



HAL
open science

Identification de nouveaux partenaires protéiques de l'oncoprotéine Ets-1 et étude de sa régulation par l'enzyme de réparation de l'ADN PARP-1 au sein des cellules tumorales

Arnaud Legrand

► **To cite this version:**

Arnaud Legrand. Identification de nouveaux partenaires protéiques de l'oncoprotéine Ets-1 et étude de sa régulation par l'enzyme de réparation de l'ADN PARP-1 au sein des cellules tumorales. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2013. Français. NNT : 2013LIL2S001 . tel-01362093

HAL Id: tel-01362093

<https://theses.hal.science/tel-01362093>

Submitted on 8 Sep 2016

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.

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE II

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
DANS LA SPECIALITE « BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE »**

Par

Arnaud LEGRAND

**Identification de nouveaux partenaires protéiques de
l'oncoprotéine Ets-1 et étude de sa régulation par l'enzyme
de réparation de l'ADN PARP-1 au sein des cellules
tumoraux.**

Le 28 Février 2013

JURY

Président :

Rapporteurs :

Examineurs :

Directeur de Thèse :

Pr Nicole PORCHET

Pr Olivier COQUERET

Dr Vincent FAVAUDON

Dr Thierry IDZIOREK

Dr Brigitte HARTMANN

Dr Marc AUMERCIER

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à tous les membres du jury pour avoir consacré une part de leur temps précieux à l'évaluation de ce travail de Thèse. Je suis reconnaissant à Madame le Professeur Nicole PORCHET d'assurer la présidence de ce jury ainsi qu'à Monsieur le Professeur Olivier COQUERET et à Monsieur le Docteur Vincent FAVAUDON d'avoir accepté d'assumer la contraignante fonction de rapporteur et enfin aux Docteurs Brigitte HARTMANN et Thierry IDZIOREK d'avoir accepté la fonction d'examineur.

Merci au Professeur Yvan de LAUNOIT et au Docteur Vincent VILLERET pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire respectif et pour l'intérêt montré à l'égard de mon travail.

Un grand merci à mon directeur de Thèse, le Docteur Marc AUMERCIER, pour son esprit critique et sa franchise sans concession qui m'ont permis de grandir et de mûrir pendant ces quatre ans, ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordée et la qualité de son encadrement.

Un merci particulier aux Docteurs Clélia LAITEM et Souhaila CHOUL-LI pour m'avoir accompagné lors de mes premiers pas dans le monde de la Recherche.

Je tiens à remercier chaleureusement le Docteur Lionel MARCON, collaborateur et ami, pour son soutien, son humour et son flegme face aux difficultés de notre métier.

Merci à Baptiste BIDON, Mylène MOUFLARD et Victoria LIM, étudiants que j'ai encadrés et qui m'ont beaucoup appris sur mes capacités à transmettre mes connaissances.

Merci à Isabelle ROLAND et à Dorothée VICOONE pour leur précieuse aide technique.

Merci à tous les membres du laboratoire, passés ou présents, qui m'ont accompagné au long de toutes ces années. Un merci particulier aux personnes qui m'ont aidé et avec qui j'ai eu le plaisir de travailler : les Docteurs Didier MONTE, Martine DUTERQUE-

COQUILLAUD, Laurent HELIOT et Corentin SPRIET, Hervé DROBECQ, Tian TIAN, Marlène BRULIN, Inès BONET, Laurence LABAEYE, Marie-Christine BOUCHEZ, Nicole DEVASSINE...

Merci au Ministère de la Recherche et de l'Education Supérieure et à l'Université de Lille 2 pour m'avoir accordé une allocation de recherche pendant trois ans ainsi qu'à la Fondation ARC pour m'avoir attribué un financement de 6 mois de quatrième année de Thèse.

Enfin, un immense merci à ma mère, Danièle LEGRAND, Professeur des Ecoles à la retraite, pour n'avoir cessé toutes ces années de m'enseigner les règles de la grammaire et de l'orthographe malgré mes nombreuses lacunes.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	11
RESUME	16
ABSTRACT	17
INTRODUCTION	18
PREMIERE PARTIE : ETS-1	19
CHAPITRE I : FAMILLE ETS.....	20
I/ <i>Origine de la famille Ets</i>	20
II/ <i>Présentation générale de la famille Ets</i>	20
III/ <i>Implications de la famille Ets dans les cancers</i>	22
CHAPITRE II : LA PROTEINE ETS-1: LES DOMAINES FONCTIONNELS.....	25
I/ <i>Le domaine ETS</i>	25
I-1/ <i>Structure</i>	25
I-2/ <i>Fonction</i>	27
I-2-1/ Site consensus de liaison artificiel et naturel	27
I-2-2/ Mécanismes moléculaires de reconnaissance du site consensus.....	30
II/ <i>Le domaine Pointed (PNT)</i>	31
II-1/ <i>Structure</i>	31
II-2/ <i>Fonction</i>	33
III/ <i>Le domaine transactivateur</i>	33
IV/ <i>Les domaines inhibiteurs</i>	34
IV-1/ <i>Structure</i>	34
IV-2/ <i>Fonction</i>	34
IV-2-1/ Définition de l'auto-inhibition	35
IV-2-2/ Mode d'action du module auto-inhibiteur d'Ets-1	36
CHAPITRE III : REGULATION D'ETS-1.....	40
I/ <i>Régulation de l'expression du gène ets-1</i>	40
I-1/ <i>Promoteur humain d'ets-1 et ses facteurs régulateurs directs</i>	40
I-2/ <i>Signaux extracellulaires</i>	43
I-2-1/ <i>Signaux activateurs</i>	43
I-2-2/ <i>Signaux répresseurs</i>	45
I-3/ <i>Régulation par l'expression de variants d'épissage</i>	46
I-3-1/ <i>Variants d'épissage de l'ARNm ets1</i>	46
I-3-2/ <i>Isoformes d'Ets-1</i>	47
I-3-2-1/ <i>Ets-1 p42</i>	48
I-3-2-2/ <i>Ets-1 p27</i>	49
I-4/ <i>Régulation par des microARN</i>	51
II/ <i>Régulation de l'activité transcriptionnelle d'Ets-1</i>	53
II-1/ <i>Régulation par des modifications post-traductionnelles</i>	53
II-1-1/ <i>Phosphorylation</i>	54
II-1-1-1/ <i>Activation de la protéine Ets-1</i>	54
II-1-1-1-a/ <i>Voie des Ras-MAPKs et phosphorylation de la thréonine 38</i>	54
II-1-1-1-b/ <i>Autres voies</i>	56
II-1-1-2/ <i>Répression de la protéine Ets-1</i>	57
II-1-2/ <i>SUMOylation et ubiquitination</i>	60
II-1-3/ <i>Acétylation</i>	62
II-2/ <i>Régulation par des interactions protéine-protéine : levée de l'auto-inhibition</i>	63
II-2-1/ <i>Levée de l'auto-inhibition par des partenaires protéiques</i>	63
II-2-2/ <i>Levée de l'auto-inhibition par liaison aux EBS en palindrome</i>	65

CHAPITRE IV : RÔLES BIOLOGIQUES D'ETS-1	70
I/ Rôles physiologiques d'Ets-1	70
I-1/ Rôles généraux	70
I-1-1/ Prolifération cellulaire	70
I-1-2/ Sénescence	71
I-1-3/ Apoptose	71
I-2/ Développement embryonnaire	73
I-3/ Hématopoïèse	74
I-3-1/ La lignée lymphoïde	75
I-3-1-1/ Les lymphocytes B	75
I-3-1-2/ Les lymphocytes T	76
I-3-1-3/ Les cellules NK	77
I-3-2/ La lignée myéloïde	77
I-3-2-1/ Mégacaryocytes	78
I-3-2-2/ Erythrocytes	78
I-4/ Angiogenèse	79
I-4-1/ Mécanisme général	79
I-4-2/ Ets-1 dans l'angiogenèse	79
I-4-2-1/ Expression associée à l'angiogenèse	79
I-4-2-2/ Rôle dans les cellules endothéliales	80
I-4-2-3/ Rôle dans les cellules VSMC	80
I-5/ Ostéogenèse	80
I-6/ Développement du système nerveux central et périphérique	81
I-6-1/ Mécanisme général	81
I-6-2/ Ets-1 dans le développement du système nerveux	81
II/ Rôles pathologiques d'Ets-1	83
II-1/ Cancer	83
II-1-1/ Mécanisme général	83
II-1-2/ Ets-1 dans le cancer	83
II-1-2-1/ Expression associée au cancer	83
II-1-2-2/ Rôle dans la prolifération et la transformation cancéreuse	84
II-1-2-3/ Rôle dans la migration cancéreuse	84
II-1-2-4/ Rôle dans l'invasion cancéreuse	84
II-1-2-5/ Rôle dans la formation de métastases	85
II-1-2-6/ Rôle dans la néo-angiogenèse cancéreuse	86
II-2/ Autres pathologies	86
II-2-1/ Infections virales	86
II-2-1-1/ Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	86
II-2-1-2/ Le virus T-lymphotropique humain (HTLV)	87
II-2-2/ Pathologies inflammatoires	87
II-2-2-1/ Arthrite rhumatoïde	87
II-2-2-2/ Pathologies rénales	88
II-2-2-3/ Athérosclérose	88
 DEUXIEME PARTIE : PARP-1	90
 CHAPITRE I : LA SUPERFAMILLE DES POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASES (PARP) 91	
I/ Origine de la superfamille des PARP	91
II/ Présentation générale des PARP	91
III/ Implications des PARP en biologie	94
 CHAPITRE II : L'ENZYME PARP-1 : LES DOMAINES FONCTIONNELS	97
I/ La région catalytique	97
I-1/ Structure	97
I-1-1/ Les domaines PARP_Reg (régulateur) et catalytique	97
I-1-2/ Le domaine WGR	99
I-2/ Fonction	100
I-2-1/ Mécanisme d'activation du domaine catalytique	100
I-2-2/ Catalyse de la poly(ADP-ribosyl)ation (PARylation)	101

II/ La région d'auto-modification	103
III/ La région de liaison à l'ADN	105
III-1/ Structure	105
III-2/ Fonction	107
III-2-1/ Reconnaissance des cassures simple-brin de l'ADN	107
III-2-2/ Reconnaissance des cassures double-brin de l'ADN	108
III-2-3/ Autres modalités de liaison à l'ADN	109
 CHAPITRE III : REGULATION DE LA PARP-1	 111
I/ Régulation de l'expression du gène <i>parp-1</i>	111
II/ Régulation de l'activité catalytique de la PARP-1	114
II-1/ Régulation par des interactions protéine-protéine	114
II-2/ Régulation par des modifications post-traductionnelles	115
II-2-1/ ADP-ribosylation	115
II-2-2/ Phosphorylation.....	116
II-2-3/ Acétylation	117
II-2-4/ SUMOylation	118
II-2-5/ Ubiquitination.....	118
II-3/ Régulation par la poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG)	120
II-4/ Inhibiteurs pharmacologiques de la PARP-1	122
 CHAPITRE IV : RÔLES BIOLOGIQUES DE LA PARP-1	 124
I/ La PARP-1 : une protéine aux rôles multiples	124
I-1/ Réparation de l'ADN	124
I-1-1/ Réparation par excision de base (BER).....	124
I-1-2/ Recombinaison homologue (RH)	127
I-1-3/ Non-homologous end-joining (NHEJ).....	129
I-2/ Régulation de la chromatine et des événements épigénétiques	130
I-3/ Régulation de la transcription	132
I-3-1/ Modulation de la transactivation.....	132
I-3-2/ Co-régulation transcriptionnelle	133
I-4/ Stress génotoxique, métabolique et autres	134
I-5/ Division cellulaire	136
I-6/ Sénescence et vieillissement	136
I-7/ Mort cellulaire	138
I-7-1/ Apoptose.....	138
I-7-2/ Autophagie	138
I-7-3/ La mort cellulaire dépendante de la PARP-1 : La <i>Parthanatos</i>	139
II/ Rôles physiologiques de la PARP-1	140
II-1/ Développement embryonnaire	140
II-1-1/ Différenciation des cellules souches	140
II-1-2/ Différenciation des tissus	140
II-2/ Métabolisme	140
III/ Rôles pathologiques de la PARP-1	141
III-1/ Cancers	141
III-1-1/ Expression et activité associées aux cancers.....	141
III-1-2/ Utilisation clinique des inhibiteurs de la PARP-1	142
III-1-2-1/ En complément d'une radiothérapie ou d'une chimiothérapie.....	142
III-1-2-2/ Stratégie de la létalité synthétique.....	143
III-1-2-2-a/ Définition	143
III-1-2-2-b/ Mutations <i>BRCA1/BRCA2</i>	143
III-1-2-2-c/ Autres cibles potentielles.....	144
III-1-2-3/ Biomarqueurs de sensibilité aux inhibiteurs de la PARP-1.....	144
III-1-2-3-a/ Définition	144
III-1-2-3-b/ Les protéines de fusion <i>Ets</i>	144
III-1-3/ Réussites, échecs et perspectives	145
III-2/ Pathologies inflammatoires	146
 CONTEXTE ET SUJET DE THESE	 148

RESULTATS	151
CHAPITRE I : IDENTIFICATION DE NOUVEAUX PARTENAIRES PROTEIQUES DE L'ONCOPROTEINE ETS-1	152
<i>I/ Préambule</i>	<i>152</i>
<i>II/ Présentation du « streptavidin pull-down »</i>	<i>152</i>
<i>III/ Résultats</i>	<i>154</i>
<i>IV/ Conclusion et Discussion</i>	<i>157</i>
CHAPITRE II : LE TAUX DE PROTEINES ETS-1 EST REGULE PAR LA PARP-1 DANS LES CELLULES CANCEREUSES AFIN DE PREVENIR LES DOMMAGES A L'ADN.....	160
<i>I/ Préambule</i>	<i>160</i>
<i>II/ Résumé.....</i>	<i>160</i>
<i>III/ Conclusion et discussion.....</i>	<i>182</i>
CHAPITRE III : CARTOGRAPHIE DES DOMAINES D'INTERACTION ENTRE L'ONCOPROTEINE ETS-1 ET LES DEUX ENZYMES DE REPARATION DE L'ADN, DNA-PK ET PARP-1	184
<i>I/ Préambule</i>	<i>184</i>
<i>II/ Introduction</i>	<i>184</i>
<i>III/ Résultats</i>	<i>184</i>
III-1/ Cartographie des domaines d'interaction entre Ets-1 et le complexe DNA-PK	184
III-2/ Cartographie des domaines d'interaction entre Ets-1 et la PARP-1 (résultats préliminaires)	186
.....	186
<i>IV/ Conclusion et discussion</i>	<i>189</i>
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	191
ANNEXE	201
BIBLIOGRAPHIE	205

SOMMAIRE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation des différents groupes de protéines de la famille Ets chez les vertébrés.	21
Figure 2 : Organisation structurale de la protéine Ets-1.	25
Figure 3 : Alignement des séquences des domaines ETS de structure connue.	26
Figure 5 : Contacts moléculaires entre le domaine ETS d'Ets-1 et les bases de l'ADN.	31
Figure 6 : Alignement des séquences des domaines PNT de structure connue.	32
Figure 7 : Structure tridimensionnelle du domaine PNT d'Ets-1.	32
Figure 8 : Structure du module auto-inhibiteur d'Ets-1.	35
Figure 9 : L'auto-inhibition et ses mécanismes de régulation.	36
Figure 10 : Modèle structural de l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1.	37
Figure 11 : Structure du variant <i>ets-1</i> codant la protéine Ets-1 humaine de pleine longueur, Ets-1 p51.	40
Figure 12 : Promoteur du gène <i>ets-1</i>	41
Figure 13 : Régulation de l'expression du gène <i>ets-1</i> par des signaux extracellulaires.	45
Figure 14 : Structure des différents variants de l'ARNm <i>ets-1</i> humain.	47
Figure 15 : Les isoformes de la protéine Ets-1 : Ets-1 p51, Ets-1 p42 et Ets-1 p27.	48
Figure 16 : Modèle de la fonction de dominant négatif d'Ets-1 p27.	50
Figure 17 : Processus d'expression, de maturation et modes d'action des miR.	52
Figure 18 : Les sites de modifications post-traductionnelles de la protéine Ets-1 p51.	54
Figure 19 : Voie Ras-MAPK.	55
Figure 20 : Activation de la CaMKII par la voie Ca ²⁺ dépendante.	58
Figure 21 : Modèle de SUMOylation d'Ets-1.	61
Figure 22 : Modèle de la fixation coopérative d'Ets-1 sur les EBS en palindrome du promoteur du gène de la stromélysine-1.	66
Figure 23 : Modèle pour la liaison différentielle d'Ets-1 p51 et Ets-1 p42 au niveau des EBS en palindrome du promoteur de la stromélysine-1.	68
Figure 24 : Etapes de différenciation lymphoïde et myéloïde au cours de l'hématopoïèse.	74
Figure 25 : Etapes de différenciation du système nerveux à partir du tube neural.	82
Figure 26 : Représentation des différents membres de la superfamille des PARP chez les vertébrés.	92
Figure 27 : Structure de l'enzyme PARP-1.	97
Figure 28 : Alignement de la séquence primaire de la région catalytique avec la structure secondaire des domaines identifiés.	98
Figure 29 : Structure tridimensionnelle de la région catalytique de la PARP-1.	99
Figure 30 : Structure tridimensionnelle du domaine WGR.	100
Figure 31 : Modèle de l'activation catalytique dépendante de l'ADN de la PARP-1.	101
Figure 32 : Biosynthèse du NAD ⁺ et des polymères d'ADP-ribose.	102
Figure 33 : Structure tridimensionnelle du domaine BRCT.	104
Figure 34 : Structures tridimensionnelles des ZnF de la région de liaison à l'ADN.	106
Figure 35 : Modèles de liaison de la PARP-1 aux cassures simple-brin.	107
Figure 36 : Promoteur du gène <i>parp-1</i>	112
Figure 37 : Les sites de modifications post-traductionnelles de l'enzyme PARP-1.	115
Figure 38 : Mécanisme d'ubiquitination et de dégradation par le protéasome de la PARP-1.	120
Figure 39 : Catabolisme des PAR.	121
Figure 40 : Implication de la PARP-1 dans le mécanisme de réparation par BER.	126

Figure 41 : Mécanisme de réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue.	128
Figure 42 : Mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN par NHEJ.	129
Figure 43 : Implications de la PARP-1 dans la modulation de la chromatine et dans la transcription.	132
Figure 44 : Fonctions de la PARP-1 comme rhéostat cellulaire.	136
Figure 45 : Schéma de purification des partenaires d'Ets-1 par « <i>streptavidin pull-down</i> ».	153
Figure 46 : Visualisation des partenaires d'interaction potentiels d'Ets-1, purifiés par « <i>streptavidin pull-down</i> », sur un gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie® colloïdal.	154
Figure 47 : Validation des partenaires d'interaction potentiels d'Ets-1 par « <i>Western blot</i> ».	156
Figure 48 : Interaction entre Ets-1 et ses nouveaux partenaires dans un contexte cellulaire.	157
Figure 49 : Schéma représentant les interconnexions entre les nouveaux partenaires d'Ets-1 identifiés au cours de cette étude.	158
Figure 50 : Cartographie des zones minimales d'interaction entre Ets-1 et Ku70.	186
Figure 51 : Schéma des mutants de délétion utilisés pour cartographier les zones minimales d'interaction entre Ets-1 et la PARP-1.	187
Figure 52 : Cartographie des zones minimales d'interaction entre Ets-1 et la PARP-1.	188

SOMMAIRE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Implications de la famille Ets dans les cancers.....	23
Tableau 2 : Consensus de liaison artificiel déterminé par sélection <i>in vitro</i> pour différentes protéines Ets.	29
Tableau 3 : Sites présents dans le promoteur du gène <i>ets-1</i> et les facteurs régulateurs.....	42
Tableau 4 : Séquences des EBS en palindrome dans le promoteur des gènes <i>stromélysine-1</i> et <i>p53</i>	66
Tableau 5 : Organisation et activité enzymatique des membres de la superfamille des PARP.	94
Tableau 6 : Implications des enzymes PARP en biologie.	95
Tableau 7 : Inhibiteurs catalytiques de la PARP-1 les plus utilisés.....	122
Tableau 8 : Liste des nouveaux partenaires d'interaction potentiels d'Ets-1 identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	155

ABREVIATIONS

1-9

53BP1
6His

« p53-binding protein 1 »
« 6 histidines »

A

AAD
ASC-2
ADN
ADPRT
AIF
ALC1
AML-1
AMPK
AMV
AP-1/-2
APE1
AR
ARTD
ARE
ARH
ATM
ATR
ARNm

« acidic activation domains »
« activating signal cointegrator-2 »
« acide désoxyribonucléique »
« ADP-ribosyl transférase »
« apoptosis-inducing factor »
« amplified in liver cancer 1 »
« acute myeloid leukemia-1 »
« 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase »
« avian myeloblastosis virus »
« activator protein-1/-2 »
« apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease 1 »
« androgen receptor »
« ADP-ribosyltransferase diphtheria toxin-like »
« antioxydant responsive element »
« ADP-ribosyl hydrolase »
« ataxia telangiectasia mutated »
« ataxia telangesia and Rad3-related »
« acide ribonucléique messenger »

B

BAK
Bax
Bcl-2
BER
bFGF
Bid
Blimp-1
BRCA1/2
BRCT

« bcl-2 homologous antagonist killer »
« bcl-2-associated x »
« B-cell lymphoma-2 »
« base-excision repair »
« basic fibroblast growth factor »
« BH3 interacting-domain death agonist »
« B lymphocyte-induced maturation protein-1 »
« breast cancer type 1/2 susceptibility protein »
« BRCA1 C terminus »

C

caspase
CIITA
CaM
CaMKII
CBD
CBP
CCL-2
CDK
CHFR
ChIP
CKII
CMH
CREB
CSF-1
CTCF
CTGF

« cysteinyl-aspartate-specific protease »
« class II trans-activator »
« calmoduline »
« calcium/calmodulin-dependent protein kinase II »
« chitin binding domain »
« CREB-binding protein »
« CC chemokine ligand-2 »
« cyclin-dependent kinase »
« checkpoint with forkhead (FHA)-associated and RING) finger domains »
« chromatine immunoprécipitation »
« casein kinase II »
« complexe majeur d'histocompatibilité »
« cAMP response element binding »
« colony stimulating factor-1 »
« CCTC-binding factor »
« connective tissue growth factor »

D

Da
DAG
DBD
DNA-PK
DNA-PKcs

« dalton »
« diacylglycérol »
« DNA binding domain »
« DNA dependent-protein kinase »
« DNA-PK catalytic subunit »

DNMT1	« <u>DNA</u> (cytosine-5)- <u>methyltransferase 1</u> »
DGK	« <u>diacylglycerol kinase</u> »
<u>E</u>	
E	« <u>embryonic day</u> »
EAP1/2	« <u>ets-1 associated protein 1/2</u> »
EBS	« <u>ETS binding site</u> »
EGF	« <u>epidermal growth factor</u> »
Elf	« <u>E74 like factor</u> »
Elk-1	« <u>ETS like-1</u> »
Env	« <u>envelope</u> »
Eph	« <u>ephrin</u> »
ER	« <u>estradiol receptor</u> »
Erg	« <u>ETS-related gene</u> »
Erk	« <u>extracellular signal-regulated kinase</u> »
Ese-1/-2	« <u>epithelium specific ETS-1/-2</u> »
Ets	« <u>E-twenty-six specific</u> »
<u>F</u>	
FAK	« <u>focal adhesion kinase</u> »
FEN-1	« <u>flap endonuclease 1</u> »
FGF	« <u>fibroblast growth factor</u> »
Fli-1	« <u>Friend leukemia integration-1</u> »
Flk-1	« <u>fetal liver kinase-1</u> »
<u>G</u>	
G1/2	« <u>growth 1/2</u> »
GABP- α	« <u>GA binding protein-α</u> »
GADD153	« <u>growth arrest and DNA damage inducible gene 153</u> »
Gag	« <u>group specific antigen</u> »
GDP	« <u>guanosine diphosphate</u> »
GHF-1	« <u>growth hormone factor-1</u> »
GM-CSF	« <u>granulocyte-macrophage-colony stimulating factor</u> »
GTP	« <u>guanosine triphosphate</u> »
Grb2	« <u>growth factor receptor-binding protein 2</u> »
GST	« <u>glutathion S-transférase</u> »
<u>H</u>	
HDAC1/2	« <u>histone deacetylase 1/2</u> »
Hdm2	« <u>human double minute 2 protein</u> »
HES1	« <u>hairy and enhancer of split-1</u> »
HGF/SF	« <u>hepatocyte growth factor/scatter factor</u> »
HIF-1/-2 α	« <u>hypoxia inducible factor-1/-2α</u> »
HLA-DR	« <u>human leukocyte antigens-DR</u> »
HMGB1	« <u>high mobility group box 1</u> »
hnRNP	« <u>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</u> »
HRE	« <u>hypoxia responsive element</u> »
HSP70	« <u>heat shock protein 70 kDa</u> »
HTH	« <u>helix-turn-helix</u> »
HTLV-1	« <u>human T-lymphotropic virus type-1</u> »
HUVEC	« <u>human umbilical vein endothelial cell</u> »
<u>I</u>	
IAP	« <u>inhibitor of apoptosis protein</u> »
Id1	« <u>inhibitors of DNA binding protein 1</u> »
Ig	« <u>immunoglobuline</u> »
IL	« <u>interleukine</u> »
IKK α	« <u>IκB kinase α</u> »
IKK γ	« <u>inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit γ</u> »
IP ₃	« <u>inositol 1,4,5-triphosphate 3</u> »
<u>J</u>	
JNK	« <u>c-Jun N-terminal kinase</u> »
<u>K</u>	
KIF4	« <u>kinesin family member 4</u> »
KSHV	« <u>Kaposi sarcoma-associated herpes virus</u> »

<u>L</u>	
LTR	« long terminal repeat »
<u>M</u>	
M	« mitosis »
MALDI-TOF	« matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight »
MAPK	« mitogen-activated protein kinase »
MDC1	« mediator of DNA damage checkpoint protein 1 »
Mdm2	« murine double minute 2 »
MDR-1	« multi drug resistance-1 »
MEC	« matrice extracellulaire »
miR	« microARN »
MLCK	« myosin light-chain kinase »
MMP	« matrix metalloproteinase »
Mo-MLV	« Moloney-murine leukemia virus »
MRN	« mre11/rad50/nibrin »
Mre11	« meiotic recombination 11 »
mTOR	« mammalian target of rapamycin »
<u>N</u>	
NAD	« nicotinamide adénine dinucléotide »
NAMPT	« nicotinamide phosphoribosyltransferase »
NF1	« nuclear factor 1 »
NFκB	« nuclear factor kappa B »
c- ou a-NHEJ	« classique ou alternative non-homologous end joining »
NK	« natural killer »
NKT	« natural killer T »
NKR	« NK receptors »
NLS	« nuclear localization signal »
NMN	« nicotinamide mononucléotide »
NMNAT	« nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase »
NO	« nitric oxide »
NRDB	« negative regulatory region of DNA binding »
NRE	« negative regulatory element »
Nrf-2	« nuclear factor-E2-related factor-2 »
<u>O</u>	
Oct	« octamer »
OGG1	« 8-oxoguanine glycosylase 1 »
ORF	« open reading frame »
<u>P</u>	
p300	« E1A binding protein p300 »
PAR	« polymère d'ADP-ribose »
PARG	« poly(ADP-ribose) glycohydrolase »
PARP	« poly (ADP-ribose) polymerase »
PARP_Cat	domaine catalytique de la PARP-1
PARP_Reg	domaine régulateur de la PARP-1
PARylation	« poly (ADP-ribosyl)ation »
pb	paire de bases
PBD	« PAR binding domain »
PBM	« protein-binding microarray »
PCNA	« proliferating cell nuclear antigen »
PCR	« polymerase chain reaction »
Pdef	« prostate-derived Ets factor »
PDGF	« platelet-derived growth factor »
PDGF-R/α	« PDGF receptor α »
Pea-3	« polyomavirus enhancer A binding protein-3 »
Perp	« p53 apoptosis effector related to PMP-22 »
PI3K	« phosphatidylinositol 3-kinases »
PF-4	« platelet factor 4 »
PIAS	« protein inhibitor of activated STAT »
PIP ₂	« phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphates 2 »

PKC- α	« <u>protein kinase C-α</u> »
PLC	« <u>phospholipase C</u> »
PMA	« <u>phorbol 12-myristate 3-acetate</u> »
PNK	« <u>polyucleotide kinase</u> »
PNT	« <u>domaine Pointed</u> »
pol	« <u>polymérase</u> »
PPAR γ	« <u>peroxisome proliferator-activated receptor γ</u> »
PTEN	« <u>phosphatase and tensin homolog</u> »
PTHrP	« <u>parathyroid hormone-related protein</u> »
Pu-1	« <u>purine rich-1</u> »
R	
RAR α	« <u>retinoic acid receptor α</u> »
RARE	« <u>retinoic acid response element</u> »
Rb	« <u>retinoblastoma protein</u> »
RBBP8	« <u>retinoblastoma-binding protein 8</u> »
RH	« <u>recombinaison homologue</u> »
RHA	« <u>RNA helicase A</u> »
RING	« <u>really interesting new gene</u> »
RISC	« <u>RNA-induced silencing complex</u> »
RMN	« <u>résonance magnétique nucléaire</u> »
RNF	« <u>ring finger protein</u> »
ROS	« <u>reactive oxygen species</u> »
RPA	« <u>replication protein A</u> »
RRE	« <u>Ras responsive element</u> »
RT-PCR	« <u>retrotranscription polymerase chain reaction</u> »
S	
S	« <u>synthesis</u> »
SAM	« <u>sterile alpha motif</u> »
SAP	« <u>SAF-A/B, acinus and PIAS</u> »
SAP-1	« <u>SRF accessory protein-1</u> »
SCID	« <u>severe combined immuno-deficiency</u> »
SDS-PAGE	« <u>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</u> »
SENP-1	« <u>SUMO/sentrin-specific protease-1</u> »
SFPQ	« <u>splicing factor, proline (P)- and glutamine (Q)-rich</u> »
SHH	« <u>sonic hedgehog</u> »
SIRT	« <u>sirtuin</u> »
SM α -actine	« <u>smooth muscle-α actin</u> »
Smad3	« <u>sma- and mad-related protein 3</u> »
SNP	« <u>single nucleotide polymorphism</u> »
SOS	« <u>son of sevenless</u> »
Sox	« <u>SRY-related HMG-box</u> »
SRF	« <u>serum response factor</u> »
Ste4p	« <u>sterile 4p</u> »
SUMO	« <u>small ubiquitin-like modifier</u> »
SVF	« <u>sérum de veau foetal</u> »
T	
TAD	« <u>transactivation domain</u> »
Tax-1	« <u>transactivator of pX-1</u> »
TCR	« <u>T-cell receptor</u> »
Tel	« <u>translocation ETS leukemia</u> »
EMT	« <u>epithelial-mesenchymal transition</u> »
TFE-3	« <u>transcription factor E-3</u> »
TGF	« <u>transforming growth factor</u> »
TH	« <u>T-helper</u> »
TLE1	« <u>transducin-like enhancer protein 1</u> »
TLR-9	« <u>toll-like receptor-9</u> »
TNF- α	« <u>tumor necrosis factor-α</u> »
TNKS	« <u>tankyrase</u> »
TOP1	« <u>ADN topoisomérase 1</u> »
TopBP1	« <u>DNA topoisomérase 2-binding protein 1</u> »

TopoII β	« <u>t</u> opoiso <u>m</u> érase <u>I</u> I <u>β</u> »
TPA	« 12-O- <u>t</u> etradecanoylphorbol 13- <u>a</u> cetate »
<u>U</u>	
Uba-2	« <u>u</u> biquitin- <u>a</u> ctivating enzyme- <u>2</u> »
Ubc-9	« <u>u</u> biquitin <u>c</u> onjugating enzyme- <u>9</u> »
uPA	« <u>u</u> rokinase <u>p</u> lasminogen <u>a</u> ctivator »
USF-1	« <u>u</u> pstream <u>s</u> timulatory <u>f</u> actor-1 »
UTR	« <u>u</u> n <u>t</u> ranslated <u>r</u> egion »
UV	« <u>u</u> ltra- <u>v</u> iolets »
<u>V</u>	
VEGF	« <u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor »
VIH	« <u>v</u> irus de l' <u>i</u> mmunodéficienc <u>e</u> <u>h</u> umaine »
VSMC	« <u>v</u> ascular <u>s</u> mooth <u>m</u> uscle <u>c</u> ells »
<u>W</u>	
wHTH	« <u>w</u> inged <u>h</u> elix- <u>t</u> urn- <u>h</u> elix »
<u>X</u>	
XLF	« <u>X</u> RCC4- <u>l</u> ike <u>f</u> actor »
XRCC1	« <u>X</u> -ray <u>r</u> epair <u>c</u> ross- <u>c</u> omplementing protein <u>1</u> »
<u>Y</u>	
YY1	« <u>y</u> ing- <u>y</u> ang <u>1</u> »
<u>Z</u>	
ZnF	« <u>z</u> inc <u>f</u> inger »

RESUME

Ets-1 est un facteur de transcription, membre de la famille Ets, possédant un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé, qui permet de reconnaître un cœur consensus GGAA/T présent dans le promoteur de ses gènes cibles. Ce facteur régule des gènes impliqués dans divers processus physiologiques tels que le développement, l'hématopoïèse et l'angiogenèse ou pathologiques notamment dans la progression et l'invasion tumorale. Malgré les efforts engagés par la communauté scientifique ces dix dernières années, il y a peu de stratégies de ciblage thérapeutique d'Ets-1 qui peuvent être transposées dans un cadre clinique. Compte tenu du fait que ce facteur de transcription est un marqueur de mauvais pronostic pour de nombreux carcinomes, dont entre autres, ceux du sein, des poumons ou encore du colon, la mise en évidence d'une stratégie de ciblage de son activité pro-tumorale pourrait constituer une avancée majeure dans la lutte contre le cancer.

Ets-1 n'agit pas seule au niveau de ses promoteurs cibles mais en coopération avec une variété de co-régulateurs transcriptionnels. De plus, ce facteur est ciblé par de nombreuses voies de transduction des signaux cellulaires. L'identification de nouveaux partenaires interagissant avec Ets-1 devrait donc nous permettre de mieux appréhender ses réseaux de régulation afin de mettre au point une stratégie de ciblage de son activité. Dans ce but, nous avons mis en œuvre un système de purification de partenaires, en utilisant des protéines Ets-1 biotinylées, basé sur la forte affinité entre la biotine et la streptavidine, appelé « *streptavidin pull-down* ». Nous avons ainsi identifié de nouveaux partenaires protéiques potentiels. Parmi ceux-ci, nous avons pu confirmer comme partenaires interagissant avec Ets-1, des protéines de réparation de l'ADN tels que le complexe DNA-PK et la PARP-1. La poly(ADP-ribose) polymérase-1 (PARP-1) est une enzyme aux rôles multiples qui catalyse la poly(ADP-ribosyl)ation ou PARylation. Si elle fut identifiée à l'origine comme une protéine de réparation de l'ADN, de nombreux travaux ont montré ces dernières années qu'elle est un co-régulateur majeur des mécanismes de transcription.

Nous avons démontré qu'Ets-1 interagit directement avec la PARP-1 et est PARylée par celle-ci. L'utilisation d'inhibiteurs catalytiques de la PARP-1 sur des cellules de lignées cancéreuses, exprimant Ets-1, a pour conséquences l'accumulation massive de ce facteur et une augmentation de son activité transcriptionnelle. Ceci suggère une implication de la PARylation dans la stabilité d'Ets-1 en lien avec sa dégradation par le protéasome. Cependant, sous inhibition de la PARP-1, l'accumulation d'Ets-1 est toxique pour la cellule cancéreuse. En effet, nous avons observé une forte augmentation des dommages à l'ADN qui corrèle avec la mort des cellules tumorales. Nous supposons qu'une activité non régulée d'Ets-1 est néfaste pour le devenir cellulaire d'autant plus quand une enzyme de réparation de l'ADN comme la PARP-1 est inhibée.

Ces résultats mettent en évidence un nouveau mécanisme de régulation d'Ets-1 au sein des cellules cancéreuses en liaison avec les protéines de réparation de l'ADN. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de la PARP-1 pourrait constituer une nouvelle stratégie afin de cibler spécifiquement les tumeurs exprimant Ets-1.

ABSTRACT

Ets-1 is a transcription factor, member of the Ets family, having a well-conserved DNA binding domain which recognizes a core consensus sequence, GGAA/T, present in the promoter of target genes. This factor regulates genes involved in various physiological processes such as development, haematopoiesis, and angiogenesis and in pathological processes notably cancer progression and invasion. Despite the efforts of the scientific community during these past 10 years, few strategies for Ets-1 therapeutic targeting can be applied to clinical medicine. Considering the fact that this transcription factor is a poor prognostic marker for numerous carcinomas, such as breast, lung or colorectal cancers, the finding of a new strategy for targeting its activity in tumours could be a new advance in the fight against cancer.

Ets-1 does not act alone on its target promoters but with a wide range of transcriptional co-regulators. Moreover, this factor is a target for many signal transduction pathways. Identifying novel proteins that interact with Ets-1 should permit a better understanding of its regulation networks to develop a strategy for targeting its activity. For this purpose, we used a purification system to identify interacting partners, using biotinylated Ets-1 proteins, based on the strong affinity between biotin and streptavidin, called streptavidin pull-down. We thereby identified new potential interaction partners. Among those, we could confirm as Ets-1 partners, DNA repair proteins, such as the DNA-PK complex and PARP-1. The poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is an enzyme with various roles that catalyses poly(ADP-ribosyl)ation or PARylation. Originally, it was identified as a DNA repair protein. Nevertheless, these past few years, many studies have highlighted its role as a co-regulator in transcription processes.

We demonstrated that Ets-1 directly interacts with PARP-1 and is PARylated in return. In Ets-1-expressing cancer cells, the catalytic inhibition of PARP-1 caused massive accumulation of this factor and enhanced its transcriptional activity. These results suggest that PARylation is involved in Ets-1 protein stability linked to its proteasomal degradation. Nevertheless, under PARP-1 inhibition, accumulation of Ets-1 is toxic for cancer cells. Indeed, we observed a strong increase in DNA damage that leads to cancer cell death. We assume that an unregulated activity of Ets-1 is harmful to the cellular outcome even more when a DNA repair protein such as PARP-1 is inhibited.

These results give new insight into Ets-1 regulation in cancer cells linked to DNA repair proteins. Furthermore, our findings suggest that PARP-1 inhibitors would be useful in a new therapeutic strategy that specifically targets Ets-1-expressing tumours.

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : Ets-1

CHAPITRE I : Famille Ets

I/ Origine de la famille Ets

La découverte du premier membre de la famille Ets, le gène *v-ets* (« *E-twenty-six specific* »), s'est faite en 1983 lors de l'isolement du génome du rétrovirus aviaire transformant E26 [1, 2]. La démarche originelle fut de déterminer la séquence responsable de la capacité qu'a ce virus d'induire des leucémies d'origine érythroblastique et myéloblastique chez le poulet [3]. La séquence qui fut alors identifiée correspondait à un gène de fusion de structure tripartite *gag-myb-ets*, contenant deux oncogènes : *v-myb* et *v-ets*, en remplacement des gènes *pol* et *env* de la structure classique (*gag-pol-env*). Alors que le rôle oncogénique du gène *v-myb* avait déjà été précédemment décrit chez le rétrovirus transformant AMV (« *avian myeloblastosis virus* ») [4], l'oncogène *v-ets* se présenta comme un nouvel intervenant dans les mécanismes de transformation.

Il s'en suivit l'identification de la forme proto-oncogénique de ce gène, désignée *c-ets* puis *ets-1*, dans le génome aviaire et humain [5, 6]. Sur la base d'homologies de séquence avec *ets-1*, toute une famille de gènes fut ensuite découverte mettant ainsi à jour un ensemble de protéines conservé de l'éponge jusqu'à l'homme en passant par le nématode, la drosophile et l'oiseau. Le nombre de protéines Ets se serait ainsi considérablement élargi au cours de l'évolution, et ce par duplications successives à partir de quelques gènes *ets* ancestraux [7]. L'ensemble de ces gènes fut alors baptisé du nom de son fondateur, famille Ets [8, 9]. A ce jour, 27 membres ont été recensés chez les vertébrés.

II/ Présentation générale de la famille Ets

La famille des gènes *ets* code des facteurs de transcription répartis en 12 groupes chez les vertébrés selon la similarité de leurs séquences (Figure 1) [9]. Ils sont soit activateurs de la transcription soit, pour certains, répresseurs (Fev, Erf, Pe-1, Net, Tel) [10]. La caractéristique majeure de cet ensemble de protéines est la présence d'un domaine de liaison à l'ADN fortement conservé, le domaine ETS, qui constitue la signature de cette famille [11]. Ce domaine est capable de reconnaître un élément spécifique de l'ADN, dénommé EBS (« *ets binding site* »), constitué d'environ 9 paires de bases incluant une séquence centrale de consensus 5'-GGAA/T-3' [12]. Ce site consensus de liaison, présent dans de nombreux

promoteurs cibles, permet aux facteurs Ets de réguler l'expression de plus de 200 gènes de façon positive ou négative selon la présence d'un domaine transactivateur ou transrépresseur [10, 13]. De plus, un autre domaine, le domaine Pointed (PNT), est conservé chez de nombreux membres de la famille Ets. Celui-ci est impliqué dans des interactions protéine-protéine (Figure 1) [14].

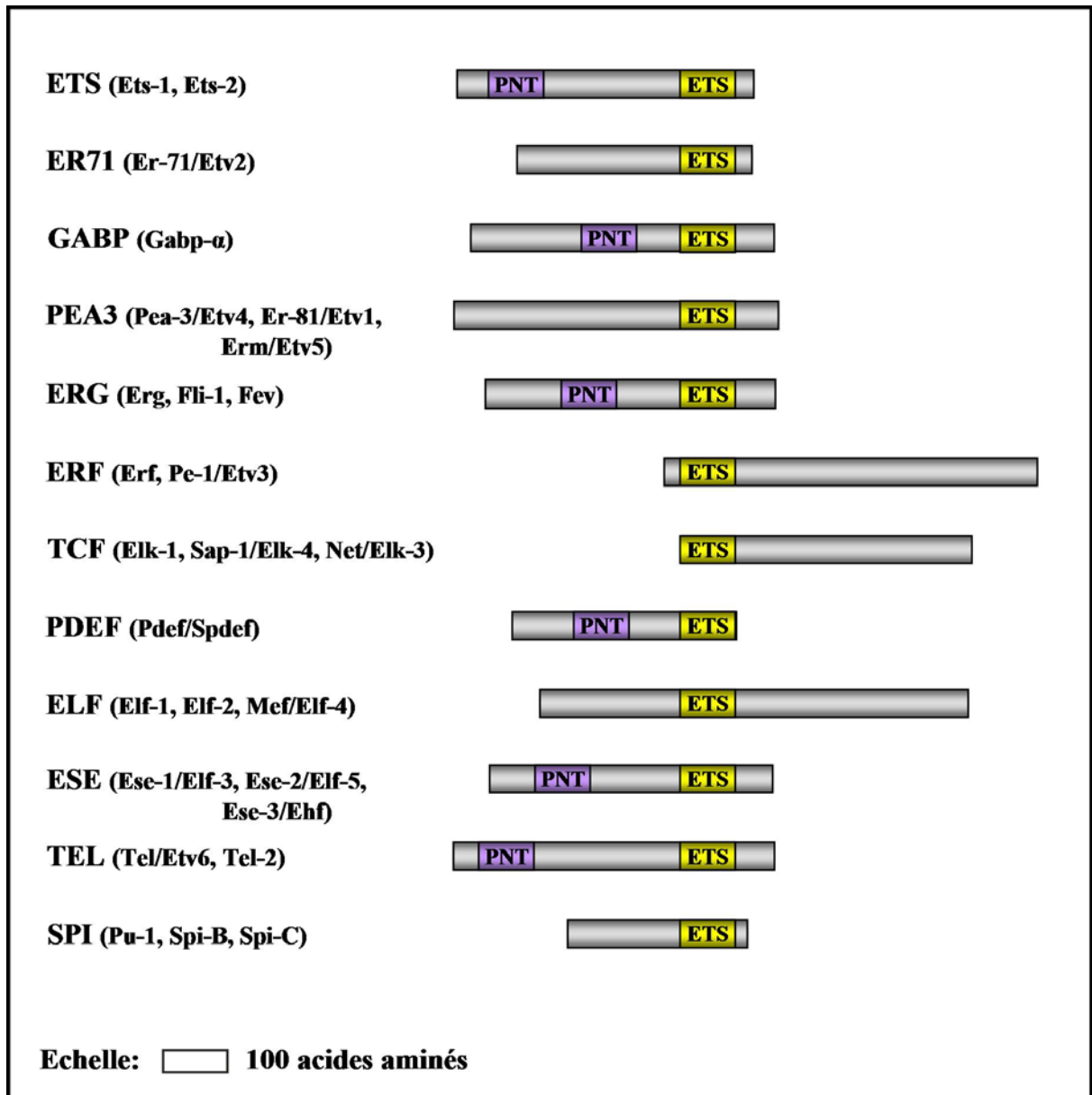


Figure 1 : Représentation des différents groupes de protéines de la famille Ets chez les vertébrés. Les protéines composant chaque groupe sont indiquées entre parenthèses. Les domaines principaux ont été représentés, à savoir le domaine ETS en jaune et le domaine Pointed (PNT) en violet. D'après [10].

De manière générale, les facteurs Ets n'agissent pas seuls au niveau de leurs promoteurs cibles mais en coopération avec une variété de partenaires protéiques selon le contexte

biologique [15]. De plus, les protéines Ets sont des cibles nucléaires de nombreuses voies de transduction cellulaire, leur conférant ainsi un rôle d'intégrateur des signaux extracellulaires [16]. En conséquence de leurs fonctions de régulateurs transcriptionnels et de médiateurs de la signalisation, ces protéines sont impliquées dans des processus physiologiques, tels que le développement, l'angiogenèse, la morphogenèse mais aussi dans des pathologies telles que des maladies auto-immunes et inflammatoires bien que leurs rôles les plus connus soient au sein des cancers [10].

III/ Implications de la famille Ets dans les cancers

Dès leur découverte, les membres de la famille Ets ont été associés à des phénomènes de cancérisation et désignés comme oncoprotéines [1]. Des travaux ultérieurs ont montré que si leur expression était rare chez l'adulte, elle se retrouvait fréquemment lors de cancers couvrant une multitude de carcinomes mais également des sarcomes, des leucémies et des lymphomes [17]. Les protéines Ets y sont souvent surexprimées ou impliqués dans des réarrangements chromosomiques engendrant des protéines de fusion au fort pouvoir oncogénique. Il est ainsi à noter l'expression de fusions entre la protéine EWS (une protéine fixant l'ARN) et les membres Erg (« *Ets-related gene* ») et Fli-1 (« *friend leukemia integration-1* »), responsables en bonne partie des sarcomes d'Ewing (tumeurs osseuses infantiles), entre la protéine TMPRSS2 (une serine protéase) et Erg ou des membres du groupe PEA3 (« *polymavirus enhancer A binding protein 3* »), impliqués dans des carcinomes de la prostate androgène-dépendant, ou enfin des fusions avec le membre Tel (« *translocation ETS leukemia* ») retrouvées dans des leucémies et des lymphomes [17].

La surexpression de protéines Ets dans les cancers est corrélée à un mauvais pronostic de survie. Ceci s'explique par leurs rôles au sein de toutes les étapes de la cancérisation. Elles promeuvent aussi bien des phénomènes précoces de transformation, que l'invasion tumorale par l'expression d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire, jusqu'à l'angiogenèse et les processus métastatiques [10, 17].

Néanmoins, on peut constater que s'il existe bien une certaine redondance fonctionnelle entre les membres de la famille Ets, due au domaine ETS très conservé, ces protéines ne sont pas toutes impliquées dans les mêmes cancers. En effet, on peut diviser leurs implications en deux classes distinctes, d'une part les membres retrouvés principalement dans des tumeurs solides (groupes ETS, ERG et PEA3) et d'autres dans des leucémies (groupes ELF, TEL et SPI) (Tableau 1). Il est intéressant de noter qu'une étude approfondie des propriétés de liaison

à l'ADN et notamment du consensus précis au sein des EBS a permis de faire la même distinction en démontrant que les facteurs Ets dit de classe I, impliqués dans des tumeurs solides, étaient capable de reconnaître des EBS avec un consensus plus variable que les autres [12] (voir Chapitre II §I-2-1).

Groupe	Membre	Cancers associés
ETS	Ets-1	Sein, ovaire, poumon, côlon, thyroïde, utérus, mélanome, gastrique, prostate, pancréas, méningiome, foie, thymus, angiosarcomes
	Ets-2	Sein, foie, côlon, pancréas, thyroïde, prostate
ERG	Erg	Prostate, sarcome d'Ewing, ovaire
	Fli-1	Sarcome d'Ewing
PEA3	Pea-3	Sein, Sarcome d'Ewing, poumon, gastrique, prostate
	Er-81	Sarcome d'Ewing, prostate
	Erm	Sein, prostate
TEL	Tel	Leucémie
SPI	Pu-1	Leucémie
ELF	Elf-1	Leucémie, prostate, ovaire, endomètre
	Elf-2	Leucémie
	Mef	Leucémie

Tableau 1 : Implications de la famille Ets dans les cancers. D'après [17].

Donc et de manière surprenante, chaque membre de la famille Ets serait capable de réguler un lot particulier de gènes lui permettant d'agir de façon spécifique malgré la forte

conservation du domaine ETS et du site de liaison reconnu [12, 13]. Néanmoins, la redondance fonctionnelle de ces facteurs reste un problème majeur en vue d'un ciblage thérapeutique. En effet, le ciblage d'un seul membre de la famille, s'il était possible, pourrait être compensé par l'expression d'une autre protéine Ets. Ainsi, se pose deux questions fondamentales : comment une protéine Ets donnée est capable d'agir spécifiquement vis-à-vis des autres membres de la famille ? Et est-il possible de mettre à jour une voie thérapeutique permettant de cibler toutes les protéines Ets ? A partir de l'analyse des travaux menés sur la protéine Ets-1, nous tenterons de mettre en lumière les mécanismes mis en jeu par ce facteur pour atteindre cette spécificité d'action ainsi que les processus cellulaires la contrôlant.

CHAPITRE II : LA PROTEINE ETS-1: LES DOMAINES FONCTIONNELS

La protéine Ets-1 de pleine longueur (également dénommée Ets-1 p51 chez l'Homme) est un facteur de transcription constitué de cinq domaines protéiques plus ou moins conservés au sein de la famille Ets qui sont un domaine de fixation à l'ADN (le domaine ETS), un domaine de transactivation (le domaine TAD), un domaine d'interactions protéine-protéine (le domaine PNT), et deux domaines inhibiteurs (les domaines I) (Figure 2).

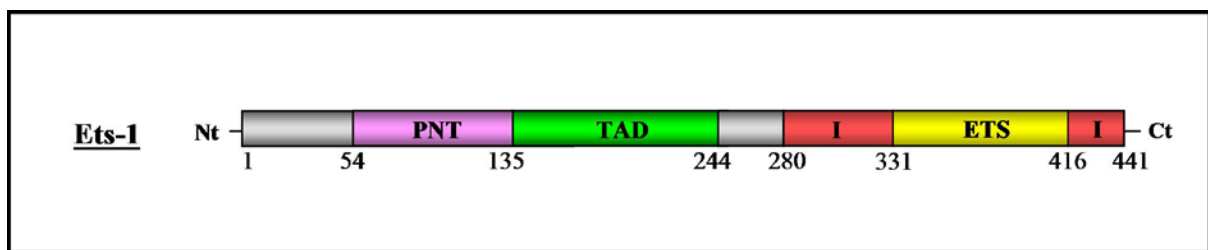


Figure 2 : Organisation structurale de la protéine Ets-1.

Les domaines fonctionnels sont représentés : le domaine Pointed (PNT) en violet, le domaine de transactivation (TAD) en vert, les domaines inhibiteurs (I) en rouge, le domaine de liaison à l'ADN (ETS) en jaune. La numérotation en nombre d'acides aminés est indiquée.

I/ Le domaine ETS

I-1/ Structure

La structure du domaine ETS de liaison à l'ADN a été résolue par radio-cristallographie et par résonance magnétique nucléaire (RMN) en absence ou en présence d'ADN [18-20]. Celle-ci a pu être comparée aux structures obtenues pour d'autres membres de la famille Ets, tels que Fli-1 [21], Pu-1 (« *purin rich-1* ») [22], Gabp- α (« *GA binding protein- α* ») [23], Sap-1 (« *SRF accessory protein-1* ») [24], Elk-1 (« *Ets-like-1* ») [25], Pdef (« *prostate-derived Ets factor* ») [26] et Ets-2 (« *epithelium specific Ets-2* ») [27]. L'ensemble de ces travaux a mis en lumière la très forte conservation structurale de ce domaine (Figure 3).

