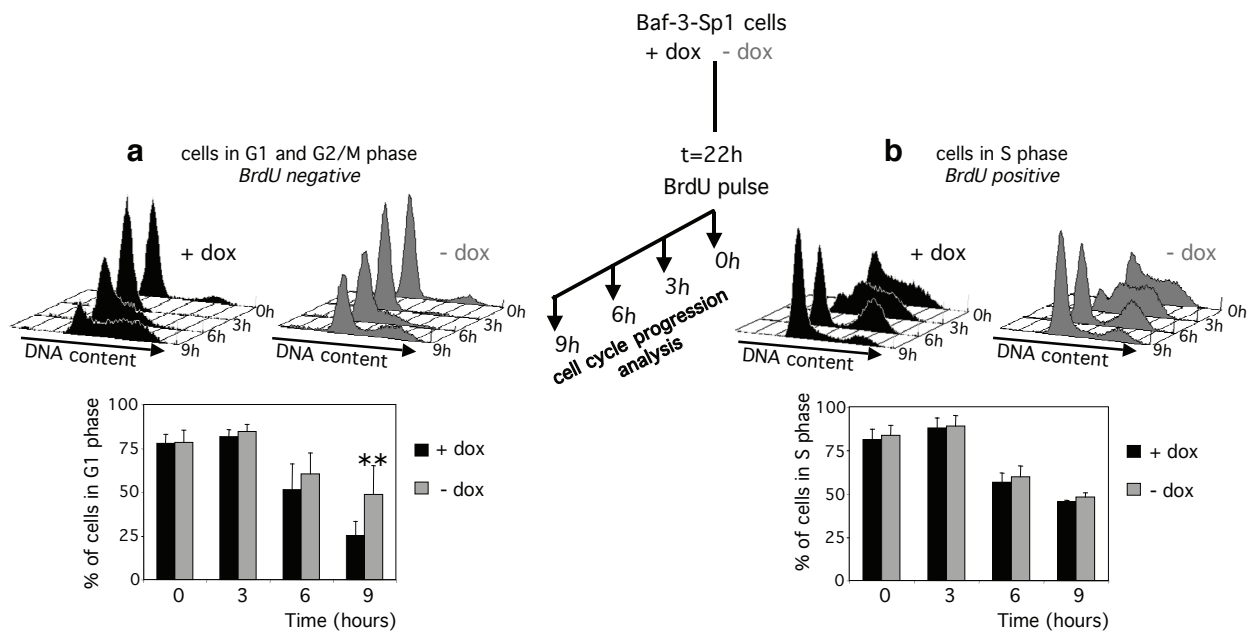


FIG. 3.

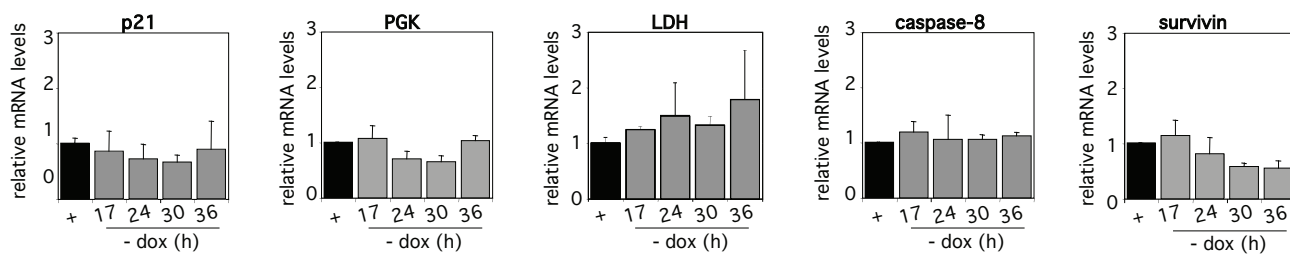


FIG. 4.

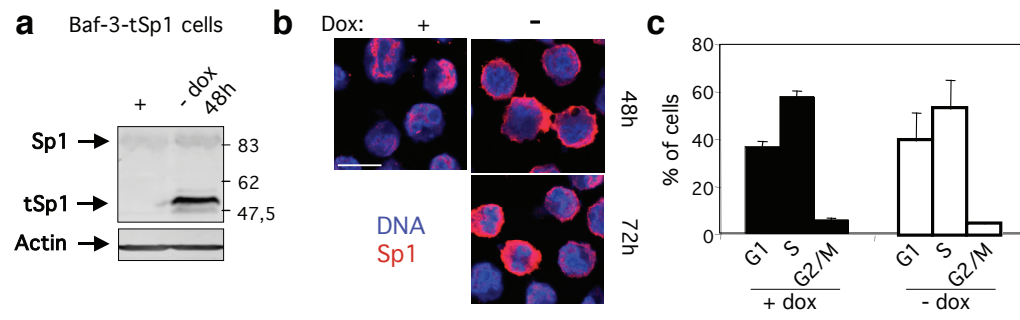


FIG. 5.

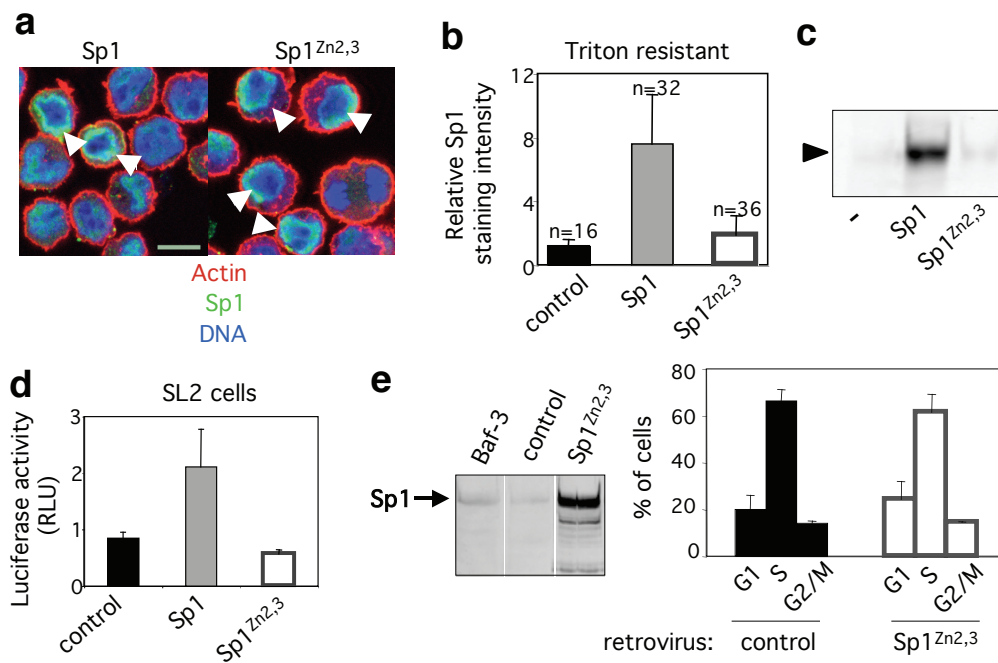


FIG. 6.

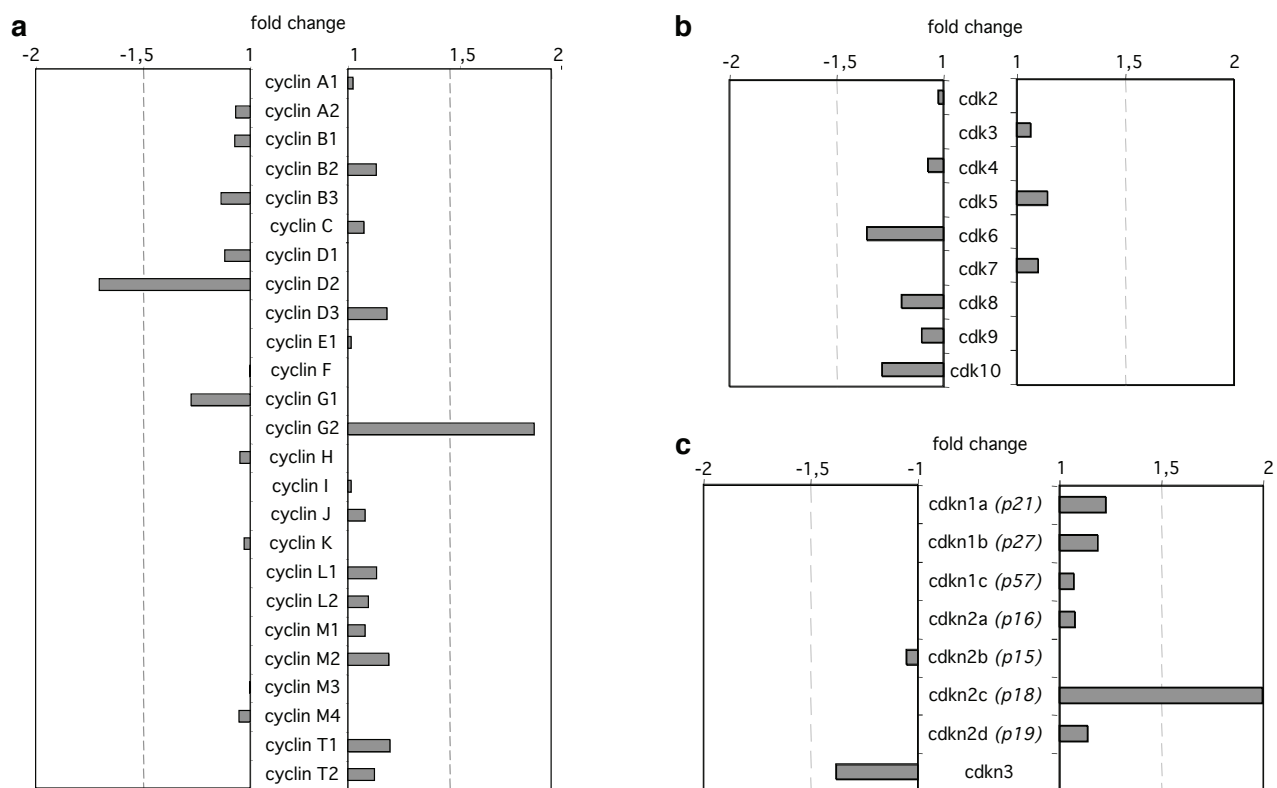


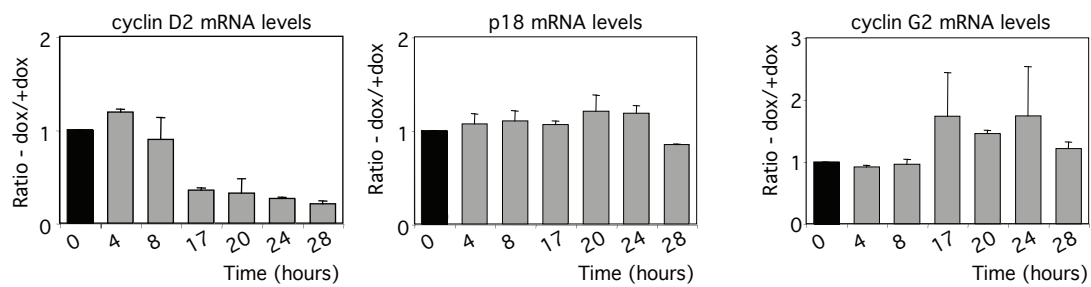
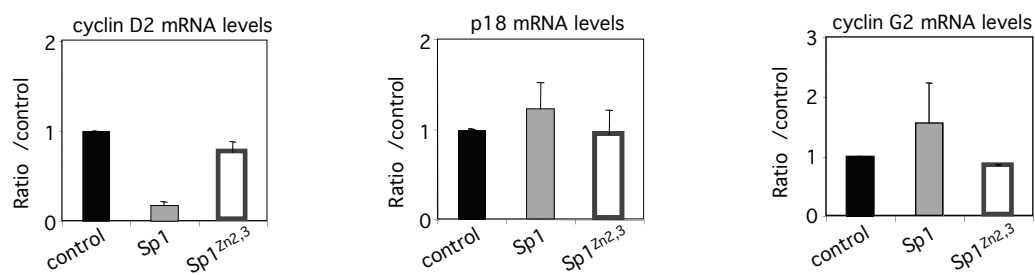
FIG. 7.**a** Baf-3-Sp1 cells**b** Transduced Baf-3 cells

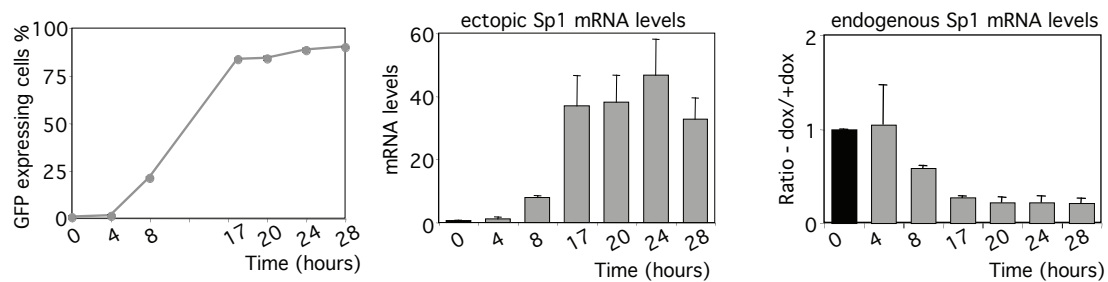
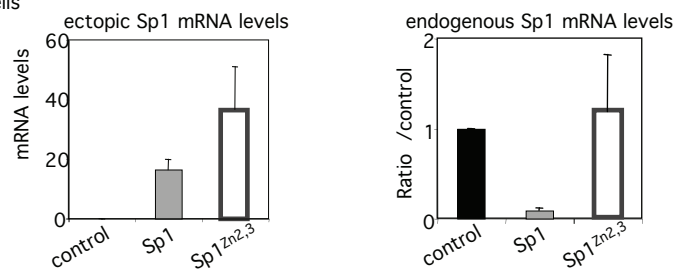
FIG. 8.**a** Baf-3-Sp1 cells**b** Transduced Baf-3 cells

Table 1.

| | Number of genes in list | Number of genes with Sp1 binding sites | Percentage | p-value ^(d) |
|--------------------------------------|----------------------------|---|-------------------|------------------------|
| <i>control list</i> ^(a) | 1145 | 176 | 15.3 % | |
| <i>up-regulated</i> ^(b) | 480 | 53 | 11 % | 0.027 |
| <i>down-regulated</i> ^(c) | 319 | 65 | 20.3 % | 0.040 |

^(a) Control list of non-regulated genes generated randomly as described in methods.

^(b) Up regulated genes from differentially expressed gene list (> 1.3 fold)

^(c) Down regulated genes from differentially expressed gene list (<1.3 fold)

^(d) Statistical significance calculated as described in theMethods.

DISCUSSION

I La surexpression de Sp1 induit l'apoptose des cellules

En utilisant plusieurs approches expérimentales (inductible ou infection), nous avons montré qu'un fort niveau d'expression de Sp1 est délétère pour les cellules hématopoïétiques Baf-3 et les fibroblastes, en induisant leur apoptose de façon dépendante de l'activation des caspases. Ces résultats sont en accord avec les études du groupe de Khachigian qui décrivent un rôle pro-apoptotique de Sp1 dans des cellules de muscle lisse de chiots. Dans ces cellules, la surexpression de Sp1 induit leur apoptose (Kavurma and Khachigian, 2003) et la phosphorylation de Sp1 induite par un endommagement de l'ADN est associée à la transcription du gène *fas-l* et à l'induction de l'apoptose via l'activation de Fas (Kavurma et al., 2001). Cependant, il semble que le rôle de Sp1 dans la régulation de l'apoptose est bivalent puisque dans certains cas, Sp1 est anti-apoptotique. En effet, l'induction de l'apoptose des neurones par un stress oxydatif peut être inhibée par l'acétylation de Sp1 (Ryu et al., 2003a) ou par la surexpression de Sp1 (Ryu et al., 2003b). De plus, dans les neurones, la restauration de la transcription dépendante de Sp1 suite à la surexpression de Sp1 et de son co-facteur TAFII130 protège les neurones de la toxicité des mutants Huntingtin (Dunah et al., 2002).