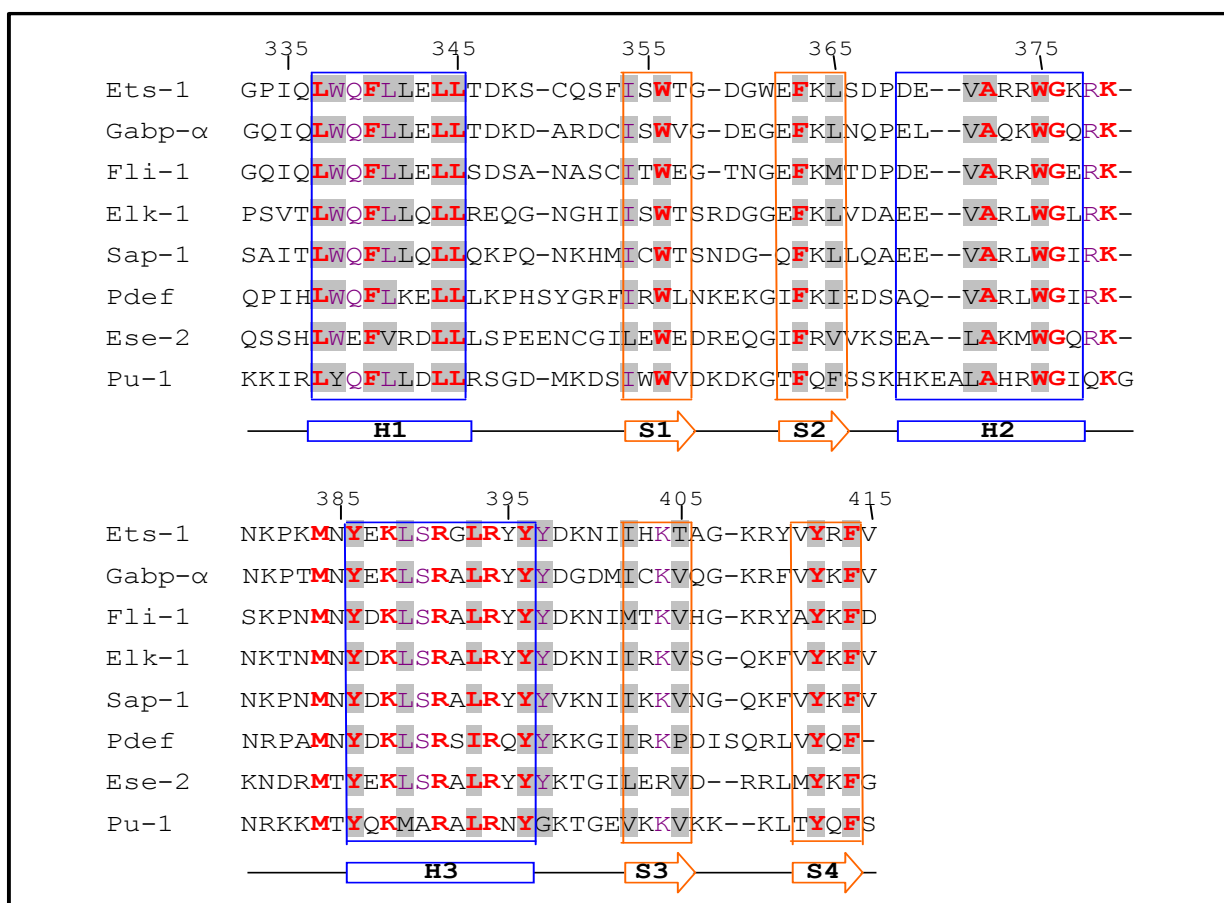


Figure 3 : Alignement des séquences des domaines ETS de structure connue.

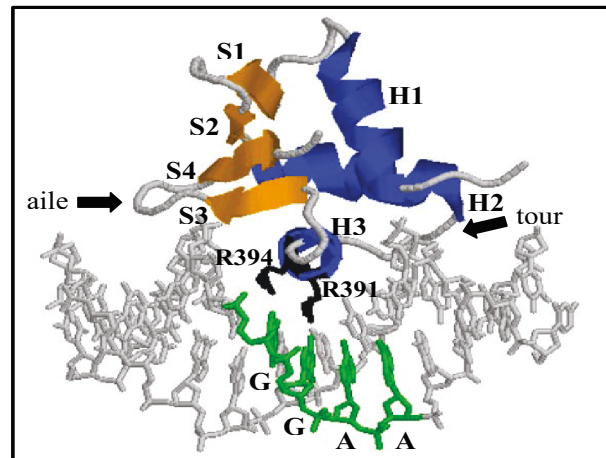
La structure secondaire est indiquée sous l'alignement des séquences, les hélices α (H1-H3) sont figurées par des rectangles bleus et les brins β (S1-S4) par des flèches orange. Les résidus conservés à 100% sont représentés en gras et en rouge. Ceux conservés à plus de 85% sont colorés en violet. Les acides aminés constituant le cœur hydrophobe du domaine sont repérés par un fond gris [24]. La numérotation des séquences correspond à celle adoptée pour Ets-1.

Il apparaît, d'après ces études, que le domaine ETS est constitué de 3 hélices α (H1 à H3) et de 4 brins β (S1 à S4) qui s'organisent tridimensionnellement selon un motif structural de type hélice-tour-hélice ailé, désigné wHTH (« *winged helix-turn-helix* ») (Figures 3 et 4). Le motif HTH résulte de la disposition perpendiculaire des hélices H2 et H3 et de leur connexion par une boucle « *turn* » (ou tour) (Figure 4). Celui-ci est compacté contre un feuillet β anti-parallèle (formé par les 4 brins β , S1 à S4) donnant naissance à un cœur hydrophobe. La dénomination « *winged* » (ou ailé) provient, quant à elle, de la boucle reliant les brins S3 et S4 qui a l'apparence d'une aile (Figure 4). De plus, la présence d'une poche regroupant les résidus hydrophobes au cœur du domaine se révèle indispensable pour stabiliser la structure globale [18].

I-2/ Fonction

De façon générale, le domaine ETS lie spécifiquement l'ADN au niveau d'une séquence possédant un cœur consensus 5'-GGAA/T-3' par l'intermédiaire de quatre zones de contacts. La plus importante implique l'hélice H3 qui s'insère dans le grand sillon de l'ADN et contacte directement les bases du cœur grâce à deux arginines (R391 et R394) strictement conservées au sein de la famille Ets (Figures 3 et 4) [18]. Ces interactions sont fondamentales pour la reconnaissance spécifique d'une séquence nucléotidique par les protéines Ets.

Figure 4 : Structure tridimensionnelle du domaine ETS d'Ets-1 lié à sa séquence cible. Les bases du cœur consensus apparaissent en vert. La chaîne latérale des arginines (R391 et R394) impliquées dans des interactions directes avec les bases de l'ADN est représentée en noir. D'après (PDB : 1K79).



Par ailleurs, trois autres régions du domaine ETS participent à des contacts avec le squelette phosphate de l'ADN de part et d'autre du cœur consensus, sur l'un ou l'autre des brins de la double hélice. Il s'agit de la boucle entre les hélices H2 et H3 (correspondant au « *turn* » du motif HTH), de celle entre les brins S3 ou S4 (qui forme l'aile du motif wHTH) et de résidus de la partie N-terminale de l'hélice H1 [18]. Certaines de ces interactions facilitent l'insertion de l'hélice H3 dans le grand sillon de l'ADN par un positionnement exact des résidus face aux bases qu'ils contactent.

Néanmoins, il existe des interactions protéine-ADN propres à Ets-1, engageant des résidus peu conservés, qui sont à la base de la spécificité de liaison à l'ADN.

I-2-1/ Site consensus de liaison artificiel et naturel

Une étude récente a permis de redéfinir les sites consensus de liaison à l'ADN des membres de la famille Ets [12]. Cette caractérisation a été effectuée *in vitro* par deux méthodes complémentaires. La première est dite technique à haut débit de spécificité de liaison à l'ADN basée sur le principe des micro-puces (« *high-throughput microwell-based DNA-binding specificity assay* ») [28]. Les protéines Ets se fixent soit sur un oligonucléotide

double-brin contenant le consensus théorique ayant la plus forte affinité pour le domaine ETS, soit sur des oligonucléotides compétiteurs ayant un consensus variable. Ceci permet de déterminer si tel ou tel membre présente une affinité pour des versions alternatives du consensus théorique. La deuxième plus classique est dite technique de « PBM » (« *protein-binding microarray* »). Elle consiste en l'utilisation de micro-puces contenant des oligonucléotides double brins de 10 mers couvrant toutes les possibilités de séquences et permet d'identifier les plus affins pour un facteur de transcription. Les deux stratégies ont donné les mêmes résultats, à savoir pour Ets-1, une séquence riche en purines de type 5'-N(A/n)(C/ga)(C/a)GGA(A/T)(G/a)(T/c)N-3' (N correspondant à n'importe quelle base) très proche de celle identifiée précédemment [29]. Celle-ci est reconnue par de nombreux autres facteurs Ets, renforçant la question de la spécificité d'action au sein de cette famille. Néanmoins, quelques différences subtiles permettent de discriminer les consensus de liaison des membres de la famille Ets en les séparant en quatre classes (Tableau 2).

On peut ainsi distinguer les membres de la famille Ets de classe I qui ne discrimine pas l'adénine de la thymine comme base en position +4 de l'EBS, des classes II et III qui reconnaissent un cœur consensus GGAA et de la classe IV qui fixe un cœur GGAT (Tableau 2). Dans le cas d'Ets-1, une étude montre que l'incapacité à privilégier une adénine à cette position provient de la lysine 388 de l'hélice H3 du domaine ETS (Figure 3). En effet, lorsque ce résidu est muté en thréonine, comme dans l'hélice H3 d'Elf-1 (« *E74 like factor-1* »), Ets-1 ne reconnaît plus que des séquences contenant un cœur GGAA [30].

D'autre part, les bases -3, -2 et -1 de l'EBS peuvent être de nature variée. En effet, le consensus est différent pour chaque classe (Tableau 2). Ceci peut s'expliquer par la forte divergence de séquence entre les domaines ETS des membres de classes différentes. En effet, les domaines ETS de Tel et Pu-1 (classe II et III) possèdent moins de 43% d'identité de séquence avec celui d'Ets-1 (classe I). Alors qu'elle est de 97% avec celui d'Ets-2 et de 69% avec celui de Fli-1, tous deux de classe I. Néanmoins, ces différences de séquence apparaissent tout de même trop faibles pour expliquer la spécificité de liaison d'Ets-1, en particulier lorsque l'on compare son consensus de fixation avec ceux des autres membres de classe I (Tableau 2).

Classe	Groupe	Protéine	Consensus déterminé									
			-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7
I	I		A/n	C/n	C/a	G	G	A	A/T	G/A	T/C	N
	ETS	Ets-1	A/n	C/ga	C/a	G	G	A	A/T	G/a	T/c	N
		Ets-2	A/n	C/ga	C/a	G	G	A	A/T	G/a	T/c	N
	ERG	Erg	A/n	C/ga	C/a	G	G	A	A/t	G/a	T/c	N
		Fli-1	A/n	C/ga	C/a	G	G	A	A/T	G/a	T/c	N
	PEA3	Pea-3	N	C/ga	C/a	G	G	A	A/t	G/a	T/c	N
	TCF	Elk-1	A/n	C/n	C	G	G	A	A/t	G/a	T/c	N
	ERF	Erf	A/n	C/n	C	G	G	A	A/T	G/A	T/C	N
	ER71	Er71	A/n	C/ga	C/a	G	G	A	A/T	G/A	T/C	N
GABP	Gabp- α	N	C/ga	C/a	G	G	A	A/T	A/G	T/C	N	
II	II		C/n	C/g	C/a	G	G	A	A/t	G/a	T/c	N
	ESE	Ese-1	C/ga	C/ga	C/a	G	G	A	A	G/A	T/c	N
	TEL	Tel	C/n	N	C/a	G	G	A	A	G/ac	T/c	N
	ELF	Elf-1	N	C/g	C/a	G	G	A	A/T	A/G	T/c	N
III	III		N	G	C/ga	G	G	A	A/t	G/c	T/c	N
	SPI	Pu-1	N	G/a	A/gc	G	G	A	A	G/c	T/c	N
IV	IV		N	C	C/a	G	G	A	T/ca	G/n	T/C	N
	PDEF	Pdef	A/C	C	C/a	G	G	A	T	N	T/c	N

Tableau 2 : Consensus de liaison artificiel déterminé par sélection *in vitro* pour différentes protéines Ets.

Le cœur invariant 5'-GGAA/T-3' est encadré en rouge. La position de la première guanine de ce cœur est désignée par +1, les bases en 5' sont numérotées -1, -2, -3; les bases en aval prennent les valeurs +2 à +7. La lettre N correspond à n'importe quelle base. Les bases en lettres majuscules sont des résidus retrouvés majoritairement au sein des sites, alors que celles en lettres minuscules sont des résidus peu représentés. D'après [12].

Il s'avère en fait que la véritable source de spécificité provient de sites éloignés du consensus de liaison. En effet, des travaux ont montré en utilisant des puces à ADN qu'il existe une fixation redondante de différents facteurs Ets au niveau de sites consensus conservés généralement situés au niveau proximal des promoteurs. Alors qu'au contraire, une fixation spécifique est décelable au niveau des sites éloignés du consensus qui sont localisés plutôt dans la partie distale des promoteurs [31].

Cette spécificité est due en partie à une plus grande variation d'affinité de liaison entre les différentes protéines Ets au niveau des sites éloignés dits de « basse affinité » par rapport

aux sites proches du consensus dits de « haute affinité », comme le démontre l'étude des affinités de fixation d'Ets-1, Ese-2, Ese-1, Pdef et Pu-1 [32] ou de Fli-1, Sap-1 et Pu-1 [33] sur différents sites plus ou moins éloignés du consensus.

Le consensus de liaison naturel des membres de la famille Ets, c'est-à-dire au niveau des promoteurs cibles, a été déterminé par immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage (ChIP-seq) [12]. Les résultats montrent que le consensus naturel est globalement similaire au consensus artificiel. Néanmoins, les auteurs soulignent le fait que les sites au sein des promoteurs les plus occupés par les facteurs Ets, notamment Fli-1, ne sont pas ceux qui permettent la transcription. Là encore, cette fixation est observée au niveau proximal des promoteurs et les auteurs n'excluent pas que les véritables sites de régulation soient plus distaux et plus éloignés du consensus.

Ceci illustre bien l'importance des sites de « basse affinité » dans le recrutement des membres de la famille Ets au niveau de ses promoteurs cibles dans un contexte naturel.

I-2-2/ Mécanismes moléculaires de reconnaissance du site consensus

La reconnaissance spécifique d'une séquence d'ADN par le domaine ETS est généralement dirigée par un réseau d'interactions moléculaires très précis. Les études structurales par radio-cristallographie et par RMN montrent que les acides aminés du domaine ETS établissent deux types de contacts au niveau de la séquence d'ADN [19, 22-27] :

(1) ceux avec les bases du cœur consensus (Figure 5A). En effet, les résidus conservés de l'hélice H3 interagissent directement avec les bases du cœur consensus 5'-GGAA-3' au niveau du grand sillon de l'ADN. Ce sont les arginines 391 et 394 (R391 et R394) qui contactent les deux guanines du cœur (Figure 4 et 5A) [24].

Pour certaines protéines Ets, des résidus supplémentaires participent à la reconnaissance directe des bases. Pour Ets-1, la tyrosine 395 (Y395) et la lysine 388 (K388) forment des liaisons avec les bases en position +3, +4 et +5 du consensus (correspondant aux positions 8, 9 et 10 de la Figure 5A) sur l'un ou l'autre des brins.

(2) ceux avec le squelette phosphate de l'ADN (Figure 5B). Ils sont établis entre des résidus plus ou moins conservés du domaine ETS et le squelette phosphate de l'ADN, de part et d'autre du cœur au niveau du petit sillon. Les résidus impliqués appartiennent : (1) à l'hélice H3, (2) à la boucle entre les hélices H2 et H3, (3) à la boucle entre les brins S3 et S4 et (4) à la partie N-terminale de l'hélice H1 [19]. C'est ce mécanisme qui permet une certaine spécificité de liaison à l'ADN à chaque membre de la famille Ets (Tableau 2).

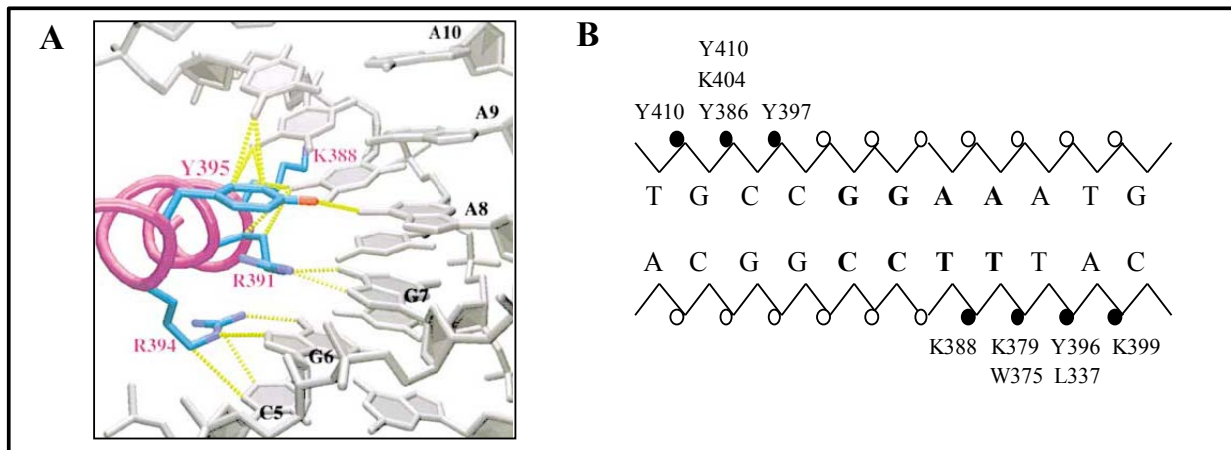


Figure 5 : Contacts moléculaires entre le domaine ETS d'Ets-1 et les bases de l'ADN.

A : Contacts directs entre l'hélice H3 du domaine ETS d'Ets-1 et les bases de l'ADN. La chaîne latérale des résidus impliqués dans des interactions directes avec les bases a été représentée et les contacts ont été figurés en jaune. Les bases du cœur 5'-GGAA-3' sont numérotées G6, G7, A8, A9. **B** : Contacts entre les résidus du domaine ETS d'Ets-1 et le squelette phosphate de l'ADN. Les phosphates contactés sont figurés par un rond noir. Pour les acides aminés interagissant avec les phosphates, leur position au sein de la séquence d'Ets-1 a été indiquée. D'après [19] (PDB : 1K79).

II/ Le domaine Pointed (PNT)

II-1/ Structure

Outre Ets-1, le domaine Pointed (PNT) est partagé par 10 membres de la famille Ets chez les vertébrés (Figure 1). Celui-ci correspond, en fait, à un domaine qui est abondamment représenté dans le règne animal depuis la levure jusqu'à l'homme, le domaine SAM (« *sterile alpha motif* »). Ce dernier est retrouvé chez de nombreuses protéines aux fonctions très diverses, telles que le récepteur à tyrosine kinase Eph (« *ephrin* »), la protéine d'assemblage Ste4p (« *sterile 4p* »), la protéine Smaug liant l'ARN, ou la DGK (« *diacylglycérol kinase* ») [34].

La structure du domaine PNT d'Ets-1 a été déterminée par RMN [35] et a pu être comparée avec celles obtenues pour Gabp- α , Tel [36] et Erg [14]. La structure secondaire de ce domaine est composée de 4 ou 5 hélices α (H2-H5 ou H1-H5), selon la protéine Ets considérée (Figure 6). Le point commun de ces différentes structures est la présence d'un domaine compacté formé par les hélices H2 à H5 grâce à des interactions hydrophobes impliquant des résidus conservés (Figures 6 et 7) [14]. Dans le cas d'Ets-1, l'hélice H1 supplémentaire n'interagit pas avec les autres hélices [35].

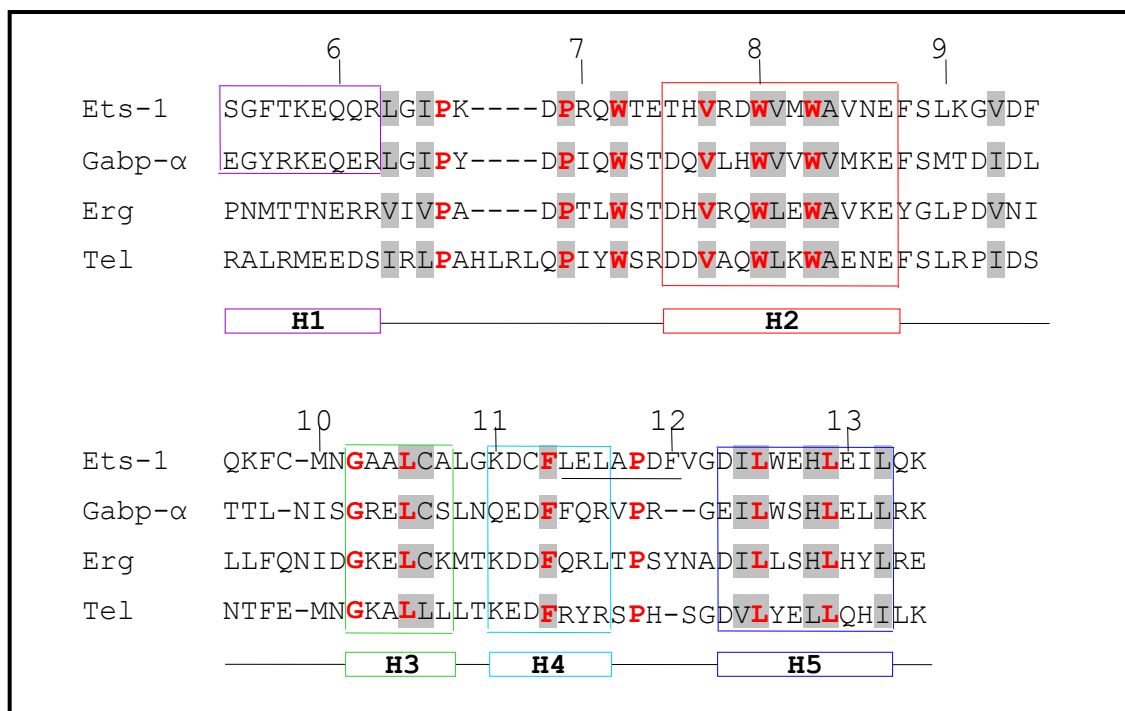


Figure 6 : Alignement des séquences des domaines PNT de structure connue.

La structure secondaire déterminée pour Ets-1 est indiquée sous l'alignement des séquences, les hélices α (H1-H5) sont figurées par des rectangles. Les résidus conservés à 100% sont représentés en gras et colorés en rouge. Les acides aminés constituant le cœur hydrophobe du domaine sont repérés par un fond gris. Les acides aminés impliqués dans l'interaction entre Ets-1 et Erk-2 sont soulignés dans la séquence [37]. La numérotation des séquences correspond à celle adoptée pour Ets-1.

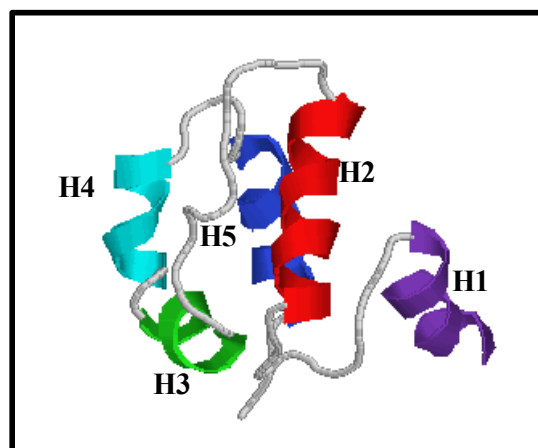


Figure 7 : Structure tridimensionnelle du domaine PNT d'Ets-1.
D'après [35] (PDB : 1BQV).

II-2/ Fonction

De façon générale, le domaine PNT est responsable du recrutement de divers facteurs par interactions : (1) avec un autre domaine PNT comme illustré par la capacité de Tel ou Erg à s'homodimériser *via* ce domaine [36, 38] ou (2) avec un domaine de nature différente permettant notamment le recrutement de facteurs essentiels à la régulation transcriptionnelle. En effet, une étude montre qu'Ets-1 peut former *via* son domaine PNT un complexe avec la MAPK (« *mitogen-activated protein kinase* »), Erk-2 (« *extracellular signal-regulated kinase-2* ») [37, 39].

De façon intéressante, l'interaction entre ces deux protéines est due à un motif protéique LXLXXXF (où L est la leucine, F la phénylalanine et X un acide aminé quelconque) présent dans le domaine PNT d'Ets-1 (Figure 6), correspondant à un site plateforme (ou « docking site ») des MAPKs Erk-1/2. Bien que des données structurales ne soient disponibles que pour l'interaction d'Ets-1 avec la kinase Erk-2, Erk-1 est très probablement recrutée au niveau de ce site. L'importance de ce motif est illustrée par le fait qu'il est retrouvé dans la séquence d'Ets-2, qui possède un domaine PNT capable d'interagir avec Erk-2, mais non dans celle de Gabp- α qui ne lie pas Erk-2 [37]. Les conséquences de cette interaction seront abordées au Chapitre III §II-1-1-1-a.

III/ Le domaine transactivateur

Le domaine transactivateur d'Ets-1 occupe une position centrale au sein de sa séquence (Figure 2). Celui-ci a été défini comme un domaine indépendant de transactivation puisqu'il est capable d'induire la transcription d'un gène rapporteur lorsqu'il est fusionné au domaine de liaison à l'ADN d'un facteur hétérologue, en l'occurrence Gal-4 [40]. Ce domaine est caractérisé par un fort contenu en résidus acides (point isoélectrique proche de 4,4), mais aucune structure n'a encore pu être définie. La structure secondaire prédite par bio-informatique indique la présence potentielle de deux hélices α et de trois brins β [41]. Ces caractéristiques tendent à classer ce domaine dans la catégorie des domaines d'activation acides (« *acidic activation domains* » ou AAD) [42]. Néanmoins, ce domaine est unique car aucune similarité n'a pu être trouvée dans la séquence des membres de la famille Ets, même avec la séquence d'Ets-2, la protéine la plus proche d'Ets-1 (55% d'identité de séquence). Ce point est important pour la compréhension des mécanismes régissant la spécificité d'action d'Ets-1 vis-à-vis d'Ets-2.

En effet, l'existence de domaines transactivateurs propres à chaque protéine peut être un moyen de recruter des facteurs différents. Ainsi, il a pu être montré qu'Ets-1 interagit avec GHF-1 (« *growth hormone factor-1* »)/Pit-1, un facteur de transcription à homéodomaine POU, *via* une région de 70 acides aminés incluant la partie C-terminale de son domaine transactivateur, alors qu'Ets-2 en est incapable [43, 44].

IV/ Les domaines inhibiteurs

IV-1/ Structure

La protéine Ets-1 possède deux domaines inhibiteurs situés de part et d'autre du domaine ETS entre les résidus 280 et 331 (domaine inhibiteur N-terminal), et les résidus 416 et 441 (domaine inhibiteur C-terminal) (Figure 2). Des travaux de RMN et de radiocristallographie montrent que chaque domaine inhibiteur possède deux hélices α : HI-1 et HI-2 pour le domaine N-terminal et H4 et H5 pour le domaine C-terminal (Figure 8A) [45, 46]. Les hélices de chaque domaine inhibiteur interagissent les unes avec les autres ainsi qu'avec l'hélice H1 du domaine ETS pour former un module compacté, le module auto-inhibiteur qui confère à Ets-1 sa propriété d'auto-inhibition de liaison à l'ADN (Figure 8B et 8C) [46]. Ce module est stabilisé par l'existence d'une large poche hydrophobe qui intègre des résidus des cinq hélices (Figure 8C). De plus, le caractère polaire des hélices HI-1, H4 et H5 renforce la formation de ce module grâce à des interactions électrostatiques.

De façon intéressante, la séquence des domaines inhibiteurs est conservée chez Ets-2, ainsi que les propriétés d'hydrophobicité et de charges des résidus cruciaux. Ceci suggère fortement l'existence d'un module auto-inhibiteur de même structure au niveau d'Ets-2 (Figure 8A) [47].

IV-2/ Fonction

Les premières études avaient mis en évidence que la délétion de l'une ou l'autre des régions qui encadrent le domaine ETS augmente fortement la fixation d'Ets-1 à l'ADN [48, 49]. Ultérieurement, des travaux ont montré que les deux domaines inhibiteurs agissent de concert pour réduire l'affinité de liaison à l'ADN d'Ets-1 [50]. De façon intéressante, la conservation des deux domaines inhibiteurs dans la séquence d'Ets-2 lui confère des propriétés d'inhibition de la liaison à l'ADN similaires à celles d'Ets-1. Ce phénomène de régulation intra-protéique de la fixation à l'ADN, appelé auto-inhibition de liaison à l'ADN, est présent chez d'autres facteurs de transcription [51].

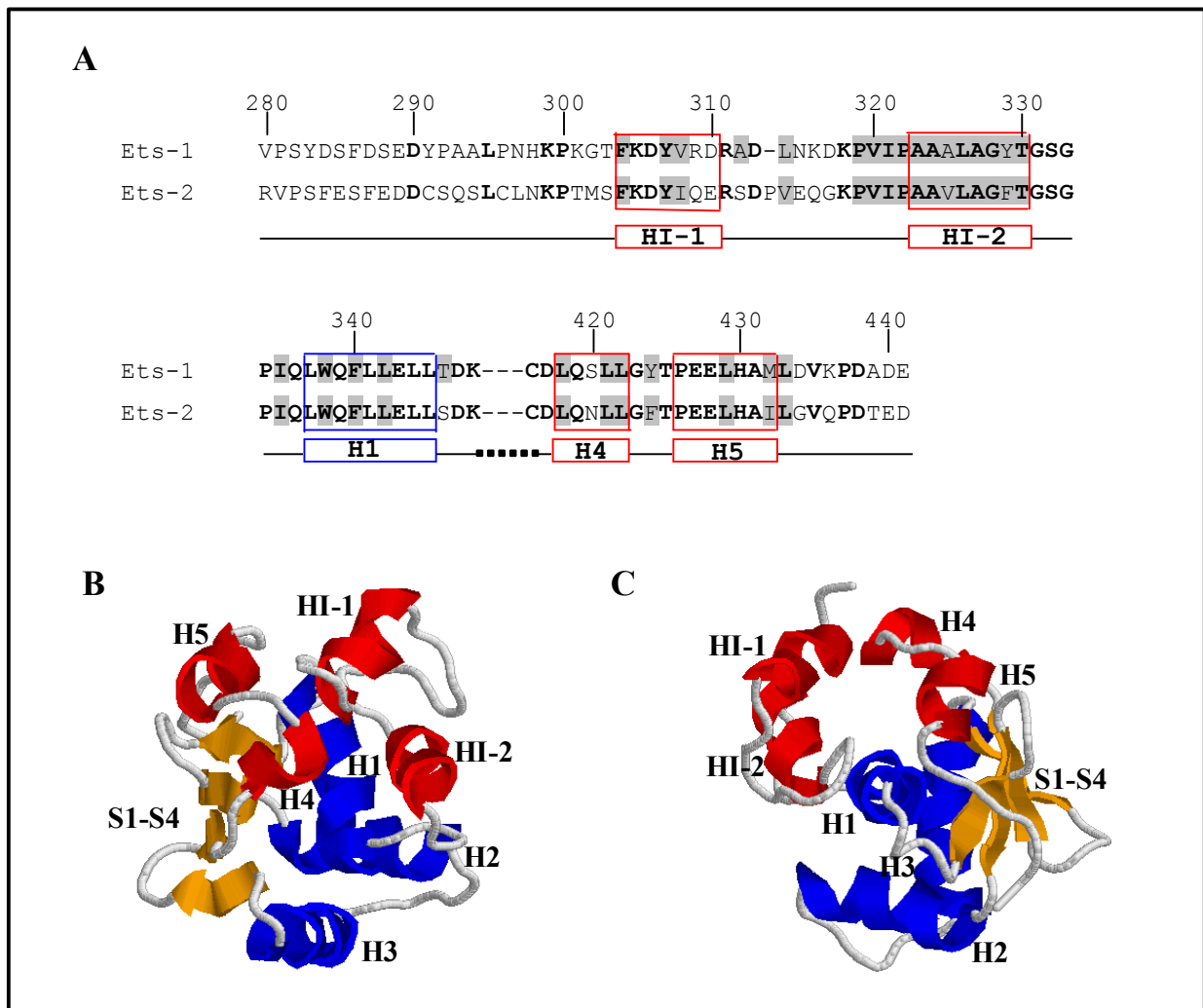


Figure 8 : Structure du module auto-inhibiteur d'Ets-1.

A : Alignement des séquences d'Ets-1 et d'Ets-2 au niveau des domaines inhibiteurs et de l'hélice H1 du domaine ETS. La structure secondaire déterminée pour Ets-1 est indiquée sous l'alignement des séquences, les hélices α des domaines inhibiteurs (H1-H5) sont figurées par des rectangles rouges et l'hélice H1 du domaine ETS par un rectangle bleu. Les résidus conservés à 100% sont représentés en gras. Les acides aminés constituant le cœur hydrophobe du module auto-inhibiteur sont repérés par un fond gris. La numérotation des séquences correspond à celle adoptée pour Ets-1. **B**, **C** : Structure tridimensionnelle du module auto-inhibiteur. Les éléments structuraux du domaine ETS sont en bleu (hélice α) et jaune (brins β), ceux des domaines inhibiteurs en rouge. La structure est représentée en vue de face (**B**) ou de haut (**C**). D'après [46] (PDB : **1R36**).

IV-2-1/ Définition de l'auto-inhibition

L'auto-inhibition est un mécanisme de régulation négative de l'activité d'une protéine [51]. De façon générale, il peut s'agir du masquage direct d'un site actif ou d'une surface d'interaction d'une protéine mais aussi, de façon plus indirecte, du maintien d'une conformation non-fonctionnelle d'un domaine cible.

Une protéine "auto-inhibée" peut être considérée comme dans un état latent où la conformation est dite "fermée". En réponse à des signaux particuliers, l'auto-inhibition est

levée suite à un changement conformationnel de la protéine qui peut être engendré par une interaction protéine-protéine, une modification post-traductionnelle ou un clivage protéolytique. La protéine tend alors vers une conformation dite "ouverte" qui correspond à un état actif. A l'opposé, l'auto-inhibition peut très bien être renforcée par des interactions protéine-protéine ou par des modifications post-traductionnelles de façon à stabiliser l'état « fermé ». En dehors de l'activation par protéolyse qui est définitive, l'auto-inhibition doit être perçue comme un mécanisme dynamique permettant le passage réversible et rapide de l'état actif vers l'état latent d'une protéine, et inversement, par le biais de modifications conformationnelles (Figure 9).

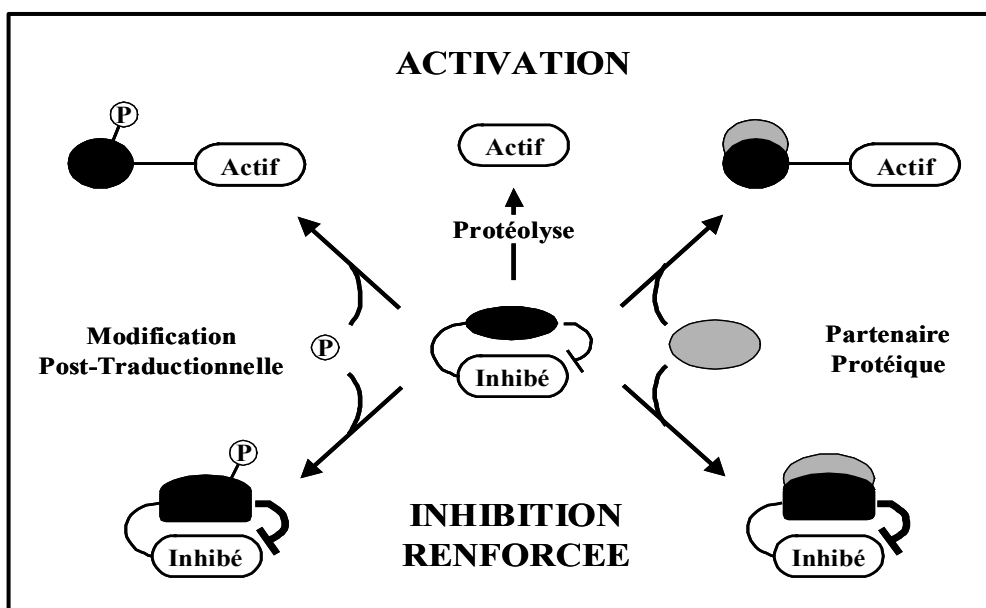


Figure 9 : L'auto-inhibition et ses mécanismes de régulation.

Le domaine protéique (en blanc) au centre est auto-inhibé par un contact intramoléculaire (domaine noir). Le clivage du domaine inhibiteur (en haut au centre) ou sa déstabilisation par l'intermédiaire d'un contact avec un partenaire protéique (en haut à droite) ou par une modification post-traductionnelle (en haut à gauche) peuvent restaurer l'activité du domaine protéique d'intérêt. Au contraire, la stabilisation du domaine inhibiteur (en bas) renforce l'auto-inhibition.

L'auto-inhibition de liaison à l'ADN est retrouvée chez divers facteurs de transcription eucaryotes et procaryotes [51]. Au sein de la famille Ets, ce mécanisme affecte les protéines des groupes ETS, PEA3, ELK et GABP [11], ainsi que les membres Erg et Tel [52, 53].

IV-2-2/ Mode d'action du module auto-inhibiteur d'Ets-1

Le module auto-inhibiteur d'Ets-1, comme décrit dans le §IV-1, est composé des hélices α des deux domaines inhibiteurs (HI-1, HI-2, H4 et H5) et de l'hélice α H1 du domaine ETS (Figure 10A). La détermination de la structure de ce module n'a eu lieu que

bien après la mise en évidence et la compréhension biochimique du mécanisme d'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1.

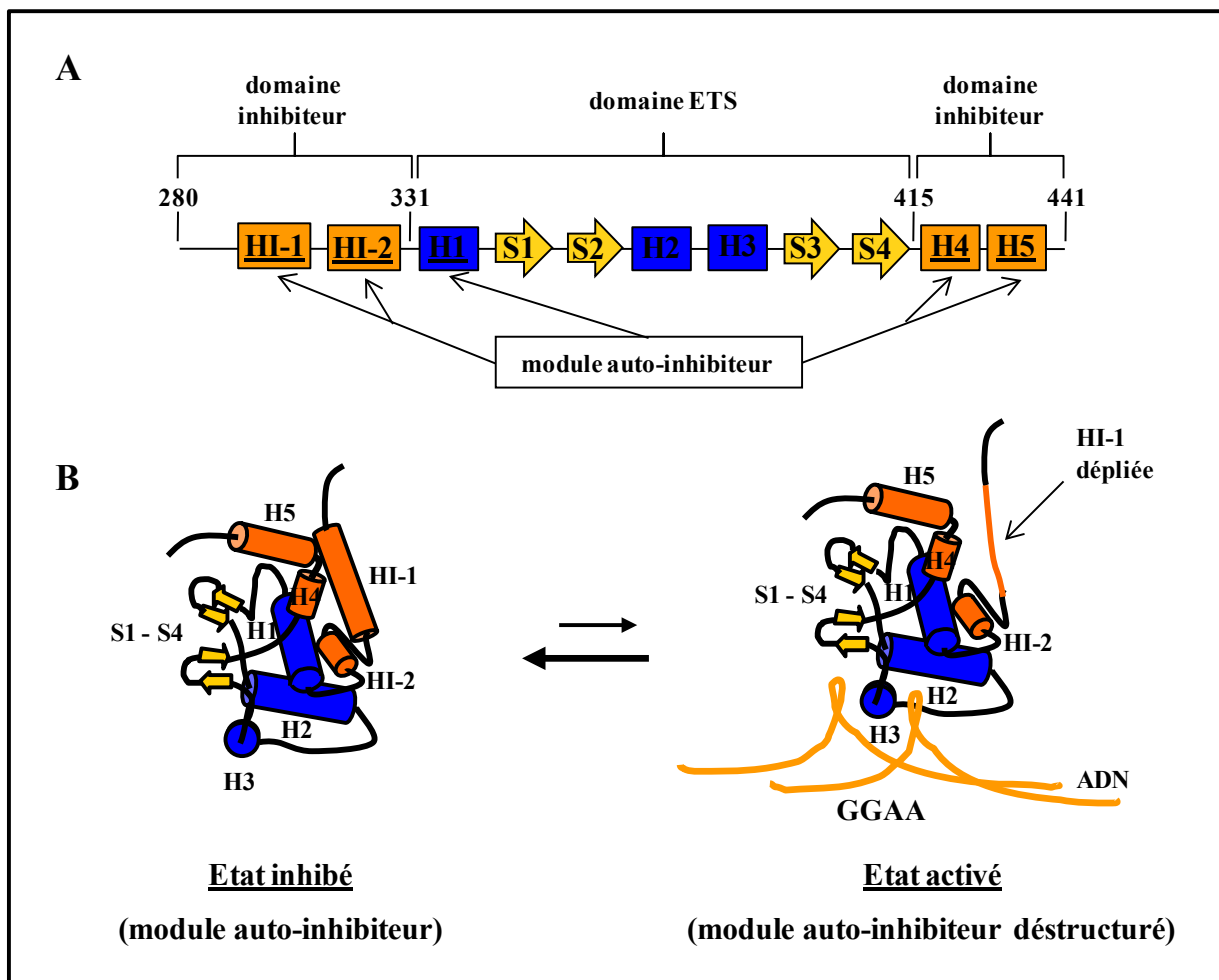


Figure 10 : Modèle structural de l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1.

A : Structure secondaire des domaines inhibiteurs et du domaine ETS d'Ets-1. Les rectangles correspondent aux hélices α et les flèches aux brins β . Le nom des hélices α constituant le module auto-inhibiteur est souligné. **B** : Modèle de levée de l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1. En solution, les hélices des domaines inhibiteurs (HI-1, HI-2, H4, H5) sont compactées sur le domaine ETS par interaction avec l'hélice H1 formant un module auto-inhibiteur. Lors de la fixation à l'ADN, l'hélice HI-1 se déplie induisant la déstructuration de ce module. Cependant, cet état est transitoire et le domaine revient rapidement à sa forme compacte (Flèche en gras). Les hélices α du domaine ETS (H1-H3) sont représentées en bleu, les brins β (S1-S4) en jaune. Les hélices des domaines inhibiteurs sont colorées en orange. D'après [46].

Les travaux, effectués sur les changements de conformation du module auto-inhibiteur d'Ets-1 lors de sa liaison à l'ADN, démontrent clairement que l'hélice HI-1 du domaine inhibiteur N-terminal de type hélice-pelote (« *helix-coil* ») se déstructure lors de la liaison d'Ets-1 à l'ADN [45, 46]. L'utilisation de mutants de délétion d'Ets-1 a également permis de démontrer l'importance du domaine inhibiteur C-terminal pour la stabilisation de l'hélice HI-1 [50].

Le modèle pour l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1 indique qu'en solution, le module auto-inhibiteur est compacté sur le domaine ETS *via* l'interaction des hélices des deux domaines inhibiteurs (HI-1, HI-2, H4, H5) avec l'hélice H1 du domaine ETS constituant un état inhibé. Lors de la fixation à l'ADN, l'hélice HI-1 du domaine inhibiteur N-terminal se déplie induisant la déstructuration du module auto-inhibiteur pour passer dans un état activé (Figure 10B). Néanmoins, cet état est transitoire. Le déplacement de l'équilibre vers l'état inhibé explique la faible affinité de liaison relative d'Ets-1, qui correspond à une réduction d'affinité d'un facteur 15 par rapport à une molécule dépourvue de module auto-inhibiteur [50, 54].

La levée de l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1 constitue un mécanisme clef lors de la sélection de ses gènes cibles. En effet, elle exige l'interaction avec des partenaires protéiques spécifiques dans le cadre d'une régulation combinatoire ou la présence d'une configuration particulière d'EBS organisés en répétition inversée (ou palindrome) (voir Chapitre III §II-2). L'auto-inhibition d'Ets-1 est donc une source de spécificité d'action pour ce facteur de transcription.

Au travers de l'ensemble des données présentées dans ce Chapitre, il apparaît clairement qu'Ets-1 partage des similarités de structure et de séquence avec d'autres protéines Ets, Ets-2 étant le facteur ayant le plus de points communs avec Ets-1. La spécificité d'action d'Ets-1 se situe notamment au niveau de la fixation sur ses promoteurs cibles grâce : (1) à la reconnaissance de séquences consensus particulières (EBS), capables d'établir des contacts spécifiques avec la protéine Ets-1 et, (2) à la faible affinité d'Ets-1 pour ses EBS due à son auto-inhibition de liaison à l'ADN dont la régulation participe grandement à la sélection des gènes ciblés par Ets-1 comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

Les données exposées au cours de ce chapitre fournissent des informations structurales sur la protéine Ets-1 et son mode de fixation à l'ADN. Nous allons maintenant nous intéresser

à la régulation d'Ets-1 dans le contexte cellulaire. Le Chapitre suivant traitera de la régulation de l'expression du gène *ets-1* et de son ARN messenger donnant naissance à différentes isoformes aux propriétés souvent antagonistes. Nous aborderons également les nombreuses modifications post-traductionnelles qui touchent Ets-1 et les intégrerons dans la signalisation cellulaire. Enfin, il sera présenté les différents mécanismes permettant de moduler l'auto-inhibition d'Ets-1.

CHAPITRE III : Régulation d'Ets-1

I/ Régulation de l'expression du gène *ets-1*

Le gène humain *ets-1* est localisé dans la région q23 du chromosome 11 et s'étend sur 60 kb. Son expression, régulée par différents signaux extracellulaires, est sous le contrôle d'un promoteur contenant des sites de fixation pour différents facteurs de transcription [55, 56]. Après l'activation de son promoteur, le gène *ets-1* est transcrit en un ARNm précurseur contenant 8 exons (numérotés A, III-IX) interrompus par 7 introns éliminés durant sa maturation. Chez l'Homme, cet ARNm mature est traduit pour produire la protéine Ets-1 de pleine longueur, Ets-1 p51 (Figure 11).

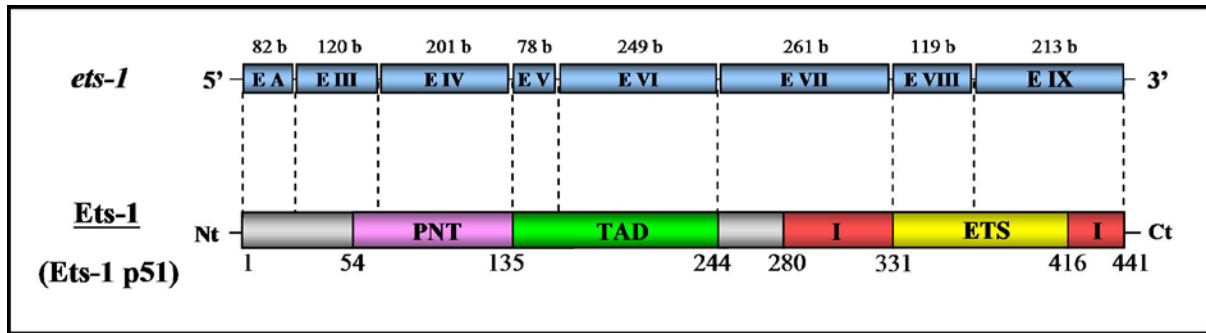


Figure 11 : Structure du variant *ets-1* codant la protéine Ets-1 humaine de pleine longueur, Ets-1 p51. Les exons sont représentés par des rectangles bleus dont la longueur est indiquée en nombre de bases (b). Les domaines protéiques codés par chaque exon sont délimités par des pointillés.

I-1/ Promoteur humain d'*ets-1* et ses facteurs régulateurs directs

Un certain nombre de sites fonctionnels pour des facteurs de transcription a pu être caractérisé au sein du promoteur du gène *ets-1* (Figure 12).

L'analyse de la séquence du promoteur du gène *ets-1* montre qu'il ne possède pas de boîtes TATA et CCAAT qui sont les sites généraux d'initiation de la transcription gouvernée par l'ARN polymérase de type II. Par contre, une région riche en GC est située à proximité du point d'initiation de la transcription (+1) en position -190 et +230 avec plus de 75% de bases GC [57] (Figure 12). Ce type de séquence est retrouvé classiquement dans les promoteurs des gènes domestiques (ou « *housekeeping genes* »). Le promoteur du gène *ets-1* contient également des éléments de régulation positive et négative qui permettent le recrutement de

facteurs de transcription responsables de son activation ou de sa répression (Figure 12) (Tableau 3).

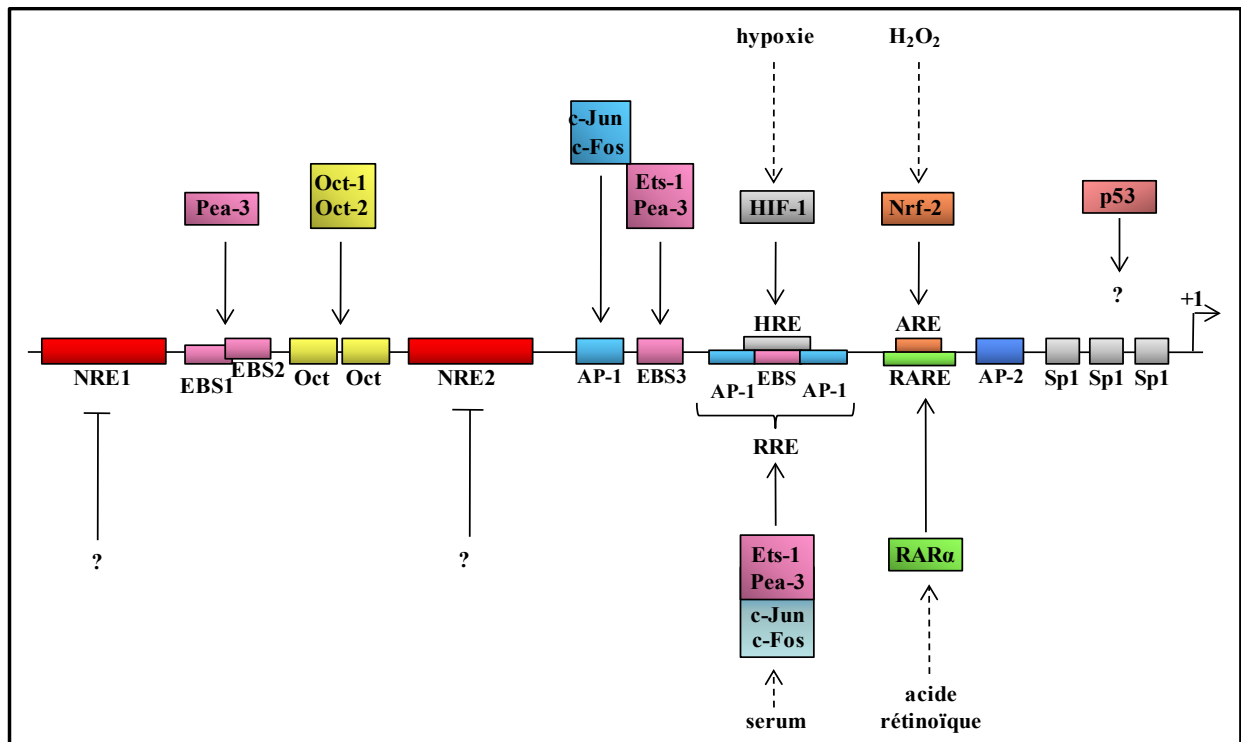


Figure 12 : Promoteur du gène *ets-1*.

Les rectangles rouges (NRE1 et NRE2) représentent les éléments de réponse négative et les autres, les éléments de réponse positive. Les flèches indiquent une activation du promoteur par des facteurs de transcription eux-mêmes (traits pleins) ou sous l'action de signaux extracellulaires (pointillés). Le +1 est le point d'initiation de la transcription.

Quelques précisions intéressantes sur la structure de ce promoteur sont à noter. Tout d'abord, la présence d'un élément de réponse à Ras (RRE) dans le promoteur d'*ets-1* pourrait être responsable de l'induction de son expression par le PMA (« phorbol 12-myristate 3-acetate » également dénommé TPA « 12-O-tétradecanoylphorbol 13-acetate »), ester de phorbol connu pour ses propriétés d'inducteur de tumeurs. Cette activation a été rapportée par différents auteurs [58-60]. En effet, ces éléments RRE jouent un rôle fondamental dans l'activation des promoteurs par des oncogènes et des esters de phorbol. D'autre part, on constate qu'Ets-1 est capable d'augmenter l'activité de son propre promoteur *via* l'EBS3 et l'EBS inclus dans le RRE (Figure 12) [57]. Il existe donc une boucle positive d'auto-activation de l'expression du gène *ets-1* [61]. Malgré sa forte identité avec Ets-1, le facteur Ets-2 est incapable d'engendrer cet effet [61]. Par contre, la protéine Pea-3 est un activateur

plus efficace qu'Ets-1 au niveau de ce promoteur [62]. Ceci résulte probablement de sa capacité à être recrutée sur les EBS1 et 2 contrairement à Ets-1 (Tableau 3).

Sites et facteurs activateurs		
Site(s)	Facteur(s) de transcription	Références
Sp1 x3	Sp1	[57]
AP-2	AP-2 (« <i>activator protein-2</i> »)	[63]
RARE (« <i>retinoic acid response element</i> »)	RAR α (« <i>retinoic acid receptor α</i> »)	[64]
ARE (« <i>antioxydant responsive element</i> »)	Nrf-2 (« <i>nuclear factor E2-related factor-2</i> »)	[65]
RRE (EBS+AP-1 x2) (« <i>Ras-responsive element</i> »)	Ets-1 ou Pea-3 avec le complexe AP-1 (c-Jun/c-Fos) (« <i>activator protein-1</i> »)	[57]
HRE (« <i>hypoxia responsive element</i> »)	HIF-1 α (« <i>hypoxia-inducible factor-1 α</i> »)	[66]
EBS (EBS3)	Ets-1 ou Pea-3	[62]
AP-1	Complexe AP-1 (c-Jun/c-Fos)	[57, 63]
Oct (« <i>octamer</i> ») x2	Oct-1 et Oct-2	[62]
EBS x2 (EBS1, EBS2)	Pea-3	[62]
Sites et facteurs répresseurs		
NRE (NRE2) (« <i>negative regulatory element</i> »)	Non déterminé(s)	[67]
NRE (NRE1)	Non Déterminé(s)	[67]

Tableau 3 : Sites présents dans le promoteur du gène *ets-1* et les facteurs régulateurs.

Les sites activateurs et répresseurs du gène *ets-1* et leur(s) facteur(s) régulateur(s) associé(s) sont présentés. Les sites sont classés selon leur fonction activatrice ou répressive et de la position proximale à la position distale par rapport au promoteur. La présence de sites multiples est indiquée par un x suivi du nombre de sites. Tous les sites ci-dessus sont également représentés en Figure 12.

Les seuls éléments répresseurs identifiés dans le promoteur d'*ets-1* sont les deux éléments NRE1 et NRE2, situés dans la partie plus distale du promoteur de part et d'autre de

la région contenant les EBS1 et 2 et les sites Oct (Figure 12). Leur délétion induit une importante augmentation de l'activité basale du promoteur de plus de 20 fois [67]. L'utilisation de constructions du promoteur du gène *ets-1* a permis de démontrer que les capacités répressives du site NRE2 sont plus fortes que celles du site NRE1. D'après les auteurs, la localisation du site NRE2 à proximité des éléments de réponse positive pourrait être à l'origine du blocage de l'accès de facteurs activateurs à leurs sites de liaison [67]. Des complexes protéine-ADN spécifiques ont pu être mis en évidence au niveau des NRE, à partir d'extraits nucléaires de cellules lymphoïdes [67]. Néanmoins, aucun facteur de transcription n'a été identifié. L'analyse de la séquence de ces éléments par bioinformatique suggère l'existence d'un site pour le facteur YY1 (« *ying-yang 1* ») [68], qui possède des capacités de répresseur transcriptionnel [69]. Jusqu'à ce jour un seul facteur de transcription capable d'inhiber l'activité de ce promoteur a pu être caractérisé. Il s'agit du suppresseur de tumeur p53 sous sa forme sauvage. La protéine p53 mutée est incapable d'induire cet effet répresseur. Bien qu'aucun site de liaison pour p53 n'ait été mis en évidence, cette protéine est détectée au niveau de la région -30 du promoteur du gène *ets-1* grâce à des expériences de pontage par les rayons UV (Figure 12). Ceci suggère que p53 serait recrutée au niveau du promoteur d'*ets-1* par des interactions protéine-protéine [70].

I-2/ Signaux extracellulaires

I-2-1/ Signaux activateurs

Des travaux ont mis en évidence l'action de certains signaux extracellulaires sur l'activation du promoteur du gène *ets-1* via la fixation de facteurs de transcription comme décrit dans le §I-1 de ce Chapitre (Figure 12). C'est le cas : (1) de l'acide rétinoïque, un agent différenciant, qui augmente le taux d'ARNm *ets-1* dans des ostéoblastes et des cellules de carcinome épidermoïde [64, 71, 72], (2) du stress oxydant causé par H₂O₂ qui stimule la synthèse de la protéine Ets-1 aboutissant à une augmentation de l'activité du promoteur dans des cellules de carcinome ovarien [65] et (3) de l'hypoxie qui aboutit également à l'induction de la transcription du gène *ets-1* dans des cellules de carcinome de la vessie et des cellules endothéliales [66].

Néanmoins, d'autres signaux extracellulaires activent l'expression d'*ets-1* bien que les modalités d'action de ces molécules soient inconnues (Figure 13). Il s'agit de facteurs de croissance tels que l'EGF (« *epidermal growth factor* ») [73, 74], le FGF (« *fibroblast growth factor* ») [75, 76], le PDGF (« *platelet-derived growth factor* ») [75] ou encore le TGF-β («

transforming growth factor-β») [76, 77]. Cette régulation intervient dans des types cellulaires variés, des fibroblastes aux cellules endothéliales ainsi que dans des cellules carcinomateuses. De manière plus restreinte, l'expression du gène *ets-1* est stimulée par le facteur de dissémination HGF/SF (« *hepatocyte growth factor/scatter factor* ») dans des cellules épithéliales [78], par le VEGF (« *vascular endothelial growth factor* ») et le bFGF (« *basic fibroblast growth factor* ») dans des cellules endothéliales [79, 80] ainsi que par le PDGF-BB dans des cellules musculaires lisses vasculaires, VSMC (« *vascular smooth muscle cells* ») [59]. Pour l'ensemble de ces facteurs, il a pu être mis en évidence que leur action passe par la voie de signalisation Ras-MAPK et par l'activation des kinases d'ERK-1/2. Par ailleurs, certaines cytokines, pro-inflammatoires comme l'IL-1 α (« *interleukine-1 α* ») [75], l'IL-1 β [81] et le TNF- α (« *tumor necrosis factor- α* ») [75, 82], ou pro-angiogéniques comme le CCL-2 (« *CC chemokine ligand-2* ») [83], empruntent également cette voie de signalisation afin d'augmenter l'expression du gène *ets-1* (Figure 13).

D'autres voies de signalisation cellulaires impliquant des kinases différentes d'Erk-1/2 peuvent être également responsables d'une expression accrue d'Ets-1. Il s'agit de voies qui stimulent : (1) la MAPK p38 lors du processus de régénération endothéliale consécutif à une dénudation de ce tissu, (2) la kinase FAK (« *focal adhesion kinase* ») dans les cellules endothéliales après interaction avec le collagène de type I [84]. Au centre de cette signalisation, l'expression du gène *ets-1* est également induite par l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, récepteur membranaire à certains composants de la matrice extracellulaire (MEC) dont le collagène de type I [85] (Figure 13). Et (3) la voie PI3K (« *phosphatidylinositol 3-kinases* »)/Akt dans des cellules de carcinomes ovarien et prostatique [86, 87] (Figure 13).

Enfin, l'expression du gène *ets-1* peut être due à une stimulation hormonale par les œstrogènes [88], à des peptides modulateurs de la vasomotricité comme l'endothéline-1 [59] et l'angiotensine II [89] ou encore à une production d'oxyde nitrique (NO) par des cellules endothéliales [90] (Figure 13).

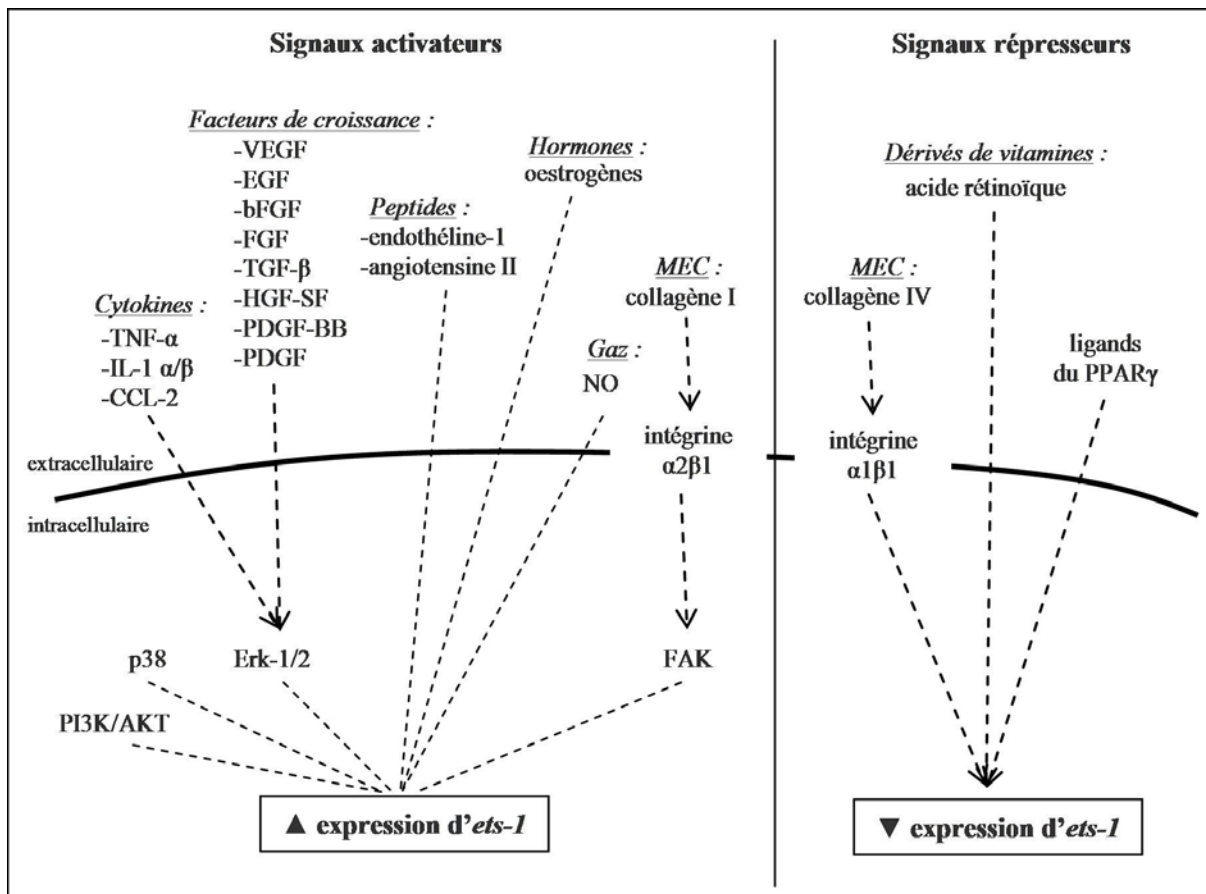


Figure 13 : Régulation de l'expression du gène *ets-1* par des signaux extracellulaires.

Les signaux indiqués sont ceux pour lesquels aucun facteur de transcription en aval n'a été identifié comme responsable de la régulation directe du promoteur.

I-2-2/ Signaux répresseurs

Il existe également des signaux extracellulaires répresseurs de l'expression d'Ets-1 (Figure 13). Par exemple, un changement dans la nature de la MEC, qui au lieu du collagène de type I, serait constituée de collagène de type IV aura un effet inverse sur l'expression du gène *ets-1*. En effet, le collagène de type IV est reconnu par l'intégrine $\alpha 1\beta 1$, et non par l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, ce qui a pour conséquence de réduire le niveau d'ARNm d'*ets-1* [85]. L'expression du gène *ets-1* pourra donc être modulée en fonction du type de molécules de la MEC en interaction avec les cellules.

Par ailleurs, des ligands synthétiques du récepteur PPAR γ (« *peroxysome proliferator-activated receptor γ* ») sont capables de bloquer l'augmentation du taux d'ARNm *ets-1* en réponse au PDGF dans des cellules VSMC [91]. Le PPAR γ activé interfère avec la voie de signalisation du PDGF en aval des MAPKs Erk-1/-2, suggérant l'inhibition d'un facteur de transcription présent au niveau du promoteur d'*ets-1* [92].

Enfin, nous pouvons citer l'acide rétinoïque qui a une fonction bivalente dans la régulation du gène *ets-1*. En effet, d'abord décrit comme un activateur *via* son récepteur RAR α (Figure 12), il a ensuite été mis en évidence que l'acide rétinoïque bloque l'induction de l'ARNm *ets-1* en interférant avec les voies du bFGF et du TNF- α dans des cellules endothéliales [93]. Il inhibe également l'activation du promoteur d'*ets-1* induit par le PMA, ceci probablement au niveau de l'élément potentiel de réponse au PMA, le RRE (Figure 12). Ceci est d'autant plus vraisemblable que ces récepteurs sont connus pour interférer avec la liaison du complexe AP-1 au niveau du RRE de certains promoteurs, comme celui du gène de la collagénase-1 (MMP-1 « *matrix metalloproteinase-1* ») [94]. L'ensemble des données suggère que l'acide rétinoïque agit selon des mécanismes distincts en fonction du contexte cellulaire.

I-3/ Régulation par l'expression de variants d'épissage

L'expression du gène *ets-1* est également régulée par le processus d'épissage alternatif. Il consiste en l'élimination de séquences exoniques en parallèle des introniques au cours de la maturation de l'ARNm précurseur. Il en résulte la production d'ARNms matures, désignés variants d'épissage, dépourvus de certaines régions codantes.

I-3-1/ Variants d'épissage de l'ARNm *ets1*

L'ARNm précurseur, issu de l'activation du promoteur du gène *ets-1*, contient 8 exons (numérotés A, III-IX) interrompus par 7 introns éliminés durant sa maturation [55, 56]. Il en résulte la génération d'un transcrit *ets-1* majoritaire de pleine longueur qui s'étend sur 6,8 kb (Figure 14).

L'ARNm *ets-1* précurseur peut également être sujet à l'élimination de séquences par le mécanisme d'épissage alternatif. En effet, une analyse par « *Northern blot* » des ARNm purifiés *via* leur queue poly-A a mis en évidence la présence d'un transcrit *ets-1* de 2,7 kb (en plus de celui de 6,8 kb) dans les cellules lymphoïdes [95]. Celui-ci conserve les 8 exons du gène *ets-1* mais est dépourvu d'une partie de la région 3' non codante du transcrit de 6,8 kb. Puisqu'il existe plusieurs sites de polyadénylation dans l'ARNm précurseur d'*ets-1*, ceci suggère que ce nouveau variant est issu de l'utilisation d'un site de polyadénylation différent. D'ailleurs, ce variant de 2,7 kb est moins stable que le transcrit majoritaire, ce qui est en corrélation avec le rôle de la queue polyA dans la stabilisation des ARNm [95].

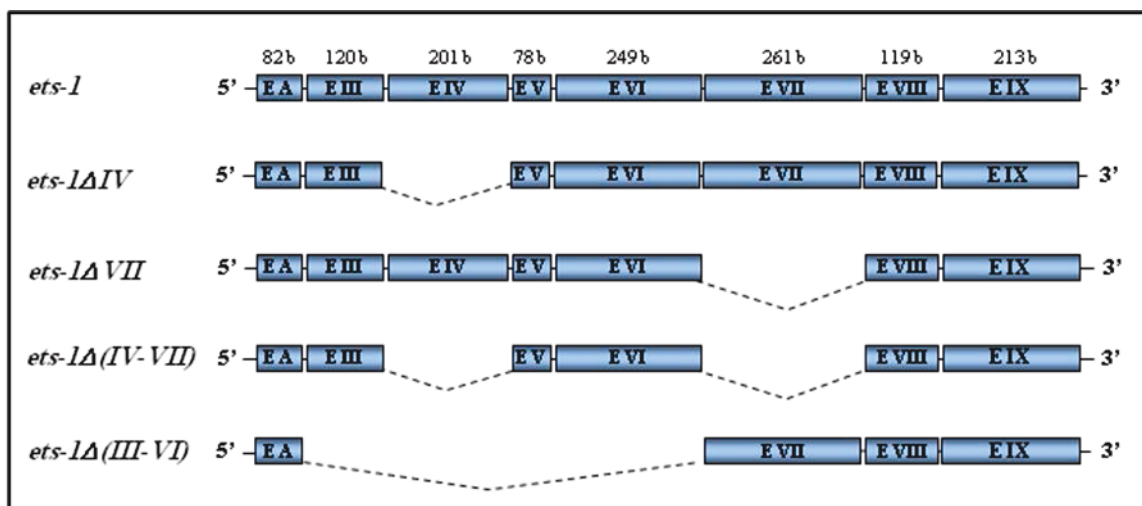


Figure 14 : Structure des différents variants de l'ARNm *ets-1* humain.

Les exons (E) sont représentés par des rectangles bleus et leur longueur est indiquée en nombre de bases (b). D'après [56, 96].

Plusieurs travaux, menés dans des lymphocytes périphériques ainsi que dans les cellules blastiques prélevées chez des patients atteints de leucémie [56, 95], ont ensuite permis d'identifier des variants d'épissage de l'ARNm *ets-1* humain ne possédant pas les exons IV, VII ou les deux. Ils sont respectivement désignés *ets-1ΔIV*, *ets-1ΔVII* et *ets-1Δ(IV-VII)* (Figure 14).

Le variant résultant de l'épissage alternatif de l'exon VII avait été préalablement détecté dans une étude réalisée sur les cellules T humaines, MOLT-4 [97]. De façon intéressante, ce variant *ets-1ΔVII*, identifié chez l'homme, est retrouvé chez d'autres espèces telles que le rat, la souris et le lapin [55, 98].

Un nouveau transcrite d'*ets-1* de 0,3 kb a été récemment identifié par notre équipe lors de l'isolement de l'ADNc d'*ets-1* de lapin dans des cellules d'une lignée de fibroblastes synoviaux, HIG-82 [96]. Il s'agit d'un nouveau variant d'épissage alternatif, désigné *ets-1Δ(III-VI)*, qui est constitué des exons A et VII à IX, mais ne possède pas les exons III à VI (Figure 14). Le patron d'expression de ce variant suit celui d'*ets-1*. Néanmoins, le taux de ce transcrite alternatif est généralement très faible comparé à celui du transcrite de pleine longueur *ets-1* [96].

I-3-2/ Isoformes d'Ets-1

Parmi les variants d'épissage décrits précédemment, seuls *ets-1ΔVII* et *ets-1Δ(III-VI)* ont été mis en évidence au niveau protéique. Ils sont appelés respectivement Ets-1 p42 et Ets-

1 p27. Elles constituent les seules isoformes connues chez l'Homme, à ce jour, de la protéine Ets-1, également appelée Ets-1 p51 (Figure 15).

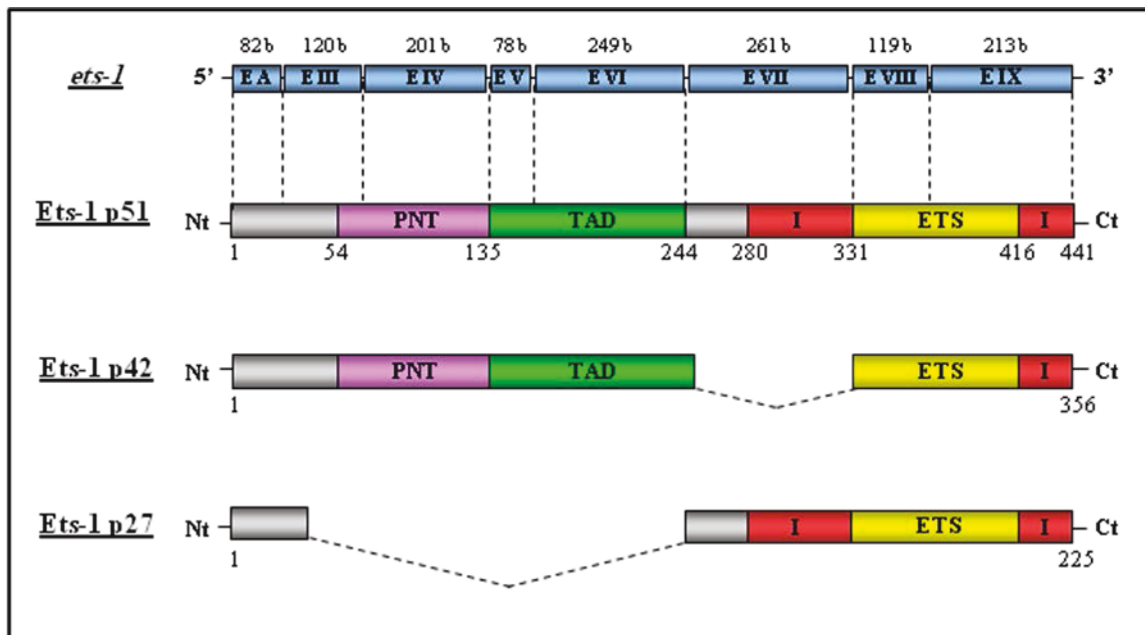


Figure 15 : Les isoformes de la protéine Ets-1 : Ets-1 p51, Ets-1 p42 et Ets-1 p27.

Les domaines fonctionnels sont représentés : le domaine Pointed (PNT) en violet, le domaine de transactivation (TAD) en vert, les domaines inhibiteurs (I) en rouge, le domaine de liaison à l'ADN (ETS) en jaune. La numérotation en nombre d'acides aminés est indiquée. La structure de l'ARNm *ets-1* est figurée et alignée par rapport à la structure de la protéine Ets-1 p51.

I-3-2-1/Ets-1 p42

Une étude menée en 1990 sur les cellules T murines, KB5-C20, décrit l'expression de deux isoformes d'Ets-1 [99]. L'isoforme minoritaire de plus faible poids moléculaire n'est pas détectée avec un anticorps dirigé contre le domaine codé par l'exon VII. La même année, une autre étude menée sur les cellules T humaines, CEM, montre l'existence d'une protéine de 42 kDa, détectée à l'aide de différents anticorps monoclonaux dirigés contre Ets-1 mais pas avec celui ciblant le domaine codé par l'exon VII [100]. Cette isoforme, dénommée Ets-1 p42, est donc codée par le variant *ets-1ΔVII*, qui est effectivement exprimé dans ce modèle cellulaire. Ets-1 p42 ne contient donc plus les acides aminés 245 à 331 comprenant le domaine inhibiteur N-terminal (Figure 15). L'isoforme Ets-1 p42 a ensuite été décrite dans des modèles cellulaires variés tels que les cellules humaines de carcinome colique [101, 102] ou mammaire [103, 104], de mélanome [103], de prostate [105] mais aussi dans les cellules T normales ou issues de leucémie et dans les astrocytes normaux ou issus d'astrocytome [106].

La différence fondamentale entre Ets-1 p51 et Ets-1 p42 se situe au niveau de leurs capacités de liaison à l'ADN. En effet, la fixation d'Ets-1 p51 à l'ADN est régie par le mécanisme d'auto-inhibition contrairement à celle d'Ets-1 p42. Ceci signifie que dans le cas des promoteurs contenant un EBS isolé, ceux-ci seront préférentiellement activés par Ets-1 p42 puisqu'elle possède une affinité de liaison plus forte qu'Ets-1 p51. Ceci a pu être démontré en particulier au niveau du promoteur de la caspase-1 (« *cysteiny-l-aspartate-specific protease-1* ») possédant un EBS situé en position -525 [107]. L'action spécifique d'Ets-1 p42 sur ce promoteur lui confère une fonction biologique propre. En effet, Ets-1 p42 est capable d'induire l'apoptose dans des cellules de carcinome de colon DLD-1 contrairement à Ets-1 p51 [101]. De plus, l'augmentation de l'expression d'Ets-1 p42 induit l'apoptose de ces cellules dans des conditions de faibles concentrations en sérum [101]. D'autre part, une réduction du taux de survie est observée après la surexpression d'Ets-1 p42 dans des cellules de carcinome mammaire invasif, MDA-MB-231, mais pas dans la lignée moins agressive, MCF-7 [103].

L'impact de l'expression d'Ets-1 p42 sur la survie est également décelable lors du développement des lignées lymphocytaires. En effet, un doublement du taux d'apoptose des lymphocytes B et T de la rate est détecté dans des souris transgéniques n'exprimant que l'isoforme Ets-1 p42. Néanmoins, il est à noter que chez ces mêmes souris la prolifération des lymphocytes T est fortement accrue dans le thymus ce qui suggère qu'Ets-1 p42 n'a pas toujours un effet pro-apoptotique [108].

I-3-2-2/ Ets-1 p27

L'auto-inhibition de liaison à l'ADN, source de spécificité d'Ets-1, est également le mécanisme gouvernant la fixation à l'ADN de l'isoforme Ets-1 p27. Des travaux menés par notre équipe ont montré que cette isoforme est un dominant négatif de la protéine Ets-1 p51 de pleine longueur, qui agit à la fois sur ses propriétés transcriptionnelles et sur sa localisation subcellulaire (Figure 16) [96].

En effet, Ets-1 p27 est incapable d'activer la transcription d'un promoteur cible d'Ets-1 p51, tel que celui de la stromélysine-1 (MMP-3). Par contre, elle se fixe sur les EBS empêchant ainsi la fixation d'Ets-1 p51 (Figure 16B). Ets-1 p27 peut également restreindre l'activité transcriptionnelle d'autres membres de la famille Ets comme Ets-2 et Pea-3 [96].

Par ailleurs, Ets-1 p27 est capable de délocaliser la protéine Ets-1 p51 du noyau vers le cytoplasme agissant ainsi comme un dominant négatif de localisation subcellulaire (Figure

16B). En effet, Ets-1 p51 est connue pour avoir une localisation majoritairement nucléaire alors qu'Ets-1 p27 est localisée équitablement dans le noyau et le cytoplasme [96]. Lors de la surexpression d'Ets-1 p27, la totalité d'Ets-1 p51 est délocalisée dans le cytoplasme [96]. Le mécanisme à la base de cette délocalisation n'est pas encore connu. Néanmoins, plusieurs événements de délocalisation ont été décrits pour Ets-1 p51, ils seront abordés dans les §I-4 et §II-1-1 de ce chapitre. Nous pouvons supposer qu'Ets-1 p27 pourrait interférer avec ces mécanismes.

Enfin, les travaux de notre équipe ont montré que la surexpression stable d'Ets-1 p27 réduit la tumorigénicité des cellules de carcinome mammaire invasif MDA-MB-231 chez la souris en contrant l'action d'Ets-1 p51 [96].

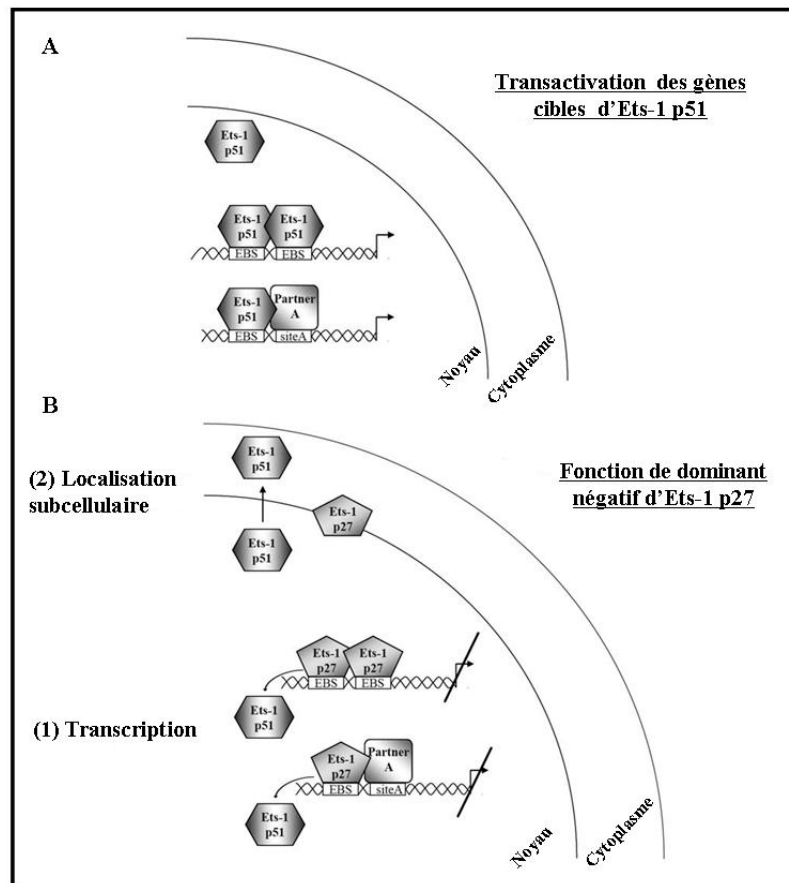


Figure 16 : Modèle de la fonction de dominant négatif d'Ets-1 p27.

A : Activation transcriptionnelle des gènes cibles d'Ets-1 p51. Pour lever son auto-inhibition de liaison à l'ADN, la protéine nucléaire Ets-1 p51 se fixe sur les promoteurs cibles contenant : (1) des EBS en palindromes voir §II-2-2 ou (2) des éléments pour recruter Ets-1 p51 *via* l'interaction avec des partenaires d'interaction voir §II-2-1.

B : Fonction de dominant négatif d'Ets-1 p27. **(1)** Dominant négatif transcriptionnel. Ets-1 p27 auto-inhibée se lie à l'ADN de la même façon qu'Ets-1 p51, bloquant ainsi l'accès aux EBS à Ets-1 p51. **(2)** Dominant négatif de la localisation cellulaire. Ets-1 p27 est capable de délocaliser Ets-1 p51 du noyau vers le cytoplasme. D'après [96].

La génération par épissage alternatif d'isoformes de la protéine Ets-1 semble donc être un moyen mis en place pour étendre la fonction de ce facteur à d'autres gènes cibles *via* l'isoforme Ets-1 p42 mais aussi pour établir un rétrocontrôle négatif de l'activité d'Ets-1 *via* l'isoforme Ets-1 p27.

I-4/ Régulation par des microARN

Les microARN ou miR sont une classe d'ARN non codant long de 20 à 25 nucléotides qui participent à la régulation de l'expression des gènes. Celle-ci s'effectue par la fixation des miR *via* leur extrémité 5' UTR (« *untranslated region* ») sur l'extrémité 3' UTR des ARNm cibles grâce à une complémentarité de séquence. Ceci aura pour conséquence le blocage de la traduction de l'ARNm voire, dans certains cas, conduira à sa dégradation [109] (Figure 17). A ce jour, plusieurs centaines de miR ont été identifiés mais il pourrait en exister plus d'un millier [110]. L'expression des miR obéit à un processus assez particulier. En effet, ils sont codés par des séquences inter-géniques ou positionnées en orientation antisens d'un gène. Ils sont d'abord transcrits sous forme d'un long précurseur, appelé pri-miR (« *primary transcript* »), puis transformés en pre-miR (« *precursor* ») par le complexe Drosha (Figure 17). Ensuite ils sont exportés dans le cytoplasme puis maturés en miR par le complexe Dicer (Figure 17). Enfin, ils sont intégrés au complexe RISC (« *RNA-induced silencing complex* ») où ils pourront reconnaître leur(s) ARNm cible(s) et empêcher leur traduction. Les miR ne régulent généralement pas un seul ARNm mais plusieurs d'entre eux codant souvent pour des protéines impliquées dans les mêmes processus physiologiques. Ainsi, les miR s'intègrent dans un vaste réseau de régulation des voies de signalisation cellulaire [109].

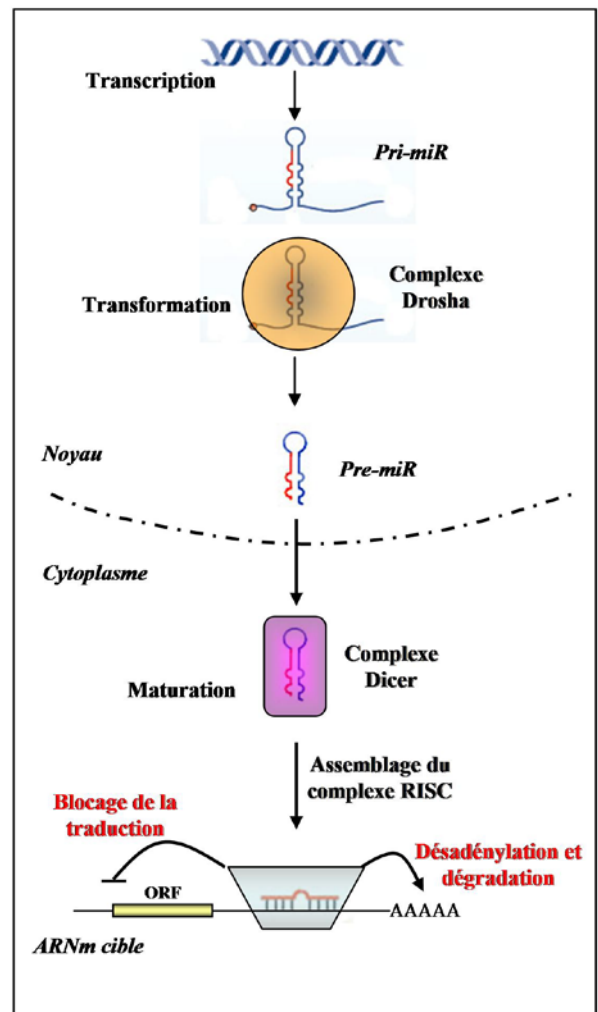
Ces cinq dernières années, de nombreuses études ont mis en évidence la régulation de l'ARNm *ets-1* par des miR. Les mieux caractérisées sont celles effectuées par la famille miR-200 et par miR-222.

En effet, des travaux, menés sur l'origine embryonnaire des progéniteurs endothéliaux, ont montré que la famille des miR-200 réprime l'expression d'Ets-1 au sein des cellules de l'endoderme primitif [111]. L'expression de la protéine Snail permet l'inhibition de l'expression des miR-200 ce qui permet *via* Ets-1 de favoriser la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et la différenciation en cellules endothéliales [111]. Ceci conforte le rôle essentiel d'Ets-1 dans l'EMT et l'angiogenèse, aspects qui seront développés dans le Chapitre IV. De plus, Le lien entre Ets-1 et les miR-200 s'observe également lors de la néo-

angiogénèse. En effet, une étude a montré que, dans les cellules endothéliales, miR-200b inhibe l'ARNm *ets-1* [112]. Lors de l'hypoxie, qui stimule l'expression du gène *ets-1* (voir §I-1), l'expression de miR-200b est réprimée permettant ainsi de laisser libre cours aux propriétés pro-angiogéniques d'Ets-1 [112]. En dehors des cellules endothéliales, les miR-200 répriment aussi l'EMT provoquée par Ets-1 dans les cancers. Ainsi, de récents travaux ont permis de constater que la réexpression du miR-200c dans des cellules de carcinome colorectal permettait d'empêcher l'EMT en réprimant l'ARNm *ets-1* [113].

Figure 17 : Processus d'expression, de maturation et modes d'action des miR.

Les différentes étapes de la maturation des miR sont représentées : la transcription à partir de la séquence intergénique ou en antisens d'un gène, la transformation du pri-miR en pre-miR par le complexe Drosha, l'exportation vers le cytoplasme, la maturation en miR par le complexe Dicer et enfin l'association avec le complexe RISC. Il est également représenté la fixation du miR sur son ARNm cible engendrant soit le blocage de la traduction en réprimant l'initiation et l'élongation au niveau de l'ORF (« *open reading frame* ») soit, dans certain cas, la dégradation de l'ARNm en désadénylant la queue polyA en 3'UTR responsable de sa stabilité. D'après [109].



Le miR-222 est également connu pour réguler Ets-1. Les premiers travaux, effectués dans le cadre pathologique de l'athérosclérose, ont montré qu'Ets-1, qui est fortement impliquée dans cette pathologie (voir Chapitre IV §II-2-2-3), pouvait être inhibée directement par trois miR : le miR-155 et le « cluster » miR-221/222 [114]. Ceci permet d'empêcher la prolifération des cellules endothéliales, leur migration et l'inflammation associées à l'athérosclérose. Peu de temps après, une étude a montré que la migration des cellules

endothéliales dans le sarcome de Kaposi était due à la forte expression d'Ets-1, provoquant néo-angiogenèse et métastases [115]. Or, cette forte expression est la conséquence de l'inhibition de la transcription du gène *miR-222* par le virus KSHV (« *Kaposi sarcoma-associated herpes virus* »), agent étiologique du sarcome de Kaposi [115]. De plus, au sein des mélanomes métastatiques, *miR-222* réprime l'expression d'Ets-1 et permet même la délocalisation des protéines Ets-1 non phosphorylées dans le cytoplasme selon un mécanisme inconnu [116]. Néanmoins, les protéines Ets-1 phosphorylées sur la thréonine 38, forme transcriptionnellement active d'Ets-1 (voir §II-1-1-1-a), restent nucléaires. Ceci va paradoxalement permettre de favoriser le processus métastatique en augmentant la proportion d'Ets-1 active dans le noyau [116]. Contrairement aux miR décrits précédemment, *miR-222* ne peut donc pas être considéré comme anti-tumoral car il ne réprime que partiellement l'expression et l'activité d'Ets-1.

Un certain nombre d'autres miR régulent l'expression d'Ets-1. Nous pouvons citer les miR 208 et 370 qui empêchent la différenciation, due à Ets-1, des pré-ostéoblastes lors de l'ostéogenèse (voir chapitre IV §I-5) [117, 118]. L'action de *miR-155* qui réprime Ets-1 pour bloquer la différenciation des mégacaryocytes [119] et de *miR-326* qui inhibe Ets-1 pour stimuler la différenciation des lymphocytes T en TH-17 (« *Interleukin 17-producing T helper cells* ») [120]. Enfin des miR dont l'expression est perdue lors de cancers laissant la voie libre à Ets-1 : *miR-125b* dans le cancer du sein [121] et les *miR-1*, 193b et 499 dans le cancer du foie [122, 123].

II/ Régulation de l'activité transcriptionnelle d'Ets-1

II-1/ Régulation par des modifications post-traductionnelles

L'activité d'Ets-1 est régulée au niveau post-traductionnel par diverses modifications qui permettent de moduler ses capacités de liaison à l'ADN, son pouvoir transactivateur ou sa stabilité. Ces modifications sont contrôlées par différentes voies de signalisation cellulaire. La voie principale d'activation d'Ets-1 est celle des Ras-MAPKs qui aboutit à la phosphorylation de la thréonine 38. Quant à la répression de son activité, elle résulte majoritairement de la phosphorylation des résidus sérines dans le domaine codé par l'exon VII en réponse à l'augmentation du taux de calcium intracellulaire. D'autres voies sont également impliquées dans la régulation de l'activité d'Ets-1.

La protéine Ets-1 subit plusieurs modifications post-traductionnelles, au niveau d'un certain nombre d'acides aminés, telles que : (1) la phosphorylation (T38, S251, S270, S273, S282, S285), (2) la SUMOylation (K15, K227), (3) l'ubiquitination (K48) ou (4) l'acétylation (Figure 18).

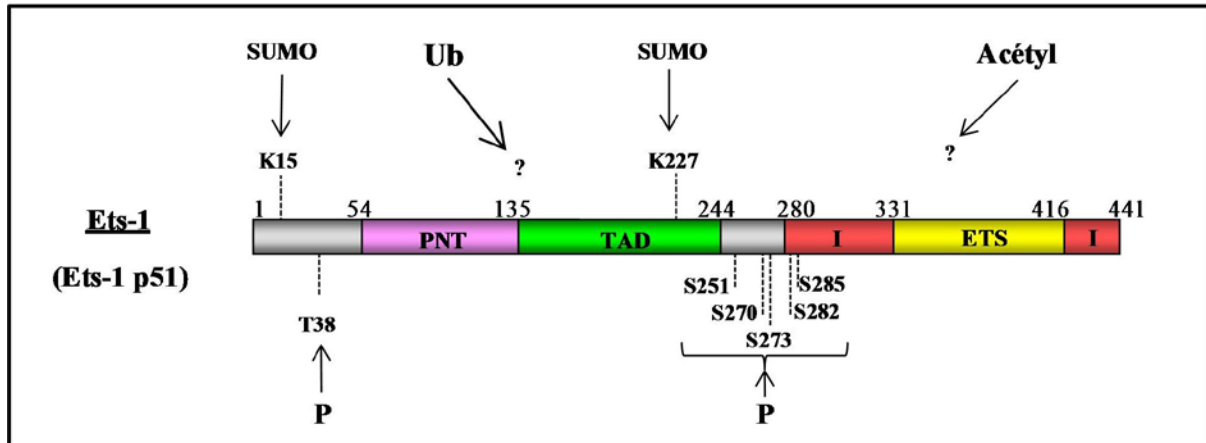


Figure 18 : Les sites de modifications post-traductionnelles de la protéine Ets-1 p51.

Les domaines fonctionnels sont représentés : le domaine Pointed (PNT) en violet, le domaine de transactivation (TAD) en vert, les domaines inhibiteurs (I) en rouge, le domaine de liaison à l'ADN (ETS) en jaune. Les résidus indiqués peuvent être modifiés par : (1) phosphorylation (P) sur la thréonine (T) en position 38 et sur les sérines (S) en position 251, 270, 273, 282 et 285, (2) SUMOylation (SUMO) sur les lysines (K) en position 15 et 227, (3) ubiquitination (Ub) et acétylation (Acétyl) sur des résidus non identifiés.

II-1-1/ Phosphorylation

II-1-1-1/ Activation de la protéine Ets-1

II-1-1-1-a/ Voie des Ras-MAPKs et phosphorylation de la thréonine 38

Les MAPKs, dont les principales sont Erk-1/-2, JNK-1/-2/-3 (« *c-Jun N-terminal kinase* ») et p38- α - β - γ - δ , sont activées en réponse à une cascade de réactions intracellulaires après stimulation de récepteurs membranaires. De manière générale, les kinases Erk-1/-2 sont activées en réponse aux facteurs de croissance alors que les protéines JNK et p38 le sont plutôt par des cytokines inflammatoires et des stimuli de stress [124, 125].

Dans le cas d'Ets-1, c'est la voie Ras-MAPK Erk-1/-2 qui est responsable de son activation par phosphorylation d'un résidu thréonine localisé en position N-terminale du domaine PNT et plus précisément en position 38 (T38) (Figure 18). Ce résidu appartient au motif de phosphorylation PLLTP (où P est la proline et L la leucine) [126].

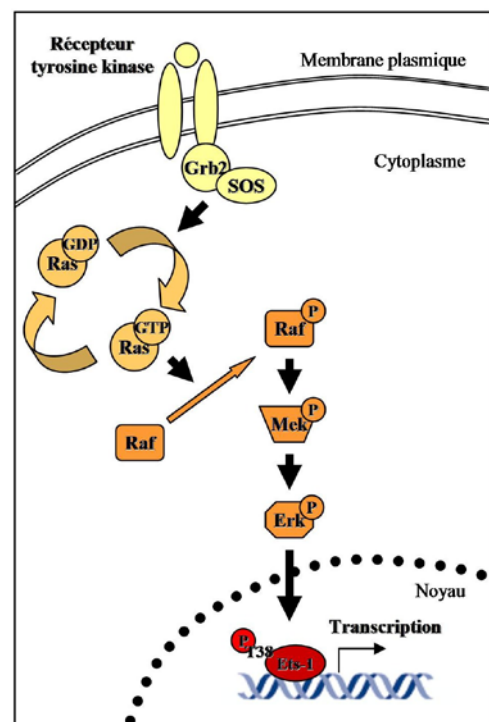
La transduction d'un signal empruntant la voie Ras-MAPK s'amorce par la stimulation d'un récepteur de la membrane plasmique à activité tyrosine kinase. Ceci induit l'activation de petites GTPases de la famille Ras par l'intermédiaire des protéines adaptatrices

(Figure 19). Ainsi, la protéine Ras permute le GDP en GTP, modifiant sa conformation et lui permettant de phosphoryler des protéines effectrices telles que les kinases Raf (qui sont des MAP kinase kinase kinases). Une fois phosphorylée, la protéine Raf phosphoryle les protéines Mek (qui sont des MAP kinase kinases) qui, par la suite, en font de même avec les protéines Erk (Erk-1/-2 ; MAP kinase) (Figure 19). Ces dernières sont alors transloquées dans le noyau où elle phosphoryle des facteurs de transcription, dont Ets-1, ce qui stimule la transcription de leurs gènes cibles [127].

La phosphorylation d'Ets-1 au niveau de la thréonine 38 a un impact très important sur ses capacités transactivatrices, mais n'affecte pas sa liaison à l'ADN [126, 128]. En effet, la simple mutation de cette thréonine 38 suffit à réduire drastiquement l'activité transcriptionnelle d'Ets-1 [126]. La phosphorylation d'Ets-1 par Erk1/2 favorise la transactivation due à Ets-1 sur des sites, dits composites, contenant un EBS et un site AP-1 pour le complexe c-Jun/c-Fos. Des études montrent ainsi, qu'après stimulation de la voie MAPK par le facteur de dissémination HGF/SF, on observe une forte activité d'Ets-1 au niveau de promoteurs possédant un site RRE (constitué de sites EBS et AP-1 voir §I-1) [126, 129]. Ceci permet l'activation rapide de certains gènes au niveau d'éléments RRE. C'est le cas pour des gènes de protéases qui digèrent la MEC, tels que ceux de l'uPA (« *urokinase plasminogen activator* »), de la collagénase-1 (MMP-1) et de la gélatinase-B (MMP-9) [74, 130].

Figure 19 : Voie Ras-MAPK.

Suite à leur activation, les récepteurs membranaires stimulent *via* les protéines Grb2 et SOS la GTPase Ras qui convertit son GDP en GTP. La protéine Ras-GTP stimule par phosphorylation la protéine Raf qui induit l'activation en cascade de Mek et Erk. La kinase Erk phosphorylée est alors transloquée dans le noyau où elle active des facteurs de transcription dont Ets-1 en la phosphorylant sur sa thréonine 38. Adapté pour Ets-1 d'après [127].



Cette augmentation d'activité par phosphorylation d'Ets-1 s'explique probablement par le fait qu'elle favorise son interaction avec certains partenaires. En effet, celle-ci permet une action synergique avec les protéines de la famille AP-1 au niveau des éléments RRE des protéases matricielles [74, 130, 131]. Cette phosphorylation facilite également la coopération transcriptionnelle avec le facteur hypophysaire GHF-1/Pit-1 au niveau d'un RRE non conventionnel, présent dans le promoteur du gène de la prolactine [132, 133]. Il est à noter que la présence d'un RRE dans le promoteur du gène *ets-1* suppose que l'induction de son expression, en réponse à la voie Ras-MAPK (voir Chapitre IV §I-2-1), soit due à Ets-1 elle-même après sa phosphorylation par Erk-1/2.

Les études structurales menées sur le domaine Pointed et le motif PLLTP d'Ets-1 montrent que la phosphorylation de la thréonine 38 n'induit aucun changement structural [37]. Ces travaux n'ont donc pas permis d'apporter d'éléments relatifs au mécanisme d'action de la phosphorylation d'Ets-1. Néanmoins, grâce à des expériences de chromatographie d'affinité utilisant Ets-1 immobilisée sur une colonne, il a été mis en évidence que les co-activateurs CBP (« *CREB* (« *cAMP response element binding* »)-*binding protein* ») et p300 (« *E1A binding protein p300* ») sont recrutés préférentiellement par la forme phosphorylée d'Ets-1 au niveau de la thréonine 38 [134]. L'activité acétyl-transférase de CBP et p300 est nécessaire à l'activation des promoteurs cibles d'Ets-1 tels que celui du gène de la stromélysine-1 (MMP-3) [135]. L'interaction avec CBP et p300 implique le domaine PNT, contenant le motif de phosphorylation ciblé par Erk-1/-2, et le domaine TAD nécessaire à la transactivation des gènes cibles [126]. Cette étude permet de faire le lien avec des travaux précédents montrant qu'Ets-1 recrute les co-activateurs CBP et p300 afin de transactiver certains de ses gènes cibles [126, 135].

II-1-1-1-b/ Autres voies

Dans les cellules humaines de carcinome mammaire invasif, MDA-MB-231, il a été mis en évidence qu'Ets-1 (sauf l'isoforme Ets-1 p42) est phosphorylée par la PKC- α (« *protein kinase C- α* »), qui est une sérine/thréonine kinase, au niveau de la région codée par l'exon VII (Figure 18) [136]. Cette phosphorylation permet d'activer Ets-1. Ceci est démontré au niveau du promoteur P3 de la PTHrP (« *parathyroid-hormone-related protein* »), hormone apparentée à l'hormone parathyroïdienne, qui est activée par le TGF- β . En présence de la PKC- α , Ets-1 induit une forte activité de ce promoteur en réponse au TGF- β [136]. Cet effet passe par un accroissement de la synergie transcriptionnelle entre Ets-1 et Smad3 (« *Sma- and Mad-related protein 3* »), médiateur nucléaire de la signalisation du TGF- β [136]. Lorsque

l'activité de la PKC- α est inhibée, l'activation du promoteur P3 du gène *PTHrP* en réponse au TGF- β est bloquée, et ceci est corrélé à une diminution du taux de protéine Ets-1. De plus, la réduction de l'expression de la PKC- α par ARN interférence entraîne la dégradation d'Ets-1 par le protéasome, sans altérer le taux d'ARNm [137]. Le mécanisme d'action de la phosphorylation d'Ets-1 par la PKC- α pourrait donc être lié à une protection vis-à-vis du protéasome, permettant d'accroître sa stabilité.

Des travaux effectués par notre équipe montrent qu'Ets-1 est également phosphorylée par le complexe DNA-PK (« *DNA-dependent protein kinase* ») sur des sites encore non identifiés [138]. Ce complexe est constitué de trois sous-unités : une large sous-unité catalytique, la DNA-PKcs, et deux sous-unités régulatrices Ku70 et Ku80. Nous avons pu observer que la surexpression de Ku80 engendre une diminution de l'activité transcriptionnelle d'Ets-1 sur les promoteurs de la collagénase-1 (MMP-1) et de la stromélysine-1 (MMP-3) [138]. Or, l'excès de Ku80 est connu pour favoriser la formation de complexes Ku80/DNA-PKcs, qui n'ont pas d'activité kinasique, au dépend du complexe actif Ku80/Ku70/DNA-PKcs [139]. Ceci laisse supposer que, lors de la surexpression de Ku80, il n'y a plus de phosphorylation d'Ets-1 par le complexe DNA-PK ce qui aurait pour conséquence une baisse de son activité transcriptionnelle.

Enfin, d'autres kinases semblent avoir un rôle d'activation d'Ets-1 même si la phosphorylation de l'oncoprotéine n'a pas été démontrée. En effet, l'inhibition spécifique de la kinase p38 MAPK et de la voie PI3K/Akt engendre une délocalisation cytoplasmique d'Ets-1 dans des cellules de lignée de carcinome ovarien stimulées au VEGF [86]. Dans l'hypothèse où ces kinases pourraient phosphoryler Ets-1, cela aurait donc pour conséquence de favoriser sa localisation nucléaire.

II-1-1-2/ Répression de la protéine Ets-1

Un autre type de phosphorylation d'Ets-1 (sauf l'isoforme Ets-1 p42), répressive cette fois, a lieu au niveau de la région riche en sérines, située en amont du domaine inhibiteur N-terminal en position 251, 270, 273, 282 et 285 (S251, S270, S273, S282 et S285) (Figure 18). Cette réaction est catalysée en réponse au calcium par la CaMKII (« *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II* ») dans la majorité des cas [140, 141], ou par la MLCK (« *myosin light-chain kinase* ») dans les astrocytes après stimulation par un analogue de l'acétylcholine [106]. Dans ce modèle cellulaire, la CaMKII étant absente, la MLCK joue probablement un

rôle redondant. Contrairement à celle effectuée par la PKC- α , cette phosphorylation inhibe l'activité d'Ets-1. A ce jour, cette contradiction n'est pas encore expliquée.

L'augmentation du taux de calcium (Ca^{2+}) cytosolique en réponse à un signal calcique résulte, d'une part, de l'ouverture des canaux calciques de la membrane plasmique et d'autre part, de l'activation de récepteurs de la membrane des organites intracellulaires (notamment le réticulum endoplasmique), tels que ceux de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) (Figure 20) [142]. Dans ce dernier cas, le signal calcique stimule les récepteurs couplés aux protéines G de la membrane plasmique qui activent alors la phospholipase C (PLC). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphates (PIP_2) de la membrane plasmique en diacylglycérol (DAG) et en IP_3 . La fixation de l' IP_3 sur ses récepteurs au niveau de la membrane des organites induit le relargage du Ca^{2+} dans le cytosol.

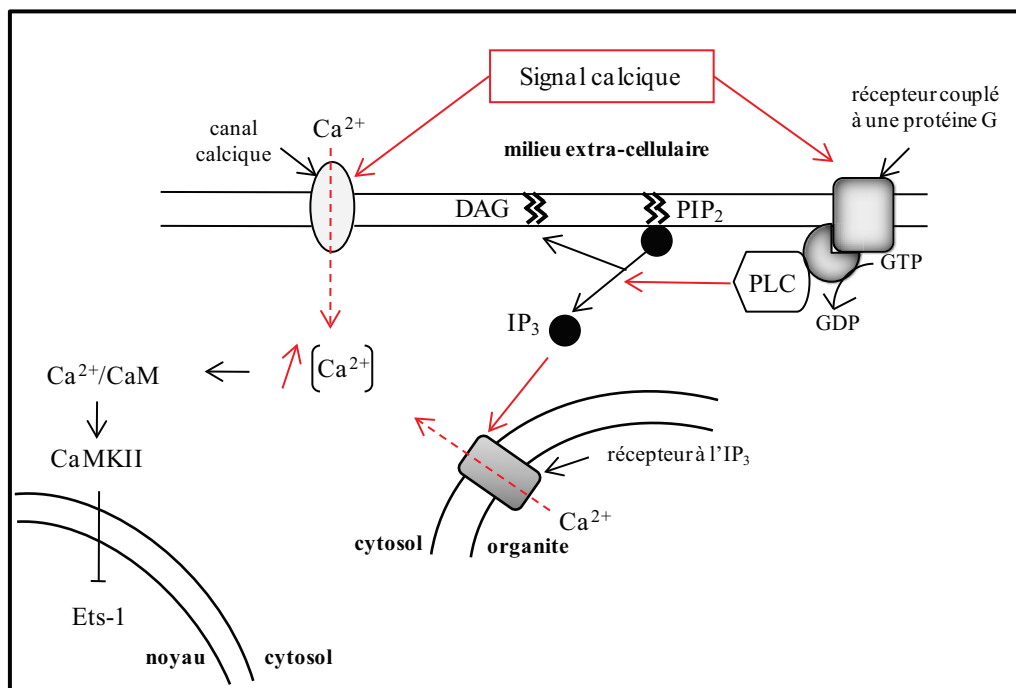


Figure 20 : Activation de la CaMKII par la voie Ca^{2+} dépendante.

Suite à un signal calcique, les canaux calciques de la membrane s'ouvrent permettant l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule. De plus, les récepteurs couplés aux protéines G sont activés. Ils stimulent la PLC qui hydrolyse les PIP_2 de la membrane en DAG et en IP_3 . L' IP_3 , en se fixant sur ses récepteurs à la membrane des organites, induit le relargage du Ca^{2+} dans le cytosol. Le calcium intracellulaire, dont la concentration augmente en réponse au signal calcique, s'associe à la calmoduline (CaM) pour activer la CaMKII. Celle-ci est responsable de l'inhibition de l'activité d'Ets-1. Les flèches rouges pleines représentent la cascade d'activation en réponse au signal et celles en pointillées, les flux de calcium. D'après [142].

Dans le cadre de la régulation d'Ets-1, le calcium est pris en charge par la calmoduline (CaM) pour former le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Celui-ci interagit avec la CaMKII qui s'active alors par auto-phosphorylation [143, 144]. La CaMKII est ensuite transloquée dans le noyau

pour inhiber l'activité d'Ets-1 en induisant la phosphorylation de sa région riche en sérines dans le domaine codé par l'exon VII.

Des travaux menés sur des lymphocytes T et B ont permis de détecter, grâce à des anticorps spécifiques, la protéine Ets-1 (p51) sous sa forme phosphorylée au niveau du domaine codé par l'exon VII suite à l'activation de la CaMKII. Celle-ci résulte de l'élévation de la concentration en calcium intracellulaire suite à la liaison d'anticorps au niveau des récepteurs spécifiques des lymphocytes T et B [145, 146]. Néanmoins, aucune forme phosphorylée d'Ets-1 p42 n'est mise en évidence dans ces conditions, du fait de l'absence de la région codée par l'exon VII. Etant insensible à ce type de phosphorylation, Ets-1 p42 pourra agir de façon indépendante sans interférer avec Ets-1 (p51), et ce malgré sa faible expression.

Cette modification post-traductionnelle en réponse au calcium est responsable du renforcement de l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1 et donc d'une répression de son activité transcriptionnelle (voir Chapitre II §IV-2) [128]. L'impact négatif de ce type de phosphorylation sur la liaison à l'ADN a pu être mis en évidence dans un contexte cellulaire, grâce à des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), au niveau du promoteur du GM-CSF (« *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* ») [147]. Il en résulte une réduction de l'activité du promoteur induite par Ets-1. D'ailleurs, la mutation des sérines phosphorylables d'Ets-1 entraîne une augmentation de l'activité du promoteur du GM-CSF de plus de 3 fois en présence de CaMKII, associée à une fixation accrue d'Ets-1 au niveau de ce promoteur [147]. De plus, l'action de la CaMKII inhibe la synergie transcriptionnelle entre Ets-1 et AML-1 (« *acute myeloid leukemia-1* ») au niveau du promoteur du GM-CSF [147]. Ceci pourrait s'expliquer par un blocage de la fixation coopérative de ces protéines, devenues incapables d'induire la levée mutuelle de leur auto-inhibition de liaison à l'ADN (voir §II-2-1). Des travaux menés au sein de notre équipe démontrent que la phosphorylation par la CaMKII empêche également la fixation coopérative d'Ets-1 au niveau des EBS en palindrome du promoteur du gène de la stromélysine-1 (voir §II-2-1) [148]. Dans ces conditions, le renforcement de la structure auto-inhibée de chaque molécule va à l'encontre de la levée mutuelle de l'auto-inhibition observée en absence de cette kinase [148].