Plusieurs facteurs pourraient participer à l'établissement du rôle de Sp1 dans la régulation de l'apoptose. Un de ces facteurs pourrait être la quantité de Sp1 : un fort niveau de Sp1 serait pro-apoptotique alors qu'un niveau moindre, plus physiologique, serait anti-apoptotique. En effet, un rôle anti-apoptotique de Sp1 à un niveau physiologique est supportée par plusieurs observations. D'une part, l'expression de Sp1 est requise pour la survie et le développement embryonnaire (Marin et al., 1997). D'autre part, l'expression de Sp1 est induite par les facteurs de survie par exemple l'IL-3 pour les cellules Baf-3 (données non montrées) ou le sérum pour les fibroblastes (Black et al., 1999). Enfin, l'activité de Sp1 est régulée au cours de l'apoptose puisque Sp1 est clivé par les caspases dans les premières étapes de l'apoptose (Rickers et al., 1999) (Piedrafita and Pfahl, 1997). En accord avec cette hypothèse, nous avons observé que l'expression d'un niveau modéré de Sp1 retarde l'apoptose des fibroblastes induite par la privation en facteurs de croissance (données non montrées). La quantité ne peut cependant pas être le seul facteur déterminant dans l'établissement du rôle de Sp1 dans la régulation de l'apoptose puisque la surexpression de Sp1 est anti-apoptotique dans les neurones (Ryu et al., 2003b) (Dunah et al., 2002). Il est possible que le rôle de Sp1 dans la régulation de l'apoptose dépende aussi du type cellulaire et/ou sa prolifération, de l'environnement extra-cellulaire et du stimulus apoptotique. Un rôle

bivalent dans la régulation de l'apoptose a aussi été décrit pour d'autres facteurs de transcription comme le facteur de transcription E2F-1 (Field et al., 1996) (Moon et al., 2005) (Wikonkal et al., 2003). L'activité de ces deux facteurs de transcription dans la régulation de l'apoptose n'est pourtant pas comparable puisque, au contraire de Sp1, E2F-1 est anti-apoptotique dans les cellules Baf-3 (Gala et al., 2001).

Sp1 n'est pas le seul facteur de transcription capable d'induire l'apoptose en condition de surexpression puisque pour d'autres facteurs de transcription comme p53, c-Myc, E2F-1, Foxo3a, c-jun, c-fos, p75 c-Myb, FKHR-L et p73, leur surexpression induit l'apoptose (Yonish-Rouach et al., 1991) (Evan et al., 1992) (Qin et al., 1994) (Brunet et al., 1999) (Bossy-Wetzel et al., 1997) (Preston et al., 1996) (Kumar et al., 2003) (Dijkers et al., 2000) (Jost et al., 1997). Ce n'est cependant pas le cas de tous les facteurs de transcription puisque certains, comme ATFx ou encore GATA-4, sont anti-apoptotiques (Persengiev et al., 2002) (Suzuki and Evans, 2004). Parmi les facteurs de transcription pro-apoptotiques, tous ne sont pas équivalents dans la régulation de l'apoptose. En effet, comme nous l'avons mentionné dans l'introduction bibliographique, l'expression ectopique de p53 est suffisante pour induire l'apoptose de différents types cellulaires. Par contre, les facteurs c-Myc ou E2F-1 sensibilisent les cellules à l'apoptose et leur activité pro-apoptotique est inhibée par l'activation de voies anti-apoptotiques par les facteurs de croissance (Harrington et al., 1994) (Hallstrom and Nevins, 2003). Dans le cas de Sp1, sa surexpression est suffisante pour induire l'apoptose de différents types cellulaires même en présence de facteurs de croissance.

II Etude des mécanismes de l'activité apoptotique

II.1 Les récepteurs de mort

Sp1 pourrait induire l'apoptose via l'activation de la voie des récepteurs de mort comme cela a déjà été décrit. En effet, la transcription de *fas-l* et de *trail* par Sp1 est impliquée dans l'induction de l'apoptose via Fas et Trail respectivement, suggérant un lien entre la voie des récepteurs de mort et Sp1 (Kavurma et al., 2001) (Nebbioso et al., 2005). De plus, Sp1 régule la transcription du gène *fas-l* dans de nombreux systèmes cellulaires différents (McClure et al., 1999) (Xiao et al., 1999) (Kavurma et al., 2001) (McClure RF, 1999, J Biol Chem) ainsi que les gènes de la famille des récepteurs de mort *trail*, *dr5* (Wang et al., 2000) (Higuchi et al., 2004). Nos résultats indiquent que l'activation des récepteurs de mort est le mécanisme d'induction de l'apoptose par Sp1 dans les fibroblastes de hamster

WT2 mais pas dans les cellules Baf-3 (Deniaud, 2006, article 1). En effet, l'apoptose induite par Sp1 est dépendante de la caspase-8 dans les fibroblastes WT2 mais pas dans les cellules Baf-3. Ceci n'est pas dû à un défaut de la voie apoptotique des récepteurs de mort dans les Baf-3 puisque l'inhibition de la caspase-8 inhibe l'apoptose induite par Fas. De plus, dans les Baf-3, nous n'avons pas détecté d'ARN codant pour Fas-L ou pour TRAIL en conditions basales ou après la surexpression de Sp1. Il aurait été très intéressant de déterminer si l'expression de ces gènes est modifiée suite à la surexpression de Sp1 dans les fibroblastes WT2. Malheureusement, les séquences du génome du hamster ne sont pas encore disponibles.

Ces résultats montrent aussi que la surexpression de Sp1 induit l'apoptose par des voies alternatives selon le type cellulaire. Cette caractéristique n'est pas unique à Sp1 puisque les facteurs de transcription E2F-1 et c-Myc peuvent aussi utiliser plusieurs voies indépendantes pour induire l'apoptose (Stiewe and Putzer, 2000) (Hemann et al., 2005) (Egle et al., 2004). De la même manière, p53 induit l'apoptose par des mécanismes différents selon le type cellulaire (Shibue et al., 2003). Par analogie avec p53, plusieurs mécanismes pourraient dicter l'activation d'une voie plutôt qu'une autre par Sp1 : la présence de différents co-facteurs, les modifications post-traductionnelles différentes et le contexte cellulaire.

II.2 Autres voies

Dans les mêmes cellules où l'apoptose induite par endommagement de l'ADN implique l'activation de la voie Fas/Fas-L via Sp1 (Kavurma et al., 2001), leur apoptose induite par la surexpression de Sp1 est due à la répression du gène *p21* (Kavurma and Khachigian, 2003). Dans les cellules Baf-3, nous n'avons pas détecté de modification de l'expression de p21 au niveau ARN (Deniaud, en préparation) indiquant que les mécanismes d'induction de l'apoptose par Sp1 dans les cellules Baf-3 sont différents de ceux préalablement décrits.

II.3 Les caspases et les protéines Bcl-2

Parmi les gènes cibles de Sp1 qui sont impliqués dans la régulation de l'apoptose, on retrouve certains gènes de la famille des récepteurs de mort, mais aussi des gènes de la machinerie apoptotique comme les caspases et la famille Bcl-2. Dans les cellules Baf-3, nous n'avons détecté aucune modification majeure de l'expression de la plupart de ces gènes, qu'ils aient été définis gènes cibles ou non de Sp1, excepté une diminution de l'expression de

Bax, Bcl-x et une augmentation de la Caspase-11 (Deniaud, 2006, article 1) et de Bmf (résultats des puces à ADN, données non montrées). La diminution de l'expression de Bcl-X et l'augmentation de Bmf pourrait sensibiliser les cellules à l'apoptose induite par Sp1 mais, au moins pour Bcl-X, ce ne peut pas être la cause de l'induction de l'apoptose. En effet, la diminution de son expression n'est pas suffisante pour induire l'apoptose des cellules Baf-3 (Low et al., 2001). Quant à l'augmentation de l'expression de la caspase-11, il est peu probable que ce soit une cause de l'apoptose induite par Sp1 puisque c'est une caspase qui a un rôle inflammatoire (Martinon and Tschopp, 2007) et que l'augmentation de son expression est tardive. Finalement, nous n'avons pas observé de modifications du profil d'activation des différentes caspases lors de l'apoptose induite par la surexpression de Sp1 ou par la privation en facteurs de survie (données non montrées). L'ensemble de ces études ne nous ont pas permis d'identifier des effecteurs de l'activité apoptotique de Sp1 dans les cellules Baf-3.

III La surexpression de Sp1 induit une perturbation du cycle cellulaire

III.1 Rôle de Sp1 dans la régulation du cycle cellulaire

Nous avons montré que la surexpression de Sp1 induit une accumulation des cellules Baf-3 en phase G1 du cycle cellulaire (Deniaud, en préparation). Cet événement n'est pas dû à l'entrée des cellules en apoptose puisqu'il précède de quelques heures l'induction de l'apoptose. L'accumulation est due à un ralentissement de la progression des cellules en phase G1 sans pas dans les autres phases du cycle cellulaire (Deniaud, en préparation). Ces résultats sont en accord avec les nombreuses évidences décrivant un rôle de Sp1 dans la régulation du cycle cellulaire. D'une part, l'expression et/ou l'activité de Sp1 est régulée au cours du cycle cellulaire (Black et al., 1999) (Grinstein et al., 2002) (Kumar and Butler, 1998) (Fojas de Borja et al., 2001) (Lacroix et al., 2002) (Vicart et al., 2006). D'autre part, Sp1 peut interagir avec certains régulateurs du cycle cellulaire comme les complexes cyclin/Cdk ou le facteur de transcription E2F-1 (Fojas de Borja et al., 2001) (Lin et al., 1996; Opitz and Rustgi, 2000) (Rotheneder et al., 1999). Quelques évidences indirectes le décrivent comme un régulateur de la progression de la phase G1 et de la transition G1-S. Par exemple, son expression est maximale pendant la phase G1 dans les fibroblastes (Grinstein et al., 2002) et son activité est régulée par les niveaux d'expression les protéines à poche qui sont des régulateurs de la phase G1 (Chen et al., 1994) (Johnson-Pais et al., 2001; Udvardia et al., 1993). De plus, une

approche bioinformatique a caractérisé la présence des sites de liaison à Sp1 principalement dans les promoteurs des gènes de la phase G1 (Elkon et al., 2003). Son rôle dans la régulation du cycle cellulaire n'est pourtant pas clairement établi puisqu'il peut avoir un effet positif ou négatif. Plusieurs études sont en faveur d'un rôle positif. Par exemple, une augmentation des cellules en phase G1 est observée suite à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de Sp1 par expression d'un dominant négatif (Grinstein et al., 2002) ou par extinction de son expression (Abdelrahim et al., 2004). A l'inverse, la surexpression de Sp1 conduit à une augmentation du nombre de cellules en phase S (Tong et al., 2007). Cependant, nos résultats et une autre étude (Kavurma and Khachigian, 2003) montrent que la surexpression de Sp1 inhibe la progression dans le cycle cellulaire, définissant Sp1 comme un régulateur négatif du cycle cellulaire. Il est intéressant de noter que ces deux études ont été réalisées avec des cellules non transformées alors que les études décrivant un rôle positif de Sp1 dans la progression du cycle cellulaire ont été effectuées à partir de cellules transformées. Le rôle de Sp1 dans la régulation du cycle cellulaire pourrait donc dépendre, au moins en partie, de l'état de transformation des cellules.

III.2 Etude des mécanismes de l'induction de l'accumulation des cellules en G1

Nous avons montré que la surexpression de Sp1 induit l'accumulation des cellules en G1 via un ralentissement de la progression de la phase G1 mais pas des autres phases du cycle cellulaire (Deniaud, en préparation). La progression dans les différentes phases du cycle cellulaire, dont la phase G1, est coordonnée par l'activité séquentielle des complexes protéiques associant des Cdk spécifiques avec leur partenaire Cycline. L'activité de ces complexes est régulée par les Cdkis ou par les protéines à poche Rb. A partir des résultats du transcriptome, nous avons déterminé l'effet de la surexpression de Sp1 sur l'expression de ces différents régulateurs du cycle cellulaire. Nous avons observé une augmentation de l'expression de p18 et de la Cycline G2 et une diminution de l'expression de la Cycline D2. De façon surprenante, nous n'avons observé aucune modification de l'expression des gènes codant pour les Cdkis p27Kip1 et p21Cip1 dont la transcription est pourtant dépendante de Sp1 (Lee et al., 2003) (Inoue et al., 1999) (Biggs et al., 1996) (De Siervi et al., 2004). L'analyse par RT-PCR en temps réel nous a ensuite permis de confirmer la diminution de l'expression la Cycline D2.

Les Cyclines D sont des composants uniques de la machinerie du cycle cellulaire car, contrairement aux autres Cyclines, leur expression est constante au cours des différentes phases du cycle cellulaire mais dépend de la présence de facteurs mitogéniques dans l'environnement extra-cellulaire. Elles constituent donc le lien entre l'environnement et la machinerie du cycle cellulaire. Lorsqu'elles sont exprimées, les Cyclines D s'associent avec leurs partenaires Cdk 4 ou 6 et, ensemble, initient la phosphorylation de Rb. L'hyperphosphorylation de Rb, qui conduit à la libération du facteur de transcription E2F-1 qui est nécessaire pour l'initiation de la phase S, est assurée par le complexe Cycline E/Cdk2. Enfin, les Cdk de la famille Cip/Kip p21Cip1 et p27Kip1 peuvent, en fonction de leur niveau d'expression, soit inhiber la progression de la phase G1 en inhibant l'activité du complexe Cycline E/Cdk2 soit la favoriser en facilitant l'association des Cyclines D avec leurs partenaires Cdk4/6. Dans les cellules de mammifères, il existe 3 Cyclines D : la Cycline D1, la Cycline D2 et la Cycline D3 qui sont fonctionnellement redondantes. La délétion combinée des 3 gènes *cycline D* dans les souris a montré que ces protéines sont requises pour la prolifération des cellules hématopoïétiques (Kozar et al., 2004). Au sein du compartiment lymphoïde, la Cycline D1 n'est pas exprimée (Della Ragione et al., 1997). La Cycline D2, par contre, a un rôle essentiel au sein du compartiment lymphocytaire B puisqu'elle est nécessaire au contrôle du nombre de progéniteurs des cellules B, à la stimulation de la prolifération des cellules B suite à l'engagement du récepteur à l'antigène et au développement de la sous-population des cellules B péritonéales B1 (Mohamedali et al., 2003) (Lam et al., 2000) (Solvason et al., 2000). Dans les cellules Baf-3, qui sont des cellules pro-B (Palacios and Steinmetz, 1985), il a été montré que la Cycline D2 est régulée par l'IL-3 et que sa surexpression était suffisante pour inhiber l'apoptose induite par la privation en IL-3 (Parada et al., 2001). L'ensemble de ces données indiquent que la diminution de l'expression de la Cycline D2 que nous observons pourrait être le mécanisme responsable de l'accumulation en G1 induit par la surexpression de Sp1. Le fait que nous observions un ralentissement de la progression de la phase G1 et non un arrêt pourrait être dû à l'expression, dans les cellules Baf-3, de la Cycline D3 (résultats des puces à ADN, données non montrées) qui est capable de compenser la réduction de l'expression de la Cycline D2 (Lam et al., 2000). Finalement, il n'est pas exclu qu'un autre mécanisme soit impliqué dans le ralentissement de la progression de la phase G1 que nous observons suite à la surexpression de Sp1. Pour démontrer l'implication de la Cycline D2 de façon formelle, il faudrait étudier l'effet de la restauration de l'expression de la Cycline D2, combiné à la surexpression de Sp1, sur la progression du cycle cellulaire. Cependant, il est probable que l'expression ectopique de la Cycline D2 *per se*

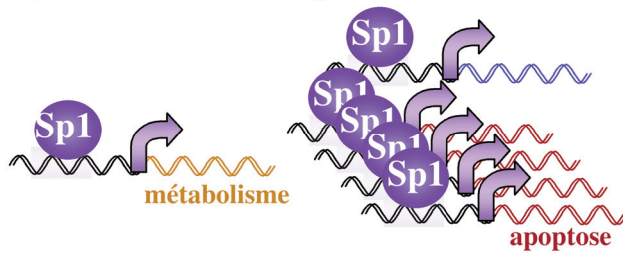
perturbe la progression dans le cycle cellulaire des cellules Baf-3, ce qui pourrait rendre l'interprétation difficile. Nous pourrions aussi inhiber l'expression de la Cycline D2 dans les cellules parentales Baf-3 et ainsi déterminer l'importance de la Cycline D2 dans le contrôle de la phase G1 dans ces cellules.