II-1-2/ SUMOylation et ubiquitination

La SUMOylation et l'ubiquitination consistent en la liaison covalente et réversible de petites protéines, respectivement SUMO (« *small ubiquitin-like modifier* ») (11 kDa) et ubiquitine (9 kDa), au niveau de résidus lysines (K) de protéines cibles. Dans le cas de la SUMOylation, il existe trois protéines SUMO principales dénommées SUMO-1, SUMO-2 et SUMO-3 ainsi qu'une protéine SUMO-4 exprimée spécifiquement dans certains tissus [149]. Ces protéines se fixent au niveau de résidus lysines contenus dans un motif consensus de type ψ -K-x-E/D (ψ étant un acide aminé hydrophobe et x un acide aminé quelconque), de leurs protéines cibles [150, 151].

Les voies enzymatiques conduisant à la SUMOylation et à l'ubiquitination sont similaires bien que l'effet sur la protéine cible soit différent [152-154]. La cascade enzymatique impliquée dans la liaison de résidus SUMO ou ubiquitine sur une protéine cible est constituée de plusieurs étapes : (1) la fixation du résidu activé en présence d'ATP sur l'enzyme E1 d'activation, (2) le transfert du résidu de l'enzyme E1 vers une enzyme E2 de conjugaison, (3) le transfert du résidu de l'enzyme E2 vers le substrat (la protéine cible) grâce à une enzyme E3 de ligation. Celle-ci sert de plateforme d'interaction qui met en contact les protagonistes de la réaction [155]. L'enzyme E1 d'activation est généralement Aos1/Uba-2 (« *ubiquitin-activating enzyme-2* ») et l'enzyme E2 de conjugaison, Ubc-9 (« *ubiquitin conjugating enzyme-9* »). La nature de l'enzyme E3 de ligation dépend du substrat.

Concernant la SUMOylation, des travaux montrent que la protéine Ets-1 est modifiée par SUMO-1 et SUMO-2 *in vitro* et dans des cellules après surexpression de ces protéines [156, 157]. Plusieurs sites putatifs de SUMOylation ont été identifiés dans la séquence d'Ets-1 [158], mais uniquement deux ont été validés. Leurs lysines acceptrices sont situées en position N-terminale du domaine PNT au niveau du 15^{ème} acide aminé d'Ets-1 (K15) et dans le domaine transactivateur TAD en position 227 (K227) (Figure 18). La liaison de SUMO-1 au niveau de la lysine 15 ne modifie en rien la structure d'Ets-1 [158] alors que la SUMOylation de la lysine 227 altère sa conformation, suggérant des effets différents sur l'activité d'Ets-1 [157]. Concernant la cascade enzymatique aboutissant à la SUMOylation d'Ets-1, il est montré que (Figure 21) : (1) Ubc-9 est bien l'enzyme E2 de conjugaison [156] et qu'elle interagit *via* son site de reconnaissance des substrats avec les domaines PNT et ETS d'Ets-1 [158, 159], (2) PIASy constitue l'enzyme E3 de ligation qui recrute Ets-1 par l'intermédiaire

de son domaine TAD [160], (3) Ets-1 est déSUMOylée par la SUMO-protéase SENP-1 (« *SUMO/sentrin-specific peptidase-1* »), illustrant le caractère réversible de ce type de modification post-traductionnelle [156, 160].

Certains signaux tels que le stress oxydant causé par H₂O₂ activent des voies de signalisation induisant la SUMOylation d'Ets-1 [156]. Cette modification post-traductionnelle d'Ets-1 réduit son pouvoir transactivateur. Ceci a été caractérisé sur divers promoteurs artificiels et naturels [148, 156, 157]. En effet, la mutation des lysines modifiées ou l'utilisation d'une enzyme de déSUMOylation, telle que SENP-1 sont responsables d'un accroissement des capacités activatrices d'Ets-1 au niveau de ces promoteurs. Les mécanismes sous-jacents restent flous à ce jour. Néanmoins, il est envisageable que la fixation d'une protéine SUMO de 10 kDa à proximité d'un site crucial pour l'interaction avec les co-activateurs CBP et p300 puisse créer une gêne stérique empêchant leur recrutement. Une autre possibilité est la formation de complexes avec des co-répresseurs, comme démontré pour la protéine EAP1 (« *ETS1 associated protein 1* »)/Daxx, qui, contrairement à ce que son nom indique, n'interagit pas directement avec Ets-1 mais *via* la SUMOylation en K15 [161]. Or EAP1/Daxx est un répresseur reconnu de l'activité transcriptionnelle d'Ets-1 comme démontré sur le promoteur des gènes de la protéine Bcl-2 (« *B-cell lymphoma-2* »), de la collagénase-1 (MMP-1) et du récepteur au VEGF, Flt-1 [162, 163].

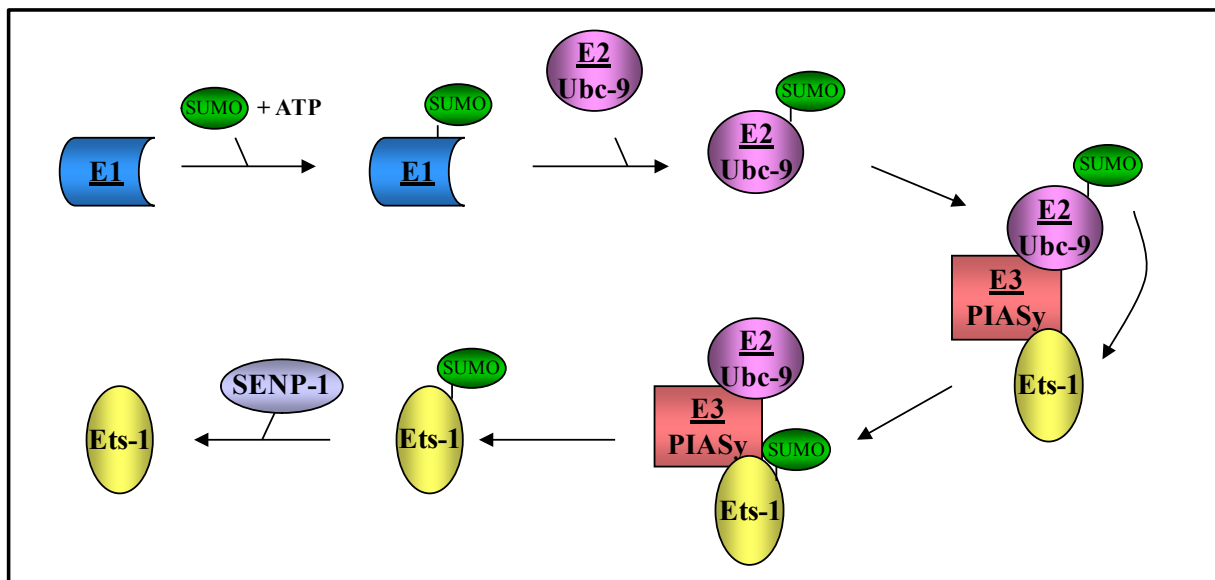


Figure 21 : Modèle de SUMOylation d'Ets-1.

Les enzymes de SUMOylation sont représentées en bleu pour l'enzyme E1 d'activation, en violet pour l'enzyme E2 de conjugaison (identifiée comme étant Ubc-9 pour Ets-1) et en rouge pour l'enzyme E3 de ligation (identifiée comme étant PIASy pour Ets-1). La petite protéine SUMO est représentée en vert, la protéine Ets-1 en jaune et la désSUMOylase SENP-1 en gris.

Concernant l'ubiquitination d'Ets-1, elle s'effectue sur des résidus lysines différents de ceux qui sont SUMOylés, indiquant qu'il n'existe pas de compétition entre ces deux types de modifications. D'ailleurs, l'ubiquitination d'Ets-1 n'est pas abolie suite à l'inactivation par mutation des sites de SUMOylation [156]. L'ubiquitination d'Ets-1 est associée à la partie N-terminale de la protéine [156]. Néanmoins, ni les sites ni les enzymes responsables de cette modification d'Ets-1 ne sont connus. Parmi les modifications post-traductionnelles responsables de la régulation d'Ets-1, son ubiquitination correspond à un signal de dégradation par le protéasome 26S [156]. Cette dégradation peut être évitée par l'interaction directe entre Ets-1 et l'enzyme E3 de ligation pour la SUMOylation, PIASy. Cependant, cet effet est complètement indépendant de la SUMOylation d'Ets-1 et n'altère pas son ubiquitination [160]. Nous pouvons donc supposer que l'interaction avec PIASy interfère avec la prise en charge d'Ets-1 ubiquitinylée par des protéines responsables de sa dégradation.

II-1-3/ Acétylation

L'acétylation consiste en l'addition de groupements acétyles $\left[\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\right]$ sur les résidus lysines d'une protéine cible par des acétyl-transférases. Il en résulte la neutralisation de la charge positive de la lysine et la modification de la taille de sa chaîne latérale. Cette réaction est réversible sous l'effet de déacétylases qui induisent le clivage des groupements acétyles.

L'acétylation d'Ets-1 est détectée au niveau basal dans des fibroblastes du derme, mais elle est surtout stimulée en réponse au TGF- β (« transforming growth factor- β ») dans ce modèle cellulaire. Les résidus lysines d'Ets-1 modifiés et l'acétyl-transférase impliquée n'ont pas encore été identifiés. Néanmoins, Ets-1 est connue pour interagir *via* une région incluant les domaines PNT et TAD avec les co-activateurs CBP et p300 [164]. Ces derniers possédant une activité acétyl-transférase envers les histones et certains facteurs de transcription [165], il est tout à fait envisageable qu'ils soient responsables de l'acétylation d'Ets-1, surtout que le complexe formé par Ets-1 avec CBP et p300 est dissocié suite à l'acétylation d'Ets-1.

De plus, une étude montre que cette modification post-traductionnelle est compatible avec la phosphorylation d'Ets-1 aussi bien au niveau de la thréonine 38 que des résidus sérines contenus dans le domaine codé par l'exon VII [166]. De façon surprenante, l'acétylation d'Ets-1 induit l'augmentation de l'expression de certains gènes, tels que ceux des chaînes $\alpha 2$ et $\alpha 1$ du collagène de type I (ou collagène $\alpha 2(\text{I})$ et $\alpha 1(\text{I})$) [166]. Il s'avère en fait que ces gènes ne sont pas des cibles directes d'Ets-1 mais de Smad3, un autre facteur activé

par le TGF- β [166]. Des expériences d'immunoprécipitation à partir d'extraits de fibroblastes de derme montrent que le relargage de CBP et de p300 par Ets-1 acétylée est concomitant à leur recrutement par Smad3 qui peut alors stimuler l'expression des gènes des chaînes de collagène de type I. De plus, la surexpression d'Ets-1 bloque l'activation des promoteurs du collagène $\alpha 2(I)$ et $\alpha 1(I)$ induite par le TGF- β , et ce en interférant avec l'action de p300 [166]. Par conséquent, il existe une compétition entre Ets-1 et Smad3 pour les co-activateurs CBP et p300 et pour ces gènes particuliers. En absence de signaux, tels que le TGF- β , Ets-1 recrute CBP et p300 afin d'activer ses gènes cibles, tels que la collagénase-1. Par contre, en présence de TGF- β , Ets-1 libère ces facteurs sous l'effet de l'acétylation et ce au profit de Smad3 qui pourra alors activer ses gènes cibles, tels que ceux du collagène $\alpha 2(I)$ et $\alpha 1(I)$.

A l'heure actuelle, l'enzyme désacétylase d'Ets-1 n'a pas été identifiée. Néanmoins, de très récents travaux montrent son interaction avec l'enzyme désacétylase HDAC1 (« *histone deacetylase 1* »). Cette interaction prend place dans un contexte de répression transcriptionnelle de la part d'Ets-1 sur le promoteur de l'interleukine 10 (IL-10) [167]. Comme dans le cas des gènes des chaînes de collagène de type I, nous pouvons supposer que l'acétylation d'Ets-1 permettrait la dérégulation de l'expression de l'IL-10. La présence d'HDAC1 pourrait donc avoir pour but de maintenir cette répression en désacétylant Ets-1.

II-2/ Régulation par des interactions protéine-protéine : levée de l'auto-inhibition

La levée de l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1, favorisant la régulation de l'expression de ses gènes cibles, s'effectue : (1) de façon dépendante des partenaires protéiques dans le cadre d'une régulation combinatoire ou (2) de façon autonome au niveau d'une configuration particulière d'EBS organisés en répétition inversée (ou palindrome). Dans les deux cas, des interactions protéine-protéine sont à l'origine de modifications conformationnelles d'Ets-1 qui déstructurent le module auto-inhibiteur, facilitant alors sa fixation à l'ADN.

II-2-1/ Levée de l'auto-inhibition par des partenaires protéiques

L'auto-inhibition de la liaison à l'ADN d'Ets-1 peut être levée grâce à l'interaction avec certains partenaires protéiques, augmentant ainsi sa faible capacité de fixation sur ses consensus. Cette coopération s'effectue au niveau de promoteurs cibles contenant un EBS

adjacent au site de liaison du partenaire. Dans ce cadre, différents facteurs de transcription ont pu être mis en cause, tels que NFκB (« nuclear factor κappa B »), TFE-3 (« transcription factor E-3 »), USF-1 (« upstream stimulatory factor-1 »), Pax-5 ou AML-1 (appelée également Runx-2) [168-170].

Cette régulation combinatoire permet d'augmenter la spécificité de liaison à l'ADN d'Ets-1 vis-à-vis des autres membres de la famille Ets, puisque les promoteurs cibles doivent contenir le site consensus de liaison du partenaire adjacent à celui d'Ets-1, désigné site composite. De plus, elle permet à Ets-1 de se fixer sur des sites très dégénérés par rapport au consensus et qui ne peuvent être reconnus par une protéine Ets seule. Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de cette régulation nous allons ici prendre les exemples de l'interaction d'Ets-1 avec Pax-5 et AML-1 en présence d'ADN.

L'interaction d'Ets-1 avec le facteur Pax-5 permet sa liaison au niveau d'un EBS présent dans le promoteur du gène de la chaîne α des immunoglobulines (gène *mb-1*) qui contient un cœur non consensus de type 5'-GGAG-3'. Les expériences de gel retard menées avec ce site montrent qu'Ets-1 est incapable de s'y lier, comme le laissait présager la forte divergence de séquence par rapport au consensus [171]. Néanmoins, l'ajout du facteur de transcription à domaine Paired Pax-5, qui possède un site adjacent à l'EBS au sein du promoteur du gène *mb-1*, permet à Ets-1 de se fixer en formant un complexe ternaire Pax-5-ADN-Ets-1 [171]. Les interactions protéine-protéine entre ces deux facteurs impliquent des résidus appartenant à leurs domaines de liaison à l'ADN respectifs (le domaine ETS pour Ets-1 et le domaine Paired pour Pax-5) [45, 172].

Le mécanisme de ce partenariat particulier a pu être décrit en résolvant par radio-cristallographie la structure du complexe ternaire comprenant les domaines ETS et Paired liés à l'ADN [19]. L'étude des contacts directs entre le domaine ETS et les bases de l'ADN montre, de façon tout à fait intéressante, que les interactions avec Pax-5 entraînent un changement de conformation d'un résidu crucial, la tyrosine 395 (Y395), de l'hélice H3 du domaine ETS d'Ets-1. La conséquence en est une non discrimination de la base en +4 du consensus du fait de la réorientation de la tyrosine 395 par la domaine Paired (voir Chapitre II §I-2-2) [19]. Ce mécanisme permet la levée de l'auto-inhibition et la stabilisation de la fixation d'Ets-1 au niveau de ces sites composites sans pour autant qu'il y ait interaction directe entre Pax-5 et les domaines inhibiteurs d'Ets-1.

Le cas du partenariat avec AML-1 est particulièrement intéressant car il a permis de mettre à jour un mécanisme original par lequel deux facteurs de transcription acquièrent mutuellement une plus grande spécificité de liaison à l'ADN. De façon similaire à Ets-1, AML-1 est auto-inhibée pour sa liaison à l'ADN à cause d'interactions intra-moléculaires entre un domaine inhibiteur, NRDB (« *negative regulatory region of DNA binding* ») et son domaine de liaison à l'ADN Runt [173].

De façon intéressante, il existe des sites de liaison adjacents pour ces deux protéines au sein des « enhancers » du virus de la leucémie murine de Moloney (Mo-MLV pour « *Moloney-murine leukemia virus* ») ou du gène de la chaîne β du récepteur des lymphocytes T (TCR pour « *T cell receptor* »), qui leur permettent d'activer la transcription de façon synergique [174]. Des expériences de retard sur gel montrent que sur ces sites, Ets-1 et AML-1 sont incapables de se fixer seules, à cause de leur auto-inhibition de liaison à l'ADN et de la dégénérescence de la séquence de ces éléments (sites de « basse affinité »). Par contre, la présence simultanée de ces deux protéines aboutit à la formation d'un complexe ternaire stable Ets-1-ADN-AML-1 suite à une levée mutuelle de leur auto-inhibition [169, 175]. Le mécanisme sous-jacent comprend des interactions protéine-protéine entre le domaine inhibiteur N-terminal d'Ets-1 et le NRDB d'AML-1, mises en évidence par des expériences de co-rétention protéique [169]. Ces interactions pourraient s'opposer au repliement de l'hélice HI-1, empêchant la reformation du module auto-inhibiteur d'Ets-1 (voir Chapitre II §IV-2-2). De plus, l'utilisation d'un mutant ponctuel d'Ets-1 a permis de démontrer de façon élégante que le mécanisme d'auto-inhibition de liaison à l'ADN est directement impliqué dans la fixation coopérative [175]. Ces travaux mettent en évidence que l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1, en restreignant son affinité de fixation, apporte une plus grande spécificité de reconnaissance grâce à l'intervention de partenaires protéiques privilégiés.

II-2-2/ Levée de l'auto-inhibition par liaison aux EBS en palindrome

Ets-1 peut « s'affranchir » de ses partenaires protéiques pour lever sa propre auto-inhibition de liaison à l'ADN en se fixant au niveau d'une configuration particulière d'EBS organisés en palindrome. En réalité, sur ce type de sites, Ets-1 devient son propre partenaire. Une telle configuration d'EBS est décrite dans un nombre restreint de promoteurs tels que celui du gène de la stromélysine-1 (MMP-3) codant une métalloprotéase matricielle [148, 176] et celui du gène du suppresseur de tumeur p53 [177, 178] (Tableau 4).

<u>promoteur</u>	<u>EBS en palindrome</u>
<i>stromélysine-1</i>	5' ... ACAGGAAGCACTTCCTGG ... 3'
<i>p53</i>	5' ... TACGGAAAGCCTTCCTAA ... 3'

Tableau 4 : Séquences des EBS en palindrome dans le promoteur des gènes *stromélysine-1* et *p53*.

Dans le contexte du promoteur du gène de la stromélysine-1, notre équipe a démontré que cette configuration particulière de sites engendre une liaison coopérative de deux molécules d'Ets-1 (p51) [148]. Ceci aboutit *in vitro* et dans un contexte cellulaire à la formation d'un complexe ternaire Ets-1-ADN-Ets-1 qui possède un fort pouvoir transactivateur au niveau de ce promoteur [148, 179]. L'utilisation de mutants de délétion d'Ets-1 montre que la région comprise entre les résidus 245-330 (codée par l'exon VII du gène *ets-1*), qui contient le domaine inhibiteur N-terminal et la région riche en sérines, est absolument nécessaire à la liaison coopérative sur ces EBS, suggérant l'implication de cette région dans l'interaction entre les deux protéines Ets-1. D'ailleurs, la phosphorylation de cette région d'Ets-1 par la CaMKII qui renforce l'auto-inhibition de liaison à l'ADN réduit la formation du complexe ternaire. Sur la base de ces travaux, un mécanisme a pu être proposé : (1) la première molécule d'Ets-1 se fixe sur un EBS avec une faible affinité à cause de son auto-inhibition de liaison, (2) la fixation de la deuxième molécule est facilitée et accélérée grâce à la présence de la région codée par l'exon VII, (3) le complexe ternaire est stabilisé par une levée mutuelle de l'auto-inhibition de liaison de chaque molécule (Figure 22).

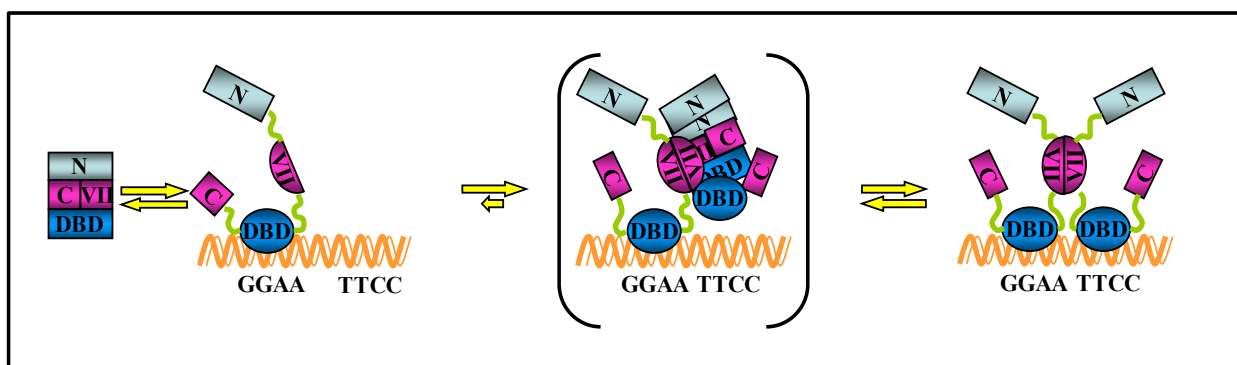


Figure 22 : Modèle de la fixation coopérative d'Ets-1 sur les EBS en palindrome du promoteur du gène de la stromélysine-1.

Une première molécule d'Ets-1 se fixe avec une faible affinité sur l'EBS en position 5' du palindrome. Grâce à une interaction au niveau du domaine codé par l'exon VII, elle facilite le recrutement d'une seconde molécule d'Ets-1 sur l'EBS en position 3'. Il en résulte la formation d'un complexe ternaire Ets-1-ADN-Ets-1. Les rectangles (rose noté C et gris noté N) représentent les extrémités carboxy et amino terminale de la protéine Ets-1. Le domaine de liaison à l'ADN correspond au cercle bleu désigné DBD et le domaine codé par l'exon VII au demi-cercle rose désigné VII. D'après [148].

La structure radio-cristallographique de ce complexe ternaire a été obtenue en utilisant le mutant minimum de délétion d'Ets-1 étant auto-inhibé (Ets-1 Δ N280) et un fragment d'ADN correspondant aux EBS en palindrome du promoteur du gène de la stromélysine-1 [180]. Ils prouvent également que : (1) la dimérisation d'Ets-1 nécessite la présence d'ADN, (2) la formation du complexe ternaire n'induit pas de réelle courbure de l'ADN, (3) les résidus 332 à 338 des domaines ETS de chaque protéine Ets-1 interagissent avec les 4 paires de bases centrales aux 2 EBS au niveau du petit sillon de l'ADN, (4) une interface entre les deux protéines Ets-1 est créée grâce à une interaction particulière entre un résidu glycine (G333) de la première protéine Ets-1 dont la conformation est dépendante du résidu proline adjacent (P334) avec un résidu asparagine (N380) de la seconde protéine Ets-1 [180].

De façon contradictoire, des travaux réalisés par notre équipe avec des molécules en solution n'aboutissent pas aux mêmes résultats. En effet, il apparaît que la formation du complexe ternaire d'Ets-1 sur les EBS en palindrome du promoteur du gène de la stromélysine-1 induit une courbure de l'ADN (Figure 23). Ainsi, la fixation d'une première molécule d'Ets-1 induit une courbure de l'ADN dirigée dans le sens de l'interface protéine-ADN (Figure 23). Le DBD de cette protéine crée une gêne stérique empêchant la liaison d'une deuxième molécule au niveau du deuxième EBS. Ces contraintes stériques peuvent être levées par l'interaction au niveau du module inhibiteur d'une deuxième molécule d'Ets-1 qui se fixe coopérativement modifiant ainsi la direction de la courbure de l'ADN induite par la première molécule (Figure 23). La direction de cette courbure de l'ADN a un impact décisif sur le niveau d'activation du promoteur. En effet, seule une courbure dirigée à l'opposé de l'interface protéine-ADN au centre des EBS induit une activation maximale du promoteur [181]. De façon très intéressante, pour Ets-1 p42, qui ne possède pas l'interface d'interaction nécessaire codée par l'exon VII, une seule molécule peut se fixer au niveau du promoteur [181] (Figure 23). Ceci corrobore l'hypothèse de gêne stérique avancée par notre équipe. De ce fait, Ets-1 p42 active peu le promoteur du gène de la stromélysine-1 malgré son affinité bien plus élevée pour les EBS isolés. Ets-1 p27, elle, peut former ce complexe ternaire mais, en absence d'activité de transactivation, elle y tient un rôle de dominant négatif d'Ets-1 [96]. Ce genre de mécanisme participe donc fortement à la spécificité de fonction de chaque isoforme d'Ets-1.

Il est à noter qu'un palindrome d'EBS est également présent dans le promoteur du gène *tp53* [177]. Des travaux menés par notre équipe montrent qu'Ets-1 se fixe de façon coopérative sur les EBS en palindrome du promoteur de *p53* pour former un complexe

ternaire Ets-1-ADN-Ets-1, optimal pour la transactivation. Dans ce palindrome, l'EBS en position 3' présente une séquence dégénérée qui est incapable de fixer Ets-1 de façon isolée, mais qui la recrute lors de la formation du complexe ternaire [177]. Cet EBS constitue un site de « basse affinité » (voir Chapitre II §I-2-1). Ces résultats sont en corrélation avec des travaux menés sur des cellules souches embryonnaires de souris démontrant que la répression d'Ets-1 par la technologie d'ARN interférence réduit le taux d'ARNm *p53* en réponse aux rayons ultra-violets (UV), mais que celui-ci est restauré par la réexpression d'Ets-1 [182].

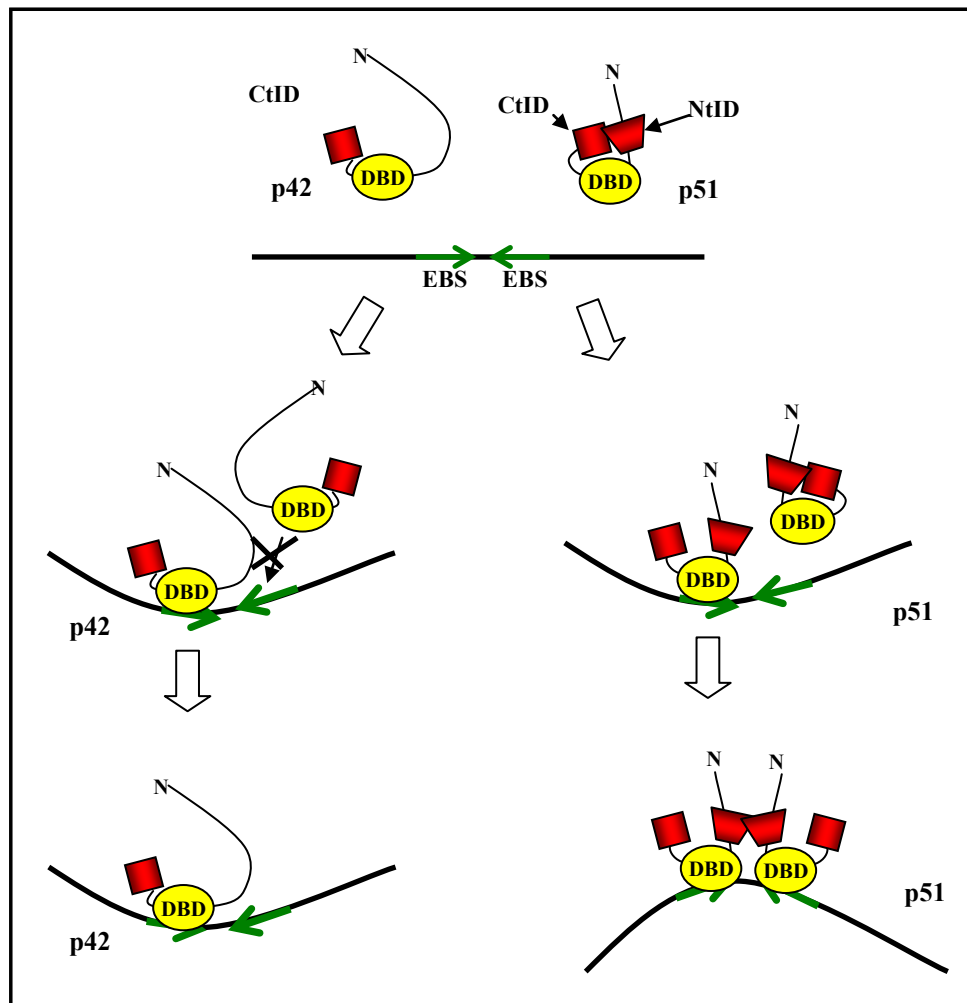


Figure 23 : Modèle pour la liaison différentielle d'Ets-1 p51 et Ets-1 p42 au niveau des EBS en palindrome du promoteur de la stromélysine-1.

La fixation d'une molécule d'Ets-1 p42 sur les EBS en palindrome induit une courbure de l'ADN. La liaison d'une deuxième molécule est empêchée par une gêne stérique au niveau du DBD. A l'inverse, deux molécules d'Ets-1 p51 sont capables de lever ces contraintes stériques *via* une interaction coopérative qui induit : (1) un réarrangement structural drastique du module auto-inhibiteur (domaines inhibiteur C-terminal (CtID) et N-terminal (NtID)) et la création d'une interface intermoléculaire entre les domaines inhibiteurs N-terminaux et (2) une courbure de l'ADN à l'opposé de l'interface protéine-ADN. Ce complexe ternaire est responsable d'une activation maximale du promoteur. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) correspond aux cercles jaunes, le domaine inhibiteur N-terminal (NtID) correspond aux trapèzes rouges, le domaine inhibiteur C-terminal (CtID) correspond aux carrés rouges, les EBS en palindrome sont représentés par des flèches vertes. D'après [181].

Par conséquent, ce mécanisme de fixation coopérative peut être un modèle général de la fixation d'Ets-1 sur des EBS en palindrome permettant de contrecarrer l'auto-inhibition et donc d'augmenter le nombre de gènes cibles potentiels d'Ets-1.

En conclusion de ce Chapitre, il ressort que la protéine Ets-1 est assujettie à une régulation extrêmement fine autant au niveau transcriptionnel, que traductionnel ou que post-traductionnel.

L'existence d'une telle régulation sous-entend une nécessité de contrôle stricte de l'activité d'Ets-1. En effet, quel est l'intérêt de mettre en œuvre tant de mécanismes de régulation d'Ets-1, si celle-ci n'a pas de conséquences importantes pour la cellule ? Nous tenterons donc d'illustrer ce postulat en mettant en lumière les rôles biologiques d'Ets-1. Le but de ce Chapitre sera de montrer comment une protéine, exprimée au sein de contextes physiologiques, peut devenir l'un des facteurs les plus néfastes dans de nombreuses pathologies en cas de dérégulation de son activité.

CHAPITRE IV : RÔLES BIOLOGIQUES D'ETS-1

I/ Rôles physiologiques d'Ets-1

I-1/ Rôles généraux

I-1-1/ Prolifération cellulaire

Ets-1 est impliquée dans différentes phases du cycle cellulaire, contribuant au contrôle de la progression du cycle. Son effet prolifératif a été décrit dans des rétinopathies [80], des gliomes [183] ou encore des carcinomes gastriques [184]. Néanmoins, ce rôle est avant tout physiologique et permet lors du développement embryonnaire, de l'hématopoïèse ou encore lors de l'angiogenèse une prolifération efficace des cellules.

Un certain nombre de gènes cibles d'Ets-1 sont en faveur de la prolifération : (1) le gène de la cycline D1, dont le promoteur est contrôlé par Ets-1 en réponse à l'hypoxie, et qui favorise la progression en phase G1 (« *growth 1* ») du cycle cellulaire [185]. (2) Les gènes de la cycline E et de CDK2 (« *cyclin-dependent kinase 2* ») activés par Ets-1 pour permettre la transition de la phase G1 à la phase S (« *synthesis* ») [186]. (3) Le gène du facteur c-Myc, dont l'expression est rendue possible grâce au recrutement d'Ets-1 au niveau de son promoteur. Ceci permet la restauration de l'entrée en phase S de fibroblastes embryonnaires murins, NIH-3T3, après stimulation par le CSF-1 (« *colony stimulating factor-1* ») [187]. (4) Les gènes du facteur NFκB et de la kinase IKKα (« *IκB kinase α* »). En effet, des études *in vitro* démontrent qu'Ets-1 active l'expression des gènes de NFκB [188] et d'IKKα [189] ce qui est en faveur de la stimulation des propriétés de NFκB et donc de la prolifération.

Par ailleurs, Ets-1 agit sur la transcription de gènes impliqués dans le blocage du cycle cellulaire, tels que : (1) le gène de la protéine p53 ; des études ont mis en évidence que le promoteur du gène suppresseur de tumeur *p53*, dont le produit coordonne l'arrêt du cycle cellulaire en réponse au stress génotoxique, est transactivé par Ets-1 (voir Chapitre III §II-2-2) [177, 178] . (2) Le gène du facteur *p21^{waf1/cip1}* et *GADD153* : Ets-1 régule positivement l'expression du gène de *p21^{waf1/cip1}* [190], un inhibiteur du cycle cellulaire et du gène de réponse aux dommages à l'ADN, *GADD153* (« *growth arrest and DNA damage inducible gene 153* ») [191].

I-1-2/ Sénescence

La sénescence est étroitement liée au cycle cellulaire, en ce sens qu'elle correspond à un arrêt permanent de la croissance des cellules. Elle peut être déclenchée par l'activation constitutive et prolongée de la voie Ras-MAPK qui, en régulant des protéines telles que p53, Rb (« *retinoblastoma protein* »), p19^{ARF} et p16^{INK4a}, favorise le blocage de la prolifération dans la sénescence [192].

De façon très intrigante, le taux de protéine Ets-1 augmente lors de la sénescence de fibroblastes humains normaux [193]. Le rôle d'Ets-1 se situe au niveau du contrôle transcriptionnel du gène *p16^{INK4a}*, codant un inhibiteur du cycle cellulaire [193]. Au sein de fibroblastes en prolifération, la fixation d'Ets-1 sur le promoteur de *p16^{INK4a}* est inhibée par la protéine Id1 (« *inhibitors of DNA binding protein 1* ») [193]. Id1 n'étant plus exprimée lors de la sénescence, Ets-1 peut alors activer le promoteur de *p16^{INK4a}*. La régulation de ce gène est très importante pour les propriétés antiprolifératives d'Ets-1. En effet, la mutation bi-allélique du gène *p16^{INK4a}* empêche la sénescence des fibroblastes induite par la surexpression d'Ets-1 [194].

I-1-3/ Apoptose

Dans des conditions physiologiques, l'apoptose, ou mort cellulaire génétiquement programmée, est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire pour maintenir l'homéostasie tissulaire. Ets-1 présente des propriétés bivalentes dans l'apoptose qui résultent de sa capacité de réguler des gènes pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. Le rôle d'Ets-1 dans l'apoptose dépend très fortement du contexte cellulaire.

En tant qu'oncoprotéine, Ets-1 est reconnue comme un facteur anti-apoptotique du fait de son activité transcriptionnelle : (1) de répression du gène du facteur pro-apoptotique Bax (« *bcl-2-associated x* ») [195]. (2) d'activation du gène du facteur anti-apoptotique Bcl-2 [162]. (3) d'activation du gène de MDR-1 (« *multi drug resistance-1* »), glycoprotéine transmembranaire permettant la résistance à l'apoptose induite par des drogues utilisées en chimiothérapie [196].

La description d'Ets-1 comme facteur anti-apoptotique est renforcée par le fait qu'Ets-1 est clivée lors de l'apoptose. En effet, des travaux ont montré que le taux d'Ets-1 chutait drastiquement dans les cellules en apoptose exprimant l'oncoprotéine [197, 198]. Notre

équipe a récemment démontré que cela était dû au clivage d'Ets-1 lors de l'apoptose par la caspase-3 [199]. Il est à noter que l'isoforme Ets-1 p42, souvent qualifiée de pro-apoptotique, est insensible à ce clivage [199].

Paradoxalement, différents travaux illustrent la capacité d'Ets-1 à induire l'apoptose. Une première étude montre que l'augmentation du taux de protéine Ets-1 stimule l'apoptose des cellules HUVEC, dans des conditions de faible concentration en sérum [200]. L'analyse par micro-array de ces cellules surexprimant Ets-1 a permis de mettre en évidence que leur apoptose est associée à : (1) une activation de gènes pro-apoptotiques tels que ceux de Bid (« *bcl2 interacting protein* »), du cytochrome p450, de la caspase-4, de p27^{kip1} et de p21^{waf1/cip1}, (2) une répression de gènes anti-apoptotiques tels que ceux de la cyclooxygénase-2, de l'IAP2 (« *inhibitor of apoptosis protein 2* ») et de Hdm2 (« *human double minute 2* »).

Néanmoins, cette étude ne permet pas de déterminer si ces gènes sont directement régulés par Ets-1.

Une autre étude menée sur des cellules ES de souris reste plus controversée. Dans ces cellules, la répression de l'expression d'Ets-1 empêche le déclenchement de l'apoptose normalement induite par les UV [182]. Par contre, l'analyse par micro-array de ces cellules, réprimées pour l'expression d'Ets-1, montre que le blocage de leur apoptose en réponse aux UV est associé à : (1) une répression de gènes pro-apoptotiques tels que ceux de Perp (« *p53 apoptosis effector related to PMP-22* ») et de Bax, ce qui est cohérent avec l'inhibition de l'apoptose, (2) une répression de gènes anti-apoptotiques tels que ceux de Mdm2 (homologue murin de Hdm2) et de la cycline G, ce qui est contradictoire avec le blocage de l'apoptose [182].

En résumé, il est important de signaler que, si ces différents groupes de gènes cibles d'Ets-1 paraissent avoir un rôle contradictoire, ils sont en réalité complémentaires. En effet, Ets-1 est bien connue comme une oncoprotéine, mais, lors de mécanismes physiologiques, son activité s'intègre au sein de régulations fines permettant l'homéostasie tissulaire. Bien qu'elle favorise la prolifération, des signaux d'alerte, par exemple de la part de gardiens du génome comme p53, peuvent faire d'Ets-1 un régulateur négatif de la prolifération. Lors de la cancérisation, ces garde-fous n'existant plus, seul est conservé le rôle prolifératif d'Ets-1.

I-2/ Développement embryonnaire

Au cours du développement murin, l'expression d'Ets-1 est détectée de façon précoce. Dès le 8^{ème} jour embryonnaire (E8), Ets-1 est mise en évidence dans le sac vitellin. Son expression est corrélée à la présence des hémangioblastes, précurseurs communs des lignées vasculaire et hématopoïétique. A peine 12 heures plus tard (E8,5), des transcrits d'Ets-1 sont trouvés dans des structures du système nerveux, telles que le tube neural et les crêtes neurales, et dans des structures vasculaires, comme le plexus vasculaire péri-optique [201, 202]. Par la suite (E11,5), Ets-1 est détectée dans le réseau vasculaire en formation, au niveau du cœur et de l'aorte dorsale, ainsi que dans les capillaires se développant au sein du système nerveux central. Durant les premières étapes de la morphogénèse (entre E12,5 et E16), Ets-1 est exprimée dans de nombreux tissus lymphoïdes, comme le thymus et la rate, mais également dans d'autres types de tissus, tels que les reins, les poumons, la langue et la peau [202]. L'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* a mis en évidence qu'Ets-1 est présente uniquement dans les cellules mésenchymateuses des organes en formation, qui possèdent des capacités de migration et d'invasion importantes [201]. Néanmoins à E16, l'expression d'Ets-1 diminue et se restreint à certains organes : reins, poumons, cœur, cerveau et thymus. Par ailleurs, Ets-1 est détectée dans les bourgeons de membres et les vertèbres au sein desquels a lieu un développement osseux [201]. Après la naissance, l'ARNm d'Ets-1 devient difficilement décelable, il est surtout synthétisé dans la rate et le thymus à un faible niveau [201].

Il est à noter que la déficience d'expression d'Ets-1 n'est pas létale chez des souris transgéniques, bien que des anomalies importantes soient constatées au sein des lignées lymphocytaires [108, 203, 204]. Lors du développement embryonnaire les facteurs Ets fonctionnent souvent par couples. Ainsi, la déficience combinée d'Ets-1 et d'Ets-2 est létale chez l'embryon de souris, et ceci du fait de graves défauts au niveau du développement vasculaire [205]. En outre, pendant le développement de la main et des doigts le couple Ets-1/Gabp- α active le promoteur du gène de la protéine morphogène SHH (« *sonic hedgehog* »). Cette transactivation se fait en concurrence avec la liaison du couple Pea-3/Erm au niveau de l'EBS le plus proximal du promoteur qui, eux, réprime l'expression du gène [206]. Ceci permet de délimiter une zone d'activité de polarisation (ZPA) sur le bourgeon du membre où le couple Ets-1/Gabp- α prend le dessus sur Pea-3/Erm. Les travaux associés à cette découverte ont montré que la favorisation de la liaison d'Ets-1 et de Gabp- α provoquait une extension de la ZPA, ceci étant à l'origine d'une polydactylie pré-axiale (PPD) [206].

L'ensemble de ses données montre une forte implication d'Ets-1 dans le développement embryonnaire mais son activité est très souvent combinatoire et redondante avec d'autres membres de la famille Ets et ceci selon le patron d'expression de chacun au sein de l'organisme.

I-3/ Hématopoïèse

L'hématopoïèse permet de générer les différents types cellulaires qui constituent le système sanguin à partir d'une cellule souche précurseur qui subit des différenciations successives (Figure 24). Celles-ci sont orchestrées par des signaux particuliers, telles que des cytokines, et par la combinaison de certains facteurs de transcription qui garantissent la spécificité de chaque lignée. Parmi ces facteurs, Ets-1 joue un rôle prépondérant dans les dernières étapes de formation de la lignée lymphoïde (lymphocytes T, lymphocytes B, cellules NK (« *natural killer* »)), et elle participe à l'établissement de la lignée myéloïde (mégacaryocytes, érythrocytes).

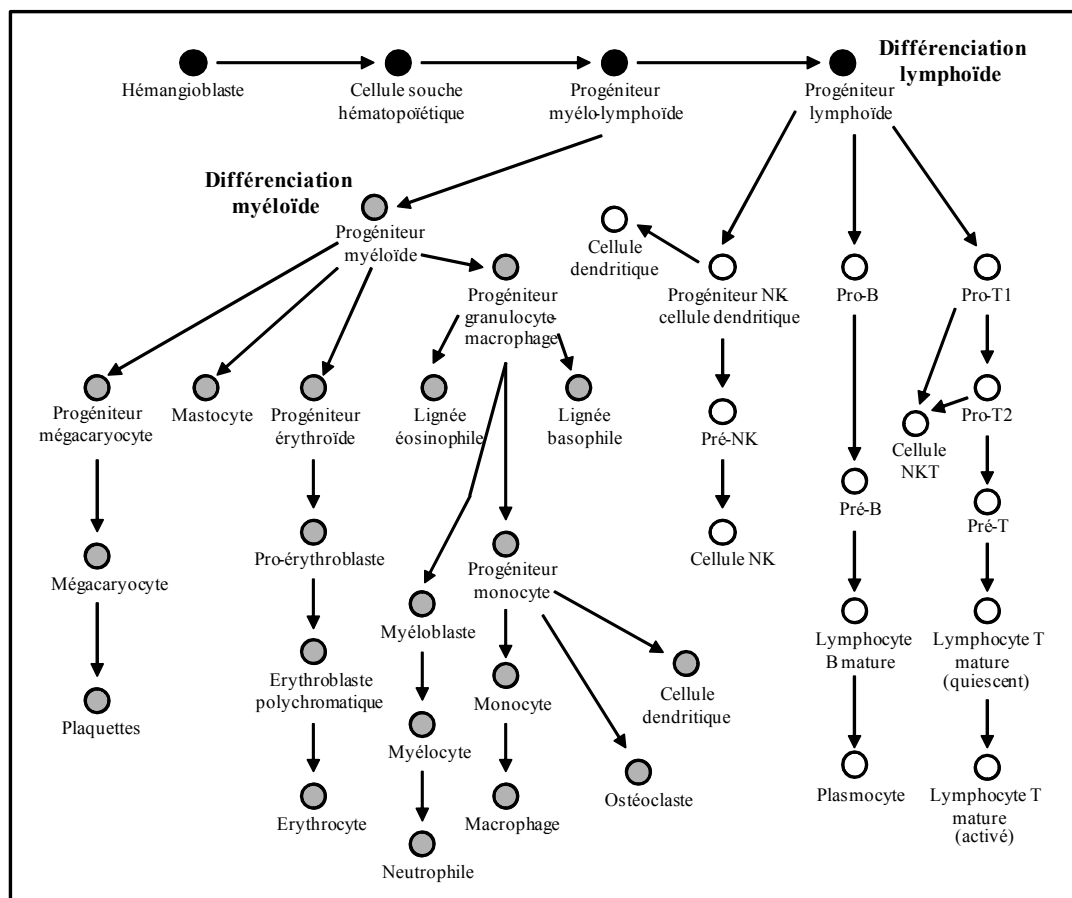


Figure 24 : Etapes de différenciation lymphoïde et myéloïde au cours de l'hématopoïèse.
D'après [207].

I-3-1/ La lignée lymphoïde

Au cours de l'établissement de la lignée lymphoïde, Ets-1 intervient dans le développement des lymphocytes B et T ainsi que des cellules NK, comme démontré par l'étude de souris transgéniques déficientes pour l'expression d'Ets-1 [204, 208-210].

I-3-1-1/ Les lymphocytes B

Dans les lymphocytes B, l'expression d'Ets-1 est observée aux différents stades de maturation mais elle diminue au cours de la différenciation terminale en plasmocytes (Figure 24) [201]. *In vivo*, l'inhibition de l'expression d'Ets-1 dans les lymphocytes de souris génétiquement modifiées conduit à des défauts de développement des pré-lymphocytes B et à une augmentation considérable du nombre de plasmocytes [203, 211]. En plus de l'altération de la différenciation terminale des lymphocytes B, l'absence d'Ets-1 déclenche une hypersensibilité de ces cellules au TLR-9 (« *toll-like receptor-9* ») et le développement de maladies auto-immunes [212]. L'ensemble de ces données indique qu'Ets-1 est nécessaire à la maturation des précurseurs des lymphocytes B et à la modulation de la différenciation terminale en plasmocytes. Ceci est en lien direct avec les propriétés transcriptionnelles d'Ets-1 qui agit dans les lymphocytes B à différents stades de maturation :

(1) dans les pro-lymphocytes B : Ets-1 est capable d'induire la transcription du gène de la chaîne α du récepteur des lymphocytes B (gène *mb-1*) [171], qui s'exprime de façon précoce au sein des pro-lymphocytes B et est nécessaire au développement de la lignée. Le contrôle de la transcription de ce gène met en jeu la fixation de Ets-1 au niveau de son promoteur grâce à l'action de Pax-5, facteur spécifique et précoce des cellules B, qui facilite son recrutement au niveau d'un site composite présent dans le promoteur du gène *mb-1* [171, 213, 214].

(2) dans les pré-lymphocytes B : Ets-1 régule le gène codant les chaînes lourdes des immunoglobulines μ (Ig μ) qui est crucial pour la différenciation. L'« *enhancer* » de ce gène est activé par Ets-1 de concert avec TFE-3 et Pu-1, un membre de la famille Ets jouant un rôle important dans l'hématopoïèse [215].

(3) dans les lymphocytes B matures : Ets-1 a pendant longtemps été considérée comme régulateur négatif de leur différenciation terminale en plasmocytes. En effet, il interfère avec les propriétés transcriptionnelles de Blimp-1 (« *B lymphocyte-induced maturation protein-*

I »), facteur inducteur de cette différenciation [216]. Ets-1 bloque la répression due à Blimp-1 sur des gènes tels que ceux de Pax-5 et du CIITA (« *class II trans-activator* »), activateur du CMH (« *complexe majeur d'histocompatibilité* ») de classe II [216]. L'action d'Ets-1 dans la différenciation des lymphocytes B se situe également dans la régulation du gène *hla-dr* (« *human leukocyte antigens-DR* ») qui code la sous-unité α du CMH de classe II. Le promoteur de ce gène est activé de façon directe par la protéine Ets-1 alors que les facteurs de la famille Ets, Ets-2 et Pu-1, n'ont pas d'effet [217]. Néanmoins, une très récente étude parue dans *Blood* montre qu'Ets-1 est essentielle au changement de classe d'immunoglobulines M (IgM), qui sont les premières Ig secrétées en réponse aux antigènes, en immunoglobulines G2a, qui sont, elles, plus tardives et plus spécifiques que les IgM [218]. Cette action d'Ets-1 n'est pas directe. Elle passe par une coopération avec la protéine Stat-1 afin d'activer le promoteur du gène du facteur de transcription T-bet, plus connu pour son rôle chez les lymphocytes T, qui, lui, permet le changement de classe [218]. En résumé, Ets-1 semble empêcher dans tous les cas que les lymphocytes B matures en restent à la sécrétion d'IgM, soit en empêchant la différenciation en plasmocyte, soit en favorisant un changement de classe vers la sécrétion d'IgG.

I-3-1-2/ Les lymphocytes T

Ets-1 est exprimée aux différents stades de maturation des lymphocytes T mais devient indétectable après leur activation (Figure 24) [219]. Au contraire, l'expression d'Ets-2 est complémentaire de celle d'Ets-1 puisqu'elle est détectée exclusivement dans les lymphocytes T matures activés. Ceci indique qu'Ets-1 et Ets-2 possèdent des rôles biologiques différents dans le développement de cette lignée [219]. L'utilisation de souris déficientes pour l'expression d'Ets-1 au niveau des lymphocytes a mis en évidence le rôle primordial joué par Ets-1 dans la survie et le maintien des lymphocytes T matures à l'état de quiescence [203, 204]. En effet, les lymphocytes T matures de ces souris génétiquement modifiées présentent une apoptose accrue ainsi qu'un défaut de prolifération en réponse à une stimulation de leurs récepteurs. De plus, l'altération de l'expression d'Ets-1 dans des souris transgéniques induit des défauts dans les dernières étapes de la sélection thymique avec une absence de production de cellules T CD8⁺ [220]. Il est également à noter que la répression de l'expression d'Ets-1 dans des souris transgéniques induit une réduction de la production de cellules NKT (« *natural killer T* ») (à ne pas confondre avec les cellules NK, Figure 24) dans le thymus, la rate et le foie [210].

L'implication d'Ets-1 dans la différenciation des lymphocytes T est à relier à sa capacité à réguler, en coopération avec AML-1, la transcription des gènes codant les chaînes α et β du TCR, qui jouent un rôle fondamental dans la maturation des pré-lymphocytes T [169, 209].

I-3-1-3/ Les cellules NK

Il apparaît que les souris transgéniques déficientes pour l'expression d'Ets-1 ont un nombre de cellules NK matures fortement diminué, montrant l'importance d'Ets-1 pour le développement de ces cellules [208]. De plus, les cellules NK *ets-1*^{-/-} sont incapables de lyser des cellules tumorales, empêchant le rejet de tumeurs dans un modèle murin. Enfin, ces cellules présentent un important défaut de sécrétion d'interféron- γ (IFN γ), une cytokine essentielle pour la réponse immunitaire [208]. De récents travaux ont mis en évidence qu'Ets-1 est un facteur de maturation des NK, sans lui, ces cellules restent au stade pré-NK [221]. Ets-1 permet l'expression de facteurs de transcription indispensables à la différenciation des NK ainsi que l'expression des NKR (« *NK receptors* ») responsable de la dégranulation, nécessaire pour lyser les autres cellules [221].

Il est également important de signaler en conclusion de ce paragraphe qu'Ets-1 est impliquée de façon générale dans la sécrétion des cytokines telles les interleukines et les chémokines par les cellules immunitaires [222]. Ets-1 contrôle ainsi positivement la transcription de gènes de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-5 [223, 224] et 8 [225, 226], du TNF- α [227], du GM-CSF [147] et du PF4 (« *platelet factor 4* ») [228] mais réprime aussi des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 [167]. Ets-1 a donc tendance à favoriser l'inflammation [222].

I-3-2/ La lignée myéloïde

Au cours de l'établissement de la lignée myéloïde, Ets-1 stimule la différenciation des mégacaryocytes alors qu'elle agit comme un frein à l'achèvement de celle des érythroïdes [229].

I-3-2-1/ Mégacaryocytes

Les mégacaryocytes sont des cellules géantes de la moelle osseuse dont le cytoplasme se fragmente pour produire les plaquettes sanguines (Figure 24). Ets-1 est exprimée tout au long de la différenciation mégacaryocytaire pour activer les gènes cibles spécifiques de cette lignée [229]. Parmi eux, nous pouvons compter ceux codant la glycoprotéine IIb (CD41) [230] et le récepteur de la thrombopoïétine (CD110) [231], qui sont des protéines membranaires exprimées à la surface des cellules à des stades précoces de la différenciation mégacaryocytaire. Leurs promoteurs sont activés au niveau d'un site composite EBS/GATA par Ets-1 en synergie avec GATA-1, un facteur de transcription spécifique de la différenciation myéloïde [229]. Le rôle d'Ets-1 dans le développement de cette lignée inclut également le contrôle de la transcription de GATA-1 et GATA-2 (facteur capable de favoriser la différenciation des mégacaryocytes) [229, 232].

I-3-2-2/ Erythrocytes

Les érythrocytes, plus communément appelés hématies, assurent le transport des gaz respiratoires dans le sang et présentent un cytoplasme riche en hémoglobine. Ets-1 est exprimée durant les premiers stades de la différenciation érythrocytaire puis décroît et devient indétectable à partir du stade érythroblaste polychromatique (Figure 24) [229]. Certains aspects moléculaires de cet effet ont pu être identifiés. Ainsi, la surexpression de Ets-1 dans ces érythroblastes conduit à une augmentation de la synthèse du facteur de transcription GATA-2, gène cible d'Ets-1, codant un facteur néfaste au développement de la lignée érythroïde mais favorable à celui des mégacaryocytes [229]. Ceci s'accompagne également d'une diminution de l'expression de GATA-1, facteur nécessaire à l'érythropoïèse normale [229], ainsi que celles de l'hémoglobine et du récepteur de la transferrine, qui sont des marqueurs de la différenciation des érythrocytes [233]. L'effet d'Ets-1 sur le promoteur de la transferrine est dû à son interaction avec MafB, un facteur spécifique des cellules myéloïdes qui bloque ses propriétés transactivatrices [234]. L'effet d'Ets-1 sur l'expression de GATA-1 est, lui, antagoniste dans les cellules mégacaryocytaires (activateur) et érythroïdes (répresseur).

I-4/ Angiogenèse

I-4-1/ Mécanisme général

L'angiogenèse est un processus physiologique correspondant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux qui sont préexistants. Pour cela, les cellules endothéliales sont activées en réponse à un stimulus. Ceci conduit de façon successive : (1) à la déstabilisation de la paroi vasculaire préexistante, (2) au déplacement des cellules endothéliales à travers le vaisseau, (3) à la dégradation de la membrane basale, (4) à la digestion de la MEC environnante et (5) à la migration orientée des cellules endothéliales suivie d'une phase proliférative. Ces étapes clés sont sous la dépendance de signaux pro-angiogéniques, tels que le VEGF et le bFGF, qui induisent la sécrétion de protéases par les cellules endothéliales. Grâce à des contacts intercellulaires, il se forme alors des tubes constituant la lumière du futur vaisseau sanguin dont la formation est achevée par le recrutement des péricytes et des cellules VSMC (« *vascular smooth muscle cells* »).

I-4-2/ Ets-1 dans l'angiogenèse

I-4-2-1/ Expression associée à l'angiogenèse

Au cours du développement embryonnaire, Ets-1 est exprimée dans les structures vasculaires en formation, au niveau du cœur, des artères, des capillaires et des méninges [202]. A l'opposé, Ets-1 n'est plus détectée dans les vaisseaux matures après leur différenciation, indiquant qu'elle est associée au processus même de l'angiogenèse [202]. De plus, son expression est induite lors de la régénération endothéliale suite à la dénudation d'une monocouche de cellules endothéliales [235].

De nombreuses expériences réalisées *in vivo* ont permis de désigner Ets-1 comme un acteur clé de l'angiogenèse. En effet, l'inhibition de l'expression d'Ets-1 à l'aide d'ARN antisens spécifiques est capable de bloquer l'angiogenèse induite *in vivo* [236, 237]. De la même façon, l'utilisation d'un dominant négatif interférant avec l'action d'Ets-1 prévient l'angiogenèse induite par le bFGF et le VEGF dans un modèle murin [238]. De plus, l'expression d'Ets-1 est associée à la formation des capillaires sanguins et à leur stabilisation [239]. Cependant, les souris déficientes pour l'expression d'Ets-1 ne présentent pas de défaut de vascularisation [208]. Ceci s'explique par la redondance entre Ets-1 et Ets-2, leur double déficience aboutissant à des malformations vasculaires létales chez la souris [205].

I-4-2-2/ Rôle dans les cellules endothéliales

Le rôle d'Ets-1 dans l'angiogenèse est également illustré par des travaux menés dans des lignées de cellules endothéliales. Ceux-ci montrent que la suppression de la synthèse d'Ets-1 réduit la migration des cellules induite par le VEGF [240] et la formation de tubes stimulée par le CCL-2 [83]. A l'inverse, la surexpression d'Ets-1 dans des cellules endothéliales augmente leurs capacités invasives, leur permettant d'acquérir un phénotype angiogénique [241].

La fonction d'Ets-1 dans les cellules endothéliales puise son origine dans la régulation de nombreux gènes cruciaux pour leurs propriétés angiogéniques (*Flt-1*, *Flk-1*, et *VE-cadhérine*), leurs capacités invasives (*collagénase-1*, *stromélysine-1*, *uPA* et *gélatinase-B*), ainsi que pour leur migration (*intégrine β 3*) [242, 243].

I-4-2-3/ Rôle dans les cellules VSMC

L'implication d'Ets-1 dans l'angiogenèse ne concerne pas uniquement les cellules endothéliales, mais également les cellules musculaires lisses vasculaires, VSMC [244]. En premier lieu, l'expression d'Ets-1 est induite par des facteurs modulant les propriétés de ces cellules, tels que le PDGF-BB et l'endothéline-1 [59].

Bien que les données fonctionnelles soient peu abondantes, une étude a mis en évidence qu'Ets-1 est capable d'activer la croissance des cellules VSMC [245]. Cet effet est en corrélation avec des travaux montrant qu'Ets-1 active le promoteur de gènes codant : (1) PDGF-A et PDGF-D, des facteurs stimulant la croissance de ces cellules [245, 246] et (2) PDGF-R α , un récepteur à certains facteurs de croissance de la famille du PDGF [247]. Comme l'indiquent certaines expériences, Ets-1 pourrait également participer à la différenciation des cellules VSMC, démontrée par la perte d'expression de la SM α -actine (« *smooth muscle α -actin* »), marqueur de différenciation des cellules VSMC [248].

I-5/ Ostéogenèse

L'expression d'Ets-1 est détectée dans les structures osseuses en formation au cours du développement, mais pas dans le cartilage [201]. A l'inverse, Ets-2 est mis en évidence dans le cartilage en formation, suggérant des rôles distincts au cours de l'ostéogenèse [202]. L'utilisation d'un modèle cellulaire d'ostéoblastes, la lignée MC3T3-E1, a permis d'éclaircir

le rôle propre d'Ets-1 au cours de l'ostéogenèse. Cette lignée forme des nodules osseux en une période de 30 à 35 jours de culture. Le développement nodulaire à partir des cellules MC3T3-E1 s'effectue en trois phases successives, caractérisées par : (1) une prolifération accrue de ces cellules, (2) une différenciation accompagnée de la synthèse d'une matrice osseuse, et (3) une minéralisation de la matrice [249]. Dans ce modèle cellulaire, Ets-1 s'exprime uniquement lors de la phase de prolifération alors qu'Ets-2 est synthétisée durant les phases suivantes [72]. En effet le rôle d'Ets-1 est de permettre la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes en régulant les gènes : (1) de la PTHrP, un médiateur du remodelage osseux [117, 118, 249], (2) de l'ostéopontine, un constituant de la matrice osseuse, qui est activé par Ets-1 en synergie avec AML-1 [250], et (3) du facteur de croissance CTGF (« *connective tissue growth factor* ») également impliqué dans la différenciation en ostéoblaste et le remodelage osseux [251].

I-6/ Développement du système nerveux central et périphérique

I-6-1/ Mécanisme général

Le système nerveux central se développe avec l'apparition de la plaque neurale, issue de l'épaississement de l'ectoderme. Celle-ci s'invagine, et se renferme pour donner d'une part le tube neural et d'autre part la crête neurale, originaire des bordures de la plaque sous-jacentes à l'ectoderme. Deux types de cellules prolifèrent au sein du tube neural: les neuroblastes et les glioblastes. Les neuroblastes donnent naissance aux neurones. Les glioblastes se différencient pour former les cellules gliales, telles que les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales (Figure 25). La partie antérieure du tube neural est destinée à former le cerveau et la partie postérieure, la moelle épinière. Les cellules de la crête neurale auront des destins très variés : elles formeront des mélanocytes, les dents, du cartilage facial, le thymus, le septum cardiaque, ainsi qu'une partie du système nerveux périphérique [252] (Figure 25).

I-6-2/ Ets-1 dans le développement du système nerveux

Ets-1 est exprimée précocement au sein du système nerveux central en formation, au niveau du tube neural, puis plus tardivement, dans le cortex cérébral en développement [201, 202]. Le rôle d'Ets-1 s'étend donc sur toutes les lignées issues du tube neural. La synthèse d'Ets-1 est détectable lors de la différenciation neuronale (neuroblastes) et dans des astrocytes en culture (issus des glioblastes) [106, 201]. Ets-1 intervient aussi dans la différenciation de la

lignée glioblastique [253]. D'un point de vue moléculaire, Ets-1 est associée à la régulation du gène du récepteur δ aux opioïdes, qui est également exprimé dans le cortex cérébral en développement [254] et celui de la prolactine, qui est activé dans l'hypophyse [133].

Ets-1 est également un facteur majeur du développement de la crête neurale. Il permet la genèse de la crête neurale céphalique [255], qui donnera les mélanocytes et les cartilages de la face en permettant l'expression du marqueur précoce de différenciation Sox10 (« *SRY-related HMG-box 10* ») [256]. Ceci explique peut-être le rôle prépondérant d'Ets-1 lors de la cancérisation des mélanocytes [257]. Ets-1 est aussi essentielle au développement de la crête neurale cardiaque qui donnera le septum du cœur [258]. En effet, la déficience d'expression d'Ets-1 provoque des malformations post-natales du septum cardiaque chez la souris transgénique reliées à un défaut de migration et de différenciation des cellules de la crête neurale [258].

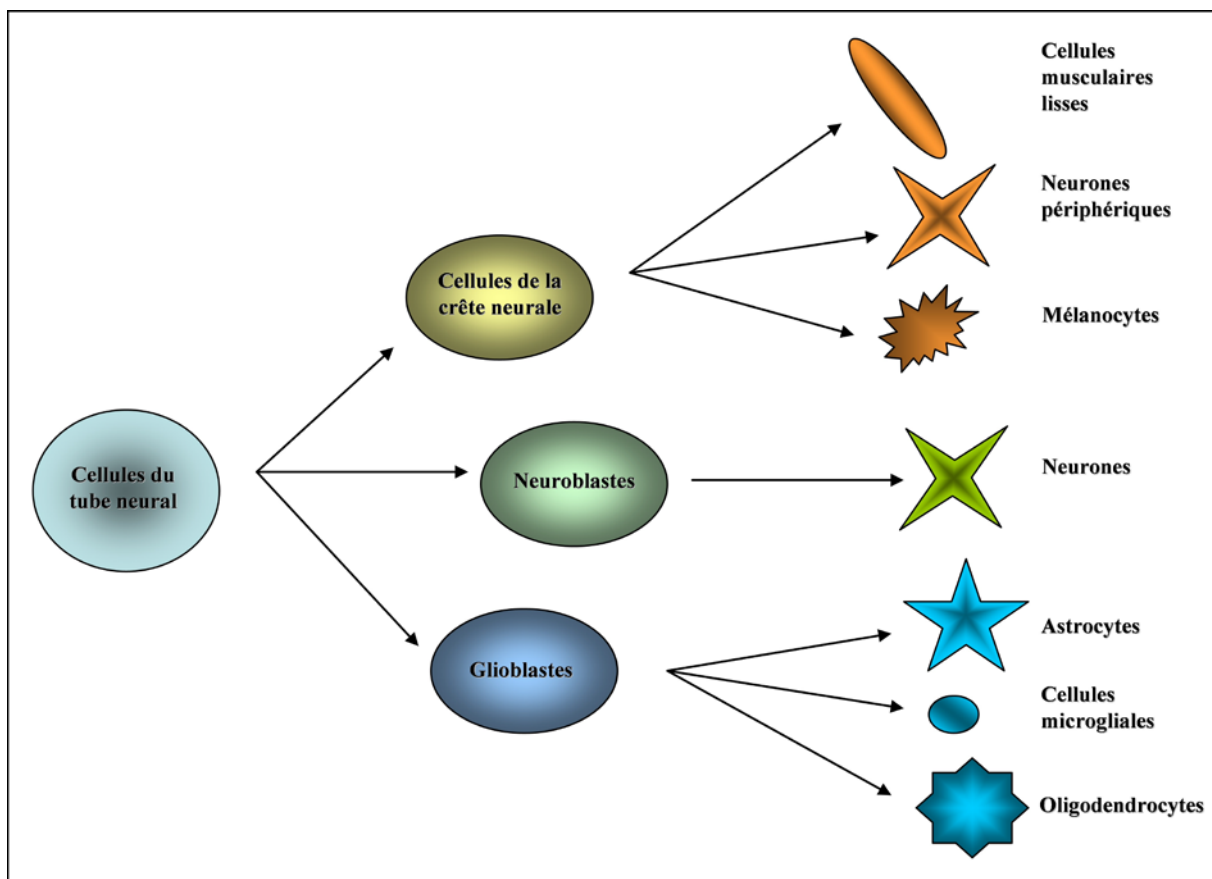


Figure 25 : Etapes de différenciation du système nerveux à partir du tube neural.
D'après [252].

II/ Rôles pathologiques d'Ets-1

II-1/ Cancer

II-1-1/ Mécanisme général

Au niveau moléculaire, le cancer résulte de l'altération génétique, issue de facteurs héréditaires ou environnementaux, d'une cellule. Dans certaines conditions (étape d'induction), celles-ci vont conduire à l'acquisition d'un phénotype transformé qui est caractérisé par : (1) une prolifération accrue et illimitée, (2) une perte de l'inhibition de contact, (3) une indépendance vis-à-vis des signaux mitogènes et (4) une résistance à l'apoptose. Après déstabilisation de l'homéostasie tissulaire, de nombreux clones de cellules transformées parviennent à émerger (étape de promotion). Ceux-ci contribueront à former, par exemple dans le cas de cellules épithéliales, une tumeur *in situ*, désignée carcinome.

Dans ce cas, les cellules tumorales se dédifférencient progressivement par EMT puis acquièrent la capacité de rompre la lame basale et d'envahir la MEC environnante. Grâce à des interactions avec le stroma, diverses protéases sont sécrétées afin de digérer la matrice et de favoriser la migration des cellules issues de la tumeur primaire. Celles-ci pénètrent alors dans les vaisseaux sanguins par intravasation et pourront coloniser un autre tissu (métastases) par un processus inverse.

Dans l'environnement tumoral, de nouveaux vaisseaux sanguins se développent à partir de vaisseaux préexistants sous l'effet de divers facteurs pro-angiogéniques sécrétés par la tumeur. Ce processus, nommé néo-angiogenèse tumorale, s'établit suivant le même mécanisme que l'angiogenèse normale. Il contribue, d'une part, à l'apport nutritif nécessaire au métabolisme accru de la tumeur et d'autre part, à la dissémination des cellules qui formeront des métastases.

II-1-2/ Ets-1 dans le cancer

II-1-2-1/ Expression associée au cancer

Chez l'homme, Ets-1 est peu ou pas exprimée dans les tissus sains adultes alors qu'elle est fortement détectée dans les tissus cancéreux [259]. De nombreuses tumeurs solides, que ce soit des carcinomes ou bien des sarcomes, ainsi que certaines tumeurs circulantes présentent un taux élevé d'Ets-1 (au niveau ARNm ou protéine) [259].

L'expression d'Ets-1 est généralement associée à la progression tumorale *in vivo*, désignant Ets-1 comme un facteur de mauvais pronostic, notamment dans les carcinomes

mammaires, les carcinomes pulmonaires, les carcinomes colorectaux, les carcinomes pancréatiques, les carcinomes ovariens, les carcinomes du col de l'utérus, les carcinomes prostatiques, les mélanomes, les méningiomes et les angiosarcomes de la peau [10, 17, 259].

Au niveau cellulaire, Ets-1 est impliquée dans de nombreux processus associés à la progression tumorale tels que la prolifération, la transformation, la migration, l'invasion de la MEC, la formation métastatique et la néo-angiogenèse.

II-1-2-2/ Rôle dans la prolifération et la transformation cancéreuse

Le statut de proto-oncoprotéine d'Ets-1 est synonyme de son rôle dans la transformation cellulaire. En effet, l'expression exogène d'Ets-1 dans des fibroblastes embryonnaires de souris, NIH-3T3, suffit à induire leur transformation et à les rendre tumorigéniques chez l'animal [61].

De plus, lorsque l'activité d'Ets-1 est bloquée (grâce à l'utilisation d'un dominant négatif) dans des cellules de carcinome thyroïdien, la transformation est inhibée et la croissance est réduite de façon drastique [260]. L'extinction de l'expression d'Ets-1 dans des cellules de gliome est également responsable d'une réduction de leur prolifération [183]. Ceci est directement relié au rôle d'Ets-1 dans le cycle cellulaire (voir §I-1-1).

Enfin, Ets-1 est capable de bloquer l'apoptose de cellules de carcinome thyroïdien, ce qui pourrait accroître leurs propriétés transformantes [260].

II-1-2-3/ Rôle dans la migration cancéreuse

Ets-1 participe également à la migration cellulaire. Ainsi, il a été mis en évidence que l'utilisation d'un dominant négatif [261, 262] ou d'ARNs antisens spécifiques [263] d'Ets-1 réduit la migration de cellules de gliome. Ceci s'accompagne d'une inhibition de la synthèse de l'intégrine αv [261]. Les intégrines jouent un rôle crucial dans la migration des cellules cancéreuses à travers leur fonction de récepteurs des composants de la MEC. Dans des cellules de mélanome malin, la surexpression d'Ets-1 est également capable de promouvoir la migration, ce qui est associée à l'augmentation de la synthèse de l'intégrine $\beta 3$ [257].

II-1-2-4/ Rôle dans l'invasion cancéreuse

Le rôle d'Ets-1 dans l'invasion tumorale est suggéré par deux observations réalisées *in vivo* sur des explants de carcinomes : l'expression d'Ets-1 est plus abondante dans les tumeurs

invasives que dans les tumeurs *in situ*, et elle prédomine dans les fibroblastes du stroma [264, 265]. Dans ces explants, la synthèse d'Ets-1 est corrélée à celle de nombreuses protéases matricielles impliquées dans la dégradation d'un grand nombre de composants de la MEC. Ainsi, il est rapporté qu'Ets-1 est co-exprimée *in vivo* : (1) avec la collagénase-1 (MMP-1) et la gélatinase-B (MMP-9) dans le stroma de carcinomes colorectaux [266], ovariens [267] et mammaires [268], (2) avec l'uPA au sein de carcinomes mammaires [104], (3) avec la gélatinase-A (MMP-2) dans le stroma de carcinomes ovariens [269] et (4) avec la stromélysine-1 (MMP-3) dans le stroma d'adénocarcinomes de colon, et de carcinomes pulmonaires, mammaires et thyroïdiens [270]. L'ensemble des gènes codant ces protéases matricielles est régulé de façon directe par Ets-1 [74, 104, 130, 148, 271]. D'ailleurs, l'utilisation d'un dominant négatif interférant avec les propriétés d'Ets-1 affecte les capacités d'invasion tumorale [96, 262].

II-1-2-5/ Rôle dans la formation de métastases

L'activité tumorigène d'Ets-1 est directement liée à la formation de métastases. En effet, des études menées sur des cellules de gliome exprimant un dominant négatif d'Ets-1 montrent que la répression de l'activité d'Ets-1 réduit la capacité de ces cellules à développer des métastases hépatiques après injection dans la membrane chorioallantoïde d'embryons de poulet [261].

Les propriétés d'Ets-1 dans ce processus résultent de la régulation de certains gènes cibles. Ainsi, le gène de la PTHrP, cible d'Ets-1, code une protéine exprimée par des tumeurs mammaires agressives dans lesquelles elle promeut la dissémination métastatique au niveau de l'os [272]. D'ailleurs, Ets-1 facilite la croissance des cellules de cancer du sein dans le microenvironnement osseux en stimulant l'ostéolyse [273]. Le modèle suivant concernant le rôle d'Ets-1 dans ce processus a été décrit : les cellules de cancer du sein exprimeraient de façon précoce l'IL-8, dont la transcription est activée par Ets-1, pour initier la dégradation osseuse (par activation des neutrophiles), alors que la PTHrP, détectée plus tardivement, serait responsable du maintien du cycle de destruction osseuse [274].

De plus, il est à noter que la transcription d'une enzyme impliquée dans la formation de métastases dans certains types de carcinomes, la N-acétyl-glucosaminyl-transférase V, est sous la dépendance d'Ets-1 [275, 276].

II-1-2-6/ Rôle dans la néo-angiogenèse cancéreuse

En plus d'agir de façon directe sur les capacités prolifératives, migratoires et invasives des cellules cancéreuses, Ets-1 contrôle l'environnement tumoral en favorisant la néo-angiogenèse. En effet, l'expression d'Ets-1 est détectée *in vivo* dans les vaisseaux qui irriguent diverses tumeurs [277], notamment celles de l'ovaire, du col de l'utérus et de l'endomètre [278-280]. Celle-ci est corrélée avec la synthèse de VEGF ou de VEGFR-1 dans les vaisseaux de certains carcinomes [281, 282]. Le rôle d'Ets-1 dans la néo-angiogenèse tumorale, comme dans l'angiogenèse physiologique, est dû : (1) à l'induction de son expression par des facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGF et (2) à sa capacité à réguler de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules endothéliales (voir §I-4-2).

II-2/ Autres pathologies

II-2-1/ Infections virales

II-2-1-1/ Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH, HIV en anglais) est un rétrovirus qui infecte les cellules humaines par l'intermédiaire du marqueur membranaire CD4 qui est reconnu par la glycoprotéine gp120 du VIH. Ainsi, les lymphocytes T CD4+, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules microgliales cérébrales qui possèdent ce marqueur peuvent être infectées par le VIH. Il existe deux types de VIH, le VIH-1 et le VIH-2. La transcription des gènes viraux dans la cellule infectée est sous le contrôle d'un « *enhancer* », désignée LTR (« *long terminal repeat* »). Une étude menée sur des cellules T montre qu'Ets-1 est recrutée au niveau du LTR du VIH-1 dans une région, dite U3 (-141/-149), nécessaire à la croissance virale *in vitro* [283]. La régulation de la transcription des gènes viraux du VIH par Ets-1 implique des partenaires protéiques, notamment : (1) le facteur NFκB. Ils agissent de façon coopérative au niveau de sites EBS et NFκB fonctionnels présents dans les « *enhancers* » des VIH-1 et VIH-2 [284]. (2) le facteur USF-1. Ils transactivent de façon synergique l'« *enhancer* » du VIH-1. Cet effet résulte de la formation d'un complexe ternaire comprenant Ets-1 et USF-1 qui sont recrutées au niveau de leur site composite EBS/E-box [285]. Une étude a également identifié Ets-1 p42 comme responsable

de la réactivation de VIH-1 latent en absence d'activation des lymphocytes T *via* sa fixation au niveau du LTR [286].

II-2-1-2/ Le virus T-lymphotropique humain (HTLV)

Le virus T-lymphotropique humain (HTLV) est le premier rétrovirus infectant l'homme à avoir été découvert. Il est responsable du déclenchement de divers cancers notamment des leucémies et des lymphomes. Le LTR du HTLV-1 contient deux éléments activateurs de réponse à Ets-1. L'un d'entre eux, désigné EER-1, contient des EBS recrutant la protéine Ets-1 [287]. Ets-1 et Ets-2 sont capables de transactiver l'« *enhancer* » de ce virus en agissant au niveau de cette région EER-1. Celle-ci constitue également un élément de réponse à Tax-1, facteur codé par le virus HTLV lui-même [288]. D'ailleurs, une étude démontre l'existence d'une synergie d'action entre Ets-1 et Tax-1 au niveau d'un site composite appartenant à cet EER-1 pour stimuler l'« *enhancer* » de ce virus [287]. Il est à noter que la coopération entre Ets-1 et Tax-1 est également décrite dans le contexte de l'activation du gène de l'interleukine 5 [223].

II-2-2/ Pathologies inflammatoires

L'induction de l'expression d'Ets-1 par des cytokines pro-inflammatoires (Interleukines 1 β , 5 et 8 ou le TNF- α) ainsi que sa capacité à activer la synthèse de protéases matricielles (collagénase-1 (MMP-1), gélatinase-B (MMP-9), stromélysine-1 (MMP-3) et uPA, entre autres) font de cette protéine un acteur important dans certaines maladies inflammatoires et invasives.

II-2-2-1/ Arthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde est caractérisée par une inflammation de la membrane synoviale s'accompagnant d'une dégradation du cartilage articulaire. *In vivo*, les tissus de patients atteints de cette pathologie expriment Ets-1 au niveau des fibroblastes composant la membrane synoviale, mais également au niveau des macrophages et des cellules endothéliales [289]. Dans des cellules synoviales de patients touchés par l'arthrite rhumatoïde, l'expression d'Ets-1 est corrélée à une augmentation de la collagénase-1, de la collagénase-3 (MMP-13) et de la stromélysine-1 [290], ainsi qu'à une sécrétion des cytokines pro-inflammatoires interleukine 1 β et TNF- α [291], cibles transcriptionnelles d'Ets-1. Une hypoxie tissulaire est

détectée dans les articulations de rats atteints de polyarthrite rhumatoïde. Du fait de la colocalisation d'Ets-1 et de HIF-1 α dans ces zones [292], celle-ci pourrait être responsable de l'expression du gène *ets-1* (voir Chapitre III §I-1). L'hypoxie est connue pour stimuler la néo-angiogenèse. Or, une angiogenèse inflammatoire est liée à l'arthrite rhumatoïde qui implique le facteur Ets-1 [293]. Le VEGF, facteur angiogénique important dans cette pathologie, pourrait aussi être le responsable de l'expression du gène *ets-1*.

II-2-2-2/ Pathologies rénales

La protéine Ets-1 est synthétisée dans le rein au cours de l'embryogenèse mais devient indétectable chez l'adulte [207], sauf dans certaines pathologies. En effet, Ets-1 est associée à la progression d'une maladie inflammatoire des glomérules rénaux, la glomérulonéphrite [294]. Son rôle dans cette pathologie est lié, entre autres, à sa capacité d'induire la synthèse de MMPs [295]. Néanmoins, les données sur l'action d'Ets-1 au sein de ces pathologies sont assez fragmentaires. L'expression d'Ets-1 peut être provoquée par la voie de l'angiotensine II ou par l'endothéline-1 [89, 185] (voir Chapitre III §I-1).

II-2-2-3/ Athérosclérose

L'athérosclérose débute par l'accumulation de corps gras au niveau de la paroi interne des artères (intima) à laquelle s'ajoutent progressivement des dépôts de fibrinogène, de plaquettes, de cellules sanguines et de calcium. Il s'en suit une prolifération des cellules VSMC (conséquence à leur dé-différenciation) et du tissu conjonctif. Ceci entraîne la formation d'une plaque instable inflammatoire, la plaque d'athérome. Un rôle d'Ets-1 dans l'athérosclérose a été proposé sur la base de son action dans les processus de dé-différenciation et de prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, VSMC (voir Chapitre IV §I-4-2-3). De manière intéressante, Ets-1 est détectée dans l'aorte d'un modèle murin d'athérosclérose en association avec le TNF- α et Erk-1/-2 phosphorylées [82]. Là encore, HIF-1 α et le VEGF présents dans cette pathologie pourraient permettre l'expression du gène *ets-1* [296]. Il est à noter que sont également impliquées dans cette expression les voies de l'angiotensine II [114] et du TNF- α [297] (voir Chapitre III §I-1).

L'exposé des rôles biologiques d'Ets-1 met en évidence un lien indéniable entre la fonction de ce facteur et ses propriétés transcriptionnelles. Il ressort également de l'étude bibliographique exposée dans ce Chapitre, la fonction polyvalente d'Ets-1 dans divers aspects de la cancérisation. Ceci est d'ailleurs à l'origine du terme oncoprotéine fréquemment utilisé pour la désigner.

Par conséquent, Ets-1 constitue une cible dont la répression pourrait bloquer ou freiner la progression tumorale. Cependant, de nombreuses inconnues demeurent afin de mettre en place une telle stratégie. En effet, à ce jour, aucune thérapie de ciblage d'Ets-1 n'a montré d'efficacité clinique. La raison en est probablement que, si de nombreux mécanismes spécifiques de son action sont connus au sein de processus restreints, paradoxalement, peu de choses ont été déterminées d'un point de vue plus général sur sa régulation. Afin de mettre en place une thérapie ciblée, il est nécessaire de pouvoir atteindre ce qui constitue la clef de voûte de l'action d'Ets-1. Or, la seule voie pouvant représenter un tel angle d'attaque serait la voie Ras-MAPK. Son ciblage étant peu envisageable en clinique, du fait de son importance fondamentale dans de nombreux processus physiologiques, il est essentiel d'étudier de façon plus approfondie les réseaux de régulation d'Ets-1 afin de mettre au point une stratégie de ciblage de son activité.

DEUXIEME PARTIE : PARP-1

CHAPITRE I : La superfamille des poly(ADP-ribose)

polymérases (PARP)

I/ Origine de la superfamille des PARP

En 1963, Chambon, Weil et Mandel découvrent une nouvelle enzyme dépendante de l'ADN dont l'activité est stimulée par le nicotinamide adénine dinucléotide sous sa forme oxydée (NAD⁺) [298]. A partir de ce substrat, elle catalyse une modification post-traductionnelle, encore inconnue à l'époque, appelée poly(ADP-ribosyl)ation, qui consiste en un greffage de polymères d'ADP-ribose (PAR) sur une protéine acceptrice [299]. De ce fait, cette nouvelle enzyme, fondatrice d'une nouvelle famille, fut appelée la poly(ADP-ribose) polymérase-1, la PARP-1 [300].

Par la suite, il fut entrepris de caractériser toutes les enzymes de cette famille grâce à une comparaison exhaustive, effectuée au sein de la banque de données du NCBI, par homologie de séquences avec la « signature PARP » contenue dans le domaine catalytique de la PARP-1 [300] (Figure 26). Ceci permit de mettre à jour une superfamille d'enzymes constituée de 17 membres conservés des plantes aux mammifères, présentant même des homologies structurales avec certaines toxines bactériennes catalysant l'ADP-ribosylation [301]. Néanmoins, ces enzymes semblent être absentes chez la levure [299].

II/ Présentation générale des PARP

La superfamille des PARP comprend 17 membres ; 11 d'entre eux sont répartis en quatre groupes distincts, alors que les 6 autres sont considérés comme non classés (Figure 26) [301].

Leur point commun est la présence d'une « signature PARP » dans leur domaine catalytique, cette séquence peptidique très conservée correspond au site actif de l'enzyme [300]. Cependant, la présence de ce site ne signifie pas obligatoirement que ces enzymes ont une activité de poly(ADP-ribosyl)ation (PARylation) [302]. En effet, seules les PARP-1 et -2 et les Tankyrases (TNKS) sont connues pour avoir une capacité de PARylation qui consiste en une polymérisation linéaire des ADP-riboses (Tableau 5). De plus, les PARP-1 et -2 peuvent greffer latéralement de nouveau PAR sur une chaîne linéaire, formant ainsi des

polymères multi-branchés. La capacité de PARylation est également prédite pour les PARP-3 et -4 et est due à l'existence d'un résidu d'acide glutamique (E) indispensable situé dans la partie C-terminale du domaine catalytique (E988 pour la PARP-1) [301]. De plus, une activité de mono(ADP-ribosylation) est décrite pour les PARP-3, -6, -10 et -14 (Tableau 5). C'est pour cette raison que la nomenclature officielle des enzymes préfère le terme ADP-ribosyl transférase (ADPRT) ou ARTD (« *ADP-ribosyltransferase diphtheria toxin-like* ») au terme PARP qui reste pourtant, et de loin, le plus utilisé [302]. Il est très important de remarquer que 9 membres sur 17 de la superfamille des PARP n'ont aucune capacité d'ADP-ribosylation connue (Tableau 5).

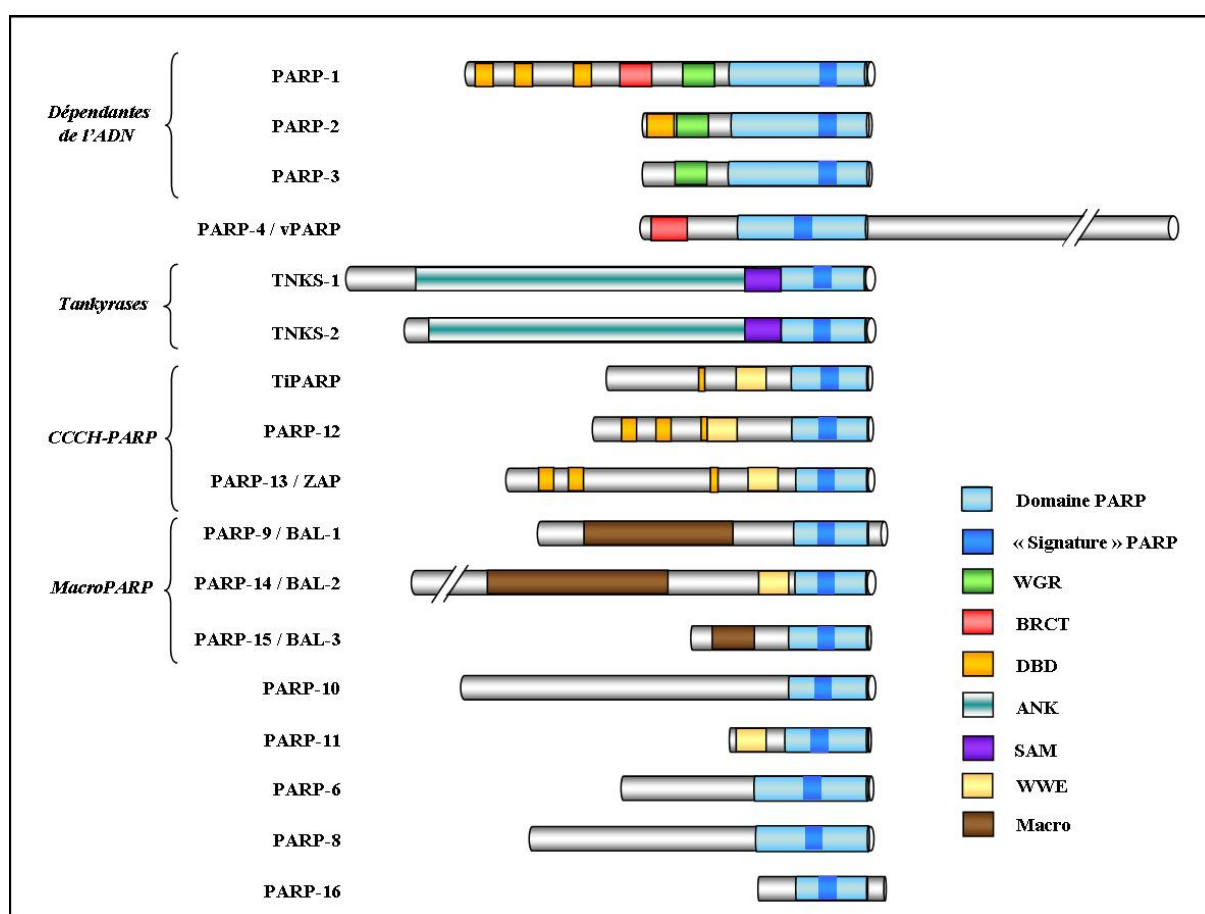


Figure 26 : Représentation des différents membres de la superfamille des PARP chez les vertébrés.

Le nom de chaque membre de la superfamille est indiqué selon la nomenclature des PARP. Un nom alternatif est inscrit si celui-ci est fréquemment retrouvé dans la bibliographie. Les domaines principaux ont été représentés, à savoir le domaine catalytique PARP en bleu clair contenant la « signature PARP » conservée dans toute la famille en bleu foncé. A noter également, les motifs répétés Ankyrine (ANK) spécifiques des Tankyrases (TNKS), le domaine WGR spécifique des PARP dépendantes de l'ADN, les domaines Macro retrouvés chez les MacroPARP et le domaine WWE très présent au sein de la superfamille. L'indication DBD (« *DNA binding domain* ») réfère à des structures de liaison à l'ADN constituées de doigts de zinc. Les hachures pour PARP-4 et PARP-14 indiquent des régions non structurées tronquées pour une meilleure lecture du schéma. D'après [301].

En dehors du domaine catalytique, d'autres domaines protéiques se retrouvent fréquemment chez les PARP. En premier lieu, nous pouvons signaler que 5 membres présentent des domaines de liaison à l'ADN (DBD) de type doigts de Zinc (Figure 26). Néanmoins, il faut dissocier les doigts de zinc des PARP-1 et -2 de type $CX_2CX_{28,30}HX_2C$ (où C désigne une cystéine, H une histidine et X n'importe quel acide aminé) permettant la reconnaissance de cassures simple- et double-brin de l'ADN (voir Chapitre II §III-2), des doigts de zinc de TiPARP et des PARP-12 et -13 de type $CX_{7-11}CX_{3-9}CX_3H$ qui sont des domaines putatifs de liaison à l'ARN et qui donnent leur nom au groupe des CCCH-PARP (Figure 26) [301]. Ensuite, le domaine WWE se retrouve chez toutes les CCCH-PARP mais également chez les PARP-11 et -14. Il doit son nom à trois résidus d'acides aminés conservés, deux tryptophanes (W) et un acide glutamique (E). Il s'agit d'un domaine d'interaction protéine-protéine également impliqué dans des interactions *via* la reconnaissance des PAR [303, 304]. Enfin, il est à noter que les PARP-1 et -4 possèdent un domaine BRCT (« *BRCAl C terminus* ») qui permet des interactions protéine-protéine (voir Chapitre II §II).

Pour finir, certains domaines sont spécifiques de l'un des quatre groupes de PARP. Les PARP-1, -2 et -3 dépendantes de l'ADN pour leur activité catalytique contiennent un domaine WGR (Figure 26), appelé ainsi car il possède un motif constitué de résidus tryptophane (W), glycine (G) et arginine (R). Il permet l'activation du domaine catalytique après la reconnaissance des cassures de l'ADN [305]. Les Tankyrases diffèrent des autres PARP par la présence d'un domaine SAM et d'une région contenant des motifs répétés de type ankyrine (Figure 26). Ceux-ci sont impliqués dans des interactions protéine-protéine [301, 306]. Enfin, les MacroPARP contiennent plusieurs domaines Macro qui ont la capacité de fixer l'ADP-ribose sous forme de monomère ou de PAR ainsi que des métabolites du NAD^+ . Ils interviennent dans le contrôle de la PARylation catalysée par les PARP notamment en régulant la longueur des polymères [301, 304].

Bien qu'étant toutes des ADP-ribosyl transférases, les PARP ont des fonctions biologiques très diversifiées. De façon générale, les PARP sont impliquées dans le contrôle du métabolisme de la cellule.

Membre	Nomenclature ARTD	Groupe	Taille (aa)	Activité enzymatique
PARP-1	ARTD1	Dépendantes de l'ADN	1014	P → L et B <u>E</u>
PARP-2	ARTD2		570	P → L et B <u>E</u>
PARP-3	ARTD3		540	M et P (prédite) <u>E</u>
PARP-4	ARTD4		1724	P (prédite) <u>E</u>
TNKS-1	ARTD5	Tankyrases	1327	P → L <u>E</u>
TNKS-2	ARTD6		1166	P → L <u>E</u>
TiPARP	ARTD14	CCCH-PARP	657	M (prédite)
PARP-12	ARTD12		701	M (prédite) <u>E</u>
PARP-13	ARTD13		902	M (prédite)
PARP-9	ARTD9	MacroPARP	854	M (prédite)
PARP-14	ARTD8		1801	M <u>E</u>
PARP-15	ARTD7		444	M (prédite) <u>E</u>
PARP-10	ARTD10		1025	M
PARP-11	ARTD11		331	M (prédite) <u>E</u>
PARP-6*	ARTD15		630	M <u>E</u>
PARP-8	ARTD16		854	M (prédite) <u>E</u>
PARP-16*	ARTD17		322	M (prédite)

Tableau 5 : Organisation et activité enzymatique des membres de la superfamille des PARP.

Les membres de la superfamille sont présentés dans le même ordre qu'en Figure 26. La nomenclature ARTD est la dénomination enzymatique officielle. Aa = acides aminés. Pour les activités enzymatiques : P = PARylation qui peut être (→) L = Linéaire ou B = Multi-branchée, M = Mono-(ADP-ribosylation). Les activités prédites sont non démontrées. E = PARP qui possède le résidu d'acide glutamique conservé indispensable mais non suffisant pour avoir une activité de PARylation. * Il existe une forte ambiguïté sur certaines dénominations des PARP dans la littérature, ainsi la PARP-6 désigne parfois la TNKS-2 mais il y a également confusion entre les PARP-6 et -16. Ici, elles sont présentées comme en Figure 26. D'après [302].

III/ Implications des PARP en biologie

Dès les premiers travaux effectués sur les PARP, elles ont été associées aux processus impliquant l'ADN. En effet, la PARP-1, notamment, est une protéine ubiquitaire, très fortement exprimée dans tous les types cellulaires et qui peut être considérée comme un véritable gardien du génome [299]. Les PARP-1, -2 et -3 participent activement aussi bien aux mécanismes de réparation des cassures simple-brin que des cassures double-brin de l'ADN (Tableau 6). Les TNKS, elles, agissent sur l'intégrité des télomères ainsi que dans une

moindre mesure PARP-1 et -2. Nous pouvons également noter le rôle de la PARP-1 dans la réplication de l'ADN en phase S du cycle cellulaire (Tableau 6).

Dans un contexte cellulaire, ces différentes fonctions permettent, selon le niveau de dommage à l'ADN, de promouvoir soit la mitose et la prolifération, soit, si la cellule est trop endommagée, de provoquer l'arrêt du cycle voire la mort cellulaire (voir Chapitre IV §I-7).

Structure de la chromatine et métabolisme de l'ADN	
Compaction et décompaction de la chromatine	PARP-1, PARP-2
Transcription	PARP-1, PARP-2, PARP-9, PARP-14
Domaines chromatinien (<i>Insulation</i>)	PARP-1
Réparation des cassures simple-brin (BER)	PARP-1, PARP-2
Réparation des cassures double-brin (a-NHEJ)	PARP-1, PARP-3
Réplication de l'ADN	PARP-1
Entretien des télomères	TNKS-1, TNKS-2, PARP-1, PARP-2
Division, prolifération, différenciation et mort cellulaire	
Mitose	PARP-1, PARP-2, PARP-3, TNKS-1
Différenciation cellulaire	PARP-1, PARP-2
Mort cellulaire	PARP-1
Prolifération	PARP-1, PARP-10
Physiologie et pathologies	
Carcinogenèse, progression tumorale, hypoxie et migration cellulaire	PARP-1, PARP-6, PARP-9, PARP-14
Infection virale	PARP-1, PARP-13
Réponses immunitaire et inflammatoire	PARP-1, PARP-2, PARP-9, PARP-14
Résistance aux drogues	PARP-4
Métabolisme	PARP-2, PARP-1
Spermatogenèse	PARP-2
Développement vasculaire et osseux	TiPARP

Tableau 6 : Implications des enzymes PARP en biologie.

BER « *base-excision repair* », a-NHEJ « *alternative-non-homologous end joining* » (voir Chapitre IV §I-1). D'après [307].

Les PARP ont aussi un rôle majeur dans les phénomènes de régulation de la compaction de la chromatine et dans la transcription (Tableau 6). Le meilleur exemple reste le rôle de la PARP-1 dans la transcription de certains gènes et dans des mécanismes épigénétiques comme l'*insulation* ou dans la décompaction de la chromatine (voir chapitre IV §I-2 et §I-3). Cependant, nous pouvons signaler que les PARP-2, -9 et -14 sont également impliquées dans des mécanismes de transcription et ceci de façon tissu-spécifique contrairement à la PARP-1 qui est ubiquitaire [308].

Ces différentes fonctions font que les PARP sont engagées dans diverses réponses physiologiques et pathologiques principalement liées à des stress souvent génotoxiques. Ainsi les PARP-1, -2, -9 et -14 interviennent dans les réponses immunitaires et favorisent l'inflammation. Il est très frappant de constater que ces mêmes PARP (PARP-2 hormis) sont aussi impliquées dans la carcinogenèse et la progression tumorale où les mécanismes d'inflammation sont souvent détournés au profit de la tumeur (Tableau 6).

Enfin, les PARP participent au développement et à la croissance de l'organisme. PARP-1 et -2 régulent le métabolisme aussi bien à l'échelle cellulaire qu'à celle de l'individu. De plus, certaines PARP contrôlent quelques aspects du développement embryonnaire comme la spermatogenèse (PARP-2) ou le développement vasculaire et osseux (TiPARP) (Tableau 6).

En conclusion de ce chapitre, nous pouvons souligner la grande disparité qui existe entre les différentes PARP, tant au niveau de leur activité catalytique que dans la possession de domaines fonctionnels structurés, caractérisant l'un ou l'autre des membres de cette superfamille. Le membre fondateur, la PARP-1, est celui qui possède le plus de fonctions connues et est, de loin, le plus étudié. Cette enzyme contient de nombreux domaines fonctionnels qui expliquent son action fondamentale au sein des processus cellulaires et qui font de la PARP-1 un gardien du génome. Le détail de ces domaines et de leurs fonctions associées est le sujet du chapitre suivant.

CHAPITRE II : L'ENZYME PARP-1 : LES DOMAINES

FONCTIONNELS

L'enzyme PARP-1 est une protéine de 113 kDa constituée de trois régions fonctionnelles : (1) une région catalytique en position C-terminale composée du domaine catalytique à proprement parler (PARP_Cat) qui contient la « signature PARP » très conservée au sein de la superfamille et de deux domaines régulateurs de son activité PARP_Reg (Régulateur) et WGR, (2) une région centrale dite d'auto-modification contenant les sites permettant à la PARP-1 de s'auto-PARylée ainsi qu'un domaine BRCT et (3) une région de liaison à l'ADN N-terminale caractérisée par trois domaines en doigt de zinc (ZnF) (Figure 27).

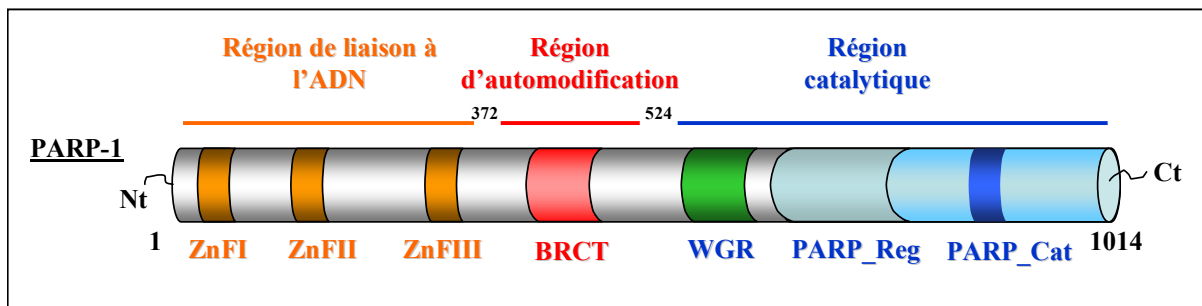


Figure 27 : Structure de l'enzyme PARP-1.

Les domaines fonctionnels sont représentés : le domaine catalytique (PARP_Cat) en bleu clair contenant la « signature PARP » en bleu foncé, le domaine régulateur (PARP_Reg) en bleu grisé, le domaine WGR en vert, le domaine BRCT en rouge et les domaines en doigts de zinc (ZnF « *Zinc finger* » de I à III). La numérotation en nombre d'acides aminés est indiquée.

I/ La région catalytique

I-1/ Structure

I-1-1/ Les domaines PARP_Reg (régulateur) et catalytique

La structure de la région catalytique (domaine WGR hormis) a été résolue par radiocristallographie en absence ou en présence de son substrat, le NAD⁺, mais également avec divers inhibiteurs de la PARP-1 s'insérant dans le site actif de l'enzyme [302, 309-311]. Cette région peut être subdivisée en deux domaines structurés distincts [310]. Le premier est un domaine composé d'une succession de 5 hélices α s'étendant des résidus 662 à 784 (Figure 28 et 29) [310]. De ce fait, il fut nommé « *helical domain* » (HD) puis PARP_Reg une fois sa fonction élucidée [307, 310]. Le deuxième domaine, correspondant à la partie catalytique,

s'étend des résidus 785 à 1010 et est d'une structure plus complexe du fait d'une alternance de 15 brins β de tailles très différentes et de 7 hélices α (Figure 28 et 29) [310]. Ceci lui permet d'effectuer d'importants changements conformationnels afin d'accueillir les substrats de l'enzyme [309, 311]. La comparaison de cette structure avec les domaines catalytiques de PARP-2 et PARP-3 a permis de mettre en évidence une très forte conservation non seulement au niveau de l'organisation du domaine mais également des changements de conformation similaires lors de la fixation du substrat [302].

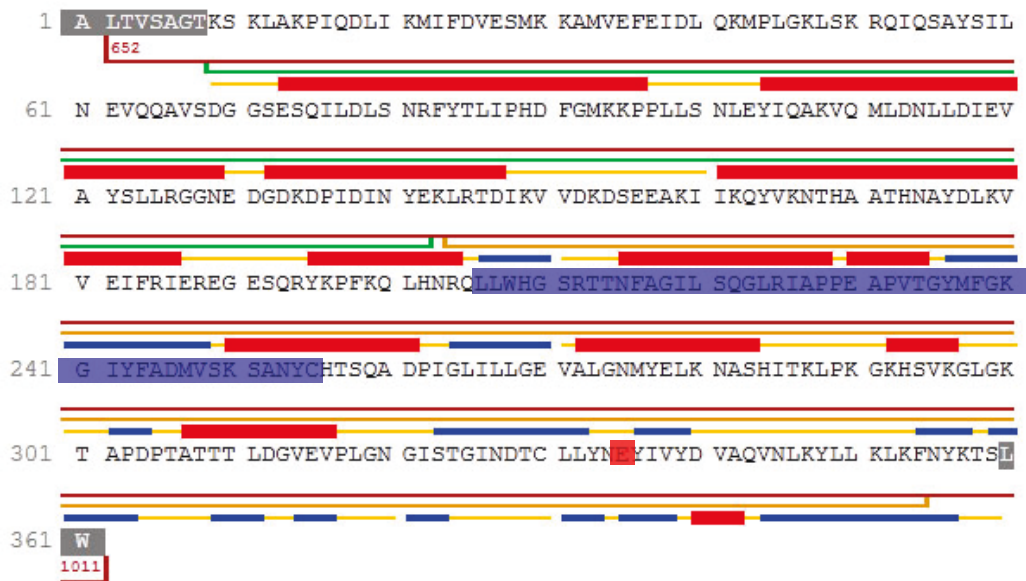


Figure 28 : Alignement de la séquence primaire de la région catalytique avec la structure secondaire des domaines identifiés.

La structure secondaire déterminée pour la région catalytique est indiquée sous la séquence protéique. Les hélices α sont en rouge, les brins β en bleu et les parties non structurées en orange. Les séquences correspondant aux domaines fonctionnels sont représentées : le domaine régulateur (PARP_Reg) en vert et le domaine catalytique (PARP_Cat) en orange foncé. La « signature PARP » est surlignée en bleu, l'acide glutamique 988 (E988) qui est indispensable à l'activité de PARylation en rouge. Le trait rouge foncé marquant la séquence des résidus 652 à 1011 correspond au fragment protéique de la PARP-1 utilisé pour la cristallisation. Les résidus grisés sont ceux dont la structure secondaire n'a pas pu être déterminée. La numérotation en nombre d'acides aminés est indiquée.

La comparaison de la structure du domaine catalytique de la PARP-1 avec d'autres protéines connues a permis de mettre en évidence une forte homologie avec les toxines bactériennes possédant une activité d'ADP-ribosyl transférase, notamment avec la toxine diphtérique, et cela même s'il existe peu de similarité de séquences [310]. La partie la plus conservée correspond au site actif de l'enzyme (Figure 28). D'ailleurs l'homologie de séquences y est si forte entre les PARP que celle-ci constitue la « signature PARP » qui a permis de caractériser tous les membres de la superfamille [300].

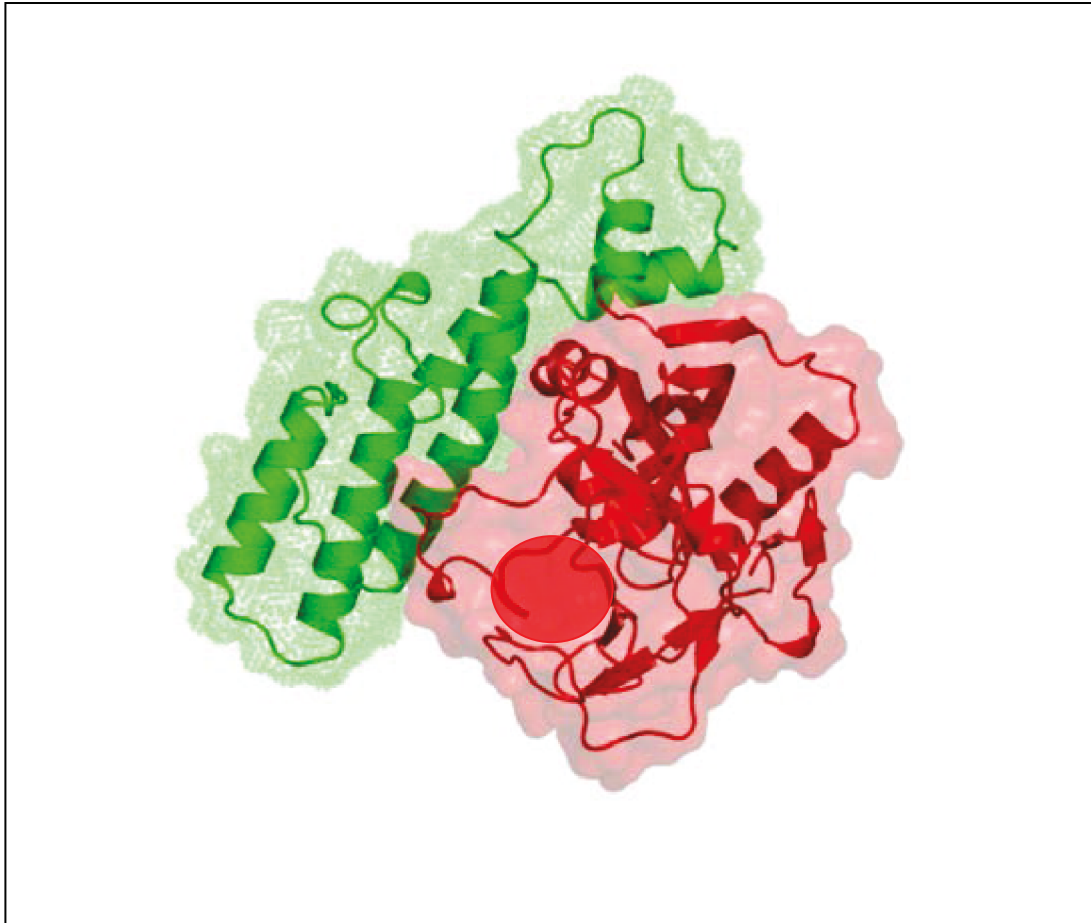


Figure 29 : Structure tridimensionnelle de la région catalytique de la PARP-1.

Le domaine PARP_Reg est coloré en vert, le domaine PARP_Cat en rouge et la partie du site actif de l'enzyme où se fixe le NAD⁺ est encerclé en rouge. D'après (PDB : 1A26) [309].