La diminution de l'expression du gène Cycline D2 pourrait être le résultat d'une action directe de Sp1. Plusieurs observations supportent cette hypothèse. D'une part, la diminution de l'expression du gène *cycline D2* est dépendante de la liaison de Sp1 à l'ADN et, en cinétique, elle corrèle avec l'induction de l'expression du Sp1 ectopique (Deniaud, en préparation). En effet, dans un des clones exprimant Sp1 de façon inductible, dès 17 heures après induction le niveau maximum de l'ARN sp1 ectopique est détecté ce qui corrèle avec l'inhibition maximale de l'expression du gène *cycline D2*. Il serait très intéressant d'étudier l'expression du gène *cycline D2* à des temps plus précoces et à des intervalles plus courts afin de déterminer la latence entre la répression de sa transcription et l'expression de Sp1 ectopique. Néanmoins, nos résultats sont en faveur d'un mécanisme direct ne nécessitant pas la production *de novo* d'une protéine intermédiaire qui est un processus plus long. D'autre part, le promoteur du gène *cycline D2* contient des sites de liaison à Sp1, au nombre de 14 dans les 3000 pb en amont du site d'initiation selon le logiciel MatInspector (données non montrées). De plus, le site de liaison à Sp1 non consensus (GGGGAGGGG) du gène *cycline D2* est fonctionnel puisqu'il est requis pour la transcription constitutive de ce gène dans les cellules T (Martino et al., 2001). De façon générale, des sites Sp1 sont retrouvés dans le promoteur des gènes codant pour les 2 autres Cyclines D (Nagata et al., 2001) (Tong et al., 2007) suggérant que Sp1 est un régulateur transcriptionnel important des gènes *cyclines D*. Ensemble, ces données suggèrent fortement que le gène *cycline D2* est un gène cible de Sp1. Cependant, si c'est le cas, alors, dans notre système expérimental, Sp1 est un répresseur de sa transcription impliquant des mécanismes différents de ceux utilisés dans les cellules T pour réguler la transcription. Finalement, il n'est pas exclu que la répression de la transcription du gène *cycline D2* ne soit pas directement contrôlée par Sp1. Pour le tester, nous pourrions utiliser la technique de précipitation de l'ADN lié à Sp1 dans les premières heures après l'induction du Sp1 ectopique.

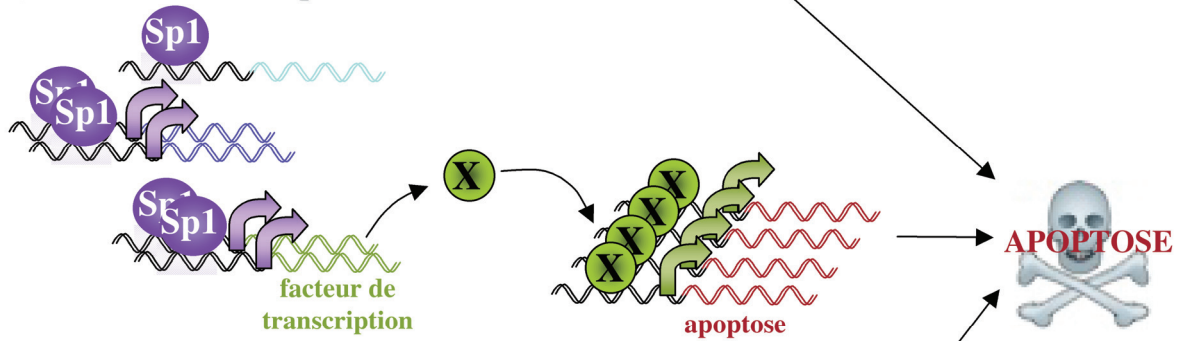
IV Importance de l'activité transcriptionnelle de Sp1 dans le phénotype observé suite à la surexpression de Sp1

Sp1 étant un facteur de transcription, le modèle d'action le plus intuitif qui peut être proposé suit un schéma linéaire direct : Sp1 se lie à ses sites de liaison pour réguler la transcription de gènes cibles spécifiques. A un niveau physiologique, Sp1 se lie et régule la transcription de nombreux gènes cibles dont les gènes de ménage et les gènes du métabolisme. Par contre, en condition de surexpression, un excès de Sp1 va se lier aux promoteurs de gènes cibles additionnels, qui ne sont normalement pas liés en conditions basales, et réguler leur transcription. Un tel mécanisme d'action, qualifié de mécanisme transcriptionnel, implique que la dérégulation de l'expression des gènes cibles de Sp1 additionnels est la cause du phénotype que nous observons. Deux possibilités sont envisageables. Soit ces gènes cibles de Sp1 sont les gènes responsables de l'induction de l'apoptose ou du ralentissement de la progression du cycle cellulaire : c'est le mécanisme transcriptionnel direct (figure 17 a). Soit ces gènes cibles de Sp1 sont les gènes codant pour des facteurs de transcription qui, eux, régulent la transcription des gènes responsables de l'induction de l'apoptose et du ralentissement du cycle cellulaire : c'est le mécanisme transcriptionnel indirect (figure 17 b). Ces deux mécanismes d'action transcriptionnels ont été décrits comme mécanismes utilisés par le facteur de transcription E2F-1 pour induire l'apoptose. En effet, E2F-1 peut activer directement la transcription de gènes de la famille Bcl-2 (Hershko and Ginsberg, 2004) ou du gène codant pour le facteur de transcription apoptotique p73 (Stiewe and Putzer, 2000) ou le régulateur positif de p53, Arf (Bates et al., 1998). Un troisième mécanisme n'impliquant pas l'activité transcriptionnelle peut aussi être envisagé (figure 17 c). Cela a déjà été décrit pour le facteur de transcription p53 qui peut induire l'apoptose des cellules en présence d'inhibiteur de son activité transcriptionnelle en agissant comme une protéine BH3-only (Strom et al., 2006). Cela a aussi été proposé pour le facteur de transcription c-Myc qui pourrait induire l'apoptose via l'induction d'un endommagement de l'ADN (Vafa et al., 2002) (Karlsson et al., 2003).

a) mécanisme transcriptionnel direct



b) mécanisme transcriptionnel indirect



c) mécanisme indépendant de l'activité transcriptionnelle

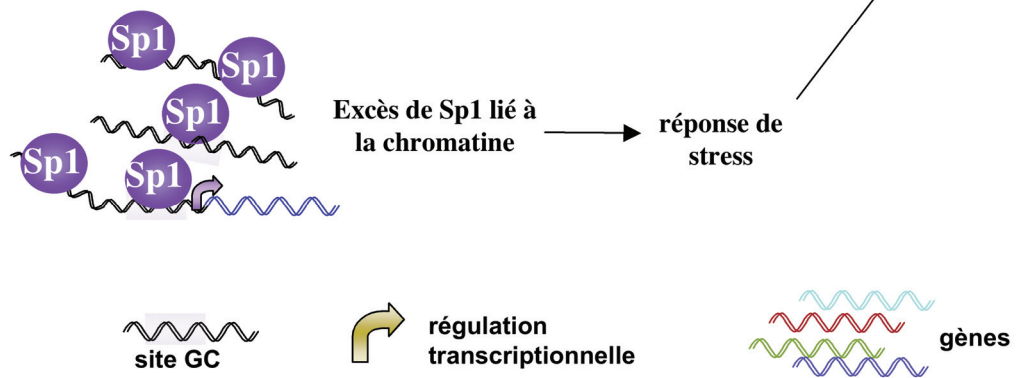


Figure 17 : Les différents modèles d'action de Sp1 possibles conduisant à l'induction de l'apoptose

Afin de tester le rôle de l'activité transcriptionnelle de Sp1 dans l'induction de l'apoptose et du ralentissement du cycle cellulaire observé dans les cellules Baf-3 suite à sa surexpression, nous avons utilisé différentes approches : étude de formes mutées de Sp1 au niveau du domaine de liaison à l'ADN, étude de l'expression de gènes cibles de Sp1 et recherche de sites de liaison à Sp1 dans les promoteurs des gènes différentiellement exprimés suite à la surexpression de Sp1, identifiés par étude transcriptomique.

IV.1 Etude de formes mutées de Sp1

Nous avons montré qu'une forme de Sp1 dépourvue de l'ensemble du domaine de liaison à l'ADN, localisée dans le cytoplasme, n'est plus capable d'induire l'apoptose (Deniaud, article 1). Ces résultats indiquent que si Sp1 a une activité apoptotique indépendante de son activité transcriptionnelle, alors il agit via des mécanismes différents de ceux décrits pour p53. En effet, la forme cytoplasmique de p53 peut induire l'apoptose, vraisemblablement en agissant comme une protéine BH3-only (Chipuk et al., 2004) (Leu et al., 2004).

Nous avons aussi montré que la liaison de Sp1 à l'ADN est requise pour son activité apoptotique. En effet, des formes de Sp1 mutées ponctuellement au niveau d'un ou plusieurs doigts de zinc, toujours localisées dans le noyau mais incapables de lier l'ADN et donc transcriptionnellement inactives, ne sont plus capables d'induire l'apoptose des cellules Baf-3 (Deniaud, en préparation). Cependant, ces résultats ne nous permettent pas de déterminer si l'activité apoptotique de Sp1 requiert seulement sa liaison à l'ADN ou requiert aussi son activité transcriptionnelle. Cependant, il a été observé qu'il est impossible d'obtenir de clones cellulaires viables surexprimant une forme de Sp1 constituée uniquement du domaine de liaison à l'ADN et du domaine de transactivation D qui est, théoriquement, capable de lier l'ADN mais transcriptionnellement inactive (Chen et al., 2000). Cette observation serait en faveur d'un mécanisme d'action dépendant de sa liaison à l'ADN mais indépendant de son activité transcriptionnelle. Pour répondre à cette question, il serait intéressant d'étudier l'activité apoptotique de mutants de Sp1 de taille comparable à la protéine sauvage, toujours capables de lier l'ADN mais transcriptionnellement inactifs. Cependant, Sp1 est constitué de nombreux domaines de transactivation, chacun d'entre eux contribuant à son activité transcriptionnelle, ce qui rend difficile l'obtention de tels mutants.

IV.2 Etude de l'expression de gènes cibles de Sp1 connus

Si Sp1 induit l'apoptose via une activité transcriptionnelle, alors les gènes dont l'expression sera modifiée suite à sa surexpression seront des gènes cibles de Sp1. Par RT-PCR en temps réel et de protection à la RNase, nous avons étudié l'expression de gènes, connus pour être des gènes cibles de Sp1, impliqués dans la régulation de l'apoptose tels que *caspase-3*, *caspase-8*, *fas-l*, *trail*, *survivine*, *bax*, *bcl-x* (Liu et al., 2002) (Liedtke et al., 2003) (Kavurma et al., 2001) (Nebbioso et al., 2005) (Xu et al., 2007) (Thornborrow and Manfredi, 2001) (Grillot et al., 1997) ou impliqués dans la régulation du métabolisme tels que la *ldh-a* ou la *pgk* (Short et al., 1994) (Pfeifer et al., 1990) ainsi que le gène *p21* (Biggs et al., 1996) (De Siervi et al., 2004). Nous n'avons observé aucune modification de leur expression ou alors, lorsqu'elle est détectée, elle intervient juste avant l'entrée des cellules en apoptose, c'est-à-dire plus de dix heures après l'induction du niveau maximal d'expression de Sp1 (Deniaud, en préparation). Ces résultats soulèvent deux points majeurs. D'une part, la présence de sites GC dans le promoteur de ces gènes n'est pas suffisante pour observer une réponse transcriptionnelle suite à la surexpression de Sp1. D'autre part, la dérégulation de l'expression des gènes, lorsqu'elle est observée, n'est probablement pas due à une action directe de Sp1 puisqu'on observe un décalage d'une dizaine d'heures entre l'expression de Sp1 ectopique et la réponse transcriptionnelle. Une étude de la dynamique du récepteur aux glucocorticoïdes en présence du ligand dans le milieu montre que le recrutement du récepteur aux glucocorticoïdes à l'ADN se fait en quelques secondes, suivi du recrutement de la RNAPolymérase qui effectué en quelques minutes (Becker et al., 2002). Ces observations indiquent donc que la latence entre l'activation du promoteur par un facteur de transcription et la production des ARN se compte plutôt en minutes qu'en heures.

IV.3 Recherche des sites Sp1 dans le promoteur des gènes différenciellement exprimés

Comme nous l'avons mentionné plus haut, l'hypothèse d'un mécanisme d'action direct de Sp1 suppose que les gènes dont l'expression est dérégulée suite à la surexpression de Sp1 sont des gènes cibles de Sp1. Si tel est le cas, on s'attend à retrouver plus de gènes ayant des sites de liaison à Sp1 dans leur promoteur parmi la liste de gènes différenciellement exprimés suite à la surexpression de Sp1 que parmi des gènes non régulés et choisis aléatoirement. Par contre, dans l'hypothèse d'un mécanisme d'action indépendant de

l'activité transcriptionnelle de Sp1, la fréquence de gènes ayant un ou des site(s) de liaison à Sp1 dans leur promoteur devrait être similaire entre les gènes différentiellement exprimés ou non. A partir des résultats de la comparaison du transcriptome des cellules surexprimant ou non Sp1, nous avons classé les gènes différentiellement exprimés en deux listes : les gènes surexprimés et les gènes sous-exprimés suite à la surexpression. Nous avons recherché la présence de sites de liaison à Sp1 consensus (GGGGCGGGG) dans le promoteur des gènes inclus dans les deux listes ainsi que dans une liste contrôle de gènes choisis aléatoirement et dont l'expression n'est pas dérégulée suite à la surexpression de Sp1.

IV.3.1 Induction indépendante de l'activité transcriptionnelle de Sp1

Parmi les gènes surexprimés, la fréquence des gènes ayant un site consensus de liaison à Sp1 dans leur promoteur est inférieure à celle calculée à partir de la liste contrôle ce qui suggère que l'induction de la transcription de ces gènes ne dépend pas directement de Sp1 (Deniaud, en préparation). De façon très intéressante, la fonction biologique qui est significativement sur-représentée parmi les gènes surexprimés est la régulation de l'apoptose suggérant que le ou les effecteur(s) de l'apoptose induite par Sp1 pourrai(en)t être inclus dans ce groupe de gènes et que leur induction est indépendante de l'activité transcriptionnelle de Sp1.