I-1-2/ Le domaine WGR

Le domaine WGR, appelé ainsi car il contient un motif constitué de résidus tryptophane (W), glycine (G) et arginine (R), a pendant longtemps été considéré comme faisant partie de la région centrale d'auto-modification. Néanmoins, de très récents travaux ont montré qu'il s'agissait d'un domaine de régulation de l'activité catalytique supplémentaire et que donc il faisait partie intégrante de la région catalytique au même titre que le domaine PARP_Reg [305]. Le domaine WGR ne se retrouve que chez les PARP dépendantes de l'ADN (PARP-1, -2 et -3) (Figure 26). Il permet de faire le lien entre la région de liaison à l'ADN et la région catalytique et ainsi de propager les changements conformationnels dus à la reconnaissance de cassures de l'ADN jusqu'au domaine catalytique (voir §I-2-1). Il s'étend des résidus 518 à 643 et sa structure a été résolue par résonance magnétique nucléaire (RMN). Elle se compose de 8 brins β et d'une grande hélice α en position C-terminale (juste avant le dernier brin β) (Figure 30) [312].

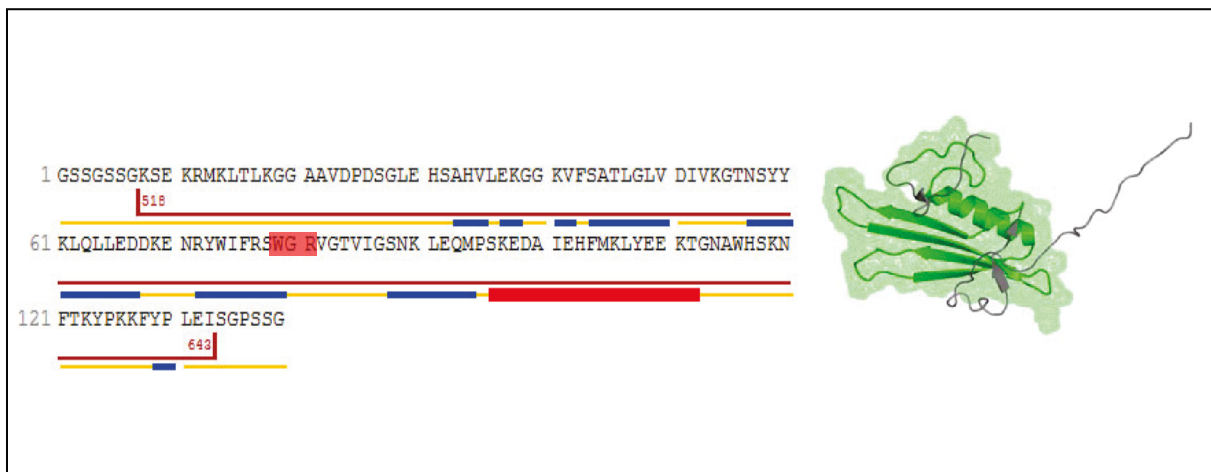


Figure 30 : Structure tridimensionnelle du domaine WGR.

La structure secondaire déterminée pour le domaine WGR est indiquée sous la séquence primaire. L'hélice α est en rouge, les brins β en bleu et les parties non structurées en orange. Le trait rouge foncé marquant la séquence des résidus 518 à 642 correspond au domaine WGR (source SCOP). Le motif WGR est surligné en rouge. La numérotation en nombre d'acides aminés est indiquée. D'après (PDB : **2CR9**).

I-2/ Fonction

I-2-1/ Mécanisme d'activation du domaine catalytique

Jusqu'à très récemment, les modifications structurales conduisant à l'activation du domaine catalytique étaient peu caractérisées. Des travaux parus en 2012 dans la revue *Science* montrent que cette activation se fait par la transmission de changements conformationnels depuis la région N-terminale de liaison à l'ADN jusqu'à la région C-terminale catalytique. Les domaines essentiels à ce processus sont les ZnFI et III (voir §III), le domaine WGR et évidemment PARP_Reg et PARP_Cat [305]. Les domaines ZnFI, ZnFIII et WGR se fixent collectivement au niveau des cassures de l'ADN (Figure 31), ceci expliquant pourquoi le domaine WGR ne se retrouve que chez les PARP dépendantes de l'ADN. Ce module compact rentre en contact avec le domaine PARP_Reg et déclenche un changement conformationnel au sein du cœur hydrophobe de la 2^{ème} hélice α au niveau des leucines 698 et 701 (L698 et L701) ce qui aboutit finalement à l'activation du domaine catalytique (Figure 31). De façon intéressante, la mutation de résidus à l'intérieur de ce cœur hydrophobe permet une activation constitutive de la PARP-1 indépendamment de l'ADN [305]. Ceci tend à prouver que la PARP-1 peut être activée en absence d'ADN endommagé tant qu'il y a un changement de conformation au niveau du domaine PARP_Reg. En effet certains partenaires de la PARP-1 l'active de façon indépendante de l'ADN, c'est notamment le cas de la MAPK Erk-2 [313].

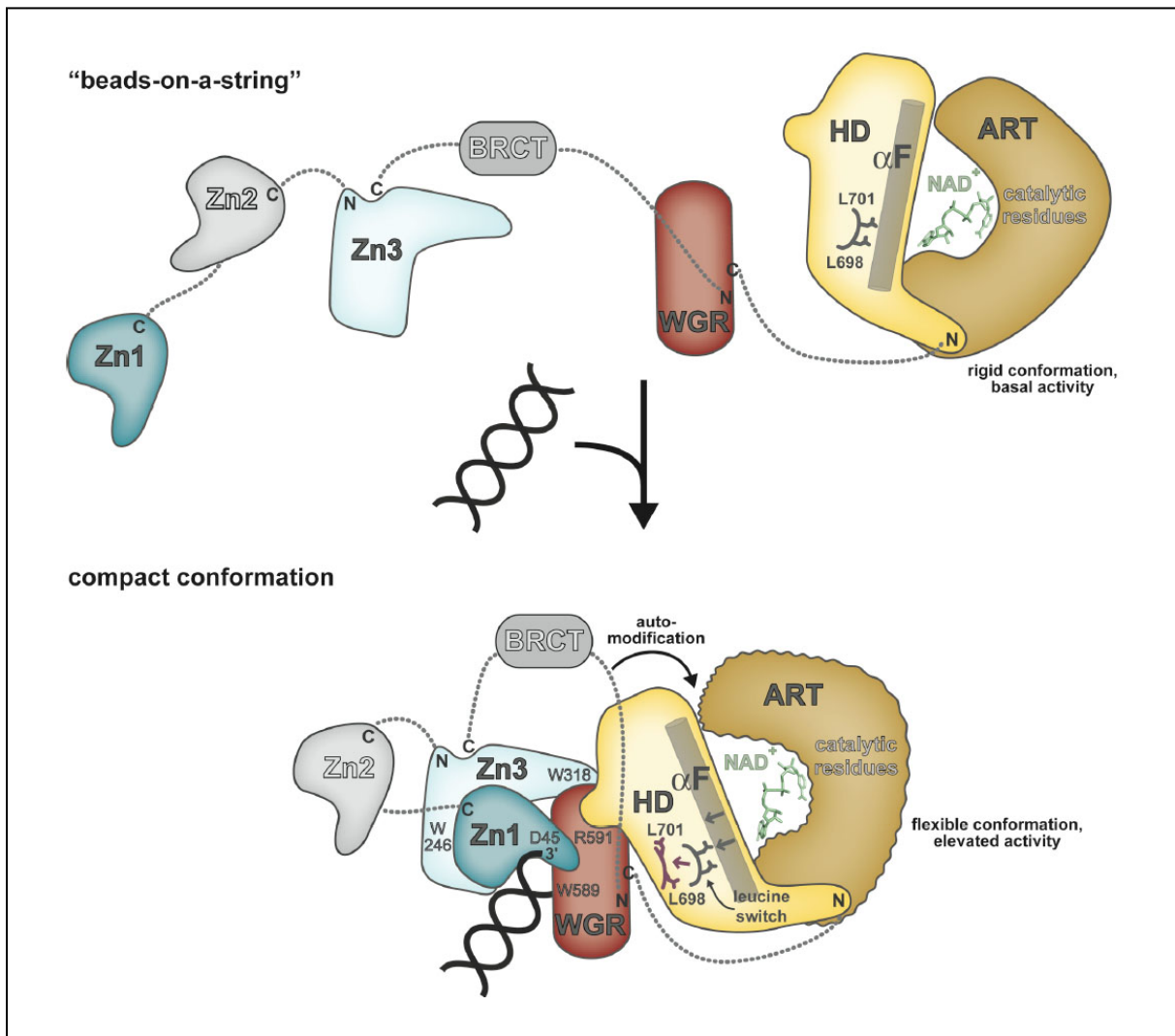


Figure 31 : Modèle de l'activation catalytique dépendante de l'ADN de la PARP-1.

Les différentes conformations de la PARP-1 sont représentées : la conformation « *beads-on-a-string* » qui correspond à la conformation relâchée en absence d'ADN endommagé avec une faible activité catalytique et le module compact lorsque la PARP-1 est fixée sur l'ADN avec une forte activité catalytique. Les domaines indiqués sont les ZnFI à III (Zn1 à 3), BRCT, WGR, HD (PARP_Reg) et ART (PARP_Cat). Les résidus essentiels à la liaison à l'ADN du ZnFI (W246, W318), du ZnFIII (D45) et du WGR (W589, R591) et les leucines (L698, L701) de la 2^{ème} hélice α (α F) du domaine PARP_Reg sont représentés. Reproduit d'après [305].

I-2-2/ Catalyse de la poly(ADP-ribosylation) (PARylation)

La poly(ADP-ribosylation) ou PARylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout de polymère d'ADP-ribose sur des résidus d'acide glutamique (E), d'acide aspartique (D) ou sur des lysines (K) de protéines acceptrices. L'enzyme PARP-1, une fois activée, utilise le NAD^+ et le métabolise en une unité d'ADP-ribose et en une nicotinamide (Figure 32). L'ADP-ribose est ensuite attaché sur un résidu E, D ou K de la protéine acceptrice. Deux types de polymères peuvent ensuite être générés par la PARP-1 : (1)

une élongation linéaire par l'attachement d'un nouvel ADP-ribose *via* une liaison de type $\alpha(1\rightarrow2)$ O-glycosidique sur le ribose précédent, ou (2) un branchement qui se fait lui *via* l'autre groupement hydroxyle du ribose (Figure 32). La PARylation de protéines acceptrices peut également être non-covalente par la fixation de PAR libre [314].

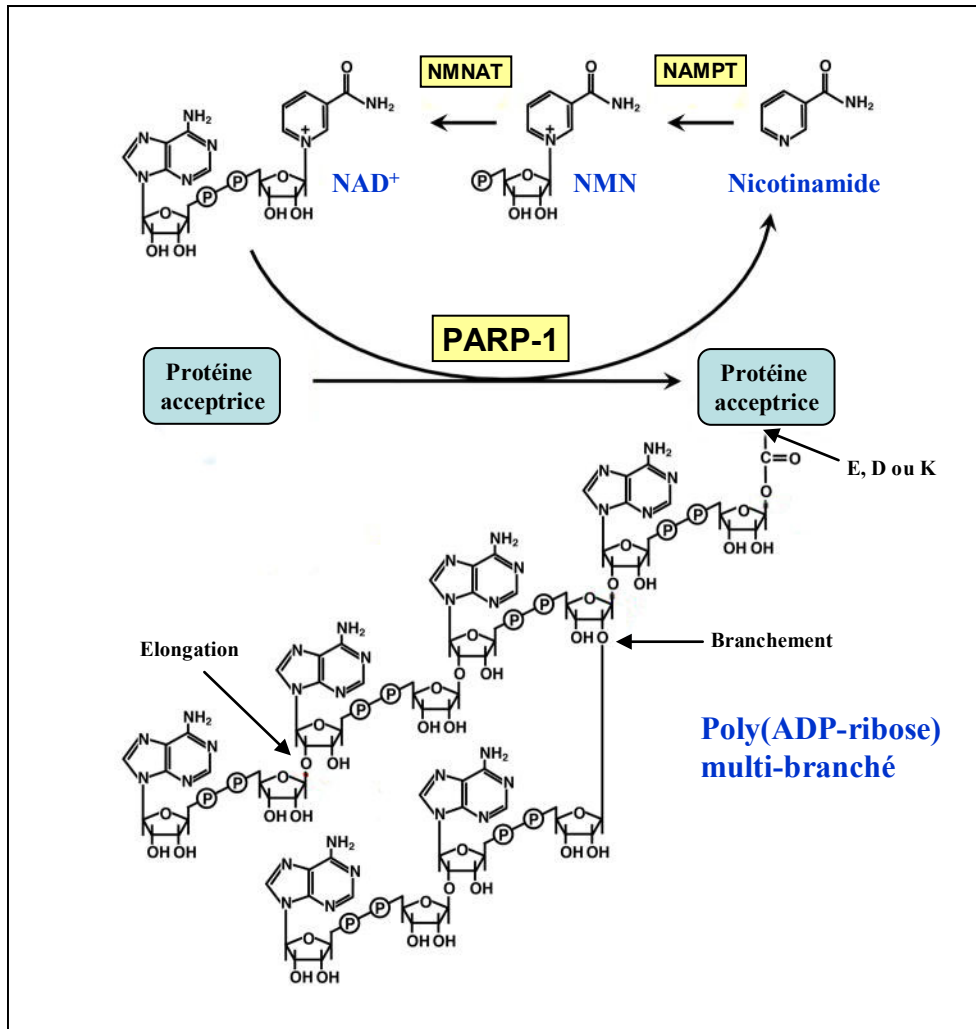


Figure 32 : Biosynthèse du NAD⁺ et des polymères d'ADP-ribose.

Les formules chimiques des différents composés ainsi que leur structure sont représentées. Les résidus accepteurs de la protéine cible sont indiqués pour E et D par un groupement carboxyle mais le greffage est aussi possible sur une lysine (K) par le groupement amine. Les groupements hydroxyles des riboses permettant l'élongation et le branchement des polymères sont indiqués par des flèches. D'après [315].

La nicotinamide, résidu de la réaction, peut être métabolisée en nicotinamide mononucléotide (NMN) par l'enzyme NAMPT (« *nicotinamide phosphoribosyltransferase* ») puis en NAD⁺ par l'enzyme NMNAT (« *nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase* ») (Figure 32). Ceci est essentiel car la nicotinamide est un inhibiteur naturel de la PARP-1 [299]. Le NAD⁺ étant un substrat indispensable à la production d'ATP, cette chaîne métabolique de PARylation doit obligatoirement être régulée finement selon les besoins

énergétiques de la cellule. En effet, une activité intense de PARylation par la PARP-1 conduirait à une déplétion complète du NAD^+ , ceci ayant pour conséquence directe une disparition du pool d'ATP cellulaire ce qui aboutit à une mort programmée très particulière, liée à la PARP-1, la *Parthanatos* (voir Chapitre IV §I-7-3).

Les conséquences de la PARylation pour les protéines acceptrices sont très variées et de nouvelles fonctions n'ont cessé d'être découvertes ces dernières années [316]. La PARylation a des rôles directs comme : (1) la dissociation de complexes formés par des interactions protéine-protéine ou protéine-ADN, ceci est dû au caractère très électronégatif de cette modification, mais également (2) l'association de complexes *via* des domaines protéiques qui lient les PAR ou PBD (« *PAR binding domain* ») dont par exemple les domaines WWE ou Macro (voir Chapitre I §II). Cette modification post-traductionnelle a aussi des conséquences indirectes très diverses. Nous pouvons citer par exemple un rôle dans la localisation subcellulaire du suppresseur de tumeur p53 où sa PARylation empêche son exportation vers le cytoplasme [317]. Néanmoins, la conséquence la plus surprenante qui prend de plus en plus d'importance est que la PARylation promeut la dégradation par le protéasome de certaines protéines acceptrices *via* leur ubiquitination [304]. Ce phénomène est rendu possible par l'existence d'ubiquitine ligases possédant des PBD et dont l'activité est stimulée par leur fixation sur les PAR [304]. La PARP-1 étant la première cible de ce mécanisme, cette notion sera plus largement développée dans le chapitre III §II-2-5.

La PARP-1 est responsable de la biosynthèse de 90% des PAR présents dans une cellule. La majorité d'entre eux sont greffés sur la PARP-1 elle-même. Lorsque l'ADP-ribose est mobilisé au sein des PAR, il n'est plus disponible afin de reformer les réserves de NAD^+ et d'ATP. C'est pourquoi, la durée de demi-vie des PAR est très courte, moins d'une minute, et leur catabolisme très rapide, ce sujet sera abordé Chapitre III §II-3.

II/ La région d'auto-modification

La région d'auto-modification tient une place centrale dans la spécificité de fonction de la PARP-1. En effet, des travaux ont montré, grâce à l'utilisation de protéines chimériques, que les domaines catalytiques des PARP-1, -2 et -3 sont interchangeable [318]. De plus, plusieurs études ont démontré que ces PARP possèdent une certaine complémentarité pour leur liaison aux cassures de l'ADN [319]. Au contraire, la région d'auto-modification, qui s'étend des résidus 373 à 525, comprend des motifs spécifiques de la PARP-1 et est associée à des fonctions essentielles.

Le seul domaine structuré de cette région est un domaine BRCT. Ce genre de structures se retrouve généralement sous forme de répétition en tandem comme au sein des protéines TopBP1 (« *DNA topoisomerase 2-binding protein 1* »), 53BP1 (« *p53-binding protein 1* »), MDC1 (« *mediator of DNA damage checkpoint protein 1* ») ou encore dans la protéine BRCA1 (« *breast cancer type 1 susceptibility protein* ») en position C-terminale, ce qui a donné son nom au domaine BRCT. Cependant, il peut aussi être sous forme isolée notamment dans les protéines XRCC1 (« *X-ray repair cross-complementing protein 1* »), DNA ligase III et dans la PARP-1 [320]. Les domaines BRCT sont des modules d'interaction protéine-protéine, de liaison aux phospho-peptides et ont également des rôles putatifs de liaison à l'ADN et de PBD [320]. Leur fonction est intimement liée aux mécanismes de réparation de l'ADN même si le domaine BRCT de la PARP-1 n'est pas indispensable à son activité catalytique [305, 318, 321].

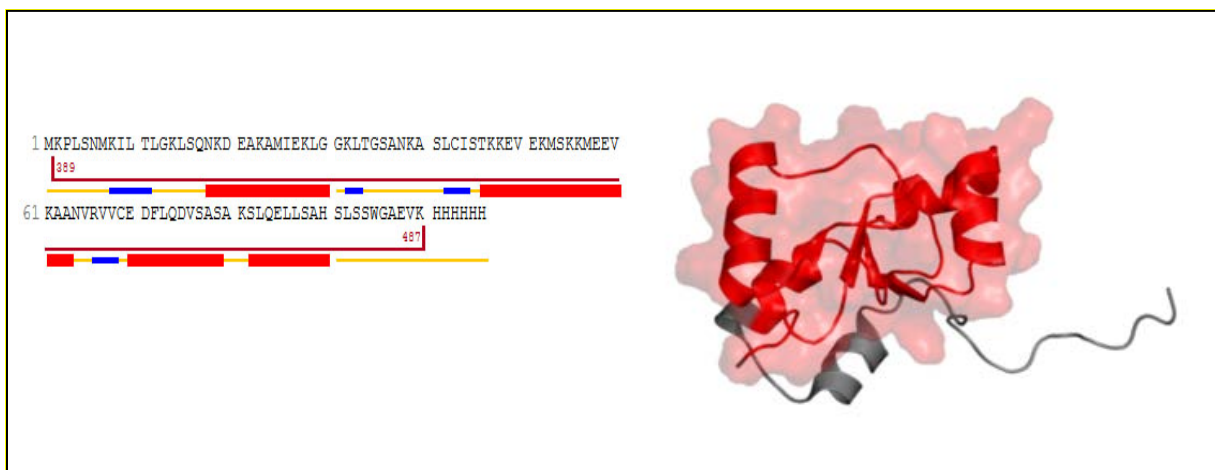


Figure 33 : Structure tridimensionnelle du domaine BRCT.

La structure secondaire déterminée pour le domaine BRCT est indiquée sous la séquence primaire. Les hélices α sont en rouge, les brins β en bleu et les parties non structurées en orange. Le trait rouge foncé marquant la séquence des résidus 389 à 487 correspond au domaine BRCT (source SCOP). La numérotation en nombre d'acides aminés est indiquée. D'après (PDB : 2LE0).

La structure du domaine BRCT de la PARP-1 a été résolue par RMN [322]. Il se constitue de 4 hélices α et de 4 brins β (Figure 33). Il est responsable de la plupart des interactions protéine-protéine entre la PARP-1 et ses partenaires. De plus, on peut considérer que la majorité des substrats protéiques de la PARP-1 interagissent au niveau du domaine BRCT [302, 316]. C'est ce qui leur permet d'être en proximité directe avec le domaine catalytique.

La région d'auto-modification contient également les sites permettant l'auto-PARylation de la PARP-1. Ceux-ci sont nécessaires à la régulation de l'activité catalytique de cette enzyme même s'ils ne sont pas indispensables à la formation de PAR [305, 318, 321]. L'auto-modification facilite la PARylation car elle constitue une amorce qui permet à la PARP-1 d'ajouter d'autres polymères sur elle-même ou sur d'autres protéines [299, 302]. C'est pourquoi, plus son activité est prolongée plus la PARP-1 s'auto-modifie. L'auto-PARylation favorise également la formation des complexes de réparation de l'ADN car nombre des composants de ces complexes possèdent des PBD qui se fixent au PAR [299]. Pendant près de 40 ans, de nombreux travaux ont essayé d'identifier les sites exacts d'auto-PARylation. Cependant, la taille des polymères, plus de 200 unités, et le fait qu'ils soient multi-branchés rendent très difficile cette identification. Récemment, deux études ont permis une avancée majeure dans ce domaine, pourtant leurs résultats sont différents. La première a mis en évidence que, contrairement à ce qui était envisagé, ce sont des résidus lysine qui sont modifiés (K498, K521, K524) [318]. Par contre, une deuxième étude, parue quelque mois plus tard, montre une modification de deux résidus d'acide glutamique et d'un acide aspartique (D387, E488, E491) [321]. Les auteurs de cette dernière étude ne trouvent pas de modifications sur les lysines et suggèrent qu'il s'agit d'une modification secondaire [321]. Ceci est renforcé par le fait que ces lysines peuvent être soit PARylées soit acétylées et que l'acétylation semble être privilégiée (voir chapitre III §II-2).

Enfin, nous pouvons noter que la région centrale possède un motif putatif de type « *Leucine zipper* » en position N-terminale du domaine BRCT qui serait responsable de l'homodimérisation de deux molécules de PARP-1, ce qui est connu pour augmenter fortement leur activité catalytique [316].

III/ La région de liaison à l'ADN

III-1/ Structure

La région de liaison à l'ADN se situe en position N-terminale de la PARP-1 des résidus 1 à 372 (Figure 27). Elle possède trois domaines structurés de type doigt de zinc (ZnFI, ZnFII et ZnFIII) et deux motifs importants : un signal de localisation nucléaire (NLS) bipartite et un site de clivage pour la caspase-3 de séquence DEVD (Figure 34).

Les domaines ZnFI et ZnFII sont très semblables. Ce sont tous deux des doigts de zinc de type $CX_2CX_{28,30}HX_2C$ (C pour cystéine et H pour histidine) connus pour être des domaines conservés dans l'évolution reconnaissant l'ADN endommagé sans spécificité de séquence [323]. Le ZnFI se compose de 2 hélices α et de 5 brins β alors que le ZnFII a 3 hélices α et 4 brins β (Figure 34). Néanmoins, nous pouvons constater que leurs structures tridimensionnelles sont assez similaires surtout comparées à celle du ZnFIII (Figure 34). Ce dernier, aux propriétés très différentes, est formé par trois larges hélices α et une succession de 7 courts brins β (Figure 34). Le ZnFIII ne serait pas essentiel à la liaison de la PARP-1 aux cassures de l'ADN notamment dans les cas de dommages simple-brin [324]. Son rôle lorsqu'il se lie à l'ADN est de réguler l'activité catalytique de la PARP-1 surtout au niveau de cassures double-brin (Figure 31) [305, 325].

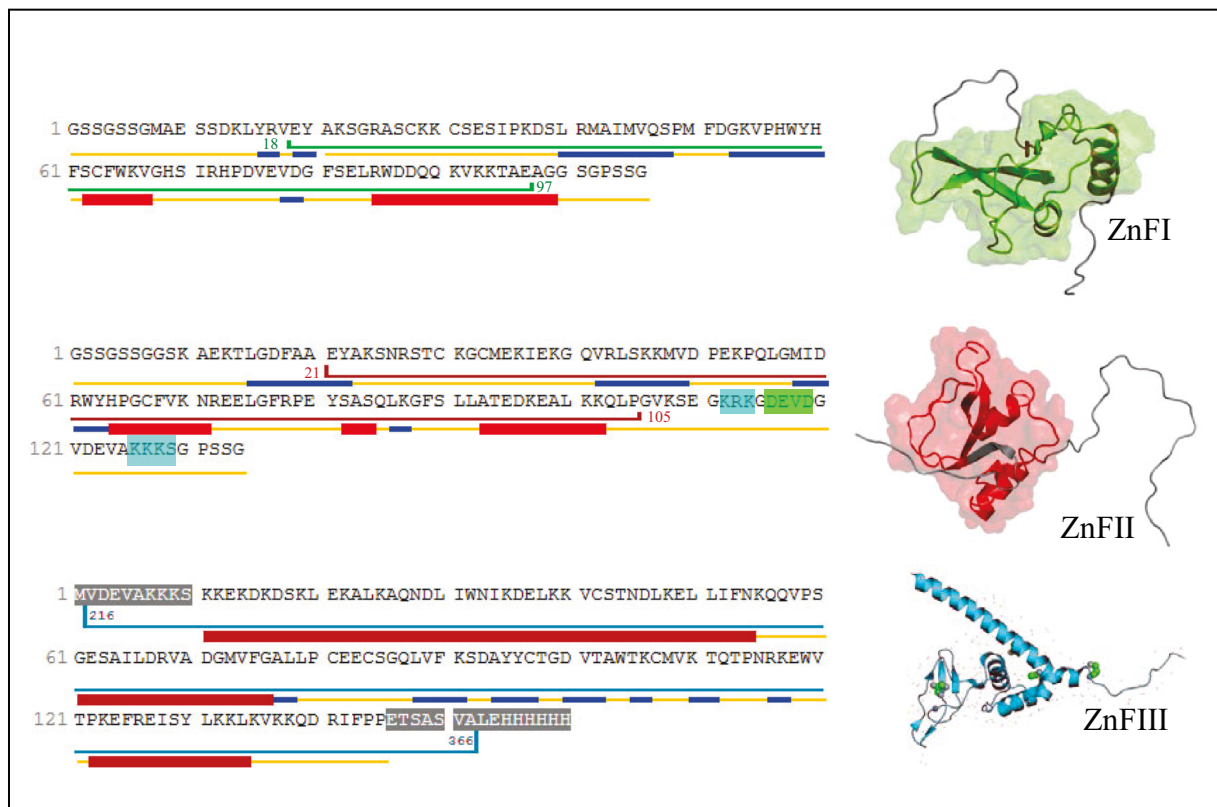


Figure 34 : Structures tridimensionnelles des ZnF de la région de liaison à l'ADN.

Les structures secondaires déterminées pour les trois ZnF sont indiquées sous la séquence protéique. Les hélices α sont en rouge, les brins β en bleu et les parties non structurées en orange. Le trait vert couvre la séquence du ZnFI, le trait rouge la séquence du ZnFII et le trait bleu la séquence du ZnFIII. En dehors de la séquence du ZnFII, le NLS bipartite est surligné en bleu et le site de clivage pour la caspase-3 en vert. Les résidus grisés sont ceux dont la structure secondaire n'a pas pu être déterminée. La numérotation en nombre d'acides aminés est indiquée. D'après (PDB : **2DMJ**, **2CS2**, **2RIQ**).

III-2/ Fonction

III-2-1/ Reconnaissance des cassures simple-brin de l'ADN

La PARP-1 est impliquée dans des mécanismes de réparation de l'ADN tels que le système de réparation par excision de base (BER voir Chapitre IV §I-1-1). Ce genre de processus nécessite une reconnaissance efficace des cassures simple-brin de l'ADN. Dans le cas de la PARP-1, celle-ci s'effectue au niveau de la région N-terminale de liaison à l'ADN. D'un point de vue moléculaire, la communauté scientifique reste partagée sur le mécanisme précis.

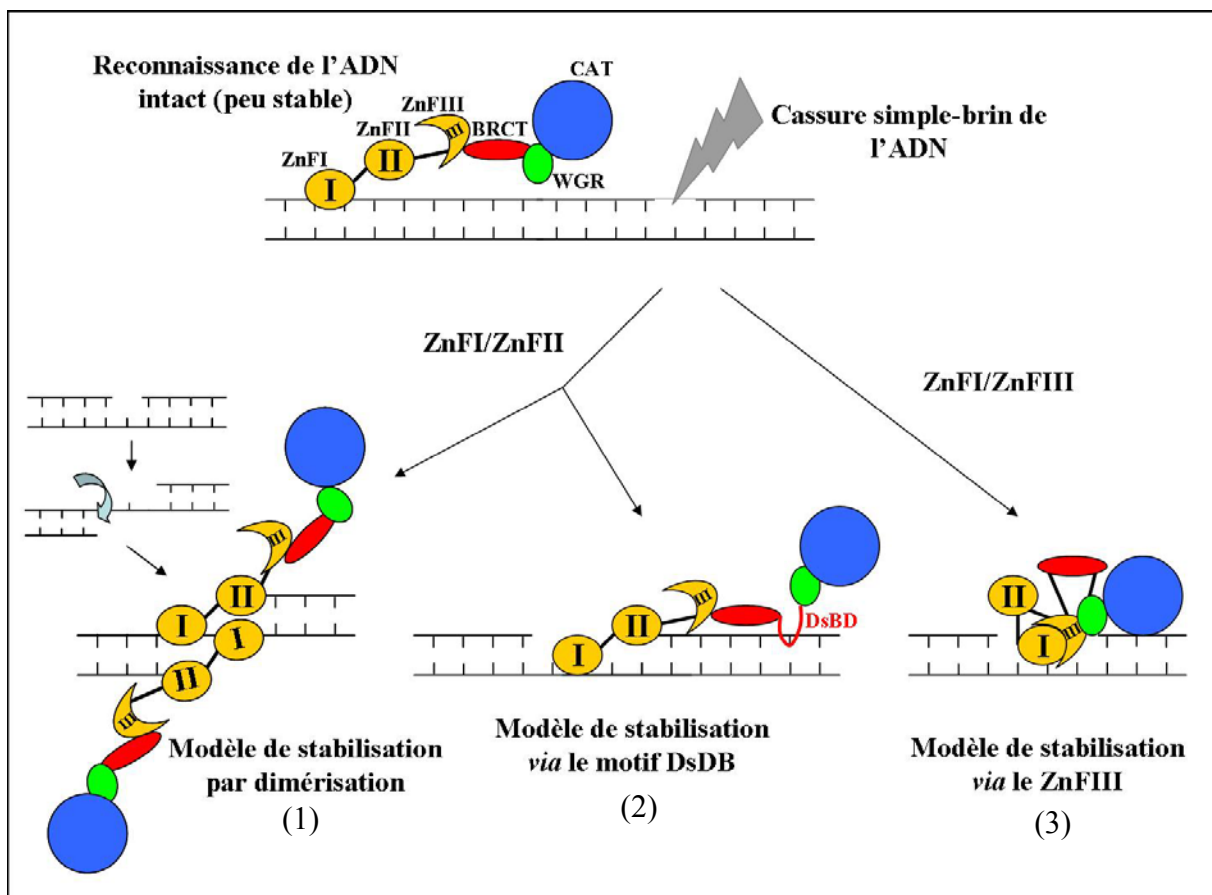


Figure 35 : Modèles de liaison de la PARP-1 aux cassures simple-brin.

Les différents modèles avancés pour la liaison de la PARP-1 aux cassures simple-brin sont présentés. La PARP-1 est représentée ainsi que ses domaines fonctionnels. Le modèle (1) est basé sur les travaux d'Anthony Oliver [324], le (2) sur ceux de Masahiko Satoh [326] et le (3) sur les travaux de John Pascal et de Karolin Luger [325, 327].

La plupart des travaux s'accordent sur le fait que la reconnaissance de la cassure simple-brin est prise en charge par le ZnFI [326-328]. Néanmoins, il est également avancé que le ZnFI pourrait se lier à de l'ADN non endommagé et qu'il faudrait la liaison d'un

deuxième ZnF pour parfaire la reconnaissance d'un dommage. Pour l'équipe d'Anthony Oliver qui a résolu le complexe PARP-1/ADN par radiocristallographie, le ZnFI se lie au brin intact de la double hélice alors que le ZnFII se fixe au niveau de la cassure (Figure 35) [324]. Ce modèle est soutenu par divers travaux antérieurs qui ont montré, qu'en absence du ZnFII, le ZnFI ne pouvait seul discriminer l'ADN endommagé de l'intact [326, 329]. Pourtant, les auteurs soulignent que le complexe formé par ces deux domaines en doigt de zinc n'est pas stable en l'état. L'équipe d'Anthony Oliver propose que la stabilisation s'effectue *via* la dimérisation de deux molécules de PARP-1 par l'interaction entre le ZnFI de la première molécule avec le ZnFII de la deuxième et réciproquement. Au contraire, l'équipe de Masahiko Satoh a montré l'existence d'un possible motif de liaison à l'ADN double-brin (DsDB) en position N-terminale du domaine WGR qui stabiliserait le complexe (Figure 35) [324, 326]. Un autre modèle particulièrement documenté par l'équipe américaine de John Pascal tendrait plutôt pour une reconnaissance de l'ADN par le ZnFI qui serait stabilisée, en cas de cassure, par le ZnFIII et potentiellement par le domaine WGR (Figure 35) [305, 325, 327, 328]. Un seul bord de la cassure étant reconnu, ce modèle n'exclut pas une dimérisation de deux molécules de PARP-1 [318]. Par contre, il rejette toute implication du ZnFII qui, pour les auteurs, n'est pas strictement requis [328]. Cette affirmation est soutenue par d'autres travaux qui montrent que ce ZnF et la région d'auto-modification ne sont nécessaires ni à la liaison à l'ADN ni à l'activation de la PARP-1 [305, 318, 321].

III-2-2/ Reconnaissance des cassures double-brin de l'ADN

La PARP-1 est également impliquée dans des mécanismes de réparation de cassures double-brin. Ce rôle est moins bien caractérisé notamment pour ce qui est de la réparation par recombinaison homologue (HR) (voir Chapitre IV §I-1-2). Il existe des données bien plus complètes pour les mécanismes de « *non-homologous end-joining* » (NHEJ) (voir Chapitre IV §I-1-3). Au sein de ces mécanismes deux modes de liaison à l'ADN ont été mis en évidence.

Le premier correspond à des adaptations de modèles démontrés pour les cassures simple-brin. Le module compact, avancé par l'équipe de Pascal, constitué du ZnFI, du ZnFIII et du WGR, peut parfaitement se lier à des cassures double-brin [305]. Le modèle de l'équipe de Satoh est également transposable à condition qu'il existe une extrémité débordante au niveau de la cassure [326]. Cependant, celui qui s'adapte le mieux aux cassures double-brin est la dimérisation avancée par l'équipe d'Oliver. L'interaction des ZnFI et ZnFII de chaque

molécule permet de joindre les deux fragments d'ADN ce que les autres modèles ne montrent pas (voir §III-2-1, Figure 35). Cela est en cohérence avec les observations faites du rôle de la PARP-1 dans la NHEJ [330-332].

Le deuxième est une liaison en coopération avec une autre enzyme de réparation connue, elle, pour lier principalement les cassures double-brin, le complexe DNA-PK. Il est constitué d'une sous-unité catalytique possédant une activité de type kinasique et de deux sous-unités régulatrice Ku70 et Ku80. Des travaux montrent que la PARP-1 et la DNA-PK interagissent en un complexe formant un canal comprenant Ku70/Ku80 et la région de liaison à l'ADN de PARP-1 [333]. Ce canal ainsi formé pourrait accueillir les cassures double-brin en permettant à la PARP-1 d'intervenir dans la réparation. Ce modèle donne un rôle à la PARP-1, là où les anciennes données, présentes dans la littérature, ne laissaient de place qu'à l'action du complexe DNA-PK.

III-2-3/ Autres modalités de liaison à l'ADN

En dehors des cassures simple- et double-brin, la PARP-1 peut se lier à toutes sortes d'ADN notamment cruciformes ou en épingle à cheveux, mais également à des structures impliquant plusieurs double-hélices d'ADN comme des entrecroisements de chromosomes ou des quadruplex [315]. Cette enzyme se retrouve aussi fréquemment fixée sur l'ADN des nucléosomes [315, 327]. Enfin, la PARP-1 pourrait agir comme « *enhancer* » de certains gènes (voir Chapitre IV §I-3-1). C'est le cas pour les gènes *cxcl1* et *bcl6* [334]. Cette liaison est effectuée sur un ADN double-brin intact et de façon séquence spécifique même si aucun consensus de liaison n'a pu être mis en évidence pour la PARP-1 [334].

L'ensemble de ces données nous montre que les fonctions de l'enzyme PARP-1 sont intimement liées aux structures protéiques qui la composent. Afin d'être activée, de modifier des protéines cibles et de lier l'ADN, la PARP-1 a besoin de passer par différents changements conformationnels qui en font une protéine à l'action très dynamique.

Bien qu'étant une protéine ubiquitaire et fortement exprimée, la PARP-1 peut être régulée au niveau de l'expression de son gène. Cette régulation est très importante car elle correspond souvent à des contextes cellulaires très particuliers et participe également au dynamisme de l'action de la PARP-1. Ce sujet sera abordé lors du chapitre suivant.

De plus, nous exposerons, dans le prochain chapitre, les différentes régulations de l'activité de la PARP-1 rendues possibles par des interactions protéine-protéine ainsi que par des modifications post-traductionnelles comme, notamment, la phosphorylation, l'acétylation ou même l'auto-PARylation. Nous verrons comment ces modifications permettent de moduler la liaison de la PARP-1 aux cassures de l'ADN, son interaction avec ses partenaires protéiques et son activité de PARylation.

CHAPITRE III : REGULATION DE LA PARP-1

I/ Régulation de l'expression du gène *parp-1*

Le gène humain de la PARP-1 se situe dans la région q41-42 du chromosome 1 et possède 23 exons [335]. Ce gène s'exprime fortement dans tous les organes, chez l'embryon comme chez l'individu adulte, ce qui fait de la PARP-1 la protéine nucléaire la plus abondante (plus d'un million de copies) après les histones. Cependant, on trouve une expression plus élevée de l'ARNm *parp-1* dans le cerveau, le thymus, le cœur et les testicules [336, 337]. Cette expression varie également au cours du cycle cellulaire. En effet, elle est plus forte lors des phases G1 et S que lors des phases G2 et M [338, 339]. Des travaux ont démontré que la diminution d'expression de la PARP-1 était associée à la différenciation cellulaire [340-343] ou à la sénescence [344, 345]. Au contraire, celle-ci augmente lors de l'activation des lymphocytes [346, 347] ou dans certaines pathologies notamment lors de cancers (voir Chapitre IV §III-1). Toutes ces études montrent que, si l'expression de la PARP-1 est ubiquitaire, sa modulation par des mécanismes transcriptionnels est impliquée dans des contextes cellulaires très particuliers.

Le promoteur du gène *parp-1* a été caractérisé chez l'Homme, la souris et le rat [348-351]. Il s'agit d'un promoteur qui ne possède ni boîtes TATA ni séquence CCAAT. Par contre, une région riche en GC est présente à proximité du point d'initiation de la transcription (+1) [351]. Ce type de séquence est retrouvé classiquement dans les promoteurs des gènes domestiques (ou « *housekeeping genes* »).

La modulation de l'expression du gène de la PARP-1 se fait selon trois niveaux qui correspondent chacun à un contexte cellulaire différent. (1) La cellule n'est soumise à aucun stress, l'enzyme PARP-1 est peu active et son expression est modérée. (2) Des stress de type génotoxique, par exemple, ont endommagé l'ADN, l'enzyme PARP-1 est active et son expression est plus forte afin de réparer efficacement les cassures. Il est important de noter ici que des cellules qui n'expriment plus ou peu la PARP-1 seront donc très sensibles au stress et n'y survivront pas. (3) Le nombre de dommages à l'ADN est dramatique, la PARP-1 est suractive et participe à l'enclenchement de la mort cellulaire programmée. Une fois entrée dans ce processus irréversible, la PARP-1 est clivée par les caspases afin d'empêcher que la réparation de l'ADN interfère avec la mort de la cellule. Préventivement, la suractivation de la PARP-1 engendre la chute de l'expression de son gène.

Différents facteurs de transcription se fixent au niveau du promoteur afin de permettre la transactivation ou la transrépression du gène selon l'un des trois contextes cellulaires (Figure 36).

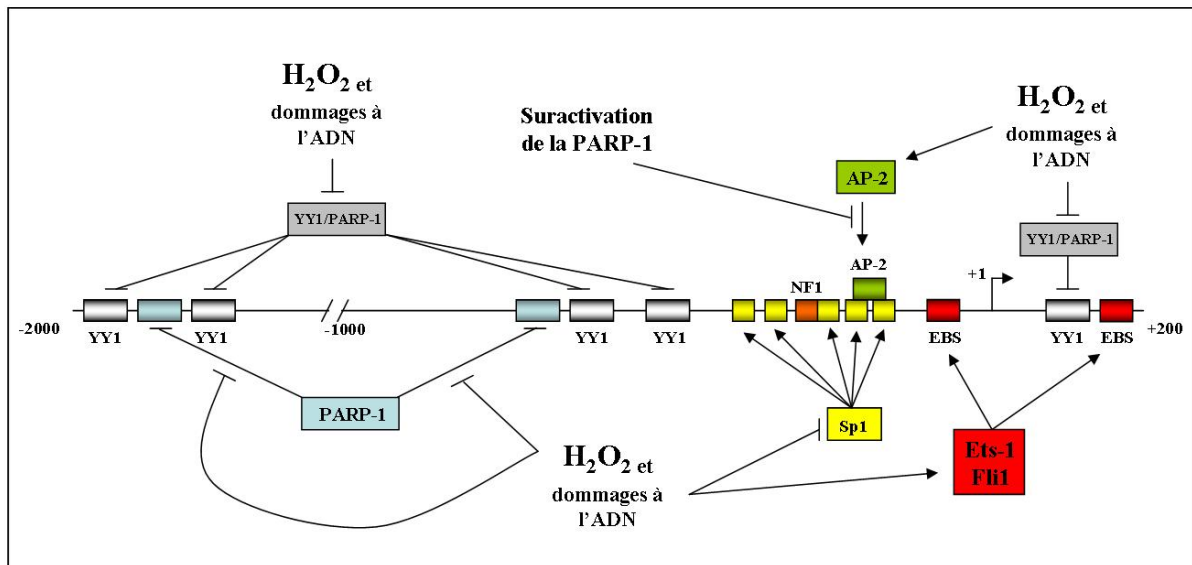


Figure 36 : Promoteur du gène *parp-1*.

Les rectangles représentent des sites de fixation pour des facteurs de transcription. Les rectangles bleus sont des sites où la PARP-1 agit sans coopérer avec un facteur de transcription. Le +1 est le point d'initiation de la transcription.

Lorsque la cellule n'est soumise à aucun stress, l'activation du promoteur du gène de la PARP-1 est assurée par le facteur de transcription Sp1. Ce facteur possède cinq sites de fixation tous situés dans la région proximale du promoteur (Figure 36) [349, 351]. Sur l'un de ces sites, Sp1 coopère avec le facteur NF1 (« *nuclear factor 1* ») sur un site composite qui semble être l'élément de régulation majeur de l'expression basale du gène *parp-1* [351]. Le promoteur du gène *parp-1* contient également des sites de fixation pour des répresseurs. Il existe cinq sites pour le facteur YY1 (Figure 36) [352, 353]. Au niveau de ces sites, YY1 interagit avec la PARP-1 qui participe ainsi à la répression de l'expression de son propre gène. Il s'agit d'une boucle de rétrocontrôle négatif qui permet de garder une expression modérée et stable de la PARP-1. Ce mécanisme de rétrocontrôle s'observe également par la liaison de la PARP-1 sur des motifs particuliers de son promoteur. Il en existe deux : un en position proximale, l'autre en position distale (Figure 36). La PARP-1 s'y fixe comme corépresseur au sein de complexes macromoléculaires de type « *scaffold* » [350].

Lors de la détection de dommages à l'ADN ou par la présence de radicaux libres comme l'H₂O₂, l'expression du gène *parp-1* passe d'un niveau basal à une forte activation. Dans ce but, une transition s'effectue en remplaçant le facteur Sp1 par des facteurs de

transcription répondants aux stress génotoxiques. Pour cela, la PARP-1, qui est activée par le stress cellulaire, PARyle Sp1 qui ne peut plus se lier au promoteur [354]. Parallèlement, si l'activation de la PARP-1 est modérée, cela permet d'augmenter l'action du facteur AP-2 qui possède un site de fixation au sein de la même région proximale du promoteur (Figure 36) [349, 354]. D'autres facteurs permettent également l'expression de la PARP-1 dans ce contexte. Il s'agit de facteurs de transcription de la famille Ets. Parmi eux, nous pouvons citer Ets-1 et Fli-1 [355, 356]. Leur action a été mise en évidence dans la pathologie du sarcome d'Ewing mais il est connu que l'expression d'Ets-1 est stimulée par des espèces réactives de l'oxygène (ROS « *reactive oxygen species* ») comme l'H₂O₂ et le NO^{*} [65, 90]. Cinq EBS ont été identifiés dans le promoteur mais seul deux d'entre eux semblent actifs (Figure 36). Celui juste en amont du site d'initiation de la transcription permet une forte activation du gène. De plus, le deuxième, bien que situé en position +140, est essentiel à une pleine transactivation du promoteur [355]. En dehors de contextes pathologiques ou de stress, les facteurs Ets pourraient être responsables du taux élevé d'ARNm *parp-1* dans certains tissus comme le thymus, les lymphocytes ou le cerveau où ces facteurs sont fortement exprimés. Lors d'un stress génotoxique, la PARP-1 PARyle également le facteur YY1 ce qui permet la dissociation du complexe qu'elle forme avec lui et la dérégulation du promoteur ce qui augmente le pool de protéines PARP-1 dans la cellule pour contrer les dommages à l'ADN [352]. La PARP-1 auto-PARylée ne pouvant également plus se lier à l'ADN, elle se dissocie aussi du promoteur de son gène au niveau des sites YY1 et au niveau des sites de type *scaffold* [350, 352].

Si les dommages sont trop importants, la cellule doit rentrer dans un processus de mort cellulaire programmée. La PARP-1, lorsque son niveau d'activation est maximal, participe d'ailleurs activement à ce processus (voir Chapitre IV §I-7) [301]. Une fois ces programmes de mort enclenchés, leur déroulement est irréversible. Néanmoins, la PARP-1, même suractivée, peut conserver des fonctions de réparation de l'ADN. Il est connu que l'échappement à ces morts programmées est un facteur de cancérisation. C'est pourquoi, afin d'éviter qu'elle n'interfère avec la mort de la cellule, la PARP-1 est clivée par les caspases. Préventivement, l'expression du gène *parp-1* doit également être supprimée. Dans ce but, la PARP-1 suractivée, avant d'être clivée par les caspases, va PARylée AP-2 qui ne se fixe plus sur le promoteur du gène *parp-1* [354]. L'expression de la PARP-1 chute, ce qui laisse la voie libre aux mécanismes de mort cellulaire programmée (voir Chapitre IV §I-7). Nous pouvons supposer qu'un phénomène similaire pourrait exister pour les membres de la famille Ets.

II/ Régulation de l'activité catalytique de la PARP-1

II-1/ Régulation par des interactions protéine-protéine

La PARP-1 interagit avec un très grand nombre de protéines dans la cellule. Ceci est rendu possible par l'abondance de cette enzyme nucléaire. Parmi ses partenaires, beaucoup peuvent être modifiés par PARylation ce qui a de fortes conséquences sur leurs propriétés fonctionnelles. Néanmoins, la réciproque est plus rare. En effet, peu de partenaires protéiques sont connus pour pouvoir moduler l'activité catalytique de la PARP-1. Cette enzyme, une fois activée par l'ADN, a une certaine tendance à modifier son environnement proche sans réelle spécificité d'interaction. C'est pourquoi, les protéines, qui modulent l'activité catalytique de la PARP-1, interagissent généralement directement avec l'enzyme lorsqu'elle est inactive.

Les premières protéines identifiées comme pouvant moduler l'activité de la PARP-1 de façon indépendante de l'ADN (cassures ou structures particulières voir Chapitre II §III-2) sont les histones [302]. Les histones H1, H4 et H2B permettent l'activation de la PARP-1 et son auto-PARylation alors que le variant d'histone H2A l'inhibe [302]. Cependant, pour ce dernier, son potentiel d'inhibition varie selon les espèces. En effet, il est bien plus faible chez la drosophile [357]. Il est possible que cela soit davantage lié à un état de compaction de la chromatine ou à l'intervention d'autres protéines comme l'acétyltransférase TIP60 qu'à H2A seul [358].

D'autres protéines peuvent supprimer l'activité catalytique de la PARP-1. C'est le cas de KIF4 (« *kinesin family member 4* ») qui inhibe la PARP-1 afin de permettre la survie des cellules neuronales lors de stress. Cette interaction est dissociée par l'action de la CaMKII [359].

La plupart des protéines pouvant moduler l'activité de la PARP-1 de façon indépendante de l'ADN sont des enzymes. Le détail des modifications post-traductionnelles qu'elles effectuent sur la PARP-1 sera abordé dans le prochain paragraphe. Nous pouvons citer les kinases Erk-2 et JNK-1/-2, les mono-ADP-ribosyltransférase Sirtuin 6 (SIRT6) et PARP-3 qui engendrent toute une activation de la PARP-1 [302]. Enfin, l'acétyltransférase CBP/p300 permet d'augmenter l'activité de PARylation et l'E3 SUMO ligase PIASy qui participe à la sélection des protéines ciblées par la PARP-1 lors de la mitose [302].

II-2/ Régulation par des modifications post-traductionnelles

L'activité de la PARP-1 est très finement régulée par des modifications post-traductionnelles permettant de moduler sa liaison à l'ADN, ses interactions avec ses partenaires et ses fonctions catalytiques. Ces modifications sont contrôlées par différentes voies de signalisation cellulaire dont une multitude de kinases. La PARP-1 est également acétylée, SUMOylée, ubiquitinylée et bien sûr PARylée par elle-même mais aussi par d'autres PARP (Figure 37).

Ces différentes modifications sont interconnectées. En effet, l'amplitude de l'auto-PARylation peut être dépendante de la phosphorylation par la kinase Erk-2 (S372 et S373) ainsi que de l'acétylation par CBP/p300 sur certaines lysines (K498, K521 et K524). Enfin, l'ubiquitination de la PARP-1 ne se fait que si celle-ci est PARylée ou SUMOylée.

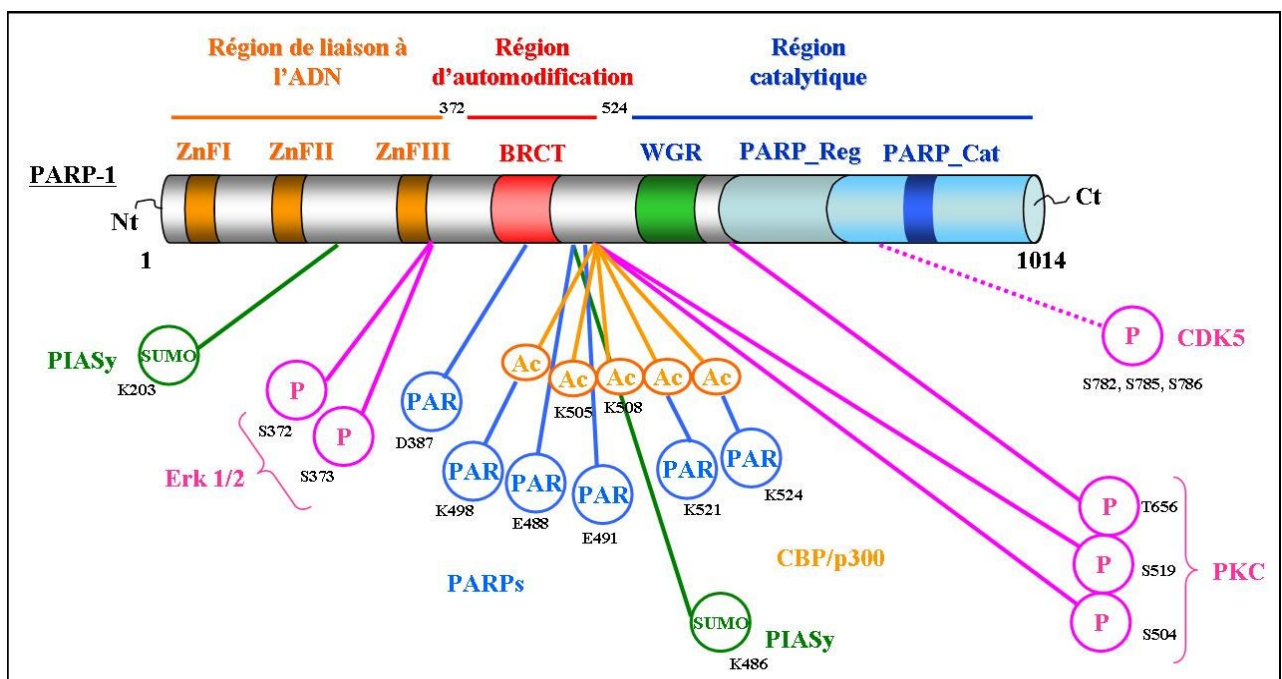


Figure 37 : Les sites de modifications post-traductionnelles de l'enzyme PARP-1.

Les domaines fonctionnels sont représentés comme en Figure 27. Les résidus indiqués peuvent être modifiés par : (1) phosphorylation (P) (en rose) sur la thréonine (T) et sur les sérines (S), (2) acétylation (Ac) (en orange) sur les lysines (K), (3) SUMOylation (SUMO) (en vert) sur les lysines, (4) la PARylation (PAR) (en bleu) sur les lysines (K), les acides aspartiques (D) et les acides glutamiques (E).

II-2-1/ ADP-ribosylation

L'auto-PARylation de la PARP-1 fut la première modification post-traductionnelle observée sur cette protéine [298, 360]. Cette auto-modification se fait sur de nombreux

résidus dont 6 ont été identifiés : D387, E488, E491, K498, K521 et K524 (Figure 37) [318, 321]. Dans un premier temps, elle permet d'amorcer l'activité catalytique de la PARP-1 et de faciliter la PARylation d'autres protéines [316]. Dans un deuxième temps, les polymères deviennent tellement massifs qu'ils bloquent la liaison de l'enzyme sur l'ADN et engendrent la dissociation des complexes comprenant la PARP-1, permettant ainsi à d'autres protéines de prendre le relais lors des phases terminales de la réparation (voir Chapitre IV §I-1) [334].