Dans le cas d'une activité apoptotique de Sp1 de façon indépendante de son activité transcriptionnelle, nous proposons le modèle d'action suivant : à un niveau physiologique, Sp1 régule la transcription des gènes de ménage et du métabolisme et participe à la régulation de l'architecture du noyau et/ou l'intégrité génomique. Par contre, à un niveau supra-physiologique, l'excès de facteurs Sp1 va se lier à une grande fraction de l'ADN ce qui est senti comme un signal de stress suffisant pour induire l'apoptose. Ce modèle implique que la liaison de Sp1 à l'ADN, en plus de son rôle dans la régulation transcriptionnelle, a un rôle essentiel dans la régulation de la structure chromatinienne et/ou nucléaire. Quelques études indirectes supportent cette idée. En effet, dans la cellule non stressée, la localisation de Sp1 est organisée en foyers spécifiques et précis qui ne sont que peu fréquemment colocalisés avec les sites actifs de transcription (He et al., 2005). De plus, le nombre de sites liés par Sp1 *in vivo* est très grand, estimé à environ 12 000 dans le génome humain, et ces sites sont répartis aussi bien au niveau de promoteurs de gènes annotés ou d'ARN non-codants qu'au niveau de zones intergéniques (Cawley et al., 2004). La liaison de Sp1 à l'ADN n'est donc pas obligatoirement associée à la régulation transcriptionnelle. Comme nous l'avons

mentionné dans l'introduction bibliographique, cette notion a été proposée pour le facteur de transcription c-Myc. Dans ce cas, il a été suggéré que la liaison de c-Myc à l'ADN régule l'intégrité génomique et que, en condition de surexpression, c-Myc induirait l'apoptose via l'induction d'un endommagement à l'ADN (Vafa et al., 2002). Toutefois, si Sp1 induit l'apoptose de façon indépendante à son activité transcriptionnelle, le mécanisme impliqué est différent de celui décrit pour c-Myc puisque nous n'avons pas détecté de foyers caractéristiques d'un endommagement de l'ADN suite à la surexpression de Sp1 (données non montrées). Finalement, il n'est pas exclu que l'augmentation des gènes surexprimés soit le résultat d'un mécanisme transcriptionnel indirect. Ce mécanisme implique une cascade de transcription d'au moins deux étapes : 1) la dérégulation, directement par Sp1, de la transcription de gènes codant ou régulant des facteurs de transcription 2) l'induction, par ces facteurs de transcription, de l'expression des gènes responsables de l'apoptose. Nous avons effectué notre analyse au temps précédant l'entrée des cellules en apoptose et donc, une dizaine d'heures après l'induction maximale de l'expression du Sp1 ectopique. Dans le cas d'un mécanisme transcriptionnel indirect, à ce temps, la majorité des gènes seront donc des gènes cibles du ou des facteurs de transcription dont l'expression et/ou l'activité aura été dérégulée par la surexpression de Sp1. Pour déterminer si Sp1 induit l'apoptose via ce mécanisme, l'effet des inhibiteurs de la traduction, et donc de la synthèse *de novo* d'un ou des intermédiaire(s), sur le phénotype pourraient être étudiés. Cependant, les systèmes expérimentaux utilisés ne nous permettent pas de réaliser ces études puisque ces inhibiteurs conduiraient à l'inhibition de l'accumulation de Sp1 lui-même. Nous pourrions, par contre, effectuer la même analyse mais à des temps plus précoces de la cinétique, juste après l'induction de Sp1. L'enrichissement en gènes cibles parmi les gènes surexprimés à des temps précoces après induction sera en faveur d'un mécanisme transcriptionnel indirect alors que le contraire sera en faveur d'un mécanisme transcriptionnel indirect.

IV.3.2 Répression dépendante de l'activité transcriptionnelle de Sp1

Parmi les gènes sous-exprimés, nous avons observé un enrichissement de gènes contenant au moins un site consensus de liaison à Sp1 dans leur promoteur comparé à la liste contrôle, ce qui suggère que la répression de la transcription d'au moins une partie de ces gènes est due à l'action directe de Sp1 (Deniaud, en préparation). De façon très intéressante, un des gènes le plus sous-exprimé suite à la surexpression de Sp1 est le gène *sp1* endogène. Nous avons montré que la cinétique de la diminution du niveau d'ARN du Sp1 endogène

corrèle parfaitement avec la cinétique d'induction de l'expression de Sp1 ectopique et, au temps où le niveau d'expression de la protéine Sp1 ectopique induit est maximal, l'inhibition de la transcription du *sp1* endogène est complète (Deniaud, en préparation). Ces résultats suggèrent que le gène *sp1* endogène est directement réprimé par Sp1 lui-même. Cette hypothèse est en accord avec notre observation que le gène *sp1* fait partie des gènes qui contient au moins un site consensus de liaison à Sp1 dans leur promoteur et avec l'étude qui montre que Sp1 régule sa propre transcription (Nicolas et al., 2003) (Nicolas et al., 2001). Par contre, dans ces études, l'expression ectopique de Sp1 dans les cellules 293T ou Hela active le promoteur du gène *sp1* alors que, dans les cellules Baf-3, nous observons une répression de la transcription du gène *sp1* suite à la surexpression de Sp1. Ces résultats, avec l'observation que seuls les gènes sous-exprimés sont enrichis en gènes cibles de Sp1, suggèrent dans les cellules Baf-3, en condition de surexpression, Sp1 a une activité transcriptionnelle répressive. Ceci est en accord avec l'hypothèse formulée précédemment selon laquelle la transcription du gène *cycline D2* pourrait être directement réprimée par Sp1.

Quel que soit le mécanisme, la transcription du gène *sp1* endogène est réprimée rapidement après la surexpression de Sp1 indiquant que la quantité de Sp1 est finement régulée et soumise à un retro-contrôle négatif, au moins dans les cellules Baf-3. Biologiquement, la répression de la transcription du gène *sp1* pourrait représenter une réponse de compensation au stress constitué de l'accumulation d'une trop grande quantité de Sp1. Par analogie avec les réponses à l'endommagement de l'ADN ou à un stress du réticulum endoplasmique, la réponse à un excès de Sp1 pourrait être biphasique : la première phase viserait à réduire l'accumulation de Sp1 en réprimant sa propre transcription. Cette première phase serait accompagnée d'une réduction de la transcription dépendante de Sp1, qui serait due au caractère répressif de Sp1. Dans une deuxième phase, en cas de stress excessif et/ou maintenu, l'excès de Sp1 lié à l'ADN conduirait à l'induction de l'apoptose, vraisemblablement de façon indépendante de l'activité transcriptionnelle de Sp1.

Concernant notre analyse bio-informatique, plusieurs critiques pourraient être formulées. D'une part, la séquence du site de liaison à Sp1 que nous avons recherché dans les promoteurs des gènes pourrait ne pas être la « bonne ». En effet, les études *in vitro* montrent que les séquences des sites de liaison à Sp1 peuvent être variables en 3' et le site consensus est défini comme : (G/T)GGG(C/A)GG(G/A)(G/A)(C/T) (Bucher, 1990) (Kriwacki et al., 1992). Cependant, d'après la base de données TRANSFAC (version 7.0), qui est la base de données de référence concernant les éléments génomiques de régulation de la transcription, la

séquence que nous avons recherchée est celle qui est la plus largement représentée parmi les 108 qui ont été compilées (<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/databases/transfac/getTF.cgi?AC=M00196>). De plus, même si cette séquence n'est pas la seule séquence liée à Sp1, elle est néanmoins représentative de l'ensemble des séquences des sites liés à Sp1 en terme de distribution dans le génome (Cawley et al., 2004).

D'autre part, la recherche du site de liaison à Sp1 a été effectuée dans les 2000 pb en amont du site d'initiation de la transcription. Ce choix semble acceptable pour Sp1 puisque les sites de liaison à Sp1 sont préférentiellement localisés à proximité du site d'initiation de la transcription (à moins de 500 pb en amont) dans les promoteurs des gènes du cycle cellulaire identifiés comme gènes cibles de Sp1 (Elkon et al., 2003). Par conséquent, si la transcription de quelques gènes cibles de Sp1 peut être contrôlée par un ou des site(s) de liaison à Sp1 localisé(s) à distance du site d'initiation de la transcription, il semble que ce soient des cas négligeables.

V Rôle de la surexpression de Sp1 dans la transformation

Nous avons montré qu'un fort niveau de Sp1 inhibe la progression dans le cycle cellulaire au moins dans les cellules Baf-3 et induit l'apoptose des cellules non transformées, ce qui évoque les fonctions caractéristiques de suppresseur de tumeur. Pourtant, dans de nombreux types de cancers différents, le niveau d'expression et/ou l'activité de Sp1 est augmentée suggérant un rôle positif de Sp1 dans la transformation.

Un lien entre la protéine Sp1 et la transformation tumorale est clairement établi. D'une part, Sp1 est surexprimé dans de nombreux cancers chez l'homme (estomac, pancréas, thyroïde) (Shi et al., 2001) (Chiefari et al., 2002) (Wang et al., 2003). Sp1 est aussi hyperactivé par rapport aux tissus sains dans des cellules de cancers du sein et de carcinomes hépatiques (Lietard et al., 1997) (Zannetti et al., 2000). Chez les patients atteints de cancer gastrique, l'expression forte de Sp1 est synonyme d'un pronostic défavorable (Wang et al., 2003). Il semble que la surexpression/hyperactivation de Sp1 est acquise progressivement au cours de la transformation et est généralement détectée à des stades tardifs de la transformation (Kumar and Butler, 1999) (Lou et al., 2005). Cette surexpression/hyperactivation de Sp1 est essentielle à la transformation des cellules puisque l'inhibition de la surexpression de Sp1 dans les fibrosarcomes réduit leur capacité à former des tumeurs dans des souris athymiques (Lou et al., 2005). Ces résultats confirment des données antérieures qui montraient que l'inhibition de la liaison à l'ADN ou de l'expression

de Sp1 réduit la prolifération de lignées cellulaires de cancer du poumon et de gliomes (Ishibashi et al., 2000) ou les capacités invasives de lignées cellulaires de cancer gastrique (Jiang et al., 2004). Le rôle essentiel de Sp1 dans la transformation semble à priori contradictoire avec nos résultats qui montrent qu'un fort niveau de Sp1 est pro-apoptotique. Une telle contradiction a déjà été observée pour certains oncogènes. Par exemple, les oncogènes c-Myc ou E2F-1 stimulent la prolifération cellulaire de façon indépendante aux facteurs de croissance et cette activité est couplée à une activité apoptotique pour empêcher une prolifération cellulaire inappropriée (Evan et al., 1992) (Qin et al., 1994). L'acquisition d'une résistance à l'apoptose permet alors la survie des cellules présentant l'activation de ces oncogènes et leur transformation (Eischen et al., 1999).

Le processus de transformation est un long processus qui implique de multiples altérations génétiques permettant d'acquérir, entre autres, une résistance à l'apoptose, une indépendance aux facteurs mitogéniques mais aussi une activation de l'angiogénèse et d'un potentiel invasif (Hanahan and Weinberg, 2000). L'ensemble de ces altérations cellulaires sont nécessaires au processus de transformation. Le rôle positif de Sp1 dans la transformation pourrait impliquer sa capacité à activer la transcription du gène codant pour le facteur angiogénique VEGF (Yao et al., 2004) (Shi et al., 2001) (Ishibashi et al., 2000) ou du gène codant uPAR (urokinase receptor) une protéine clef de l'invasion tumorale (Zannetti et al., 2000) (Zannetti et al., 2005). La stimulation de l'angiogénèse et/ou le potentiel invasif par Sp1 pourrait participer à l'expansion clonale rapide et à la formation de métastases ce qui serait un avantage seulement pour les cellules ayant déjà acquis les autres caractéristiques de la transformation, dont la résistance à l'apoptose, et donc à des stades tardifs de la transformation.

En conclusion, nous pouvons envisager l'implication de Sp1 dans la régulation de l'apoptose et la transformation de la façon suivante (Figure 18) : Sp1, lorsqu'il n'est pas surexprimé, participe au maintien de la survie des cellules non transformées vraisemblablement en activant la transcription des gènes de ménage. Un excès de Sp1 dans les cellules non transformées ou à un stade précoce de la transformation conduit à leur apoptose. Par contre, à un stade avancé de la transformation, les cellules tumorales ont acquis une résistance à l'apoptose et peuvent échapper à l'induction de l'apoptose par Sp1. Dans ce cas, la surexpression ou l'hyperactivation de Sp1 participe alors au développement tumoral via l'induction de gènes impliqués dans l'angiogénèse et la migration.

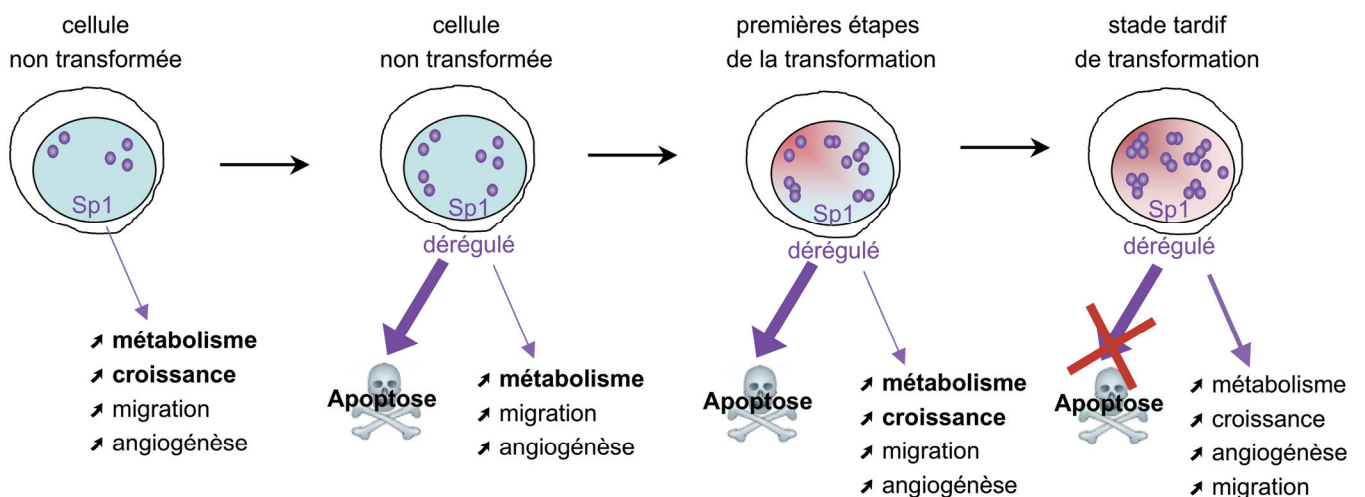


Figure 18 : Modèle de l'implication de Sp1 dans la régulation de l'apoptose et dans la transformation

REFERENCES

A

Abdelrahim, M., Smith, R., 3rd, Burghardt, R., and Safe, S. (2004). Role of Sp proteins in regulation of vascular endothelial growth factor expression and proliferation of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 64, 6740-6749.

Ainbinder, E., Revach, M., Wolstein, O., Moshonov, S., Diamant, N., and Dikstein, R. (2002). Mechanism of rapid transcriptional induction of tumor necrosis factor alpha-responsive genes by NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 22, 6354-6362.

Amati, B., Brooks, M.W., Levy, N., Littlewood, T.D., Evan, G.I., and Land, H. (1993). Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell* 72, 233-245.

Armstrong, S.A., Barry, D.A., Leggett, R.W., and Mueller, C.R. (1997). Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity. *J Biol Chem* 272, 13489-13495.

Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* (New York, N.Y 281, 1305-1308.

Attardi, L.D., Lowe, S.W., Brugarolas, J., and Jacks, T. (1996). Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *Embo J* 15, 3693-3701.

B

Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L., and Vousden, K.H. (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395, 124-125.

Baudino, T.A., Maclean, K.H., Brennan, J., Parganas, E., Yang, C., Aslanian, A., Lees, J.A., Sherr, C.J., Roussel, M.F., and Cleveland, J.L. (2003). Myc-mediated proliferation and lymphomagenesis, but not apoptosis, are compromised by E2f1 loss. *Mol Cell* 11, 905-914.

Becker, M., Baumann, C., John, S., Walker, D.A., Vigneron, M., McNally, J.G., and Hager, G.L. (2002). Dynamic behavior of transcription factors on a natural promoter in living cells. *EMBO Rep* 3, 1188-1194.

Bell, L.A., O'Prey, J., and Ryan, K.M. (2006). DNA-binding independent cell death from a minimal proapoptotic region of E2F-1. *Oncogene* 25, 5656-5663.

Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S.W., Luzio, J.P., Simari, R., and Weissberg, P. (1998). Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* (New York, N.Y 282, 290-293.

Berkovich, E., and Ginsberg, D. (2003). ATM is a target for positive regulation by E2F-1. *Oncogene* 22, 161-167.

Bieda, M., Xu, X., Singer, M.A., Green, R., and Farnham, P.J. (2006). Unbiased location analysis of E2F1-binding sites suggests a widespread role for E2F1 in the human genome. *Genome Res* 16, 595-605.

Bigger, C.B., Melnikova, I.N., and Gardner, P.D. (1997). Sp1 and Sp3 regulate expression of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor beta4 subunit gene. *J Biol Chem* 272, 25976-25982.

Biggs, J.R., Kudlow, J.E., and Kraft, A.S. (1996). The role of the transcription factor Sp1 in regulating the expression of the WAF1/CIP1 gene in U937 leukemic cells. *J Biol Chem* 271, 901-906.

Black, A.R., Jensen, D., Lin, S.Y., and Azizkhan, J.C. (1999). Growth/cell cycle regulation of Sp1 phosphorylation. *J Biol Chem* 274, 1207-1215.

Blake, M.C., Jambou, R.C., Swick, A.G., Kahn, J.W., and Azizkhan, J.C. (1990). Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter. *Mol Cell Biol* 10, 6632-6641.

Blattner, C., Sparks, A., and Lane, D. (1999). Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Mol Cell Biol* 19, 3704-3713.

Bossy-Wetzel, E., Bakiri, L., and Yaniv, M. (1997). Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *Embo J* 16, 1695-1709.

Botella, L.M., Sanchez-Elsner, T., Sanz-Rodriguez, F., Kojima, S., Shimada, J., Guerrero-Esteo, M., Cooreman, M.P., Ratziu, V., Langa, C., Vary, C.P., *et al.* (2002). Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood* 100, 4001-4010.

Bouwman, P., Gollner, H., Elsasser, H.P., Eckhoff, G., Karis, A., Grosveld, F., Philipsen, S., and Suske, G. (2000). Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development. *Embo J* 19, 655-661.

Brasse-Lagnel, C., Fairand, A., Lavoinne, A., and Husson, A. (2003). Glutamine stimulates argininosuccinate synthetase gene expression through cytosolic O-glycosylation of Sp1 in Caco-2 cells. *J Biol Chem* 278, 52504-52510.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.

Bucher, P. (1990). Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J Mol Biol* 212, 563-578.

Burns, T.F., Bernhard, E.J., and El-Deiry, W.S. (2001). Tissue specific expression of p53 target genes suggests a key role for KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis in vivo. *Oncogene* 20, 4601-4612.

C

Caelles, C., Helmberg, A., and Karin, M. (1994). p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 370, 220-223.

Castoldi, M., and Chu, M.L. (2002). Structural and functional characterization of the human and mouse fibulin-1 gene promoters: role of Sp1 and Sp3. *Biochem J* 362, 41-50.

Cawley, S., Bekiranov, S., Ng, H.H., Kapranov, P., Sekinger, E.A., Kampa, D., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Cheng, J., Williams, A.J., *et al.* (2004). Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* 116, 499-509.

Cecchinelli, B., Lavra, L., Rinaldo, C., Iacovelli, S., Gurtner, A., Gasbarri, A., Ulivieri, A., Del Prete, F., Trovato, M., Piaggio, G., *et al.* (2006). Repression of the antiapoptotic molecule galectin-3 by homeodomain-interacting protein kinase 2-activated p53 is required for p53-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 26, 4746-4757.

Chao, C., Herr, D., Chun, J., and Xu, Y. (2006). Ser18 and 23 phosphorylation is required for p53-dependent apoptosis and tumor suppression. *Embo J* 25, 2615-2622.

Chao, C., Saito, S., Kang, J., Anderson, C.W., Appella, E., and Xu, Y. (2000). p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. *Embo J* 19, 4967-4975.

Chen, F., Zhang, F., Rao, J., and Studzinski, G.P. (2000). Ectopic expression of truncated Sp1 transcription factor prolongs the S phase and reduces the growth rate. *Anticancer Res* 20, 661-667.

Chen, L.I., Nishinaka, T., Kwan, K., Kitabayashi, I., Yokoyama, K., Fu, Y.H., Grunwald, S., and Chiu, R. (1994). The retinoblastoma gene product RB stimulates Sp1-mediated transcription by liberating Sp1 from a negative regulator. *Mol Cell Biol* 14, 4380-4389.

Chen, X., Ko, L.J., Jayaraman, L., and Prives, C. (1996). p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 10, 2438-2451.

Chiang, C.M., and Roeder, R.G. (1995). Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science (New York, N.Y)* 267, 531-536.

Chiefari, E., Brunetti, A., Arturi, F., Bidart, J.M., Russo, D., Schlumberger, M., and Filetti, S. (2002). Increased expression of AP2 and Sp1 transcription factors in human thyroid tumors: a role in NIS expression regulation? *BMC Cancer* 2, 35.

Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D.D., and Green, D.R. (2005). PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science (New York, N.Y)* 309, 1732-1735.

Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science (New York, N.Y)* 303, 1010-1014.

Chu, S., and Ferro, T.J. (2005). Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene* 348, 1-11.

Chun, R.F., Semmes, O.J., Neuveut, C., and Jeang, K.T. (1998). Modulation of Sp1 phosphorylation by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *J Virol* 72, 2615-2629.

Clarke, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L., and Wyllie, A.H. (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362, 849-852.

Cohen, H.T., Bossone, S.A., Zhu, G., McDonald, G.A., and Sukhatme, V.P. (1997). Sp1 is a critical regulator of the Wilms' tumor-1 gene. *J Biol Chem* 272, 2901-2913.

Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.

Courey, A.J., Holtzman, D.A., Jackson, S.P., and Tjian, R. (1989). Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell* 59, 827-836.

Courey, A.J., and Tjian, R. (1988). Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* 55, 887-898.

Croxton, R., Ma, Y., Song, L., Haura, E.B., and Cress, W.D. (2002). Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. *Oncogene* 21, 1359-1369.

D

Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.

Daniel, S., Zhang, S., DePaoli-Roach, A.A., and Kim, K.H. (1996). Dephosphorylation of Sp1 by protein phosphatase 1 is involved in the glucose-mediated activation of the acetyl-CoA carboxylase gene. *J Biol Chem* 271, 14692-14697.

Das, S., Raj, L., Zhao, B., Kimura, Y., Bernstein, A., Aaronson, S.A., and Lee, S.W. (2007). Hzf Determines cell survival upon genotoxic stress by modulating p53 transactivation. *Cell* 130, 624-637.

Datta, P.K., Blake, M.C., and Moses, H.L. (2000). Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by transforming growth factor-beta -induced physical and functional interactions between smads and Sp1. *J Biol Chem* 275, 40014-40019.

de Alboran, I.M., Baena, E., and Martinez, A.C. (2004). c-Myc-deficient B lymphocytes are resistant to spontaneous and induced cell death. *Cell Death Differ* 11, 61-68.

De Siervi, A., Marinissen, M., Diggs, J., Wang, X.F., Pages, G., and Senderowicz, A. (2004). Transcriptional activation of p21(waf1/cip1) by alkylphospholipids: role of the mitogen-activated protein kinase pathway in the transactivation of the human p21(waf1/cip1) promoter by Sp1. *Cancer Res* 64, 743-750.

Degtarev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543-8567.

Della Ragione, F., Borriello, A., Mastropietro, S., Della Pietra, V., Monno, F., Gabutti, V., Locatelli, F., Bonsi, L., Bagnara, G.P., and Iolascon, A. (1997). Expression of G1-phase cell cycle genes during hematopoietic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 73-76.

Dennig, J., Hagen, G., Beato, M., and Suske, G. (1995). Members of the Sp transcription factor family control transcription from the uteroglobin promoter. *J Biol Chem* 270, 12737-12744.

Dijkers, P.F., Medema, R.H., Pals, C., Banerji, L., Thomas, N.S., Lam, E.W., Burgering, B.M., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Koenderman, L., and Coffey, P.J. (2000). Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol Cell Biol* 20, 9138-9148.

Discher, D.J., Bishopric, N.H., Wu, X., Peterson, C.A., and Webster, K.A. (1998). Hypoxia regulates beta-enolase and pyruvate kinase-M promoters by modulating Sp1/Sp3 binding to a conserved GC element. *J Biol Chem* 273, 26087-26093.

Doetzlhofer, A., Rotheneder, H., Lagger, G., Koranda, M., Kurtev, V., Brosch, G., Wintersberger, E., and Seiser, C. (1999). Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol Cell Biol* 19, 5504-5511.

Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.

Du, X.L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I.G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., and Brownlee, M. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction

activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12222-12226.

Dunah, A.W., Jeong, H., Griffin, A., Kim, Y.M., Standaert, D.G., Hersch, S.M., Mouradian, M.M., Young, A.B., Tanese, N., and Krainc, D. (2002). Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science (New York, N.Y)* 296, 2238-2243.

Dynan, W.S., and Tjian, R. (1983a). Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. *Cell* 32, 669-680.

Dynan, W.S., and Tjian, R. (1983b). The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35, 79-87.

E

Egle, A., Harris, A.W., Bouillet, P., and Cory, S. (2004). Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6164-6169.

Eischen, C.M., Packham, G., Nip, J., Fee, B.E., Hiebert, S.W., Zambetti, G.P., and Cleveland, J.L. (2001a). Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1. *Oncogene* 20, 6983-6993.

Eischen, C.M., Weber, J.D., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Cleveland, J.L. (1999). Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev* 13, 2658-2669.

Eischen, C.M., Woo, D., Roussel, M.F., and Cleveland, J.L. (2001b). Apoptosis triggered by Myc-induced suppression of Bcl-X(L) or Bcl-2 is bypassed during lymphomagenesis. *Mol Cell Biol* 21, 5063-5070.

Elkon, R., Linhart, C., Sharan, R., Shamir, R., and Shiloh, Y. (2003). Genome-wide in silico identification of transcriptional regulators controlling the cell cycle in human cells. *Genome Res* 13, 773-780.

Emili, A., Greenblatt, J., and Ingles, C.J. (1994). Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol* 14, 1582-1593.

Erster, S., Mihara, M., Kim, R.H., Petrenko, O., and Moll, U.M. (2004). In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Mol Cell Biol* 24, 6728-6741.

Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z., and Hancock, D.C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-128.

F

Fei, P., Bernhard, E.J., and El-Deiry, W.S. (2002). Tissue-specific induction of p53 targets in vivo. *Cancer Res* 62, 7316-7327.

Felsher, D.W., and Bishop, J.M. (1999). Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3940-3944.

Feng, X.H., Lin, X., and Derynck, R. (2000). Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *Embo J* 19, 5178-5193.

Fernandez, P.C., Frank, S.R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., and Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* 17, 1115-1129.

Field, S.J., Tsai, F.Y., Kuo, F., Zubiaga, A.M., Kaelin, W.G., Jr., Livingston, D.M., Orkin, S.H., and Greenberg, M.E. (1996). E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* 85, 549-561.

Flores, E.R., Tsai, K.Y., Crowley, D., Sengupta, S., Yang, A., McKeon, F., and Jacks, T. (2002). p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* 416, 560-564.

Fojas de Borja, P., Collins, N.K., Du, P., Azizkhan-Clifford, J., and Mudryj, M. (2001). Cyclin A-CDK phosphorylates Sp1 and enhances Sp1-mediated transcription. *Embo J* 20, 5737-5747.

Frame, F.M., Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Cress, W.D., and Kowalik, T.F. (2006). E2F1 induces MRN foci formation and a cell cycle checkpoint response in human fibroblasts. *Oncogene* 25, 3258-3266.

Friedlander, P., Haupt, Y., Prives, C., and Oren, M. (1996). A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis. *Mol Cell Biol* 16, 4961-4971.

G

Gala, S., Marreiros, A., Stewart, G.J., and Williamson, P. (2001). Overexpression of E2F-1 leads to cytokine-independent proliferation and survival in the hematopoietic cell line BaF-B03. *Blood* 97, 227-234.

Gartel, A.L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F., and Tyner, A.L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4510-4515.

Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z.H., and Tjian, R. (1994). A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 192-196.

Gollner, H., Bouwman, P., Mangold, M., Karis, A., Braun, H., Rohner, I., Del Rey, A., Besedovsky, H.O., Meinhardt, A., van den Broek, M., *et al.* (2001a). Complex phenotype of mice homozygous for a null mutation in the Sp4 transcription factor gene. *Genes Cells* *6*, 689-697.

Gollner, H., Dani, C., Phillips, B., Philipsen, S., and Suske, G. (2001b). Impaired ossification in mice lacking the transcription factor Sp3. *Mech Dev* *106*, 77-83.

Grillot, D.A., Gonzalez-Garcia, M., Ekhterae, D., Duan, L., Inohara, N., Ohta, S., Seldin, M.F., and Nunez, G. (1997). Genomic organization, promoter region analysis, and chromosome localization of the mouse *bcl-x* gene. *J Immunol* *158*, 4750-4757.

Grinstein, E., Jundt, F., Weinert, I., Wernet, P., and Royer, H.D. (2002). Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells. *Oncogene* *21*, 1485-1492.

H

Hagen, G., Dennig, J., Preiss, A., Beato, M., and Suske, G. (1995). Functional analyses of the transcription factor Sp4 reveal properties distinct from Sp1 and Sp3. *J Biol Chem* *270*, 24989-24994.

Hagen, G., Muller, S., Beato, M., and Suske, G. (1992). Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res* *20*, 5519-5525.

Hagen, G., Muller, S., Beato, M., and Suske, G. (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *Embo J* *13*, 3843-3851.

Hallstrom, T.C., and Nevins, J.R. (2003). Specificity in the activation and control of transcription factor E2F-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 10848-10853.

Haltiwanger, R.S., Grove, K., and Philipsberg, G.A. (1998). Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc-beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *J Biol Chem* *273*, 3611-3617.

Hamanaka, R., Kohno, K., Seguchi, T., Okamura, K., Morimoto, A., Ono, M., Ogata, J., and Kuwano, M. (1992). Induction of low density lipoprotein receptor and a transcription factor SP-1 by tumor necrosis factor in human microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* *267*, 13160-13165.