Au-delà de l'auto-PARylation, la PARP-1 peut également être trans-modifiée par d'autres PARP. Tout d'abord, par une autre molécule de PARP-1 lors d'une dimérisation, ceci a été observé lors de mécanismes de réparation de cassures simple-brin et correspond au modèle d'Oliver (voir Chapitre II §III-2-1) [324]. La PARP-2 peut aussi former un hétérodimère avec la PARP-1 et ainsi se modifier l'une l'autre afin de s'activer lors des processus de réparation [361, 362]. La PARP-3, nouvel intervenant dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN, active également la PARP-1 mais de façon indépendante de l'ADN [363, 364]. Cependant, le rôle de l'activité de mono(ADP-ribosyl)ation de la PARP-3 n'est pas clairement défini dans ce processus [364].

D'autres ADP-ribosyl transférase peuvent modifier la PARP-1. C'est le cas de SIRT6, une enzyme qui catalyse la mono(ADP-ribosyl)ation en plus de son activité désacétylase [365]. Lors d'un stress oxydant, SIRT6 mono-ADP-ribosyle la PARP-1 sur la lysine 521 au niveau des cassures double-brin ce qui active la PARP-1 et permet une meilleure réparation des dommages [365].

La déPARylation de la PARP-1 est prise en charge par la PARG (« *poly(ADP-ribose) glycohydrolase* »), ce qui est essentiel pour garantir un recyclage rapide de l'ADP-ribose et une conservation du pool de NAD⁺ dans la cellule. Ce sujet sera abordé plus en détails §II-3.

II-2-2/ Phosphorylation

La PARP-1 est ciblée par de très nombreuses kinases. En effet, elle se situe à un point de jonction de la plupart des voies de signalisation cellulaire. Une récente étude a tenté de répertorier, grâce à un criblage par spectrométrie de masse, tous les sites de phosphorylation présents au sein de la PARP-1 et les kinases qui leur étaient associés [366]. Ces travaux ambitieux ont permis de caractériser de nombreux sites même si certains étaient déjà connus. Cependant, l'identification des kinases responsables de ces phosphorylations s'est révélée plus compliquée du fait que nombre d'entre elles ciblaient exactement les mêmes sites. En combinant ces travaux avec d'autres données présentes dans la littérature, nous aborderons ici

les phosphorylations expérimentalement avérées mais leur nombre ne cesse de grandir au fur et à mesure des années.

Tout d'abord, de nombreuses kinases activent la PARP-1. C'est le cas : (1) d'Erk-2 qui est requise pour l'activation maximale de la PARP-1 peu de temps après la détection de dommages à l'ADN [367]. Cette modulation passe par la phosphorylation des sérines 372 et 373 (Figure 37) [366]. Si l'interaction avec Erk-2 augmente l'activité de la PARP-1, cette action est réciproque. Ainsi l'activité de phosphorylation d'Erk-2 se trouve accrue notamment sur des cibles *bona fide* comme sur le membre de la famille Ets, Elk-1 [313]. (2) de la kinase dépendante des cyclines CDK2 qui phosphoryle PARP-1 au sein du domaine catalytique afin qu'elle active l'expression de gènes codant pour des hormones impliquées dans les carcinomes mammaires [368]. (3) des JNK-1/-2 qui promeuvent une activation soutenue de la PARP-1 après stimulation à l'H₂O₂ [369]. (4) de la CaMKII qui permet la dissociation de la PARP-1 d'avec KIF4, l'un de ses corépresseurs [359]. (5) de la CKII (« *casein kinase II* »), kinase impliquée dans l'association de complexe de réparation de l'ADN et dans la réponse aux stress génotoxiques [366]. Pour ces trois dernières kinases, les sites de phosphorylation sur la PARP-1 sont inconnus.

Ensuite, plusieurs kinases peuvent réprimer l'activité catalytique de la PARP-1. C'est le cas de : (1) la PKC qui diminue l'affinité de PARP-1 pour l'ADN et son activité catalytique [370, 371]. Trois sites ont été identifiés, un proche du domaine WGR (T656) et deux au niveau des sites d'auto-PARylation (S504 et S519) (Figure 37) [366]. (2) la CDK5 dont trois sites potentiels ont été identifiés dans le domaine catalytique (Figure 37) [372]. Contrairement à la CDK2, la CDK5 réprime l'activité de la PARP-1 [368]. Néanmoins, les CDK2 et CDK5 sont connus pour intervenir au sein des mécanismes de régulation différents [373]. (3) du complexe DNA-PK qui est aussi connu pour supprimer l'activité de la PARP-1 alors qu'en retour la PARylation active le complexe DNA-PK [374]. Cependant, le(s) site(s) de modification reste(nt) inconnu(s).

D'autres études seront nécessaires pour mieux comprendre la relation qui lie ces kinases et la PARP-1, surtout compte tenu du fait qu'aucun mécanisme impliquant une phosphatase n'a été caractérisé [316].

II-2-3/ Acétylation

La PARP-1 est régulée par acétylation sur cinq lysines présentes dans la région d'auto-modification (Figure 37). Leur première caractérisation fut faite au sein des macrophages lors

de la signalisation de la voie pro-inflammatoire initiée par le facteur de transcription NF- κ B [375, 376]. Ces acétylations sont nécessaires à l'interaction entre NF- κ B, la PARP-1 et le complexe « Médiateur » de régulation transcriptionnelle [376]. La PARP-1 agit donc ici comme un co-activateur transcriptionnel et il est important de signaler que ceci se fait indépendamment de son activité catalytique [376, 377]. D'ailleurs, l'acétylation est effectuée sur trois lysines qui peuvent aussi être PARylées (K498, K521 et K524). Il y a donc compétition sur ces lysines entre l'acétylation et l'auto-PARylation ce qui s'observe également sur des résidus lysines acétylés au sein de la PARP-2 et des histones [378, 379].

Pourtant, l'acétylation ne réprime pas l'activité catalytique de la PARP-1. Au contraire, la désacétylation effectuée par des enzymes telles que HDAC1, HDAC2 ou SIRT1 ont pour conséquence de désactiver la PARP-1 [376, 380]. De plus, la PARP-1 est acétylée, afin d'être activée, lorsque des cardiomyocytes sont soumis à un stress [380].

L'acétylation de la PARP-1 pourrait donc être un état intermédiaire garantissant une activité modérée de la PARP-1 mais d'autres études seront nécessaires pour élucider sa réelle fonction.

II-2-4/ SUMOylation

Lors d'un stress génotoxique ou d'un choc thermique, la PARP-1 est SUMOylée par l'enzyme PIASy sur deux lysines (K203 et K486) (Figure 37) [381, 382]. La PARP-1 SUMOylée est ensuite reconnue par l'E3 ligase RNF4 (« *ring finger protein 4* ») qui ubiquitinye la PARP-1 (voir prochain paragraphe). L'interaction entre PIASy et la PARP-1 n'est pas directe, elle se fait par l'intermédiaire des PAR (Figure 38) [382]. D'ailleurs, c'est pour cette raison que d'autres protéines peuvent être SUMOylées par RNF4 en même temps que la PARP-1 à condition qu'elles soient PARylées. C'est le cas, par exemple, de la kinase IKK γ (« *inhibitor of nuclear factor κ -B kinase subunit γ* ») [382].

II-2-5/ Ubiquitination

La caractérisation de l'ubiquitination de la PARP-1 est récente. D'ailleurs, les sites précis de modification n'ont pas été identifiés. Cela est dû au fait, que l'ubiquitination est une modification secondaire pour la PARP-1. Elle doit être préalablement SUMOylée ou PARylée.

Comme nous l'avons déjà signalé, la PARP-1 SUMOylée est reconnue par l'E3 ligase RNF4 puis ubiquitinylée [381]. Ceci engendre sa dégradation par le protéasome. Ce processus qui a lieu lors de la réponse aux stress permet la dérégulation de certains gènes. Ainsi, lors de la réponse aux chocs thermiques, par exemple, la PARP-1, qui réprime l'expression de la protéine chaperonne HSP70 (« *heat shock protein 70 kDa* ») au niveau du promoteur de son gène, est SUMOylée puis ubiquitinylée et enfin est dégradée par le protéasome (Figure 38) [381]. Cela permet l'expression de cette protéine chaperonne spécifiquement lors de chocs thermiques. La dégradation de la PARP-1 lors d'un stress peut paraître paradoxale. Néanmoins, la SUMOylation de la PARP-1 n'a lieu qu'au niveau des promoteurs de ces gènes particuliers ou lorsque la réparation de l'ADN a déjà été effectuée [381, 382]. Les fonctions de réparation de l'ADN n'en sont donc pas altérées.

La PARylation de la PARP-1 est également un signal de reconnaissance pour certaines ubiquitine ligases. En effet, la PARylation aboutit à la dissociation des complexes de réparation de l'ADN. Afin d'empêcher la reformation immédiate de ces complexes, les différentes protéines les constituant sont souvent dégradées par le protéasome. Ceci est rendu possible par l'existence d'ubiquitine ligases qui contiennent des PBD et donc qui reconnaissent les PAR [303, 304]. Ceci permet de promouvoir leur activité d'ubiquitine ligase. La plus connue de ces ligases est la RNF146, aussi appelée Iduna. Des travaux ont montré que son activité protège les neurones de la toxicité du glutamate en interférant avec la mort cellulaire dépendante de la PARP-1 (*Parthanatos*) [383, 384]. RNF146 ubiquitinye la PARP-1 lorsqu'elle est fortement PARylée (Figure 38) [383, 384]. Ainsi, les molécules de PARP-1 suractive ne peuvent pas enclencher la mort cellulaire programmée [384]. RNF146 permet également la dégradation d'autres protéines PARylées dont entre autres les Tankyrases, l'axine ou encore une protéine impliquée dans la maladie du Chérubisme, 3BP2 [385-387].

Il existe d'autres E3 ubiquitine ligases dépendantes de la PARylation qui ciblent la PARP-1. Par exemple, l'enzyme CHFR (« *checkpoint with forkhead (EHA)-associated and really interesting new gene (RING) finger domains* »), qui possède un PBD, ubiquitinye la PARP-1 en cas de stress mitotique comme lors de l'utilisation de poisons du fuseau (Figure 38) [388]. Cela permet d'empêcher la PARP-1 d'agir contre le blocage du cycle cellulaire en phase G2/M [388].

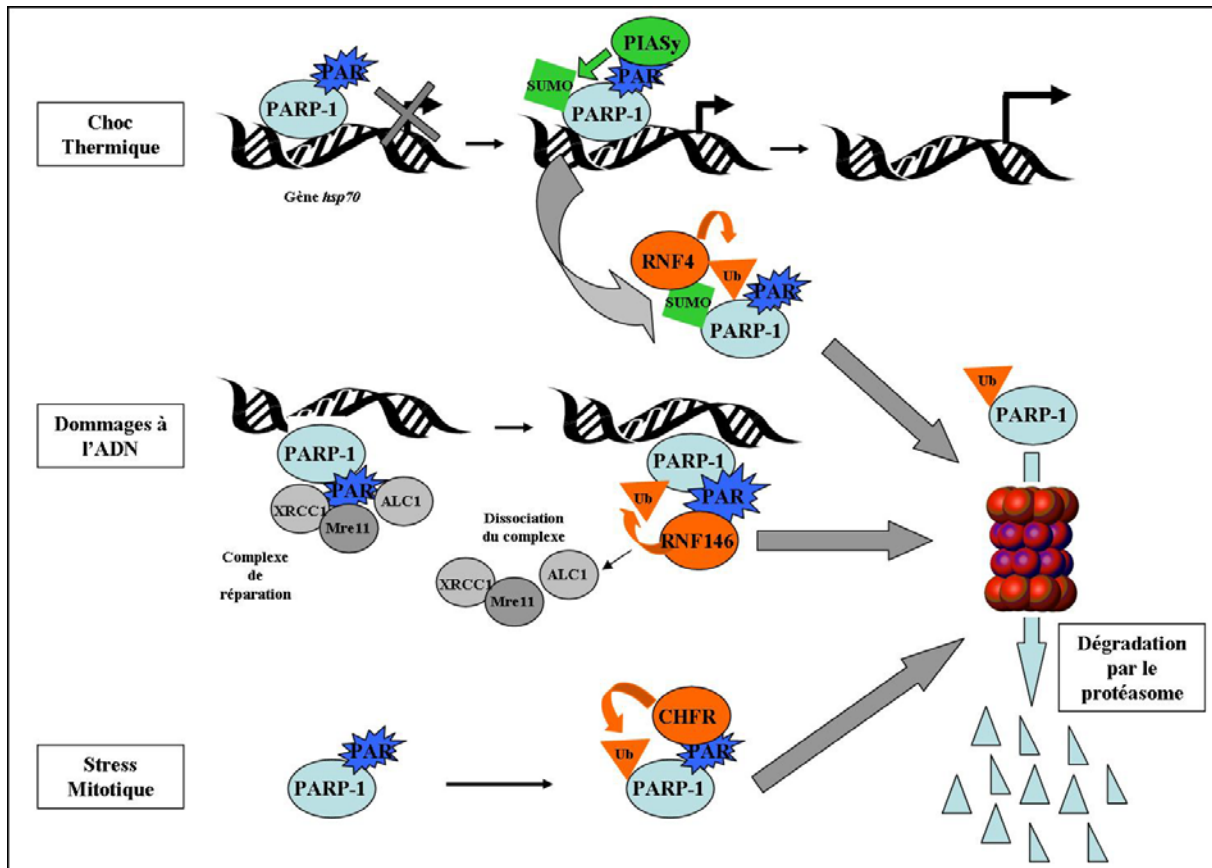


Figure 38 : Mécanisme d'ubiquitination et de dégradation par le protéasome de la PARP-1.

Trois exemples de mécanismes de dégradation de la PARP-1 sont représentés. Le premier est dans le contexte du choc thermique. Il permet l'expression du gène *hsp70* par la dégradation de la PARP-1 après sa SUMOylation par l'enzyme PIASy et son ubiquitination par RNF4. Le deuxième prend place lors de la réparation des cassures de l'ADN où PARP-1 est ubiquitinylée par RNF146. Un exemple de complexe de réparation est indiqué. ALC1 (« *amplified in liver cancer 1* »), XRCC1, Mre11 (« *meiotic recombination 11* »). Le dernier s'active après un stress mitotique et est dû à l'enzyme CHFR. D'après [304, 381].

II-3/ Régulation par la poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG)

Le catabolisme des PAR est essentiel pour la cellule afin de reconstituer ses réserves de NAD^+ . En effet, si l'activité de PARylation n'est pas contrebalancée, la totalité du NAD^+ peut se retrouver consommé. Or, il s'agit d'un substrat indispensable à la production d'ATP, sans lui, la cellule meurt par manque d'énergie. De plus l'ADP-ribose qui compose les PAR ne peut être utilisé tant qu'il est mobilisé au sein des polymères. Les PAR sont donc dégradés très rapidement, moins d'une minute après leur constitution. L'enzyme principale, qui est responsable de cette dégradation, est la poly(ADP-ribose) glycohydrolase, la PARG [301, 302]. Chez les mammifères, il en existe trois isoformes : deux cytoplasmiques (PARG 99 kDa et 102 kDa) et une nucléaire (PARG 110 kDa) [389]. La PARG peut ainsi réguler toutes les PARP qu'elles soient localisées dans le noyau (PARP dépendantes de l'ADN), dans le cytoplasme (CCCH- et MacroPARP) ou dans les deux compartiments (Tankyrases) [302]. La

structure du domaine catalytique de la PARG a été étudiée [390]. Il contient un domaine Macro qui, en plus d'être un PBD, reconnaît aussi l'ADP-ribose libre. Ce domaine contient un site actif qui permet à la PARG de rompre les liens $\alpha(1\rightarrow2)$ O-glycosidiques faisant la jonction entre les unités d'ADP-ribose (Figure 39). Cette activité est autant exo- qu'endo-glycohydrolytique chez la PARG, ce qui signifie qu'elle peut soit libérer de l'ADP-ribose (exo) soit des PAR (endo) (Figure 39). D'autres enzymes sont connues pour dégrader les PAR. Néanmoins, leurs fonctions sont moins bien caractérisées que celles de la PARG. C'est le cas des ADP-ribosyl hydrolases (ARH), comme ARH-3 et des hydrolases NUDIX [302]. ARH-3 ne produit que des PAR libres (Figure 39) [391]. Les fonctions de NUDIX sont peu connues.

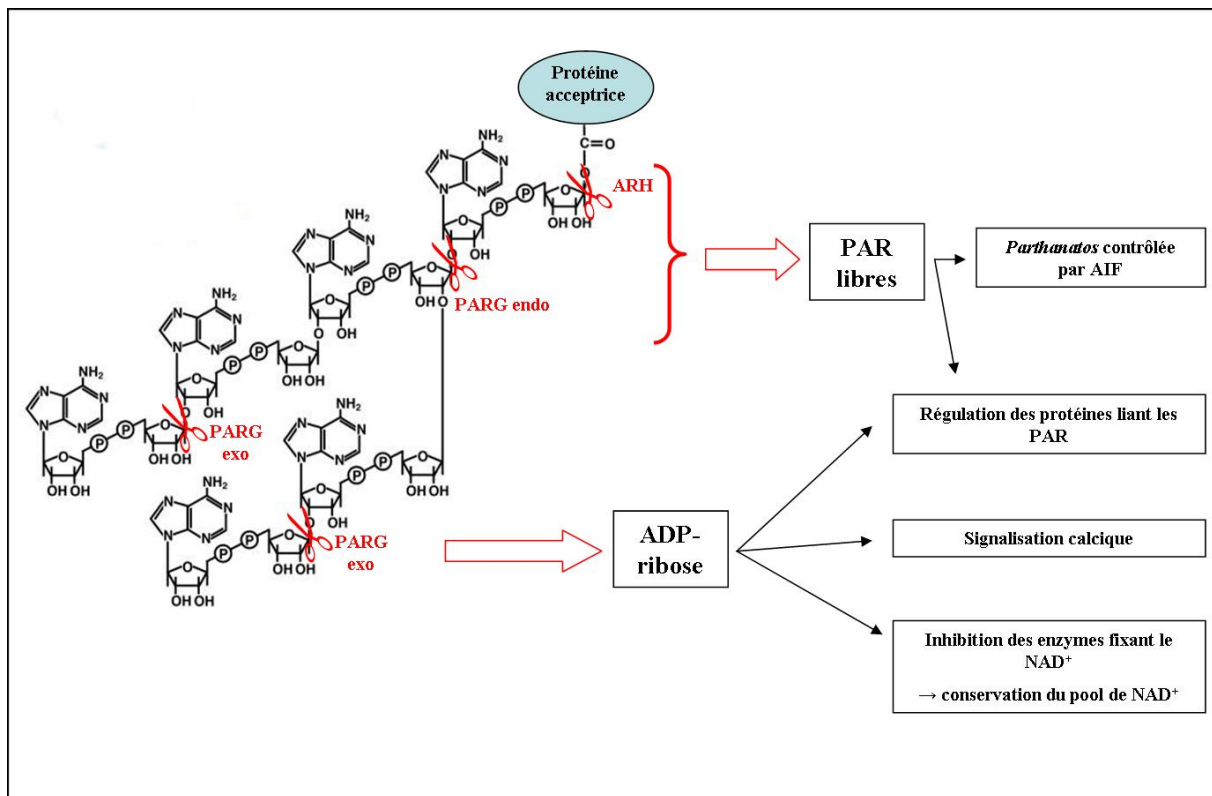


Figure 39 : Catabolisme des PAR.

Les sites de clivage par la PARG ou les ARH sont indiqués par une paire de ciseaux rouges. D'après [302, 316].

La production de PAR libre est un signal toxique pour la cellule car elle active la mort cellulaire dépendante de l'AIF (« *apoptosis-inducing factor* ») et de la PARP-1, appelée aussi *Parthanatos* [392]. L'ADP-ribose, lui, peut engendrer l'activation de signaux calciques mais surtout permet l'inhibition des enzymes catalysant le NAD^+ afin d'empêcher sa consommation (Figure 39) [393, 394]. L'ADP-ribose et les PAR peuvent également réguler la formation ou la dissociation des complexes protéiques liant les PAR (Figure 39).

II-4/ Inhibiteurs pharmacologiques de la PARP-1

Compte tenu de son implication dans de nombreuses pathologies (voir Chapitre IV), la PARP-1 a rapidement été considérée comme une cible thérapeutique potentielle. Afin de pouvoir contrer son activité catalytique, plusieurs types d'inhibiteurs pharmacologiques ont été mis au point (Tableau 7). Certains ne sont utilisés qu'au niveau expérimental, d'autres sont actuellement en tests cliniques [302]. Ce sont tous des dérivés de la Nicotinamide, l'inhibiteur naturel (Tableau 7). Leur mode de fonctionnement est d'entrer en compétition avec la fixation du NAD⁺ dans la poche du site catalytique.

Les inhibiteurs de première génération comme le 3-AB ou le DPQ sont peu spécifiques, peu efficaces et ont tendance à inhiber les autres PARP [395]. Des inhibiteurs plus modernes comme le PJ-34, utilisé en recherche expérimentale, ciblent principalement la PARP-1 ainsi que dans une moindre mesure la PARP-2 [395]. Cependant, la molécule phare utilisée en clinique reste l'Olaparib qui montre une très forte efficacité bien que cet inhibiteur soit peu spécifique de la PARP-1 [395]. Trois autres inhibiteurs sont très utilisés en clinique, l'Iniparib qui est proche du 3-AB, le Veliparib et le Rucaparib, deux benzamidazoles qui sont de plus en plus employés. Les résultats des tests cliniques obtenus grâce à ces inhibiteurs seront développés dans le chapitre IV §I-1-3.

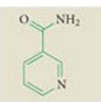
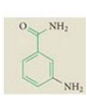
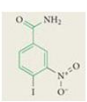
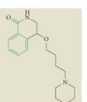
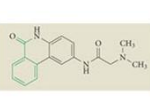
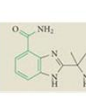
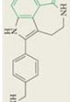
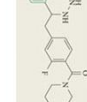
Famille du composé	Inhibiteur naturel	Benzamide			Phenanthridinone	Benzamidazole		Phthalazinone
Nom du composé	Nicotinamide	INO-1001 (3-AB)	Iniparib (BSI-201)	DPQ	PJ-34	Veliparib (ABT-888)	Rucaparib (AG-014699)	Olaparib (AZD-2281)
Structure chimique								

Tableau 7 : Inhibiteurs catalytiques de la PARP-1 les plus utilisés.

La liste des inhibiteurs est non exhaustive. Seul les plus utilisés sont présentés. D'après [302].

L'ensemble de ces données nous montre que l'enzyme PARP-1 se situe au carrefour de très nombreuses voies de signalisation qui régulent son activité et est responsable du devenir de la cellule. Pourtant, la variété de ces signaux suggère que l'action de la PARP-1 est déterminée par un contexte cellulaire et par un équilibre instable entre, d'un côté, le fait que la PARylation est indispensable au maintien de l'intégrité du génome et, d'un autre côté, qu'il s'agit également d'un signal toxique pour la cellule qui peut conduire à sa mort.

L'expression de la PARP-1 étant ubiquitaire, son action prend place dans toutes les cellules, au sein de tous les processus, qu'ils soient embryonnaires ou chez l'adulte. Néanmoins, nous avons pu constater que son expression pouvait connaître des variations sensibles en cas de stress ou lors de mécanismes de différenciation. Ce qui signifie que la PARP-1 peut aussi avoir des rôles spécifiques comme nous le verrons dans le prochain chapitre.

Enfin, en conclusion de ce chapitre nous avons vu que, contrairement à d'autres protéines, l'activité catalytique de la PARP-1 peut être facilement et efficacement contrôlée par l'utilisation de divers inhibiteurs pharmacologiques. Les fonctions pathologiques seront abordées dans le prochain chapitre et nous verrons que ces inhibiteurs ont permis des avancées majeures notamment dans la lutte contre le cancer.

CHAPITRE IV : RÔLES BIOLOGIQUES DE LA PARP-1

I/ La PARP-1 : une protéine aux rôles multiples

Dans cette première partie, nous illustrerons :

Tout d'abord, les rôles primordiaux de la PARP-1 dans différents mécanismes cellulaires à savoir : (1) dans la réparation de l'ADN, (2) dans la compaction et la décompaction de la chromatine ainsi que dans certains événements épigénétiques, et (3) dans la transcription de certains gènes.

Ensuite, les rôles que la PARP-1 joue dans divers processus cellulaires et qui peuvent être reliés à son activité de PARylation à savoir : (1) dans l'intégration et la réponse aux stress, (2) dans le contrôle de la division cellulaire et de la mitose, (3) dans la sénescence cellulaire et le vieillissement, et (4) dans la mort cellulaire.

I-1/ Réparation de l'ADN

La réparation de l'ADN fut le premier rôle décrit pour la PARP-1. Les travaux, les plus antérieurs, l'ont principalement associée au mécanisme de réparation par excision de base (BER « *base excision repair* ») qui prend en charge la réparation des cassures simple-brin. Néanmoins, au fur et à mesure des années, il a été constaté que la PARP-1 prenait part à toutes sortes de mécanismes de réparation de l'ADN notamment au sein de ceux de la recombinaison homologue (HR) et de la NHEJ (« *non homologous end-joining* »). Comme nous allons le voir, la PARP-1 n'est jamais essentielle au déroulement de ces mécanismes. Cependant, cette enzyme a un fort impact sur la qualité, la durée et la synchronisation de la réparation et donc si elle n'est pas indispensable, son absence a de grandes conséquences sur le devenir cellulaire.

I-1-1/ Réparation par excision de base (BER)

Pendant longtemps, la PARP-1 fut considérée comme essentielle au mécanisme de BER. En effet, les premières études, menées sur des souris transgéniques déficientes pour cette enzyme, ont décrit une hypersensibilité de ces animaux aux radiations ionisantes et aux dommages alkylants ou oxydatifs ce qui fut plus tard associé à un défaut de BER [396-398].

Cependant, certaines études remettent en cause le fait que la PARP-1 soit indispensable au mécanisme de BER et montrent qu'il existe des voies de secours dans le cas où celle-ci serait absente [399-401]. Nous allons ici faire état des connaissances actuelles du rôle de la PARP-1 dans le mécanisme de BER.

Le mécanisme de réparation par excision de base intervient lorsqu'une base de l'ADN est altérée par différentes modifications telles que : (1) celles dues à l'attaque par des ROS, (2) la méthylation, (3) la désamination, (4) l'alkylation, (5) l'hydroxylation ou (6) l'intégration d'un uracile à la place d'une thymine [402, 403]. La réparation de ces lésions se produit en cinq phases (Figure 40).

Tout d'abord, la base défectueuse doit être retirée, c'est la phase d'excision. Ceci est effectué grâce à la reconnaissance de la lésion par une ADN glycosylase [404] (Figure 40). Il en existe de plusieurs sortes selon l'altération et elles sont suffisantes à l'excision de la base. La lésion, devenue un site abasique, est ensuite convertie en cassure simple-brin par une endonucléase, APE1 (« *apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease 1* ») [404] (Figure 40). La PARP-1 n'est *a priori* impliquée ni dans la reconnaissance de ces altérations ni dans l'excision des bases défectueuses. Cependant, la PARP-1 est bien présente au niveau de la base altérée au sein de complexes multiprotéiques. En effet, la PARP-1 interagit avec des protéines telles que l'ADN glycosylase OGG1 (« *8-oxoguanine glycosylase 1* ») [405], la condensine I [406] et l'ADN adénylate hydrolase aprataxine [407] toutes impliquées dans la phase d'excision (Figure 40). La PARP-1 est probablement recrutée par ces protéines afin d'être disponible une fois la cassure simple-brin formée. Il est important de noter que lors d'une lésion par irradiation, une cassure simple-brin peut directement être obtenue. La PARP-1 est alors la première protéine à être recrutée (Figure 40) [404].

En effet, une fois les lésions converties en cassures simple-brin, la PARP-1 s'y fixe, ce qui permet la stimulation de son activité catalytique (Figure 40). Il s'agit d'une phase relativement courte où la PARP-1 va rapidement se dissocier de l'ADN du fait de sa forte auto-PARYlation (Figure 40). Entre-temps, les PAR formés par la PARP-1 ont permis le recrutement d'une protéine adaptatrice essentielle à l'organisation des complexes de réparation des cassures simple-brin, XRCC1 [398] (Figure 40). La PARP-1 serait donc en fait une enzyme de relais entre la phase d'excision et les phases plus tardives qui conduisent à la ligation [408].

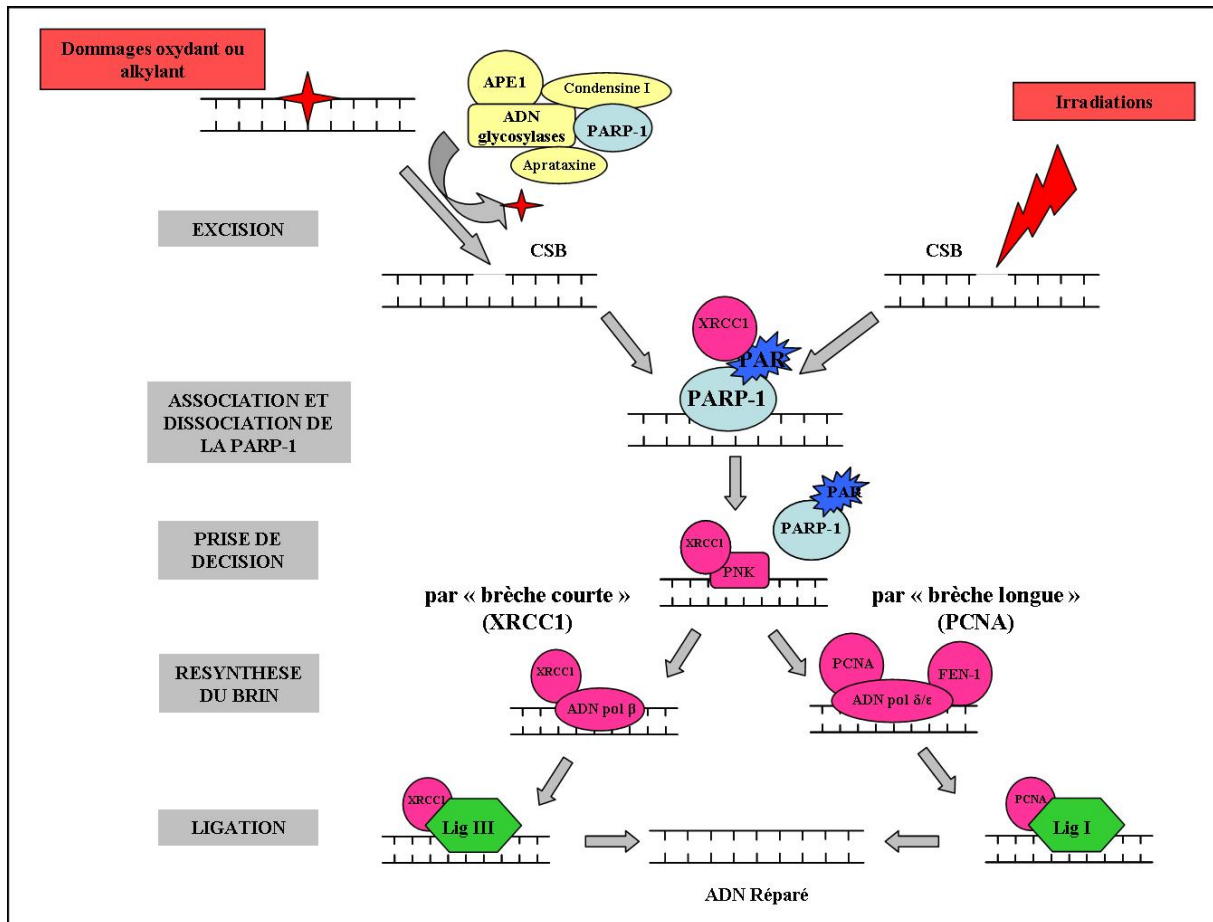


Figure 40 : Implication de la PARP-1 dans le mécanisme de réparation par BER.

Les stress actionnant le mécanisme de réparation par BER sont indiqués en rouge. Les différentes phases de réparation sont indiquées dans des cadres grisés. CSB = cassure simple-brin. Les protéines impliquées dans la phase d'excision sont colorées en jaune clair, dans l'association des complexes en magenta et dans la phase de ligation en vert. Adapté depuis [399, 404].

C'est après la dissociation de la PARP-1 que le rôle de cette enzyme devient moins clairement caractérisé. En effet, il s'agit ici d'une phase de décision soit : (1) la réparation de la cassure simple-brin se fait par « brèche courte » à savoir que seul le nucléotide déficient sera remplacé, (2) la réparation de la cassure simple-brin se fait par « brèche longue » et le brin lésé sera resynthétisé sur plusieurs bases de longueur. Dans les deux cas, il y a intervention de la kinase PNK (« *polynucleotide kinase* ») qui prépare la ligation [399]. Le coordinateur de la réparation par « brèche courte » est XRCC1 alors que par « brèche longue » c'est la protéine PCNA (« *proliferating cell nuclear antigen* ») (Figure 40) [399]. La PARP-1 stimule par son activité de PARylation le recrutement de XRCC1 et la réparation par « brèche courte » [399]. PCNA, de son côté, favorise la réparation par « brèche longue » en réprimant l'activité de la PARP-1 par interaction directe avec l'enzyme [409]. Néanmoins, il semble que la réparation par « brèche longue » soit surtout favorisée en absence de l'enzyme PARP-1 [399].

Une fois cette décision prise, le brin endommagé est resynthétisé. Lors de la réparation par « brèche courte », cette synthèse est directement effectuée par l'ADN polymérase β [399]. Par contre, lors de la réparation par « brèche longue », la cassure simple-brin est élargie sur plusieurs bases de longueur par l'endonucléase FEN-1 (« *flap endonuclease 1* ») puis le brin est resynthétisé par les ADN polymérases δ et ϵ [399].

Enfin, il y a ligation de l'ADN par la ligase III (« brèche courte ») ou par la ligase I (« brèche longue ») (Figure 40) [399]. Ainsi, la cassure simple-brin est finalement réparée.

I-1-2/ Recombinaison homologue (RH)

La recombinaison homologue (RH) est un mécanisme de réparation des cassures double-brin. Il permet de reconstruire fidèlement la séquence d'ADN en utilisant comme modèle la séquence contenue dans l'autre chromosome homologue (Figure 41). De façon surprenante, ce système de réparation très fiable n'est que peu utilisé chez les mammifères et se retrouve plus souvent chez les eucaryotes inférieurs tels que les levures. La raison en est probablement une volonté de conserver la variabilité de l'information génétique notamment rendue possible par l'existence d'allèles différents. En effet, après la recombinaison homologue, les deux séquences chromosomiques deviennent identiques. En plus de représenter une perte de variabilité génétique, la cellule prend le risque de dupliquer une copie défectueuse si l'allèle pris comme modèle est muté. Une mutation, qui était jusqu'alors récessive, pourrait donc devenir dominante. C'est pourquoi, les eucaryotes supérieurs préfèrent la NHEJ (voir §I-1-3), peu fiable mais conservant toute l'information génétique. Cependant, la RH est utilisée si une cassure double-brin se forme au sein de la fourche de réplication lors de la phase S du cycle cellulaire en prenant comme modèle la chromatide sœur (Figure 41) [410].

La première étape de la RH est d'obtenir deux extrémités 3' débordantes à partir d'une cassure double-brin (Figure 41). Ceci est rendu possible par une résection 5'→3' effectuée par le complexe Mre11/Rad50/Nibrin (MRN), RBBP8 (« *retinoblastoma-binding protein 8* ») et BRCA1 (Figure 41) [404, 410]. Les extrémités 3' débordantes sont protégées et stabilisées par la protéine RPA (« *replication protein A* »). RPA est ensuite remplacée par la recombinase Rad51 et la protéine BRCA2 afin de promouvoir l'invasion du brin homologue (Figure 41) [402]. Ce brin servira alors de modèle afin de reconstituer la séquence endommagée.

Des travaux ont démontré que la PARP-1 permet l'inhibition du mécanisme de RH. En effet, la déficience de cette enzyme entraîne une utilisation accrue de la RH au sein de cellules de souris [396]. A l'inverse, la surexpression de la PARP-1 engendre une disparition de la RH [411]. Une étude a pu démontrer que la PARP-1 retarde indirectement la formation des foyers Rad51 [412, 413].

Récemment, des travaux ont montré que le rôle de la PARP-1 se situe au niveau de la fourche de réplication de l'ADN pendant la phase S (Figure 41) [414, 415]. Si une cassure simple-brin se forme au niveau de la fourche, la réplication de l'ADN peut la convertir en cassure double-brin. Afin d'empêcher cela, la PARP-1 peut se lier aux dommages et réparer les lésions par un mécanisme de BER (Figure 41) [414, 415]. De plus, la PARP-1 inhibe la résection des brins en réprimant le complexe MRN par PARylation (Figure 41) [414-416].

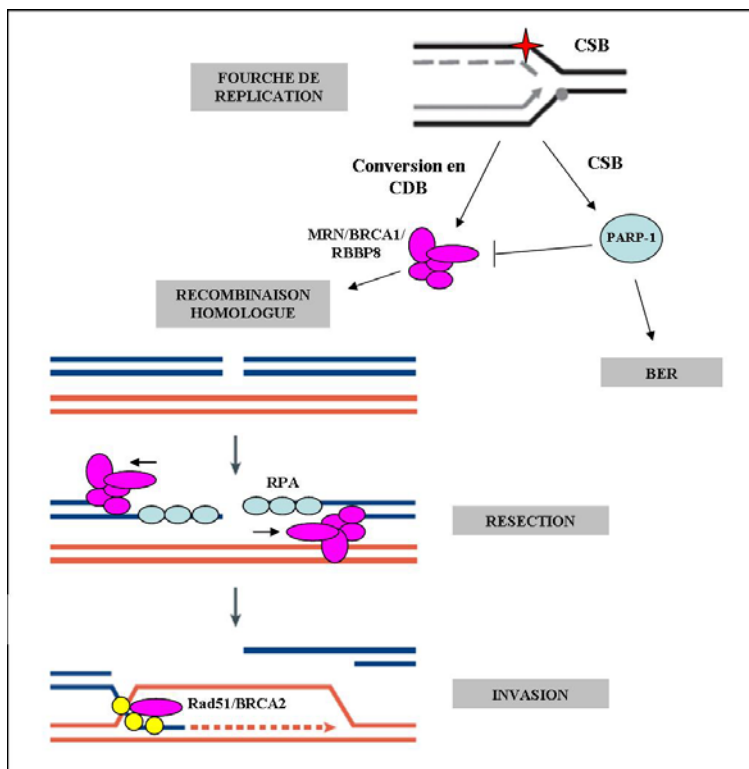


Figure 41 : Mécanisme de réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue.

Lors de lésions formées au niveau de la fourche de réplication de l'ADN, soit la cassure simple-brin (CSB) est réparée par la PARP-1 par BER, soit la cassure devient double-brin (CDB) et est réparée par recombinaison homologue. Adapté depuis [415, 417].

Nous pouvons signaler ici que ces lésions formées lors de la réplication de l'ADN ne peuvent être réparées que par la PARP-1 ou le couple BRCA1/2. C'est pourquoi des cellules qui possèdent des mutations sur les gènes de BRCA1 ou de BRCA2 ne peuvent pas survivre à l'inhibition de la PARP-1 [418] (voir §III-1-2-2-b).

I-1-3/ Non-homologous end-joining (NHEJ)

En dehors de la phase de réplication de l'ADN, les cassures double-brin sont réparées par le mécanisme de « *non homologous end-joining* » (NHEJ). Il consiste en la jonction de deux extrémités d'ADN issues d'une cassure double-brin sans qu'elles soient forcément issues de la même séquence originelle. C'est pourquoi le NHEJ peut être responsable de translocation chromosomique. Il existe deux formes de NHEJ : (1) une forme dite classique (c-NHEJ) dépendante de l'activité du complexe DNA-PK, et (2) une forme dite alternative (a-NHEJ) dépendante de l'activité de la PARP-1 (Figure 42).

La c-NHEJ est la forme majoritaire. Lors de ce mécanisme, la cassure double-brin est reconnue par les protéines Ku70 et Ku80 du complexe DNA-PK (Figure 42). Ceci permet le recrutement de la sous-unité catalytique, DNA-PKcs (Figure 42). Le complexe DNA-PK, désormais complet, peut ainsi réunir d'autres protéines telles que les enzymes Artemis, PNK et la polymérase X qui permettent la jonction de la cassure (Figure 42). Enfin, la ligation est assurée par les protéines XRCC4, XLF (« *XRCC4-like factor* ») assistées de l'ADN ligase IV [404, 419] (Figure 42).

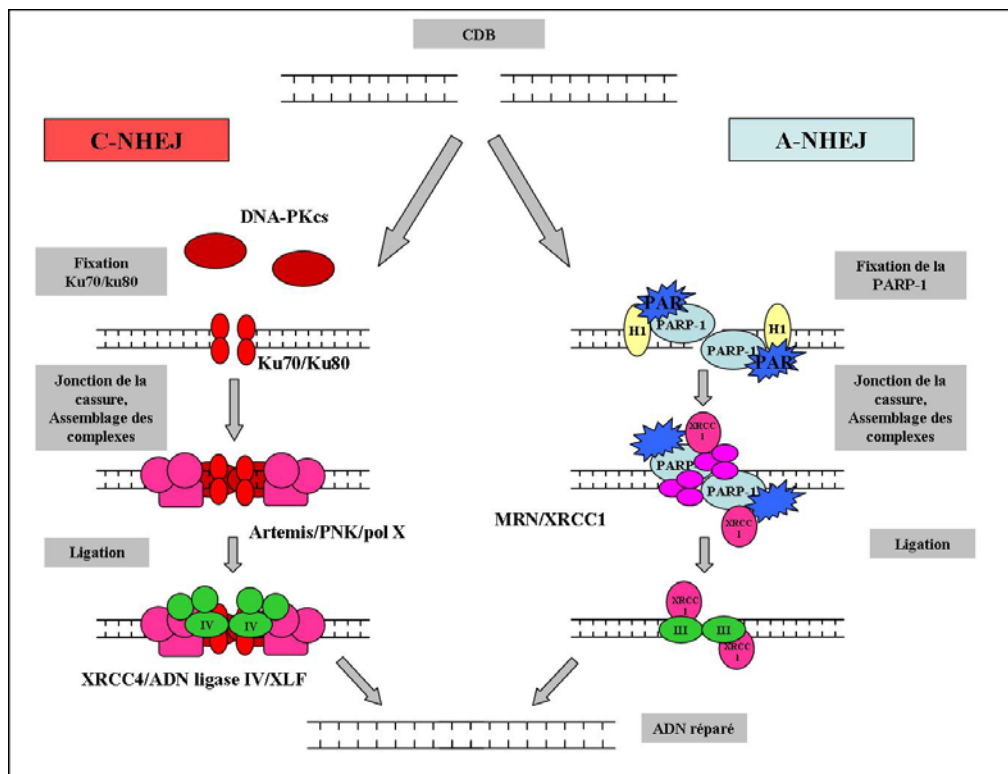


Figure 42 : Mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN par NHEJ.

Les mécanismes de c-NHEJ et a-NHEJ sont représentés. Les différentes phases de réparation sont indiquées dans des cadres grisés. CDB = cassure double-brin. Les protéines impliquées dans l'association des complexes sont colorées en magenta, dans la phase de ligation en vert. H1 = histone H1, IV = ADN ligase IV, III = ADN ligase III. Adapté depuis [404, 419].

La forme a-NHEJ n'est utilisée que comme voie de secours si la c-NHEJ est défectueuse. De nombreux travaux ont permis d'établir que la PARP-1 était le facteur majeur de cette voie [332, 420-422] (Figure 42). La reconnaissance de la cassure double-brin nécessite la dimérisation de deux molécules de PARP-1, une sur chaque extrémité (Figure 42). Ceci permet l'activation de la PARP-1 qui est également stimulée par les histones H1 présents au niveau de la cassure (Figure 42) [420]. La jonction des brins se fait par l'intervention du complexe MRN et de XRCC1. Enfin, la ligation est effectuée par la ligase III (Figure 42). La a-NHEJ se rencontre physiologiquement lors de la recombinaison V(D)J au sein des lymphocytes B et T et également dans les mécanismes de commutation de classe d'anticorps [419, 423].

Cependant, nous pouvons nous demander ce qui fait de la c-NHEJ le mécanisme majoritaire. Il est connu que la PARP-1 entre en compétition avec l'hétérodimère Ku70/Ku80 pour la reconnaissance des cassures double-brin [421, 422]. Pourtant, la PARP-1 et le complexe DNA-PK peuvent interagir au niveau de ces cassures [333]. Cependant, si la PARP-1 active le complexe DNA-PK, celui-ci inhibe la PARP-1 par phosphorylation [374, 424]. Ceci explique probablement comment le complexe DNA-PK prend définitivement le dessus sur la PARP-1, faisant de la c-NHEJ, le mécanisme dominant.

I-2/ Régulation de la chromatine et des événements épigénétiques

Des travaux ont montré très rapidement après sa découverte que la PARP-1 était impliquée dans la décompaction de la chromatine [334, 425, 426]. Cette action est possible grâce au fait : (1) que la PARP-1 fait partie de l'architecture même de la chromatine et peut donc réguler sa structure de l'intérieur, et (2) que la PARP-1 peut changer la composition de la chromatine en PARylant des protéines comme les histones.

La PARP-1, lorsqu'elle est inactive, participe à l'architecture compacte de la chromatine (Figure 43) [427]. Cette structure réprime la transcription [334]. A l'inverse, si son activité est stimulée, la PARP-1 auto-PARylée peut modifier l'architecture de la chromatine et permettre sa décompaction. Cela est dû à la répulsion entre l'auto-PARylation de la PARP-1 et l'ADN qui force la chromatine à adopter une structure en collier de perles [427]. Cette structure rend la chromatine pleinement accessible pour la transcription (Figure 43).

De plus, la PARP-1 régule la composition même de la chromatine (Figure 43) [334, 428]. En effet, la PARP-1, activée au sein de la chromatine, s'auto-PARYle, comme nous l'avons vu, mais PARYle en même temps d'autres protéines comme les histones [379]. Ces derniers sont d'ailleurs les protéines les plus modifiées par PARYlation après la PARP-1 elle-même [379]. Cette modification s'effectue notamment sur l'histone H1 et le répresseur transcriptionnel DEK et va provoquer leur exclusion de la chromatine [429, 430]. L'histone H1 est remplacé par HMGB1 (« *high mobility group box 1* »), protéine caractéristique de la chromatine décompactée (Figure 43) [429], et le départ des protéines DEK permet l'arrivée du complexe « Médiateur », activateur de la transcription [430].

D'autres histones sont PARYlés par la PARP-1 tels que les histones H2A, H2B, H3 et H4 ainsi que des protéines de l'hétérochromatine comme HP1 [428, 431]. Même s'il ne sont pas exclus de la chromatine, leur PARYlation favorise la décompaction grâce à la répulsion que cette modification engendre vis-à-vis de l'ADN [301].

En outre, la PARP-1 régule l'organisation de la matrice nucléaire, ce phénomène est appelé en anglais « *Insulation* » (Figure 43) [334, 428]. Les *insulateurs* sont des éléments génétiques qui aident à l'organisation du génome en le subdivisant en régions distinctes. En effet, les phénomènes de compaction ou de décompaction peuvent se propager tout au long de la chromatine s'ils ne sont pas stoppés [334]. Afin de mettre un point d'arrêt à cette propagation, des complexes protéiques se fixent au niveau des *insulateurs* et fonctionnent ainsi comme des barrières qui délimitent des zones indépendamment régulées les une des autres. L'une des protéines majeures de ces complexes est CTCF (« *CCCTC-binding factor* »). Des travaux ont démontré que la PARP-1 favorise la fixation de la protéine CTCF sur les *insulateurs* en la PARYlant [432-434]. Ainsi, la PARP-1 et la PARYlation permettent de former cette barrière physique à la propagation de la compaction ou de la décompaction de la chromatine (Figure 43).

Enfin, des travaux mettent en évidence un lien entre la PARYlation et la régulation des événements épigénétiques [432]. En effet, il existe une compétition entre la PARYlation des histones et leur désacétylation qui promeut, elle, la compaction de la chromatine [313]. Des travaux ont démontré l'interaction entre la PARP-1 et une désacétylase dépendante du NAD⁺, SIRT1. Ces deux enzymes sont des antagonistes, l'activité de PARYlation est inversement proportionnelle à celle de la désacétylation [435]. Cela est dû à la compétition entre la PARP-1 et SIRT1 vis-à-vis du NAD⁺ [436]. Ainsi, si la PARP-1 prend le dessus sur SIRT1, il y a

PARylation des histones et la chromatine est décompactée. A l'inverse, si SIRT1 est favorisée, les histones sont désacétylés et la chromatine devient compacte. Cependant, les signaux précis qui donnent l'avantage à l'une ou l'autre des deux enzymes restent à déterminer.

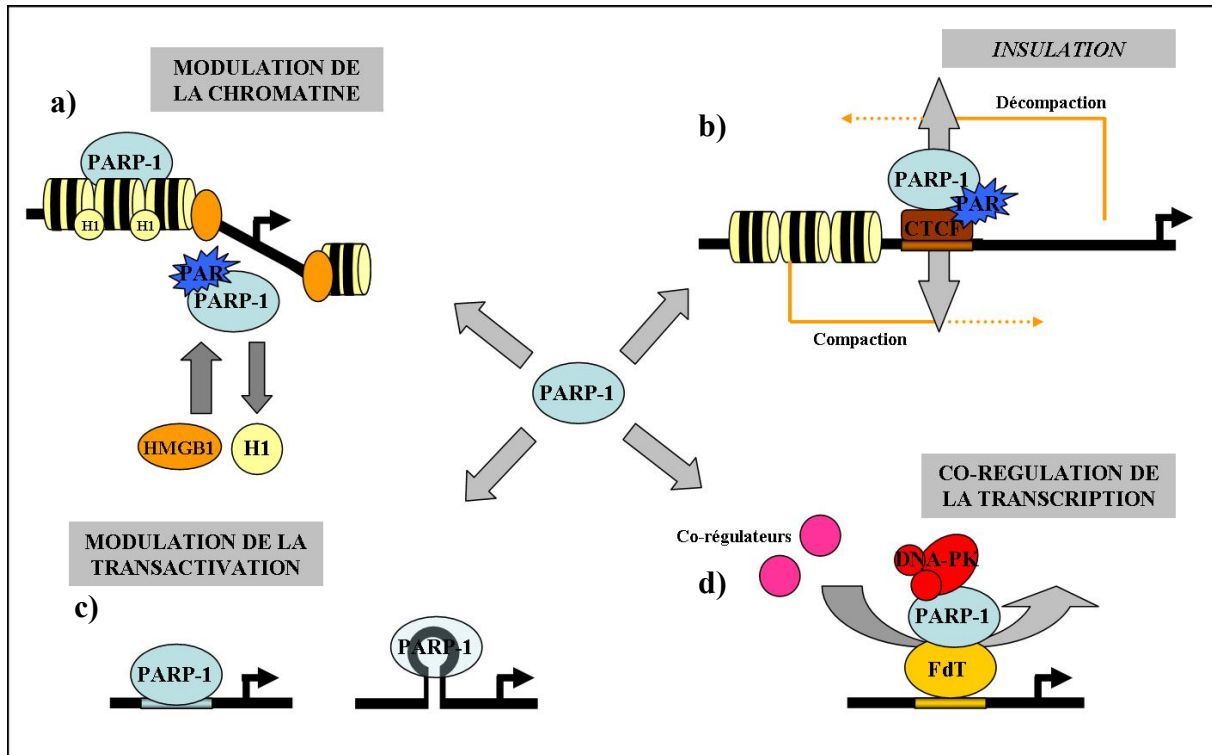


Figure 43 : Implications de la PARP-1 dans la modulation de la chromatine et dans la transcription.

a) Modulation de compaction de la chromatine par la PARP-1. Inactive, la PARP-1 renforce la compaction de l'hétérochromatine. Une fois activée, elle promeut la décompaction en favorisant l'échange des histones H1 par HMGB1. b) *Insulation* par la PARP-1. La PARP-1 stimule les fonctions de CTCF ce qui permet l'isolation des différentes régions de chromatine empêchant la propagation des changements de structure de la chromatine. c) Modulation de la transactivation par la PARP-1. La PARP-1 se fixe sur des « *enhancers* » qui lui sont spécifiques ou sur des structures particulières d'ADN afin d'activer ou de réprimer la transactivation de certains gènes. d) Co-régulation de la transcription par la PARP-1. La PARP-1 interagit avec des facteurs de transcription (FdT) et permet le recrutement de co-régulateurs (dont le complexe DNA-PK) afin d'activer l'expression de certains gènes. Adapté depuis [334].

I-3/ Régulation de la transcription

I-3-1/ Modulation de la transactivation

La PARP-1 peut se lier à des séquences spécifiques d'ADN ou à des structures particulières comme les épingles à cheveux qui fonctionnent comme *enhancer* de certains gènes (Figure 43) [437-441]. La fixation de la PARP-1 sur ces structures conduit le plus souvent à la répression du gène car l'enzyme entre en compétition avec des co-activateurs pour la fixation sur ces *enhancers*. C'est le cas pour les promoteurs des gènes *cxcl1* et *bcl6*

[442, 443]. Sur le promoteur de *cxcl1*, la PARP-1 empêche la liaison du facteur de transcription NF-kB et donc l'activation du gène [442].

La PARP-1 réprime également certains gènes en se fixant sur des *silencers*. Nous avons déjà pu voir cela au sein du gène même de la PARP-1 (voir Chapitre III §I) [444]. L'expression de ces gènes est déréprimée par l'auto-PARylation de la PARP-1 qui conduit à sa dissociation du promoteur [442].

Cependant, la PARP-1 peut aussi activer l'expression de certains gènes comme celui de *mash1* lors de la différenciation neuronale [445]. La PARP-1 chasse, du promoteur de ce gène, le co-répresseur TLE1 (« *transducin-like enhancer protein 1* ») en le PARylant [445]. La PARP-1 fonctionne donc comme un transactivateur ou un transrépresseur et cela de façon gène-spécifique.

I-3-2/ Co-régulation transcriptionnelle.

Ces dernières années, de nombreux travaux ont montré que la PARP-1 est un co-régulateur transcriptionnel [334, 446] (Figure 43). Des études ont été effectuées en utilisant des micropuces afin de déterminer les gènes dont l'expression était perturbée au sein de cellules déficientes pour la PARP-1 [447-449]. L'une d'entre elles démontre que 3,5% du transcriptome est perturbé par l'absence de la PARP-1 et que 60 à 70% des transcrits touchés sont sous-régulés [447]. La PARP-1 serait donc généralement un co-régulateur positif de la transcription. Les gènes régulés par la PARP-1 sont variés : ils sont impliqués dans le métabolisme, la réponse au stress, la transduction de signaux, le cycle cellulaire et la transcription [447]. Cependant, la PARP-1 n'est pas essentielle à leur expression comme le prouve le fait que la déficience de l'expression de cette enzyme est viable chez la souris [450].