- Han, I., and Kudlow, J.E. (1997). Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol* 17, 2550-2558.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Harrington, E.A., Bennett, M.R., Fanidi, A., and Evan, G.I. (1994). c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *Embo J* 13, 3286-3295.
- Hata, Y., Duh, E., Zhang, K., Robinson, G.S., and Aiello, L.P. (1998). Transcription factors Sp1 and Sp3 alter vascular endothelial growth factor receptor expression through a novel recognition sequence. *J Biol Chem* 273, 19294-19303.
- He, S., Sun, J.M., Li, L., and Davie, J.R. (2005). Differential intranuclear organization of transcription factors Sp1 and Sp3. *Mol Biol Cell* 16, 4073-4083.
- Hemann, M.T., Bric, A., Teruya-Feldstein, J., Herbst, A., Nilsson, J.A., Cordon-Cardo, C., Cleveland, J.L., Tansey, W.P., and Lowe, S.W. (2005). Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. *Nature* 436, 807-811.
- Hermeking, H., and Eick, D. (1994). Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* (New York, N.Y. 265, 2091-2093.
- Hershko, T., Chaussepied, M., Oren, M., and Ginsberg, D. (2005). Novel link between E2F and p53: proapoptotic cofactors of p53 are transcriptionally upregulated by E2F. *Cell Death Differ* 12, 377-383.
- Hershko, T., and Ginsberg, D. (2004). Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem* 279, 8627-8634.
- Higuchi, H., Grambihler, A., Canbay, A., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2004). Bile acids up-regulate death receptor 5/TRAIL-receptor 2 expression via a c-Jun N-terminal kinase-dependent pathway involving Sp1. *J Biol Chem* 279, 51-60.
- Hirano, F., Tanaka, H., Hirano, Y., Hiramoto, M., Handa, H., Makino, I., and Scheidereit, C. (1998). Functional interference of Sp1 and NF-kappaB through the same DNA binding site. *Mol Cell Biol* 18, 1266-1274.
- Holmberg, C., Helin, K., Sehested, M., and Karlstrom, O. (1998). E2F-1-induced p53-independent apoptosis in transgenic mice. *Oncogene* 17, 143-155.
- Homer, C., Knight, D.A., Hananeia, L., Sheard, P., Risk, J., Lasham, A., Royds, J.A., and Braithwaite, A.W. (2005). Y-box factor YB1 controls p53 apoptotic function. *Oncogene* 24, 8314-8325.

Hsieh, J.K., Fredersdorf, S., Kouzarides, T., Martin, K., and Lu, X. (1997). E2F1-induced apoptosis requires DNA binding but not transactivation and is inhibited by the retinoblastoma protein through direct interaction. *Genes Dev* 11, 1840-1852.

Huang, W., Tan, D., Wang, X., Han, S., Tan, J., Zhao, Y., Lu, J., and Huang, B. (2006). Histone deacetylase 3 represses p15(INK4b) and p21(WAF1/cip1) transcription by interacting with Sp1. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 165-171.

Huang, W., Zhao, S., Ammanamanchi, S., Brattain, M., Venkatasubbarao, K., and Freeman, J.W. (2005). Trichostatin A induces transforming growth factor beta type II receptor promoter activity and acetylation of Sp1 by recruitment of PCAF/p300 to a Sp1.NF-Y complex. *J Biol Chem* 280, 10047-10054.

Hueber, A.O., Zornig, M., Lyon, D., Suda, T., Nagata, S., and Evan, G.I. (1997). Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science (New York, N.Y)* 278, 1305-1309.

Hung, J.J., Wang, Y.T., and Chang, W.C. (2006). Sp1 deacetylation induced by phorbol ester recruits p300 to activate 12(S)-lipoxygenase gene transcription. *Mol Cell Biol* 26, 1770-1785.

I

Ianari, A., Gallo, R., Palma, M., Alesse, E., and Gulino, A. (2004). Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. *J Biol Chem* 279, 30830-30835.

Ihrle, R.A., Reczek, E., Horner, J.S., Khachatryan, L., Sage, J., Jacks, T., and Attardi, L.D. (2003). Perp is a mediator of p53-dependent apoptosis in diverse cell types. *Curr Biol* 13, 1985-1990.

Inoue, T., Kamiyama, J., and Sakai, T. (1999). Sp1 and NF-Y synergistically mediate the effect of vitamin D(3) in the p27(Kip1) gene promoter that lacks vitamin D response elements. *J Biol Chem* 274, 32309-32317.

Irwin, M., Marin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H., and Kaelin, W.G., Jr. (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 407, 645-648.

Ishibashi, H., Nakagawa, K., Onimaru, M., Castellanos, E.J., Kaneda, Y., Nakashima, Y., Shirasuna, K., and Sueishi, K. (2000). Sp1 decoy transfected to carcinoma cells suppresses the expression of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor beta1, and tissue factor and also cell growth and invasion activities. *Cancer Res* 60, 6531-6536.

Iwahori, S., Shirata, N., Kawaguchi, Y., Weller, S.K., Sato, Y., Kudoh, A., Nakayama, S., Isomura, H., and Tsurumi, T. (2007). Enhanced phosphorylation of transcription factor sp1 in

response to herpes simplex virus type 1 infection is dependent on the ataxia telangiectasia-mutated protein. *J Virol* 81, 9653-9664.

J

Jacks, T., Remington, L., Williams, B.O., Schmitt, E.M., Halachmi, S., Bronson, R.T., and Weinberg, R.A. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 4, 1-7.

Jackson, S.P., MacDonald, J.J., Lees-Miller, S., and Tjian, R. (1990). GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell* 63, 155-165.

Jackson, S.P., and Tjian, R. (1988). O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* 55, 125-133.

Jeffers, J.R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K.H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J.N., *et al.* (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* 4, 321-328.

Jiang, Y., Wang, L., Gong, W., Wei, D., Le, X., Yao, J., Ajani, J., Abbruzzese, J.L., Huang, S., and Xie, K. (2004). A high expression level of insulin-like growth factor I receptor is associated with increased expression of transcription factor Sp1 and regional lymph node metastasis of human gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* 21, 755-764.

Jimenez, G.S., Nister, M., Stommel, J.M., Beeche, M., Barcarse, E.A., Zhang, X.Q., O'Gorman, S., and Wahl, G.M. (2000). A transactivation-deficient mouse model provides insights into Trp53 regulation and function. *Nat Genet* 26, 37-43.

Johnson-Pais, T., Degnin, C., and Thayer, M.J. (2001). pRB induces Sp1 activity by relieving inhibition mediated by MDM2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2211-2216.

Jost, C.A., Marin, M.C., and Kaelin, W.G., Jr. (1997). p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389, 191-194.

Juin, P., Hueber, A.O., Littlewood, T., and Evan, G. (1999). c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev* 13, 1367-1381.

Juin, P., Hunt, A., Littlewood, T., Griffiths, B., Swigart, L.B., Korsmeyer, S., and Evan, G. (2002). c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol Cell Biol* 22, 6158-6169.

K

Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R., and Tjian, R. (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51, 1079-1090.

- Kadonaga, J.T., Courey, A.J., Ladika, J., and Tjian, R. (1988). Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science (New York, N.Y)* *242*, 1566-1570.
- Kaesler, M.D., and Iggo, R.D. (2002). Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 95-100.
- Kakudo, Y., Shibata, H., Otsuka, K., Kato, S., and Ishioka, C. (2005). Lack of correlation between p53-dependent transcriptional activity and the ability to induce apoptosis among 179 mutant p53s. *Cancer Res* *65*, 2108-2114.
- Kang, H.T., Ju, J.W., Cho, J.W., and Hwang, E.S. (2003). Down-regulation of Sp1 activity through modulation of O-glycosylation by treatment with a low glucose mimetic, 2-deoxyglucose. *J Biol Chem* *278*, 51223-51231.
- Kang, J.E., Kim, M.H., Lee, J.A., Park, H., Min-Nyung, L., Auh, C.K., and Hur, M.W. (2005). Histone deacetylase-1 represses transcription by interacting with zinc-fingers and interfering with the DNA binding activity of Sp1. *Cell Physiol Biochem* *16*, 23-30.
- Kannan, K., Kaminski, N., Rechavi, G., Jakob-Hirsch, J., Amariglio, N., and Givol, D. (2001). DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene* *20*, 3449-3455.
- Karlsson, A., Deb-Basu, D., Cherry, A., Turner, S., Ford, J., and Felsher, D.W. (2003). Defective double-strand DNA break repair and chromosomal translocations by MYC overexpression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 9974-9979.
- Kavurma, M.M., and Khachigian, L.M. (2003). Sp1 inhibits proliferation and induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by repressing p21WAF1/Cip1 transcription and cyclin D1-Cdk4-p21WAF1/Cip1 complex formation. *J Biol Chem* *278*, 32537-32543.
- Kavurma, M.M., Santiago, F.S., Bonfoco, E., and Khachigian, L.M. (2001). Sp1 phosphorylation regulates apoptosis via extracellular FasL-Fas engagement. *J Biol Chem* *276*, 4964-4971.
- Kennett, S.B., Udvardi, A.J., and Horowitz, J.M. (1997). Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription. *Nucleic Acids Res* *25*, 3110-3117.
- Kingsley, C., and Winoto, A. (1992). Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* *12*, 4251-4261.
- Knudson, C.M., Tung, K.S., Tourtellotte, W.G., Brown, G.A., and Korsmeyer, S.J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science (New York, N.Y)* *270*, 96-99.

Kollmar, R., Sukow, K.A., Sponagle, S.K., and Farnham, P.J. (1994). Start site selection at the TATA-less carbamoyl-phosphate synthase (glutamine-hydrolyzing)/aspartate carbamoyltransferase/dihydroorotase promoter. *J Biol Chem* 269, 2252-2257.

Komarova, E.A., Chernov, M.V., Franks, R., Wang, K., Armin, G., Zelnick, C.R., Chin, D.M., Bacus, S.S., Stark, G.R., and Gudkov, A.V. (1997). Transgenic mice with p53-responsive lacZ: p53 activity varies dramatically during normal development and determines radiation and drug sensitivity in vivo. *Embo J* 16, 1391-1400.

Kowalik, T.F., DeGregori, J., Leone, G., Jakoi, L., and Nevins, J.R. (1998). E2F1-specific induction of apoptosis and p53 accumulation, which is blocked by Mdm2. *Cell Growth Differ* 9, 113-118.

Kozar, K., Ciemerych, M.A., Rebel, V.I., Shigematsu, H., Zagozdzon, A., Sicinska, E., Geng, Y., Yu, Q., Bhattacharya, S., Bronson, R.T., *et al.* (2004). Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 118, 477-491.

Krainc, D., Bai, G., Okamoto, S., Carles, M., Kusiak, J.W., Brent, R.N., and Lipton, S.A. (1998). Synergistic activation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 promoter by myocyte enhancer factor 2C and Sp1. *J Biol Chem* 273, 26218-26224.

Kriwacki, R.W., Schultz, S.C., Steitz, T.A., and Caradonna, J.P. (1992). Sequence-specific recognition of DNA by zinc-finger peptides derived from the transcription factor Sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9759-9763.

Kruger, I., Vollmer, M., Simmons, D.G., Elsasser, H.P., Philipsen, S., and Suske, G. (2007). Sp1/Sp3 compound heterozygous mice are not viable: impaired erythropoiesis and severe placental defects. *Dev Dyn* 236, 2235-2244.

Kumar, A., Baker, S.J., Lee, C.M., and Reddy, E.P. (2003). Molecular mechanisms associated with the regulation of apoptosis by the two alternatively spliced products of c-Myb. *Mol Cell Biol* 23, 6631-6645.

Kumar, A.P., and Butler, A.P. (1998). Serum responsive gene expression mediated by Sp1. *Biochem Biophys Res Commun* 252, 517-523.

Kumar, A.P., and Butler, A.P. (1999). Enhanced Sp1 DNA-binding activity in murine keratinocyte cell lines and epidermal tumors. *Cancer Lett* 137, 159-165.

Kuwahara, J., Azumano, M., and Takeda, T. (1999). Nuclear localization of transcription factor Sp1. *Nucleic Acids Symp Ser*, 293-294.

L

Lacroix, I., Lipcey, C., Imbert, J., and Kahn-Perles, B. (2002). Sp1 transcriptional activity is up-regulated by phosphatase 2A in dividing T lymphocytes. *J Biol Chem* 277, 9598-9605.

- 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.
- Lavrik, I.N., Golks, A., and Krammer, P.H. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115, 2665-2672.
- Lee, J.A., Suh, D.C., Kang, J.E., Kim, M.H., Park, H., Lee, M.N., Kim, J.M., Jeon, B.N., Roh, H.E., Yu, M.Y., *et al.* (2005). Transcriptional activity of Sp1 is regulated by molecular interactions between the zinc finger DNA binding domain and the inhibitory domain with corepressors, and this interaction is modulated by MEK. *J Biol Chem* 280, 28061-28071.
- Lee, J.S., Galvin, K.M., and Shi, Y. (1993). Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6145-6149.
- Lee, T.H., Chang, H.C., Chuang, L.Y., and Hung, W.C. (2003). Involvement of PKA and Sp1 in the induction of p27(Kip1) by tamoxifen. *Biochem Pharmacol* 66, 371-377.
- Leone, G., DeGregori, J., Sears, R., Jakoi, L., and Nevins, J.R. (1997). Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature* 387, 422-426.
- Leone, G., Sears, R., Huang, E., Rempel, R., Nuckolls, F., Park, C.H., Giangrande, P., Wu, L., Saavedra, H.I., Field, S.J., *et al.* (2001). Myc requires distinct E2F activities to induce S phase and apoptosis. *Mol Cell* 8, 105-113.
- Letovsky, J., and Dynan, W.S. (1989). Measurement of the binding of transcription factor Sp1 to a single GC box recognition sequence. *Nucleic Acids Res* 17, 2639-2653.
- Leu, J.I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., and George, D.L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* 6, 443-450.
- Li, B., Adams, C.C., and Workman, J.L. (1994). Nucleosome binding by the constitutive transcription factor Sp1. *J Biol Chem* 269, 7756-7763.
- Li, R., Knight, J.D., Jackson, S.P., Tjian, R., and Botchan, M.R. (1991). Direct interaction between Sp1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription. *Cell* 65, 493-505.
- Li, S.H., Cheng, A.L., Zhou, H., Lam, S., Rao, M., Li, H., and Li, X.J. (2002). Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Mol Cell Biol* 22, 1277-1287.
- Liedtke, C., Groger, N., Manns, M.P., and Trautwein, C. (2003). The human caspase-8 promoter sustains basal activity through SP1 and ETS-like transcription factors and can be up-regulated by a p53-dependent mechanism. *J Biol Chem* 278, 27593-27604.

- Lietard, J., Musso, O., Theret, N., L'Helgoualc'h, A., Campion, J.P., Yamada, Y., and Clement, B. (1997). Sp1-mediated transactivation of LamC1 promoter and coordinated expression of laminin-gamma1 and Sp1 in human hepatocellular carcinomas. *Am J Pathol* *151*, 1663-1672.
- Lin, S.Y., Black, A.R., Kostic, D., Pajovic, S., Hoover, C.N., and Azizkhan, J.C. (1996). Cell cycle-regulated association of E2F1 and Sp1 is related to their functional interaction. *Mol Cell Biol* *16*, 1668-1675.
- Lin, W.C., Lin, F.T., and Nevins, J.R. (2001). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* *15*, 1833-1844.
- Lin, Y., Ma, W., and Benchimol, S. (2000). Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat Genet* *26*, 122-127.
- Lindstrom, M.S., and Wiman, K.G. (2003). Myc and E2F1 induce p53 through p14ARF-independent mechanisms in human fibroblasts. *Oncogene* *22*, 4993-5005.
- Liu, W., Wang, G., and Yakovlev, A.G. (2002). Identification and functional analysis of the rat caspase-3 gene promoter. *J Biol Chem* *277*, 8273-8278.
- Lomberk, G., and Urrutia, R. (2005). The family feud: turning off Sp1 by Sp1-like KLF proteins. *Biochem J* *392*, 1-11.
- Lou, Z., O'Reilly, S., Liang, H., Maher, V.M., Sleight, S.D., and McCormick, J.J. (2005). Down-regulation of overexpressed sp1 protein in human fibrosarcoma cell lines inhibits tumor formation. *Cancer Res* *65*, 1007-1017.
- Low, W., Olmos-Centenera, G., Madsen, C., Leverrier, Y., and Collins, M.K. (2001). Role of Bax in apoptosis of IL-3-dependent cells. *Oncogene* *20*, 4476-4483.
- Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., and Housman, D.E. (1993a). p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* *74*, 957-967.
- Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., and Jacks, T. (1993b). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* *362*, 847-849.
- Lu, J., Lee, W., Jiang, C., and Keller, E.B. (1994). Start site selection by Sp1 in the TATA-less human Ha-ras promoter. *J Biol Chem* *269*, 5391-5402.
- Ludwig, R.L., Bates, S., and Vousden, K.H. (1996). Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function. *Mol Cell Biol* *16*, 4952-4960.

M

- MacLachlan, T.K., and El-Deiry, W.S. (2002). Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9492-9497.
- Maclean, K.H., Keller, U.B., Rodriguez-Galindo, C., Nilsson, J.A., and Cleveland, J.L. (2003). c-Myc augments gamma irradiation-induced apoptosis by suppressing Bcl-XL. *Mol Cell Biol* 23, 7256-7270.
- Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J., and Bird, A.P. (1994). Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev* 8, 2282-2292.
- Majello, B., De Luca, P., and Lania, L. (1997). Sp3 is a bifunctional transcription regulator with modular independent activation and repression domains. *J Biol Chem* 272, 4021-4026.
- Majumdar, G., Harrington, A., Hungerford, J., Martinez-Hernandez, A., Gerling, I.C., Raghov, R., and Solomon, S. (2006). Insulin dynamically regulates calmodulin gene expression by sequential o-glycosylation and phosphorylation of sp1 and its subcellular compartmentalization in liver cells. *J Biol Chem* 281, 3642-3650.
- Marco, E., Garcia-Nieto, R., and Gago, F. (2003). Assessment by molecular dynamics simulations of the structural determinants of DNA-binding specificity for transcription factor Sp1. *J Mol Biol* 328, 9-32.
- Marin, M., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F., and Philipsen, S. (1997). Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* 89, 619-628.
- Martinez-Moczygema, M., and Huston, D.P. (2003). Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol* 112, 653-665; quiz 666.
- Martino, A., Holmes, J.H.t., Lord, J.D., Moon, J.J., and Nelson, B.H. (2001). Stat5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response to IL-2. *J Immunol* 166, 1723-1729.
- Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 14, 10-22.
- Mastrangelo, I.A., Courey, A.J., Wall, J.S., Jackson, S.P., and Hough, P.V. (1991). DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5670-5674.
- Matsuda, K., Yoshida, K., Taya, Y., Nakamura, K., Nakamura, Y., and Arakawa, H. (2002). p53AIP1 regulates the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Res* 62, 2883-2889.
- McClure, R.F., Heppelmann, C.J., and Paya, C.V. (1999). Constitutive Fas ligand gene transcription in Sertoli cells is regulated by Sp1. *J Biol Chem* 274, 7756-7762.

Merchant, J.L., Du, M., and Todisco, A. (1999). Sp1 phosphorylation by Erk 2 stimulates DNA binding. *Biochem Biophys Res Commun* 254, 454-461.

Merika, M., and Orkin, S.H. (1995). Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLf. *Mol Cell Biol* 15, 2437-2447.

Milanini, J., Vinals, F., Pouyssegur, J., and Pages, G. (1998). p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. *J Biol Chem* 273, 18165-18172.

Mitchell, K.O., Ricci, M.S., Miyashita, T., Dicker, D.T., Jin, Z., Reed, J.C., and El-Deiry, W.S. (2000). Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer Res* 60, 6318-6325.

Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., and Reed, J.C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-1805.

Mohamedali, A., Soeiro, I., Lea, N.C., Glassford, J., Banerji, L., Mufti, G.J., Lam, E.W., and Thomas, N.S. (2003). Cyclin D2 controls B cell progenitor numbers. *J Leukoc Biol* 74, 1139-1143.

Moon, N.S., Frolov, M.V., Kwon, E.J., Di Stefano, L., Dimova, D.K., Morris, E.J., Taylor-Harding, B., White, K., and Dyson, N.J. (2005). Drosophila E2F1 has context-specific pro- and antiapoptotic properties during development. *Dev Cell* 9, 463-475.

Moroni, M.C., Hickman, E.S., Lazzerini Denchi, E., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Muller, H., and Helin, K. (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* 3, 552-558.

Morrish, F., Giedt, C., and Hockenbery, D. (2003). c-MYC apoptotic function is mediated by NRF-1 target genes. *Genes Dev* 17, 240-255.

Mortensen, E.R., Marks, P.A., Shiotani, A., and Merchant, J.L. (1997). Epidermal growth factor and okadaic acid stimulate Sp1 proteolysis. *J Biol Chem* 272, 16540-16547.

Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M., and Krammer, P.H. (1998). p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* 188, 2033-2045.

Murata, Y., Kim, H.G., Rogers, K.T., Udvardi, A.J., and Horowitz, J.M. (1994). Negative regulation of Sp1 trans-activation is correlated with the binding of cellular proteins to the amino terminus of the Sp1 trans-activation domain. *J Biol Chem* 269, 20674-20681.

N

Nagata, D., Suzuki, E., Nishimatsu, H., Satonaka, H., Goto, A., Omata, M., and Hirata, Y. (2001). Transcriptional activation of the cyclin D1 gene is mediated by multiple cis-elements, including SP1 sites and a cAMP-responsive element in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 276, 662-669.

Nahle, Z., Polakoff, J., Davuluri, R.V., McCurrach, M.E., Jacobson, M.D., Narita, M., Zhang, M.Q., Lazebnik, Y., Bar-Sagi, D., and Lowe, S.W. (2002). Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol* 4, 859-864.

Nebbioso, A., Clarke, N., Voltz, E., Germain, E., Ambrosino, C., Bontempo, P., Alvarez, R., Schiavone, E.M., Ferrara, F., Bresciani, F., *et al.* (2005). Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med* 11, 77-84.

Nicolas, M., Noe, V., and Ciudad, C.J. (2003). Transcriptional regulation of the human Sp1 gene promoter by the specificity protein (Sp) family members nuclear factor Y (NF-Y) and E2F. *Biochem J* 371, 265-275.

Nicolas, M., Noe, V., Jensen, K.B., and Ciudad, C.J. (2001). Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human transcription factor Sp1 gene. *J Biol Chem* 276, 22126-22132.

Nishinaka, T., Fu, Y.H., Chen, L.I., Yokoyama, K., and Chiu, R. (1997). A unique cathepsin-like protease isolated from CV-1 cells is involved in rapid degradation of retinoblastoma susceptibility gene product, RB, and transcription factor SP1. *Biochim Biophys Acta* 1351, 274-286.

Noti, J.D. (1997). Sp3 mediates transcriptional activation of the leukocyte integrin genes CD11C and CD11B and cooperates with c-Jun to activate CD11C. *J Biol Chem* 272, 24038-24045.

O

Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., and Taya, Y. (2000). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102, 849-862.

Ohlsson, C., Kley, N., Werner, H., and LeRoith, D. (1998). p53 regulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor expression and IGF-I-induced tyrosine phosphorylation in an osteosarcoma cell line: interaction between p53 and Sp1. *Endocrinology* 139, 1101-1107.

Oka, S., Shiraishi, Y., Yoshida, T., Ohkubo, T., Sugiura, Y., and Kobayashi, Y. (2004). NMR structure of transcription factor Sp1 DNA binding domain. *Biochemistry* 43, 16027-16035.

Okamura, S., Arakawa, H., Tanaka, T., Nakanishi, H., Ng, C.C., Taya, Y., Monden, M., and Nakamura, Y. (2001). p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. *Mol Cell* 8, 85-94.

Opitz, O.G., and Rustgi, A.K. (2000). Interaction between Sp1 and cell cycle regulatory proteins is important in transactivation of a differentiation-related gene. *Cancer Res* 60, 2825-2830.

P

Pagliuca, A., Cannada-Bartoli, P., and Lania, L. (1998). A role for Sp and helix-loop-helix transcription factors in the regulation of the human Id4 gene promoter activity. *J Biol Chem* 273, 7668-7674.

Pal, S., Claffey, K.P., Cohen, H.T., and Mukhopadhyay, D. (1998). Activation of Sp1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor transcription requires specific interaction with protein kinase C zeta. *J Biol Chem* 273, 26277-26280.

Palacios, R., and Steinmetz, M. (1985). Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell* 41, 727-734.

Parada, Y., Banerji, L., Glassford, J., Lea, N.C., Collado, M., Rivas, C., Lewis, J.L., Gordon, M.Y., Thomas, N.S., and Lam, E.W. (2001). BCR-ABL and interleukin 3 promote haematopoietic cell proliferation and survival through modulation of cyclin D2 and p27Kip1 expression. *J Biol Chem* 276, 23572-23580.

Parakati, R., and DiMario, J.X. (2005). Dynamic transcriptional regulatory complexes, including E2F4, p107, p130, and Sp1, control fibroblast growth factor receptor 1 gene expression during myogenesis. *J Biol Chem* 280, 21284-21294.

Parant, J.M., and Lozano, G. (2003). Disrupting TP53 in mouse models of human cancers. *Hum Mutat* 21, 321-326.

Pascal, E., and Tjian, R. (1991). Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev* 5, 1646-1656.

Patel, J.H., Loboda, A.P., Showe, M.K., Showe, L.C., and McMahon, S.B. (2004). Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nat Rev Cancer* 4, 562-568.

Patel, S.G., and DiMario, J.X. (2001). Two distal Sp1-binding cis-elements regulate fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) gene expression in myoblasts. *Gene* 270, 171-180.

Pavletich, N.P., and Pabo, C.O. (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* (New York, N.Y) 252, 809-817.

Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G.I. (2002). Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell* 109, 321-334.

Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G., and Evan, G. (1999). Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell* 3, 565-577.

Perkins, N.D., Agranoff, A.B., Pascal, E., and Nabel, G.J. (1994). An interaction between the DNA-binding domains of RelA(p65) and Sp1 mediates human immunodeficiency virus gene activation. *Mol Cell Biol* 14, 6570-6583.

Persengiev, S.P., Devireddy, L.R., and Green, M.R. (2002). Inhibition of apoptosis by ATFx: a novel role for a member of the ATF/CREB family of mammalian bZIP transcription factors. *Genes Dev* 16, 1806-1814.

Persengiev, S.P., Raval, P.J., Rabinovitch, S., Millette, C.F., and Kilpatrick, D.L. (1996). Transcription factor Sp1 is expressed by three different developmentally regulated messenger ribonucleic acids in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology* 137, 638-646.

Pfeifer, G.P., Tanguay, R.L., Steigerwald, S.D., and Riggs, A.D. (1990). In vivo footprint and methylation analysis by PCR-aided genomic sequencing: comparison of active and inactive X chromosomal DNA at the CpG island and promoter of human PGK-1. *Genes Dev* 4, 1277-1287.

Phillips, A.C., Bates, S., Ryan, K.M., Helin, K., and Vousden, K.H. (1997). Induction of DNA synthesis and apoptosis are separable functions of E2F-1. *Genes Dev* 11, 1853-1863.

Phillips, A.C., Ernst, M.K., Bates, S., Rice, N.R., and Vousden, K.H. (1999). E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Mol Cell* 4, 771-781.

Pickering, M.T., and Kowalik, T.F. (2006). Rb inactivation leads to E2F1-mediated DNA double-strand break accumulation. *Oncogene* 25, 746-755.

Piedrafita, F.J., and Pfahl, M. (1997). Retinoid-induced apoptosis and Sp1 cleavage occur independently of transcription and require caspase activation. *Mol Cell Biol* 17, 6348-6358.

Plas, D.R., Rathmell, J.C., and Thompson, C.B. (2002). Homeostatic control of lymphocyte survival: potential origins and implications. *Nat Immunol* 3, 515-521.

Powers, J.T., Hong, S., Mayhew, C.N., Rogers, P.M., Knudsen, E.S., and Johnson, D.G. (2004). E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis. *Mol Cancer Res* 2, 203-214.

Preston, G.A., Lyon, T.T., Yin, Y., Lang, J.E., Solomon, G., Annab, L., Srinivasan, D.G., Alcorta, D.A., and Barrett, J.C. (1996). Induction of apoptosis by c-Fos protein. *Mol Cell Biol* *16*, 211-218.

Pusapati, R.V., Rounbehler, R.J., Hong, S., Powers, J.T., Yan, M., Kiguchi, K., McArthur, M.J., Wong, P.K., and Johnson, D.G. (2006). ATM promotes apoptosis and suppresses tumorigenesis in response to Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 1446-1451.

Q

Qin, X.Q., Livingston, D.M., Kaelin, W.G., Jr., and Adams, P.D. (1994). Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 10918-10922.

R

Raff, M.C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* *356*, 397-400.

Rao, J., Zhang, F., Donnelly, R.J., Spector, N.L., and Studzinski, G.P. (1998). Truncation of Sp1 transcription factor by myeloblastin in undifferentiated HL60 cells. *J Cell Physiol* *175*, 121-128.

Rao, R.V., Ellerby, H.M., and Bredesen, D.E. (2004). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* *11*, 372-380.

Real, P.J., Sanz, C., Gutierrez, O., Pipaon, C., Zubiaga, A.M., and Fernandez-Luna, J.L. (2006). Transcriptional activation of the proapoptotic bik gene by E2F proteins in cancer cells. *FEBS Lett* *580*, 5905-5909.

Reisinger, K., Kaufmann, R., and Gille, J. (2003). Increased Sp1 phosphorylation as a mechanism of hepatocyte growth factor (HGF/SF)-induced vascular endothelial growth factor (VEGF/VPF) transcription. *J Cell Sci* *116*, 225-238.

Ricci, M.S., Jin, Z., Dews, M., Yu, D., Thomas-Tikhonenko, A., Dicker, D.T., and El-Deiry, W.S. (2004). Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Mol Cell Biol* *24*, 8541-8555.

Rickers, A., Peters, N., Badock, V., Beyaert, R., Vandenabeele, P., Dorken, B., and Bommert, K. (1999). Cleavage of transcription factor SP1 by caspases during anti-IgM-induced B-cell apoptosis. *Eur J Biochem* *261*, 269-274.

Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Debatis, M.E., Jones, S., and Kowalik, T.F. (2002). E2F1 induces phosphorylation of p53 that is coincident with p53 accumulation and apoptosis. *Mol Cell Biol* *22*, 5308-5318.

Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Frame, F.M., Debatis, M.E., Sanchez, Y., Jones, S., and Kowalik, T.F. (2004). Apoptosis associated with deregulated E2F activity is dependent on E2F1 and Atm/Nbs1/Chk2. *Mol Cell Biol* 24, 2968-2977.

Roos, M.D., Su, K., Baker, J.R., and Kudlow, J.E. (1997). O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol Cell Biol* 17, 6472-6480.

Roos, W.P., and Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 12, 440-450.

Rotheneder, H., Geymayer, S., and Haidweger, E. (1999). Transcription factors of the Sp1 family: interaction with E2F and regulation of the murine thymidine kinase promoter. *J Mol Biol* 293, 1005-1015.

Russell, J.L., Powers, J.T., Rounbehler, R.J., Rogers, P.M., Conti, C.J., and Johnson, D.G. (2002). ARF differentially modulates apoptosis induced by E2F1 and Myc. *Mol Cell Biol* 22, 1360-1368.

Ryu, H., Lee, J., Olofsson, B.A., Mwidau, A., Dedeoglu, A., Escudero, M., Flemington, E., Azizkhan-Clifford, J., Ferrante, R.J., and Ratan, R.R. (2003a). Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4281-4286.

Ryu, H., Lee, J., Zaman, K., Kubilis, J., Ferrante, R.J., Ross, B.D., Neve, R., and Ratan, R.R. (2003b). Sp1 and Sp3 are oxidative stress-inducible, antideath transcription factors in cortical neurons. *J Neurosci* 23, 3597-3606.

Ryu, S., Zhou, S., Ladurner, A.G., and Tjian, R. (1999). The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature* 397, 446-450.

S

Saffer, J.D., Jackson, S.P., and Annarella, M.B. (1991). Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol* 11, 2189-2199.

Saffer, J.D., Jackson, S.P., and Thurston, S.J. (1990). SV40 stimulates expression of the transacting factor Sp1 at the mRNA level. *Genes Dev* 4, 659-666.

Salon, C., Eymin, B., Micheau, O., Chaperot, L., Plumas, J., Brambilla, C., Brambilla, E., and Gazzeri, S. (2006). E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ* 13, 260-272.

Samuels-Lev, Y., O'Connor, D.J., Bergamaschi, D., Trigiant, G., Hsieh, J.K., Zhong, S., Campargue, I., Naumovski, L., Crook, T., and Lu, X. (2001). ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* 8, 781-794.

Sax, J.K., Fei, P., Murphy, M.E., Bernhard, E., Korsmeyer, S.J., and El-Deiry, W.S. (2002). BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol* 4, 842-849.

Shi, Q., Le, X., Abbruzzese, J.L., Peng, Z., Qian, C.N., Tang, H., Xiong, Q., Wang, B., Li, X.C., and Xie, K. (2001). Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 61, 4143-4154.

Shi, Y. (2006). Mechanical aspects of apoptosome assembly. *Curr Opin Cell Biol* 18, 677-684.

Shibue, T., Takeda, K., Oda, E., Tanaka, H., Murasawa, H., Takaoka, A., Morishita, Y., Akira, S., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2003). Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev* 17, 2233-2238.

Short, M.L., Huang, D., Milkowski, D.M., Short, S., Kunstman, K., Soong, C.J., Chung, K.C., and Jungmann, R.A. (1994). Analysis of the rat lactate dehydrogenase A subunit gene promoter/regulatory region. *Biochem J* 304 (Pt 2), 391-398.

Sjottem, E., Anderssen, S., and Johansen, T. (1996). The promoter activity of long terminal repeats of the HERV-H family of human retrovirus-like elements is critically dependent on Sp1 family proteins interacting with a GC/GT box located immediately 3' to the TATA box. *J Virol* 70, 188-198.

Smale, S.T., Schmidt, M.C., Berk, A.J., and Baltimore, D. (1990). Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4509-4513.

Soengas, M.S., Alarcon, R.M., Yoshida, H., Giaccia, A.J., Hakem, R., Mak, T.W., and Lowe, S.W. (1999). Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* (New York, N.Y. 284, 156-159.

Solvason, N., Wu, W.W., Parry, D., Mahony, D., Lam, E.W., Glassford, J., Klaus, G.G., Sicinski, P., Weinberg, R., Liu, Y.J., *et al.* (2000). Cyclin D2 is essential for BCR-mediated proliferation and CD5 B cell development. *Int Immunol* 12, 631-638.

Spengler, M.L., and Brattain, M.G. (2006). Sumoylation inhibits cleavage of Sp1 N-terminal negative regulatory domain and inhibits Sp1-dependent transcription. *J Biol Chem* 281, 5567-5574.

Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S., and Mak, T.W. (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* 8, 317-325.

Stanella, J., Tu-Rapp, H., and Putzer, B.M. (2005). A novel mitochondrial protein DIP mediates E2F1-induced apoptosis independently of p53. *Cell Death Differ* 12, 347-357.

Stevens, C., Smith, L., and La Thangue, N.B. (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 5, 401-409.

Stiewe, T., and Putzer, B.M. (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat Genet* 26, 464-469.

Strasser, A., Harris, A.W., Bath, M.L., and Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348, 331-333.

Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69, 217-245.

Strom, A.C., Forsberg, M., Lillhager, P., and Westin, G. (1996). The transcription factors Sp1 and Oct-1 interact physically to regulate human U2 snRNA gene expression. *Nucleic Acids Res* 24, 1981-1986.

Strom, E., Sathe, S., Komarov, P.G., Chernova, O.B., Pavlovska, I., Shyshynova, I., Bosykh, D.A., Burdelya, L.G., Macklis, R.M., Skaliter, R., *et al.* (2006). Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. *Nat Chem Biol* 2, 474-479.

Su, K., Roos, M.D., Yang, X., Han, I., Paterson, A.J., and Kudlow, J.E. (1999). An N-terminal region of Sp1 targets its proteasome-dependent degradation in vitro. *J Biol Chem* 274, 15194-15202.

Su, W., Jackson, S., Tjian, R., and Echols, H. (1991). DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1. *Genes Dev* 5, 820-826.

Supp, D.M., Witte, D.P., Branford, W.W., Smith, E.P., and Potter, S.S. (1996). Sp4, a member of the Sp1-family of zinc finger transcription factors, is required for normal murine growth, viability, and male fertility. *Dev Biol* 176, 284-299.

Suzuki, T., Kimura, A., Nagai, R., and Horikoshi, M. (2000). Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding. *Genes Cells* 5, 29-41.

Suzuki, Y.J., and Evans, T. (2004). Regulation of cardiac myocyte apoptosis by the GATA-4 transcription factor. *Life Sci* 74, 1829-1838.

T

Takahara, T., Kanazu, S.I., Yanagisawa, S., and Akanuma, H. (2000). Heterogeneous Sp1 mRNAs in human HepG2 cells include a product of homotypic trans-splicing. *J Biol Chem* 275, 38067-38072.

Tanaka, H., Matsumura, I., Ezoe, S., Satoh, Y., Sakamaki, T., Albanese, C., Machii, T., Pestell, R.G., and Kanakura, Y. (2002). E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. *Mol Cell* 9, 1017-1029.

Tanese, N., Saluja, D., Vassallo, M.F., Chen, J.L., and Admon, A. (1996). Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIID complex: hTAFII130 and hTAFII100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13611-13616.

Thomas, K., Sung, D.Y., Yang, J., Johnson, K., Thompson, W., Millette, C., McCarrey, J., Breitberg, A., Gibbs, R., and Walker, W. (2005). Identification, characterization, and functional analysis of sp1 transcript variants expressed in germ cells during mouse spermatogenesis. *Biol Reprod* 72, 898-907.

Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* (New York, N.Y) 267, 1456-1462.

Thornborrow, E.C., and Manfredi, J.J. (2001). The tumor suppressor protein p53 requires a cofactor to activate transcriptionally the human BAX promoter. *J Biol Chem* 276, 15598-15608.

Tong, Y., Tan, Y., Zhou, C., and Melmed, S. (2007). Pituitary tumor transforming gene interacts with Sp1 to modulate G1/S cell phase transition. *Oncogene* 26, 5596-5605.

Tsai, K.Y., Hu, Y., Macleod, K.F., Crowley, D., Yamasaki, L., and Jacks, T. (1998). Mutation of E2f-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos. *Mol Cell* 2, 293-304.

U

Udvardia, A.J., Rogers, K.T., Higgins, P.D., Murata, Y., Martin, K.H., Humphrey, P.A., and Horowitz, J.M. (1993). Sp-1 binds promoter elements regulated by the RB protein and Sp-1-mediated transcription is stimulated by RB coexpression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3265-3269.

V

Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T.K., Hampton, G.M., and Wahl, G.M. (2002). c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* 9, 1031-1044.

Vallian, S., Chin, K.V., and Chang, K.S. (1998). The promyelocytic leukemia protein interacts with Sp1 and inhibits its transactivation of the epidermal growth factor receptor promoter. *Mol Cell Biol* 18, 7147-7156.

Van Loo, P.F., Bouwman, P., Ling, K.W., Middendorp, S., Suske, G., Grosveld, F., Dzierzak, E., Philipsen, S., and Hendriks, R.W. (2003). Impaired hematopoiesis in mice lacking the transcription factor Sp3. *Blood* 102, 858-866.

Vicart, A., Lefebvre, T., Imbert, J., Fernandez, A., and Kahn-Perles, B. (2006). Increased chromatin association of Sp1 in interphase cells by PP2A-mediated dephosphorylations. *J Mol Biol* 364, 897-908.

Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., and Strasser, A. (2003). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science (New York, N.Y)* 302, 1036-1038.

W

Wang, L., Wei, D., Huang, S., Peng, Z., Le, X., Wu, T.T., Yao, J., Ajani, J., and Xie, K. (2003). Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 9, 6371-6380.

Wang, Q., Ji, Y., Wang, X., and Evers, B.M. (2000). Isolation and molecular characterization of the 5'-upstream region of the human TRAIL gene. *Biochem Biophys Res Commun* 276, 466-471.

Wang, Y., Engels, I.H., Knee, D.A., Nasoff, M., Deveraux, Q.L., and Quon, K.C. (2004). Synthetic lethal targeting of MYC by activation of the DR5 death receptor pathway. *Cancer Cell* 5, 501-512.

Wendel, H.G., De Stanchina, E., Fridman, J.S., Malina, A., Ray, S., Kogan, S., Cordon-Cardo, C., Pelletier, J., and Lowe, S.W. (2004). Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* 428, 332-337.

Wikonkal, N.M., Remenyik, E., Knezevic, D., Zhang, W., Liu, M., Zhao, H., Berton, T.R., Johnson, D.G., and Brash, D.E. (2003). Inactivating E2f1 reverts apoptosis resistance and cancer sensitivity in Trp53-deficient mice. *Nat Cell Biol* 5, 655-660.

Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., *et al.* (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science (New York, N.Y)* 315, 856-859.

Wimmer, E.A., Jackle, H., Pfeifle, C., and Cohen, S.M. (1993). A *Drosophila* homologue of human Sp1 is a head-specific segmentation gene. *Nature* 366, 690-694.

Won, J., Yim, J., and Kim, T.K. (2002). Sp1 and Sp3 recruit histone deacetylase to repress transcription of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter in normal human somatic cells. *J Biol Chem* 277, 38230-38238.

Wu, X., and Levine, A.J. (1994). p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3602-3606.

Wu, Y., Mehew, J.W., Heckman, C.A., Arcinas, M., and Boxer, L.M. (2001). Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 20, 240-251.

Wu, Z., Kim, H.P., Xue, H.H., Liu, H., Zhao, K., and Leonard, W.J. (2005). Interleukin-21 receptor gene induction in human T cells is mediated by T-cell receptor-induced Sp1 activity. *Mol Cell Biol* 25, 9741-9752.

X

Xiao, S., Matsui, K., Fine, A., Zhu, B., Marshak-Rothstein, A., Widom, R.L., and Ju, S.T. (1999). FasL promoter activation by IL-2 through SP1 and NFAT but not Egr-2 and Egr-3. *Eur J Immunol* 29, 3456-3465.

Xie, W., Jiang, P., Miao, L., Zhao, Y., Zhimin, Z., Qing, L., Zhu, W.G., and Wu, M. (2006). Novel link between E2F1 and Smac/DIABLO: proapoptotic Smac/DIABLO is transcriptionally upregulated by E2F1. *Nucleic Acids Res* 34, 2046-2055.

Xu, Q., Ji, Y.S., and Schmedtje, J.F., Jr. (2000). Sp1 increases expression of cyclooxygenase-2 in hypoxic vascular endothelium. Implications for the mechanisms of aortic aneurysm and heart failure. *J Biol Chem* 275, 24583-24589.

Xu, R., Zhang, P., Huang, J., Ge, S., Lu, J., and Qian, G. (2007). Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the survivin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 356, 286-292.

Y

Yamasaki, L., Jacks, T., Bronson, R., Goillot, E., Harlow, E., and Dyson, N.J. (1996). Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* 85, 537-548.

Yang, X., Su, K., Roos, M.D., Chang, Q., Paterson, A.J., and Kudlow, J.E. (2001). O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6611-6616.

Yao, J.C., Wang, L., Wei, D., Gong, W., Hassan, M., Wu, T.T., Mansfield, P., Ajani, J., and Xie, K. (2004). Association between expression of transcription factor Sp1 and increased vascular endothelial growth factor expression, advanced stage, and poor survival in patients with resected gastric cancer. *Clin Cancer Res* 10, 4109-4117.

Yokono, M., Saegusa, N., Matsushita, K., and Sugiura, Y. (1998). Unique DNA binding mode of the N-terminal zinc finger of transcription factor Sp1. *Biochemistry* 37, 6824-6832.

Yonish-Rouach, E., Grunwald, D., Wilder, S., Kimchi, A., May, E., Lawrence, J.J., May, P., and Oren, M. (1993). p53-mediated cell death: relationship to cell cycle control. *Mol Cell Biol* 13, 1415-1423.

Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345-347.

You, Z., Madrid, L.V., Saims, D., Sedivy, J., and Wang, C.Y. (2002). c-Myc sensitizes cells to tumor necrosis factor-mediated apoptosis by inhibiting nuclear factor kappa B transactivation. *J Biol Chem* 277, 36671-36677.

Yu, B., Datta, P.K., and Bagchi, S. (2003). Stability of the Sp3-DNA complex is promoter-specific: Sp3 efficiently competes with Sp1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites. *Nucleic Acids Res* 31, 5368-5376.

Yurochko, A.D., Mayo, M.W., Poma, E.E., Baldwin, A.S., Jr., and Huang, E.S. (1997). Induction of the transcription factor Sp1 during human cytomegalovirus infection mediates upregulation of the p65 and p105/p50 NF-kappaB promoters. *J Virol* 71, 4638-4648.

Z

Zaid, A., Hodny, Z., Li, R., and Nelson, B.D. (2001). Sp1 acts as a repressor of the human adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) promoter. *Eur J Biochem* 268, 5497-5503.

Zannetti, A., Del Vecchio, S., Carriero, M.V., Fonti, R., Franco, P., Botti, G., D'Aiuto, G., Stoppelli, M.P., and Salvatore, M. (2000). Coordinate up-regulation of Sp1 DNA-binding activity and urokinase receptor expression in breast carcinoma. *Cancer Res* 60, 1546-1551.

Zannetti, A., Del Vecchio, S., Romanelli, A., Scala, S., Saviano, M., Cali, G., Stoppelli, M.P., Pedone, C., and Salvatore, M. (2005). Inhibition of Sp1 activity by a decoy PNA-DNA chimera prevents urokinase receptor expression and migration of breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 70, 1277-1287.

Zhang, L., Yu, J., Park, B.H., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2000). Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science (New York, N.Y)* 290, 989-992.

Zheng, X.L., Matsubara, S., Diao, C., Hollenberg, M.D., and Wong, N.C. (2001). Epidermal growth factor induction of apolipoprotein A-I is mediated by the Ras-MAP kinase cascade and Sp1. *J Biol Chem* 276, 13822-13829.

Ziebold, U., Reza, T., Caron, A., and Lees, J.A. (2001). E2F3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos. *Genes Dev* 15, 386-391.

Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12, 2424-2433.