De très nombreuses études ont montré que la PARP-1 co-régule spécifiquement certains gènes en interagissant avec des facteurs de transcription ou d'autres co-régulateurs (Figure 43). Nous pouvons citer l'interaction avec NF-kB, divers récepteurs nucléaires, B-Myb, Oct-1, Sp1, AP-2 ou encore des membres de la famille Ets, Erg et Ets-1 [334, 354, 377, 445, 451-456]. Dans la plupart des cas, l'activité catalytique de la PARP-1 n'est pas requise pour activer la transcription [334]. Lorsqu'elle intervient, la PARylation des facteurs de transcription a généralement pour but la dissociation des complexes transcriptionnels [354, 454]. Ce processus d'association/dissociation ressemble fortement à l'action de la PARP-1 au sein des mécanismes de réparation de l'ADN et a pour rôle d'empêcher que la transcription reste active trop longtemps, ce qui permet une régulation plus fine de l'expression des gènes.

D'autres protéines de réparation de l'ADN se retrouvent également lors de ces mécanismes de transcription dépendants de la PARP-1. Le plus fréquemment retrouvé est le complexe DNA-PK. C'est le cas pour la régulation de certains gènes cibles des facteurs de transcription USF1 (« *upstream stimulatory factor 1* »), Zic2, Erg, Ese-1 et des récepteurs nucléaires [453, 455-458].

Nous pouvons nous demander quel est le rôle d'enzymes de réparation de l'ADN dans ces mécanismes de transcription. De très nombreux modèles ont tenté de l'expliquer. Le plus souvent décrit est celui de NF- κ B. Dans ce modèle, la PARP-1 sert de plateforme de recrutement pour divers facteurs généraux de la transcription comme le complexe « Médiateur » ou CBP/p300 [375, 376].

Un autre modèle, celui des récepteurs nucléaires, est des plus surprenants. En 2006, l'équipe de Michael Rosenfeld a publié dans la revue *Science*, ce qui reste, encore aujourd'hui, le modèle le plus abouti de régulation transcriptionnelle comprenant la PARP-1 et le complexe DNA-PK [455]. Dans cette étude, les auteurs ont démontré que la PARP-1 était recrutée par le récepteur aux œstrogènes, ER- α , via la protéine adaptatrice ASC-2 (« *activating signal cointegrator-2* »). La PARP-1 apporte avec elle la Topoisomérase II β (TopoII β) et le complexe DNA-PK, chacune de ces enzymes tient un rôle bien précis : (1) la PARP-1 provoque la décompaction de la chromatine au niveau du promoteur cible et remplace l'histone H1 par HMGB1 (voir §I-2), (2) la TopoII β engendre un clivage dans la séquence du promoteur afin de faciliter cette décompaction, (3) le complexe DNA-PK permet la réparation de la cassure double-brin due à la TopoII β , et (4) le complexe est dissocié, probablement grâce à l'activité de PARylation de la PARP-1 [455]. Cela permet finalement, le recrutement d'autres co-régulateurs de l'ER- α et la transcription des gènes cibles [455].

D'autres études seront nécessaires pour élucider le rôle de la PARP-1 dans la transcription, car il est possible que sa modalité d'action en tant que co-régulateur varie, selon les promoteurs ciblés, et qu'il n'existe donc pas de règle générale [334].

I-4/ Stress génotoxique, métabolique et autres

La PARP-1 est un véritable senseur du stress cellulaire. Elle peut intégrer différents stress de diverses origines et enclencher une réponse adaptée qui permettra une prise de décision quant au devenir cellulaire. Cette activité de senseur peut se définir par l'intensité de son activité de PARylation (Figure 44). Plus un stress est puissant, plus la quantité de PAR

augmente et met en jeu la survie de la cellule (Figure 44). Cependant, les PAR ne sont pas que des messagers de mort cellulaire. En quantité modérée, ils sont essentiels à la réparation correcte de l'ADN et impliqués dans divers processus de prolifération cellulaire (Figure 44). Le sujet de ce paragraphe sera d'aborder les différents stress qui peuvent activer la PARP-1. Cela nous permettra ensuite de voir comment la PARP-1 intègre ces stress pour contrôler les processus de division, de sénescence ou de mort cellulaire.

La PARP-1 est tout d'abord connue pour répondre aux stress génotoxiques. Ceci est particulièrement bien illustré par le phénotype des souris déficientes pour la PARP-1 qui présentent une hypersensibilité aux stress génotoxiques [459]. Ils sont dus à la production de ROS (NO^\bullet , O_2^\bullet , H_2O_2 ...) qui peuvent être d'origine biologique ou exogène (radiothérapie ou chimiothérapie). Lors de la migration, de l'invasion cellulaire ou pendant l'inflammation, les cellules produisent des ROS en grande quantité afin de stimuler certains programmes d'expression génique spécifiques de ces processus. Cependant, cela provoque également un fort stress génotoxique car ces molécules endommagent l'ADN et engendrent des altérations des bases ou des cassures. Ce sont ces lésions qui activent la PARP-1 afin de favoriser la réparation de l'ADN [301]. Ainsi, l'activation de la PARP-1 est proportionnelle à l'ampleur des dommages d'où son rôle de senseur. De la même façon, la PARP-1 est activée par des lésions d'origine exogène dues à la radiothérapie ou la chimiothérapie ciblant l'ADN par des agents alkylants (cisplatine, temozolomide par exemple).

En dehors de la réparation de l'ADN, la réponse aux stress génotoxiques se traduit également au niveau transcriptionnel. Lors de l'inflammation, la PARP-1 coopère avec le facteur de transcription NF- κ B pour activer des programmes d'expression génique spécifiques. Cependant, ces programmes sont pro-inflammatoires [460]. En effet, ces gènes codent pour des cytokines pro-inflammatoires et des protéines impliquées dans la production de ROS (NO^\bullet , H_2O_2) [301, 460]. Cette inflammation peut aider le système immunitaire à éliminer les cellules trop endommagées.

En outre, la PARP-1 joue un rôle dans la réponse à de multiples stress. Elle réagit ainsi au stress métabolique, si l'activité des mitochondries est trop élevée, mais également au stress oncogénique (voir §I-6). La PARP-1 est donc un véritable rhéostat cellulaire (Figure 44).

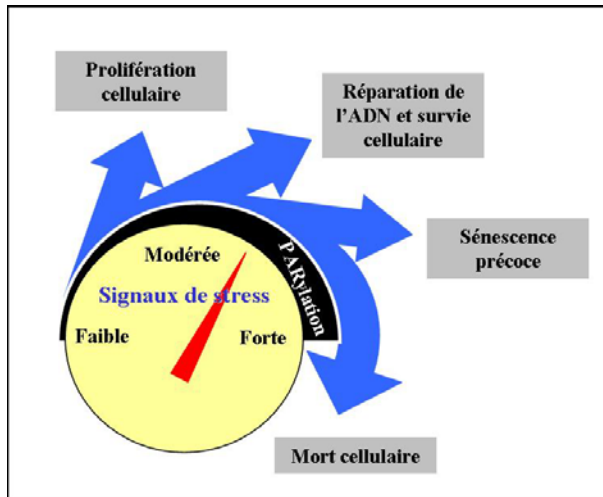


Figure 44 : Fonctions de la PARP-1 comme rhéostat cellulaire.

PARP-1 promeut différentes réponses cellulaires à divers types de stress selon leur amplitude. Plus le niveau de stress augmente, plus la PARP-1 s'active et synthétise des PAR qui sont responsables du devenir cellulaire. D'après [316].

I-5/ Division cellulaire

La PARP-1 participe au contrôle du cycle et de la prolifération cellulaire. Ceci est lié d'une part à son rôle dans la réparation de l'ADN (voir §I-1) et d'autre part à son intervention dans la réplication lors de la phase S du cycle cellulaire (voir §I-1-2). Ces aspects ne seront pas redéveloppés ici.

De plus, la PARP-1 est impliquée dans la division cellulaire. En effet, les PARP-1, -2, -3, -4 et les tankyrases sont associées avec divers composants de l'appareil mitotique lors de la mitose [300]. Plus spécifiquement, la PARP-1 est localisée au niveau des centromères, sites d'assemblage des kinétochores qui permettent la ségrégation des chromosomes lors de la mitose [461]. Ceci sous-entend qu'elle pourrait jouer un rôle important dans la division cellulaire [299]. D'ailleurs, la concentration cellulaire en PAR augmente lors de la métaphase et de l'anaphase [462]. Ces PAR servent à l'assemblage et à la stabilisation du fuseau mitotique [463].

I-6/ Sénescence et vieillissement

Il faut distinguer ici deux formes de sénescence : (1) la sénescence précoce qui est induite par un fort stress cellulaire généralement généré par l'action d'une oncoprotéine, et qui est un mécanisme de protection contre la cancérisation, et (2) la sénescence répllicative qui correspond au vieillissement de la cellule et à un arrêt de son activité métabolique.

La sénescence précoce est généralement due à l'action non contrôlée d'oncoprotéines. Le meilleur exemple en est l'activation constitutive et prolongée de la voie Ras-MAPK qui va actionner la sénescence *via* le suppresseur de tumeur p53. Ce processus permet de lutter contre la cancérisation d'une cellule en la plongeant dans une forme de stase irréversible. La PARP-1 participe à la sénescence précoce en tant que senseur de stress. Le stress oncogénique l'active et lui permet de réguler par PARylation des facteurs essentiels de la sénescence, comme p53 qui est stabilisé et relocalisé dans le noyau où il peut pleinement agir afin de bloquer la prolifération cellulaire [317]. De plus, l'activité de la PARP-1 enclenche également un programme d'expression de gènes, en collaboration avec le facteur NF- κ B, qui codent pour des protéines secrétées impliquées dans l'inflammation [464]. Ce secrétome pro-inflammatoire est dangereux car, bien qu'associé à la sénescence, il a des propriétés pro-tumorales [464]. L'activation de la PARP-1 peut donc constituer une voie d'échappement à la sénescence pour les cellules cancéreuses si des voies de régulation comme celle de p53 sont défectueuses.

La sénescence répliquative, elle, est due à la baisse d'activité générale du métabolisme de la cellule. Elle correspond au vieillissement d'une cellule au fur et à mesure des divisions cellulaires et à la dégradation de son patrimoine génétique notamment par la diminution de la longueur des télomères de ses chromosomes. Comme nombre d'autres protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire, la PARP-1 connaît une diminution de son expression et de son activité de PARylation lors du vieillissement de la cellule [344, 465].

Cette baisse d'expression et d'activité se retrouve également lors du vieillissement de l'organisme. En effet, une baisse de l'activité de la PARP-1 est observée lors du vieillissement des organismes et cela du nématode aux mammifères [345, 465]. De plus, une activité de PARylation prolongée est liée à une augmentation de la durée de vie [466]. Au niveau moléculaire, plusieurs travaux ont démontré une coopération fonctionnelle entre la PARP-1 et l'hélicase WRN (Werner) lors de la réplication de l'ADN et du maintien de l'intégrité du génome [467, 468]. Il est intéressant de noter que la mutation du gène codant pour WRN est responsable d'une maladie génétique provoquant un vieillissement précoce chez l'Homme, appelé syndrome de Werner [469]. En outre, la PARP-1 est aussi impliquée dans le maintien de la longueur des télomères [307].

La diminution de l'expression et de l'activité de la PARP-1 offre donc un lien moléculaire entre la sénescence répliquative des cellules et le vieillissement global de l'organisme.

I-7/ Mort cellulaire

L'excès de PARylation peut aboutir, dans les cas les plus extrêmes, à l'enclenchement de la mort cellulaire programmée (Figure 44). Elle peut être apoptotique, autophagique ou encore nécrotique comme la *Parthanatos*.

Ces morts cellulaires programmées diffèrent de la nécrose accidentelle par (1) l'actionnement de voies de signalisation spécifiques, et (2) un contrôle du fractionnement des compartiments cellulaires lors de la désintégration de la cellule, afin d'éviter que le contenu cellulaire se diffuse dans la MEC et provoque une inflammation du tissu environnant.

I-7-1/ Apoptose

Une cellule stressée de façon prolongée doit être éliminée pour éviter sa cancérisation ou sa nécrose accidentelle. Cette élimination se fait généralement par un processus d'apoptose. La PARP-1 étant un senseur de stress cellulaires, elle participe à ce processus. Tout comme lors de la sénescence précoce, la PARP-1 favorise l'activité du suppresseur de tumeur p53 en le PARylant (voir §I-6) [316, 317]. C'est p53 qui va par son activité de facteur de transcription soit engendrer la sénescence, soit, si la cellule est trop endommagée, provoquer l'apoptose. Pour cela, p53 active l'expression de la protéine pro-apoptotique BAK (« *Bcl-2* homologous *antagonist killer* ») et réprime la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Ceci aboutit à une prise de décision irréversible de rentrer en apoptose et à l'activation des caspases [301]. La PARP-1 ne participe donc pas à cette prise de décision mais fait le relais entre le stress cellulaire et l'activation de p53.

A partir de la prise de décision d'entrer en apoptose, la PARP-1 doit être clivée par la caspase-3 pour deux raisons : (1) bloquer toute activité résiduelle de réparation de l'ADN puisque l'ADN est fragmenté lors de l'apoptose [470], et (2) empêcher la consommation de tout le NAD⁺ car le processus d'apoptose a besoin d'énergie pour aboutir.

I-7-2/ Autophagie

L'autophagie est une mort cellulaire programmée qui se caractérise par la dégradation des différents organites cellulaires, notamment des mitochondries, par les lysosomes. Concrètement, ce processus peut être décrit comme une « autodigestion » de la cellule [470].

L'événement clef de l'autophagie est l'inactivation de la kinase mTOR (« *mammalian target of rapamycin* ») par la kinase AMPK (5' *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) lorsque les réserves d'énergie cellulaire sont basses.[471]. Lors d'un stress, la PARP-1 diminue les réserves d'énergie en consommant une partie du NAD⁺. Il en résulte une activation de l'AMPK qui réprime mTOR ce qui aboutit finalement à l'enclenchement du processus d'autophagie [471]. L'inhibition catalytique de la PARP-1 réduit donc significativement la capacité des cellules à mourir par autophagie [471].

I-7-3/ La mort cellulaire dépendante de la PARP-1 : La *Parthanatos*

La *Parthanatos* est une forme de nécrose programmée récemment mise en évidence [470, 472]. Le nom *Parthanatos* vient du terme PAR qui sont les effecteurs de ce processus et de *Thanatos* personnifiant la mort dans la mythologie grecque, équivalent de la *Grande Faucheuse* dans notre folklore moderne [470, 472]. Cette mort cellulaire ne se rencontre que chez des cellules qui se divisent peu, appelées aussi post-mitotiques, comme les neurones ou les cellules cardiaques.

Les cellules post-mitotiques contiennent moins d'énergie que les cellules en prolifération. L'activation prolongée de la PARP-1, due à un fort stress, peut donc conduire à la consommation totale du NAD⁺ chez ces cellules post-mitotiques. Sans énergie, la cellule ne peut ni entrer en apoptose, ni entrer en autophagie, elle doit donc s'engager dans un autre processus de mort cellulaire, la *Parthanatos*. La consommation totale du NAD⁺ permet la production de très nombreux PAR. La majorité de ces PAR est greffée sur la PARP-1 ou sur d'autres protéines. Cependant, cette abondance de PAR stimule aussi l'activité endoglycohydrolytique de la PARG qui libère ainsi des PAR libres (voir chapitre III §II-3). Ceux-ci diffusent hors du noyau et se fixent sur les mitochondries [392, 473]. Ils permettent ainsi le relargage du facteur pro-apoptotique AIF qui va se transloquer dans le noyau et provoquer la condensation et la fragmentation de l'ADN. Cela permet d'aboutir à une mort cellulaire qui partage des caractéristiques avec l'apoptose, du fait de l'action de l'AIF, mais qui est indépendante des caspases et très peu coûteuse en énergie [470].

Pourtant, la *Parthanatos* est considérée comme une nécrose car il y a une perte d'intégrité de la membrane plasmique [470]. Néanmoins, l'action de l'AIF a permis d'empêcher la désintégration totale de la cellule et donc l'inflammation du tissu environnant.

II/ Rôles physiologiques de la PARP-1

II-1/ Développement embryonnaire

II-1-1/ Différenciation des cellules souches

Les cellules souches embryonnaires issues des souris transgéniques déficientes pour la PARP-1 présentent une altération de 10% de leur transcriptome alors qu'elle n'est que de 3% une fois la souris adulte [447]. Ceci suggère un rôle de la PARP-1 dans l'expression génique lors du développement embryonnaire. Très peu d'informations sont disponibles sur son action. Cependant, des travaux ont montré que la PARP-1 permettrait la différenciation des cellules souches en empêchant la liaison à l'ADN du facteur de transcription Sox2 [474]. En effet, ce facteur inhibe l'expression du facteur de croissance FGF4 qui promeut la différenciation. La PARP-1 PARyle Sox2 qui se dissocie du promoteur de *fgf4* et est dégradé, permettant ainsi l'expression du FGF4 et la différenciation des cellules souches [474]. Très récemment, une étude a démontré que le couple Sox2/PARP-1 régulaient de la même façon tout un ensemble de gènes impliqués dans la pluripotence des cellules [475].

II-1-2/ Différenciation des tissus

Plus tardivement dans le développement embryonnaire, la PARP-1 est impliquée dans la différenciation de certains tissus. Elle promeut la différenciation : (1) des neurones en régulant le facteur de transcription HES1 (« *hairy and enhancer of split-1* ») [445], (2) des lymphocytes B [476], (3) des cellules de l'endoderme pariétal en réponse à l'acide rétinoïque [477] et (4) des adipocytes [478]. Par contre, la PARP-1 réprime la différenciation des lymphocytes T en régulateur (CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺) [479]. Ces phénomènes sont principalement liés à son activité de co-régulateur transcriptionnel et restent bien souvent des cas particuliers. D'autres études seront nécessaires pour déterminer le rôle exact que la PARP-1 joue dans la différenciation cellulaire.

II-2/ Métabolisme

Le rôle de la PARP-1 dans le métabolisme est indissociable de celui de la PARP-2. En effet, les embryons murins, ne possédant ni la PARP-1 ni la PARP-2, meurent pendant la gastrulation [361, 480]. Ceci a permis de montrer l'importance de la PARylation pour le

développement embryonnaire puisque, à elle deux, ces enzymes sont responsables de la quasi-totalité des PAR dans la cellule [480]. La caractérisation du phénotype de ces embryons, n'exprimant ni la PARP-1 ni la PARP-2, a permis de mettre en évidence une grave déficience des mécanismes de réparation de l'ADN comme attendu [361], mais aussi de graves défauts au niveau du métabolisme cellulaire dus à un excès de NAD⁺ [481, 482].

Prise individuellement la déficience pour l'expression de la PARP-1 ou de la PARP-2 n'a pas de conséquences dramatiques chez la souris. Néanmoins, les souris adultes déficientes pour l'expression d'une de ces deux enzymes montrent une perturbation de leur habitude alimentaire et de leur métabolisme [483]. Des travaux ont montré que ces souris étaient intolérantes au régime riche en glucose et en graisse [478, 482]. Par contre, elles sont résistantes au développement du diabète lorsqu'il est induit par la streptozotocine [484]. Ces souris montrent en fait un métabolisme très rapide dû à un excès d'énergie cellulaire [485]. A l'inverse, les souris surexprimant la PARP-1 humaine de façon ectopique ont une prédisposition à l'obésité et un métabolisme lent [485].

III/ Rôles pathologiques de la PARP-1

III-1/ Cancers

III-1-1/ Expression et activité associées aux cancers

Du fait de son statut de gardien du génome, la PARP-1 fut d'abord considérée à l'instar de p53 comme un suppresseur de tumeurs. Il était avancé que la perte de son expression ou de son activité pouvait participer à la cancérisation. Pourtant, les souris transgéniques déficientes pour la PARP-1 ne montrent aucun développement spontané de tumeurs. Par contre, elles sont plus sensibles aux agents alkylants qui engendrent chez ces souris des cancers du foie et du colon [299, 486]. Le développement spontané de tumeurs s'observe si la déplétion du gène *parp-1* est combinée à une déficience pour : (1) le complexe DNA-PK, qui est muté chez les souris SCID (« *severe combined immuno-deficiency* ») [487], ou (2) le suppresseur de tumeur p53 [488]. En outre, certains polymorphismes (SNP « *single nucleotide polymorphism* ») du gène *parp-1* qui sont associés à une activité réduite de l'enzyme, corrélerent avec une augmentation du risque de développer des cancers de la prostate, de l'œsophage, des poumons ou de la glande thyroïde [489].

Néanmoins, une fois la tumeur développée, l'expression de la PARP-1 a plutôt tendance à être accrue. En effet, la PARP-1 voit son expression augmenter dans les cancers du

sein [490-492], du foie [493], du colon [494] et dans les mélanomes [495]. Des travaux ont également montré que le taux de PARylation était plus élevé dans les tissus cancéreux [489].

Nous pouvons donc supposer que la cellule cancéreuse peut détourner l'activité de la PARP-1 en faveur de la réparation des dommages à l'ADN, et ceci en inactivant les processus de morts cellulaires programmées qui sont associés à cette enzyme.

III-1-2/ Utilisation clinique des inhibiteurs de la PARP-1

III-1-2-1/ En complément d'une radiothérapie ou d'une chimiothérapie

Les cellules tumorales accumulent de très nombreux dommages à l'ADN lors de la cancérisation et de la progression tumorale. La PARP-1 est utilisée par ces cellules afin de réparer ces dommages. De ce fait, l'inhibition pharmacologique de la PARP-1 s'est rapidement imposée comme une stratégie prometteuse pour contrer la progression tumorale.

Néanmoins, l'utilisation de ces inhibiteurs comme unique agent en thérapie anticancéreuse n'est efficace que dans des cas très particuliers (voir §III-1-2-2). Ils sont, le plus souvent, utilisés en combinaison avec un traitement de radiothérapie ou une chimiothérapie ciblant l'ADN.

Le but est de provoquer des dommages simple-brin dans l'ADN qui du fait de l'inhibition de la PARP-1 ne pourront être réparés. Lors de la réplication de l'ADN pendant la phase S, ces dommages seront convertis en cassures double-brin qui sont extrêmement toxiques pour la cellule. Si l'ADN de la cellule cancéreuse est trop endommagé, elle ne passera pas l'étape de mitose [403].

Il est très important de signaler ici que la protéine PARP-1 doit être présente au niveau des cassures. En effet, des travaux ont été menés pour savoir si les cellules cancéreuses étaient plus sensibles à l'irradiation lorsque la PARP-1 était inhibée ou lorsque son expression était supprimée. Les résultats démontrent que si la protéine PARP-1 est absente, une voie de réparation alternative par BER (par longue brèche, Figure 40) se met en place et que les dommages causés par l'irradiation sont réparés [399]. Il vaut mieux donc inhiber pharmacologiquement la PARP-1 que chercher à diminuer son expression.

De très nombreux essais cliniques concernant l'utilisation d'inhibiteurs de la PARP-1 sont en cours actuellement dans le monde, plus de 80 uniquement sur le territoire des Etats-Unis [302]. En 2010, on pouvait déjà trouver diverses stratégies de combinaison des inhibiteurs de la PARP-1 avec des agents de chimiothérapie comme par exemple des agents alkylants (Temozolomide, Cisplatine, Carboplatine, Cyclophosphamide), des poisons du

fuseau mitotique (Paclitaxel), des antimétabolites (Gemcitabine) et des inhibiteurs des topoisomérasés (Topotécan) [403]. La réussite et les échecs de cette stratégie seront abordés §III-1-3.

III-1-2-2/ Stratégie de la létalité synthétique

III-1-2-2-a/ Définition

La létalité synthétique, telle qu'elle fut définie par le généticien Theodosius Dobzhansky en 1946, est un phénomène où deux mutations génétiques, non létales séparément, le deviennent si elles sont combinées. Cela est possible entre gènes impliqués dans une même voie de signalisation ou dans deux voies différentes mais fonctionnellement reliées [403]. Cette stratégie fut très utilisée lors d'études génétiques, elle le fut très peu en pharmacologie. L'utilisation d'inhibiteurs de la PARP-1 fut une occasion d'éprouver cette stratégie en thérapie anticancéreuse [403].

III-1-2-2-b/ Mutations BRCA1/BRCA2

Les gènes *brca1* et *brca2* codent pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN par RH (voir §I-1-2). Une mutation de l'un de ces gènes, même de façon hétérozygote, augmente de plus de 60% le risque de développer un cancer du sein, de 10 à 50% un cancer des ovaires [403].

Des travaux expérimentaux ont permis de démontrer que les cellules déficientes pour BRCA1 ou BRCA2 ne survivaient pas à l'inhibition de la PARP-1 et que ceci est dû à l'incapacité de ces cellules à réparer les dommages à l'ADN survenus lors de la phase S du cycle cellulaire (voir §I-1-2) [414, 496]. A partir de ces résultats, des essais cliniques ont été lancés chez des patients souffrant de cancers avancés porteurs de mutations BRCA1/2 [403]. L'inhibiteur de la PARP-1 le plus utilisé fut l'Olaparib en raison de sa forte efficacité. Les résultats de ces essais furent très encourageants en phases I et II pour des cancers du sein, des ovaires et de la prostate. Les résultats de phase II indiquent une diminution significative et prolongée de la progression tumorale uniquement chez les patients porteurs de mutations BRCA1/2. D'autres études sont en cours avec d'autres inhibiteurs comme l'Iniparib et le Veliparib.

III-1-2-2-c/ Autres cibles potentielles

Au vu de l'interconnexion complexe qui existe entre les différentes voies de réparation de l'ADN, la stratégie de létalité synthétique peut théoriquement s'étendre à toute protéine majeure impliquée dans l'une de ces voies. Ainsi, la mutation d'autres intervenants de la RH pourrait constituer une sensibilité à l'inhibition de la PARP-1. C'est le cas notamment du complexe MRN (Mre11/ Rad50/Nibrin), dont la mutation sur le gène *mre11* se retrouve au sein de carcinome de l'endomètre et de la prostate [403]. La létalité synthétique de cette mutation en combinaison à l'inhibition de la PARP-1 est d'ores et déjà démontrée expérimentalement et est actuellement testée en essais cliniques [403]. Les mutations de kinases de la famille PI3K (PI3K, DNA-PK, ATM (« *ataxia telangiectasia mutated* ») et ATR (« *ataxia telangesia and Rad3-related* ») sont également envisagées [403, 497, 498] ainsi que d'autres protéines qui régulent leur voie de signalisation (PTEN « *phosphatase and tensin homolog* », Akt ...) au vu de leur implication dans la réparation de cassures double-brin [403, 498]. Néanmoins, il est nécessaire que des mutations altérant l'expression des gènes codant pour ces protéines se retrouvent fréquemment au sein de tumeurs de patients pour que cette stratégie ait un intérêt thérapeutique.

III-1-2-3/ Biomarqueurs de sensibilité aux inhibiteurs de la PARP-1

III-1-2-3-a/ Définition

Nous définissons ici par biomarqueurs de sensibilité, des protéines qui sont exprimées spécifiquement dans les cancers et dont l'expression est un marqueur de bonne réponse à un traitement pharmacologique, dans notre cas à l'utilisation d'inhibiteurs de la PARP-1.

III-1-2-3-b/ Les protéines de fusion Ets

Comme nous l'avons vu dans la partie consacrée à Ets-1, les membres de la famille Ets peuvent être impliqués dans des translocations donnant naissance à des protéines de fusion au fort pouvoir oncogénique. C'est le cas de TMPRSS2-Erg dans le cancer de la prostate et d'EWS-Fli-1 et EWS-Erg dans le sarcome d'Ewing. De très récents travaux effectués par l'équipe d'Arul Chinnaiyan, ont montré que les cellules exprimant ces protéines de fusion étaient très sensibles à l'inhibition de la PARP-1 [453, 499]. En effet, les inhibiteurs de la PARP-1 répriment les capacités d'invasion, d'intravasation, de tumorigénicité et le pouvoir

métastatique des cellules exprimant ces protéines de fusion [453, 499]. De plus, les auteurs montrent que, sous inhibition de la PARP-1, ces cellules accumulent un nombre important de dommages à l'ADN sous forme de cassures double-brin, phénomène non-observable en absence d'Erg ou de Fli-1 (protéine fusion ou native). Néanmoins, ces travaux n'apportent pas de réponse sur le lien entre l'activité des protéines de fusion Ets, l'inhibition de la PARP-1 et l'accumulation des dommages [453, 499].

Très récemment, une étude a montré que l'expression d'Ets-1 sensibilisait les cellules tumorales aux inhibiteurs de la PARP-1 en réprimant l'expression de BRCA1 et de BRCA2 [497]. Cette accumulation de dommages pourrait être due à un défaut de RH lors de la phase S.

La corrélation entre l'expression des membres de la famille Ets et la sensibilité aux inhibiteurs de la PARP-1 semble forte. En effet, une étude, publiée dans la revue *Nature* en 2012, a testé 130 drogues utilisées en thérapie clinique sur plusieurs centaines de lignées cellulaires à la recherche de nouveaux biomarqueurs de sensibilité. L'une des corrélations les plus significatives ressortie de cette étude, fut la sensibilisation aux inhibiteurs de la PARP-1 par l'expression de la protéine de fusion EWS-Fli-1 [500].

Des études complémentaires seront nécessaires afin d'éclaircir le lien fonctionnel qui existe entre les membres de la famille Ets et la PARP-1.

III-1-3/ Réussites, échecs et perspectives

Comme nous l'avons vu, plusieurs inhibiteurs de la PARP-1 ont passé avec succès les phases I et II d'essais cliniques dans les cancers porteurs de mutations BRCA1/2 dont l'Iniparib et l'Olaparib. Néanmoins, leur utilisation a connu un sérieux contrecoup en début d'année 2012. En effet, il fut annoncé que l'Iniparib avait échoué en phase III d'essai clinique pour des cancers du sein [501]. Des travaux menés à la suite de cet échec ont montré que cette molécule était de façon surprenante incapable d'inhiber efficacement la PARylation *in vitro* [502]. Ultérieurement, il fut révélé que l'Iniparib, faute d'inhiber l'activité catalytique, empêchait la liaison de la PARP-1 aux cassures de l'ADN [503]. Or, nous avons vu qu'il fallait que la PARP-1 se lie aux cassures afin de sensibiliser les cellules cancéreuses à la radiothérapie (voir §III-1-2-1) [399].

En outre, une étude a démontré que la plupart des inhibiteurs de la PARP-1 utilisés en clinique étaient peu spécifiques vis-à-vis des autres PARP [395]. Or, les conséquences d'une

inhibition d'autres PARP comme notamment les Tankyrases sur la santé du patient sont inconnues.

Parallèlement, l'Olaparib a connu un échec en phase II dans les cancers de l'ovaire. Pourtant, il n'y a aucun doute sur le fait que l'Olaparib est un inhibiteur *bona fide* de la PARP-1 [501]. Les raisons de cet échec sont encore sous investigation mais il semble qu'il s'agisse d'un problème de sélection des patients. Lorsque ces essais cliniques ont été entrepris, il a été supposé que toutes les tumeurs pouvaient être affectées par l'inhibition de la PARP-1. Or, nous savons aujourd'hui que la réponse au traitement dépend fortement du génotype de la tumeur (voir §III-1-2-2 et §III-1-2-3).

C'est pourquoi, il est devenu essentiel de déterminer des biomarqueurs de sensibilité efficaces aux inhibiteurs de la PARP-1.

III-2/ Pathologies inflammatoires

La suractivation de la PARP-1 générée par la production de radicaux libres peut déclencher la nécrose de cellules comme les neurones, les cellules cardiaques ou les cellules endothéliales, ce qui engendre une inflammation des tissus environnants [504].

Cette inflammation a été démontré comme néfaste dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension, l'athérosclérose, la pré-éclampsie et le vieillissement vasculaire [504]. Au niveau du cerveau, la PARP-1 est en partie responsable de la mort neuronale lors d'accidents vasculaires cérébraux ou d'ischémies. L'utilisation d'inhibiteurs dans ces pathologies permet la survie des cellules et une diminution des symptômes chez la souris ou le rat [504, 505].

L'inflammation et ses médiateurs, tels les cytokines et les radicaux libres, jouent également un rôle fondamental dans les dommages articulaires causés par la polyarthrite rhumatoïde [506]. Les inhibiteurs de la PARP-1 ont prouvé leur capacité à diminuer cette inflammation dans un modèle expérimental murin d'arthrite [507]. Ils provoquent la diminution des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-1 β et IL-12) et augmentent la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 [507].

L'exposé des rôles biologiques de la PARP-1 montre l'importance de cette enzyme dans les processus cellulaires. Nous avons pu voir également comment l'activité de cette

protéine pourtant considérée comme un gardien du génome peut être détournée au profit de la cancérisation et de l'inflammation pathologique.

L'utilisation d'inhibiteurs de la PARP-1 permet de contrôler la progression de certaines de ces maladies. Néanmoins, nous avons vu que certains de ces inhibiteurs étaient sujets à controverse. Afin de déterminer l'efficacité réelle de ces molécules notamment dans les cancers, il est essentiel de mettre en évidence des biomarqueurs de sensibilité qui garantiront une réponse au traitement.

Contexte et sujet de Thèse

Contexte et sujet de Thèse

Comme illustré dans la première partie de l'introduction, l'activité de l'oncoprotéine Ets-1 est finement régulée par divers mécanismes impliquant bien souvent des interactions protéine-protéine. En effet, Ets-1 n'agit pas seule au niveau de ses promoteurs cibles mais en coopération avec une variété de co-régulateurs transcriptionnels. De plus, ce facteur est ciblé par de nombreuses voies de transduction des signaux cellulaires. L'identification de nouveaux partenaires interagissant avec Ets-1 devrait donc nous permettre de mieux appréhender ses réseaux de régulation afin de mettre au point une stratégie de ciblage de son activité.

Dans ce but, nous avons, au sein de notre groupe, mis en œuvre un système de purification de partenaires basé sur la forte affinité entre la biotine et la streptavidine, appelé « *streptavidin pull-down* ». Nous avons utilisé des isoformes d'Ets-1 biotinylées [508], fixées par affinité sur des billes de streptavidine, afin de purifier les partenaires d'interaction de l'oncoprotéine contenus dans des extraits nucléaires de cellules cancéreuses. Cette stratégie a permis d'identifier deux enzymes de réparation de l'ADN, le complexe DNA-PK et la PARP-1 comme nouveaux partenaires potentiels d'Ets-1. Ces interactions ont été confirmées dans un contexte cellulaire et l'étude des liens fonctionnels entre le complexe DNA-PK et Ets-1 a donné lieu à une publication de notre équipe [138]. Lors de mon arrivée au sein de notre groupe, j'ai entrepris d'améliorer et de poursuivre l'identification de partenaires protéiques d'Ets-1. Les protéines caractérisées ainsi que l'avancée des travaux sera exposée dans la première partie de la section Résultats.

Mes travaux de Thèse furent également centrés sur la caractérisation du lien fonctionnel entre Ets-1 et l'enzyme PARP-1. Hormis le fait de l'avoir identifiée comme partenaire potentiel d'interaction d'Ets-1, peu d'informations dans la littérature, à cette époque, établissait une relation entre la PARP-1 et la famille Ets. Il était connu qu'Ets-1 et Fli-1 régulaient le promoteur du gène *parp-1* [355, 356]. De plus, cette enzyme avait été identifiée comme faisant partie d'un complexe transcriptionnel recruté par Ets-1, un membre de la famille Ets [456]. Enfin, des travaux parus en 2007 montraient que l'activité catalytique de la PARP-1 régulait indirectement Elk-1 en augmentant l'activité de la kinase Erk-2 [313].

Dans le cadre de cette Thèse, nous avons pu mettre à jour une partie des mécanismes complexes qui lient Ets-1 et la PARP-1. Parallèlement, d'autres travaux, publiés au cours de ma Thèse, ont permis d'affirmer nos résultats et de diriger la fin de notre étude vers une ouverture sur une possible stratégie de ciblage thérapeutique (voir Introduction, Partie PARP-1, Chapitre IV §III-1-2-3-b). Nos travaux ont débouché sur un article présenté dans ce mémoire qui a été publié dans le journal « PloS ONE ».

Enfin, nous avons entrepris de cartographier les domaines d'interaction entre Ets-1 et le complexe DNA-PK d'une part et entre Ets-1 et la PARP-1 d'autre part. Des observations faites au sein de notre groupe ont montré qu'Ets-1 est capable de stimuler l'activité catalytique de ces deux enzymes indépendamment de la présence d'ADN. Ce mode d'activation du complexe DNA-PK et de la PARP-1 par interaction protéine-protéine a déjà été observé mais est peu commun. De plus, les mécanismes moléculaires qui permettent ce phénomène n'ont jamais été caractérisés. C'est pourquoi, nous avons tenté d'expliquer l'activation du complexe DNA-PK et de la PARP-1 par Ets-1 en cartographiant les domaines impliqués dans ces interactions. De plus, cette étude nous permettra ultérieurement de déterminer la structure en trois dimensions de ces complexes ce qui devrait apporter de nombreuses informations sur la nature de ces interactions. Les résultats préliminaires de ces cartographies seront présentés dans la dernière partie de la section Résultats.

RESULTATS

Chapitre I : Identification de nouveaux partenaires protéiques de l'oncoprotéine Ets-1

I/ Préambule

Lors du début de mes travaux de Thèse, nous avons entrepris de poursuivre l'identification de partenaires protéiques d'Ets-1 par une technique de purification mise en œuvre par notre groupe précédemment, appelée « *streptavidin pull-down* ». Cette technique a permis d'identifier plusieurs nouveaux partenaires d'interaction d'Ets-1 que nous allons présenter lors de ce chapitre.

II/ Présentation du « *streptavidin pull-down* »

Dans cette étude, nous avons utilisé des protéines Ets-1 biotinylées [508] pour isoler par affinité *in vitro* de nouveaux partenaires protéiques, présents dans des extraits nucléaires de lignées cellulaires cancéreuses, grâce à la réaction streptavidine-biotine. Nous avons choisi d'utiliser la lignée cellulaire de carcinome mammaire invasif, MDA-MB-231, qui exprime de façon endogène les trois isoformes d'Ets-1, offrant ainsi un contexte cellulaire propice à la présence des principaux partenaires de l'oncoprotéine.

Afin de produire les protéines Ets-1 biotinylées, nous les avons étiquetées en leur partie N-terminale par un peptide biotinylable. Elles ont ensuite été produites chez la bactérie (*E. coli*) conjointement avec l'expression de la ligase *BirA* permettant la biotinylation du peptide [508]. Ces protéines Ets-1 sont également fusionnées à leur extrémité C-terminale avec une étiquette intéine/CBD (« *chitin binding domain* »). Ceci permet la purification des protéines Ets-1 sur des billes d'agarose/chitine par le CBD. L'intéine qui est une forme d'intron protéique permet, par l'utilisation d'un agent réducteur, le clivage de l'étiquette intéine/CBD et donc l'obtention de protéines Ets-1 biotinylées relativement pures et fonctionnelles [508]. Ce système s'inspire du système de production de protéines recombinantes natives « IMPACT™-T7 » de la société New England Biolabs® que nous avons adapté de façon à induire la biotinylation.

Pour la mise en œuvre du « *streptavidin pull-down* », ces protéines Ets-1 biotinylées sont immobilisées sur des billes de sépharose®/streptavidine (Figure 45). Des extraits nucléaires de cellules MDA-MB-231, préalablement épuisés sur des billes seules, sont ensuite incubés avec les billes chargées d'Ets-1 (Figure 45). Une fois les partenaires fixés,

les complexes sont élués par ébullition dans du tampon de Laemmli et leurs composants séparés sur gel par SDS-PAGE (« *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* »). Les bandes protéiques sont visualisées par une coloration au bleu de Coomassie® colloïdal (plus sensible que le Coomassie® classique). Ensuite, les bandes d'intérêt sont extraites du gel et analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (« *matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight* ») afin d'identifier les partenaires potentiels d'interaction par comparaison à des bases de données grâce au moteur de recherche *Mascot* (Figure 45). Le protocole du « *streptavidin pull-down* » est décrit plus en détails dans la publication exposée en chapitre II.

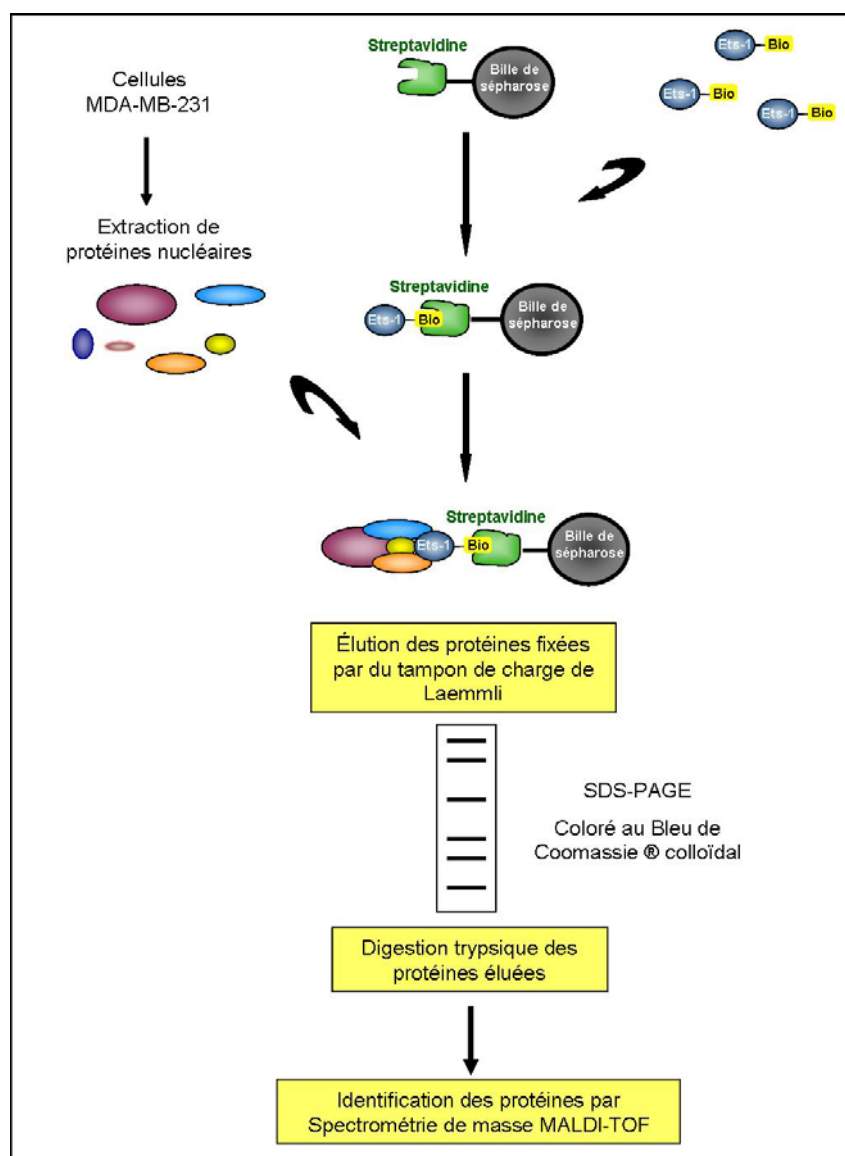


Figure 45 : Schéma de purification des partenaires d'Ets-1 par « streptavidin pull-down ».

Les différentes étapes de la purification par « streptavidin pull-down » sont présentées. Les protéines Ets-1 biotinylées sont indiquées Ets-1-bio.

III/ Résultats

Le « streptavidin pull-down » a permis d'identifier de nouveaux partenaires d'interaction potentiels d'Ets-1 visualisables par coloration au bleu de Coomassie® colloïdal (Figure 46). Leur identification par spectrométrie de masse est présentée en tableau 8.

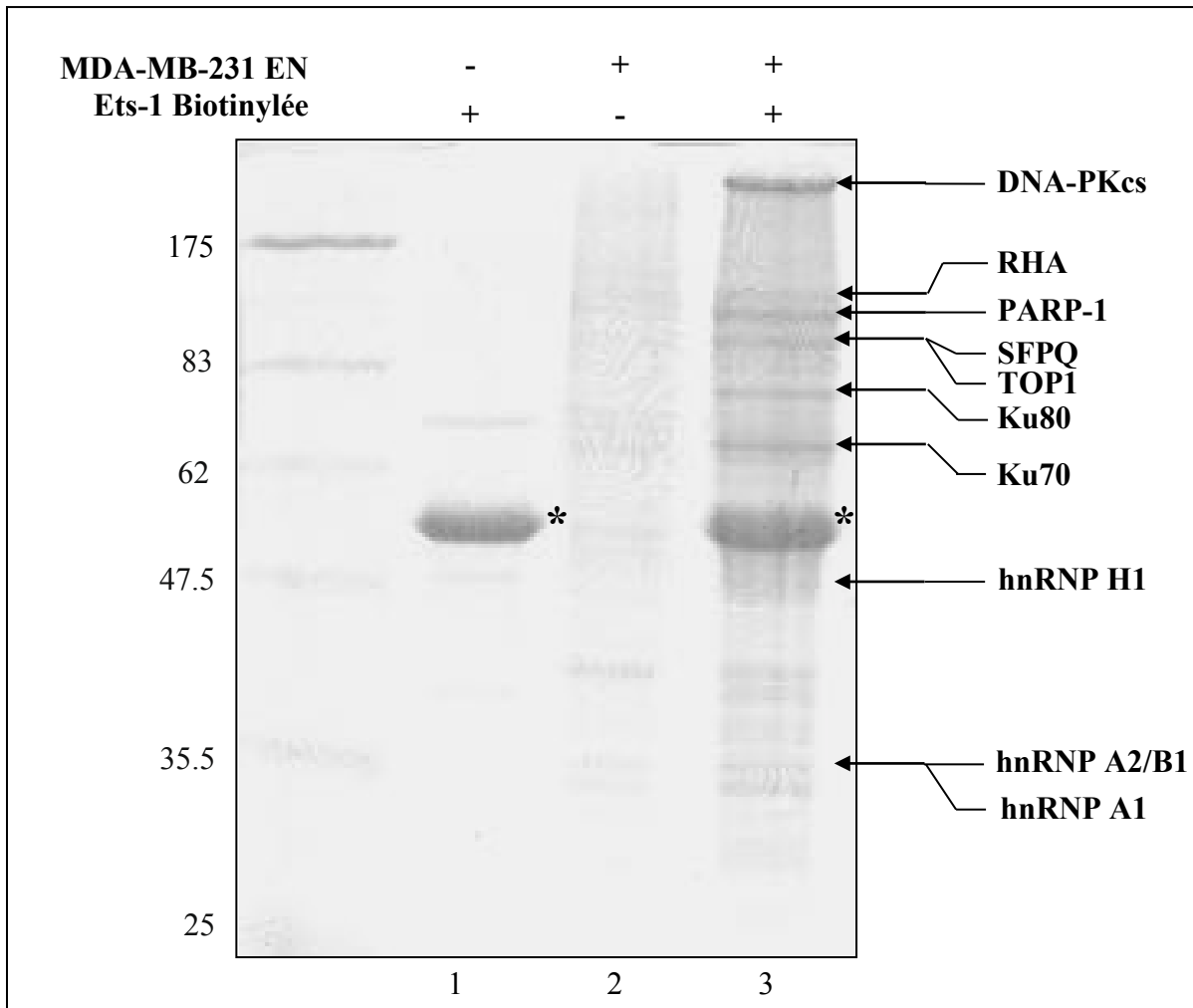


Figure 46 : Visualisation des partenaires d'interaction potentiels d'Ets-1, purifiés par « streptavidin pull-down », sur un gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie® colloïdal.

La coloration au bleu de Coomassie® colloïdal permet la visualisation des partenaires d'interaction potentiels d'Ets-1 issus d'extraits nucléaires (EN) de cellules MDA-MB-231. Les protéines Ets-1 biotinylées (*) utilisées pour le « pull-down » ont été chargées seules comme contrôle (condition 1). Les EN ont également été incubés avec les billes seules comme contrôle d'interactions non spécifiques entre des protéines nucléaires et les billes de sépharose®/streptavidine (condition 2). Les bandes indiquées par des flèches contiennent les protéines spécifiquement associées à Ets-1 et considérées comme partenaires d'interactions potentiels (condition 3).

En dehors de la PARP-1 et du complexe DNA-PK qui ont été décrit en introduction de ce manuscrit, ces nouveaux partenaires et leurs fonctions sont :

- l'ARN hélicase A ou RHA (« *RNA helicase A* »), qui est une enzyme liant l'ADN et l'ARN impliquée dans des mécanismes de régulation transcriptionnelle. Il a été montré qu'elle agissait comme intermédiaire entre des facteurs de transcription, des co-régulateurs tels que CBP/p300 et l'ARN polymérase II afin de favoriser la transcription de certains gènes.

- SFPQ (« *splicing factor, proline (P)- and glutamine (Q)-rich* »), qui est une protéine liant l'ARN impliquée dans des phénomènes de transcription, d'épissage alternatif et de réparation de cassures double-brin de l'ADN.

- l'ADN topoisomérase I (TOP1), qui est une enzyme nucléaire jouant un rôle catalytique et structural dans l'organisation chromatinienne,

- les hnRNP A1, A2/B1 et H1 (« *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein* »), qui sont des protéines favorisant la maturation et l'épissage alternatif des ARNm ainsi que leur export nucléo-cytoplasmique.

Protéine identifiée	Masse moléculaire (kDa)	Numéro d'accèsion ^a	Probabilité d'erreur ^b	Score ^c	Pourcentage de recouvrement ^d	Validation
DNA-PKcs	465	EAW86683	5,7.10-26	306	17	WB/IP
RHA	143	NP_001348	6,3.10-3	76	15	WB/IP
PARP-1	113	NP_001609	1,8.10-13	179	27	WB/IP
SFPQ	76*	NP_005057	5,9.10-4	86	30	WB/IP
TOP1	90	NP_003277	2,1.10-2	70	23	∅
Ku80	86	NP_066964	1,6.10-3	82	20	WB/IP
Ku70	70	NP_001460	7,1.10-11	155	29	WB/IP
hnRNP H1	49	NP_00551	4,4.10-5	97	32	En cours
hnRNP A2/B1	36	NP_002128	1,4.10-2	72	32	En cours
hnRNP A1	34	NP_002127	3,6.10-3	78	40	WB

Tableau 8 : Liste des nouveaux partenaires d'interaction potentiels d'Ets-1 identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Les nouveaux partenaires d'interaction potentiels d'Ets-1 identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF sont présentés par ordre de poids moléculaire apparent comme en Figure 46. * La protéine SFPQ a un poids moléculaire apparent de 95 kDa mais sa masse moléculaire théorique est de 76 kDa. ^a Numéro d'accèsion référencé par le NCBI, ^b probabilité d'erreur concernant l'identification de la protéine qui doit être la plus proche possible de 0, ^c le score est un indicateur de la qualité des résultats obtenus par la recherche dans le moteur *Mascot* (un bon score est supérieur à 70), ^d le pourcentage de recouvrement correspond au nombre de peptides de la protéine analysée recouvrant la séquence de la protéine identifiée par la banque. La validation de l'identification de ces protéines a été faite par la technique de « *Western blot* » (WB) en utilisant un anticorps

dirigé contre le partenaire puis par co-immunoprécipitation (IP) d'Ets-1 et des partenaires dans un contexte cellulaire. Ø correspond à un échec de la validation.

Une fois ces protéines identifiées par spectrométrie de masse, nous avons entrepris de valider leur présence au sein des protéines associées à Ets-1 lors du « *streptavidin pull-down* ». En effet, l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF ne prend pas en compte des séquences protéiques primaires mais des profils de tailles de peptides obtenus par digestion trypsique. Si ces profils sont spécifiques pour chaque protéine, il est possible qu'une mauvaise identification soit faite, notamment, si le score d'identification est faible (Tableau 8). Afin de valider la présence des partenaires, nous avons effectué des expériences de « *Western blot* » à l'aide d'anticorps spécifiques de chaque protéine (Figure 47). Les hnRNP A2/B1 et H1 n'ont pas été étudiées en raison de leur présence inconstante lors des identifications. Nous avons pu ainsi valider la présence des protéines RHA, SFPQ, hnRNP A1, de la PARP-1 et du complexe DNA-PK (Figure 47). Seule la TOP1 n'a pas pu être confirmée par « *Western blot* ». Cela peut être dû à la sensibilité des anticorps utilisés. Néanmoins, l'analyse par spectrométrie de masse avait déjà montré une forte probabilité d'erreur et un faible score d'identification ce qui explique peut-être cet échec (Tableau 8).

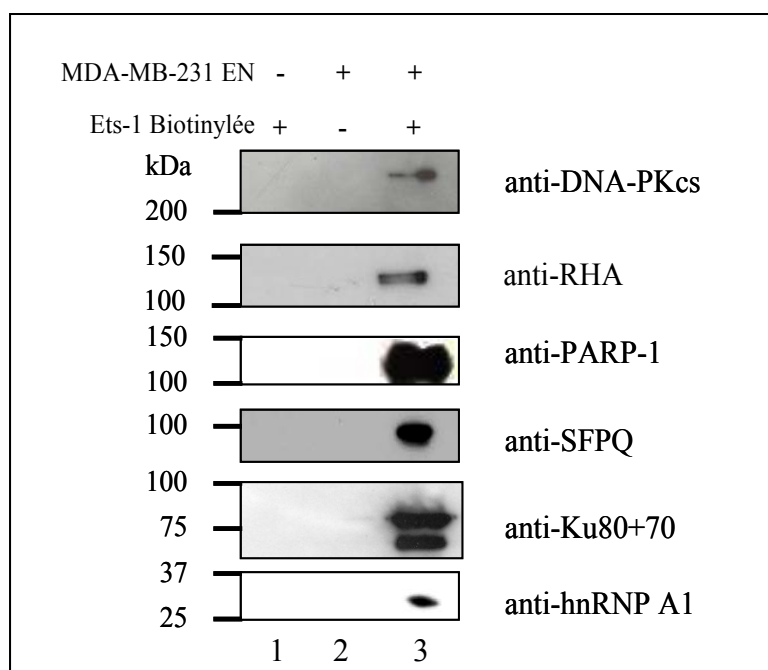


Figure 47 : Validation des partenaires d'interaction potentiels d'Ets-1 par « *Western blot* ».

Les protéines purifiées lors du « *streptavidin pull-down* » ont été analysées par « *Western blot* » grâce à des anticorps spécifiques afin de confirmer la présence des partenaires d'interaction potentiels d'Ets-1. Les conditions 1, 2 et 3 se réfèrent aux mêmes conditions qu'en Figure 46.

Parmi les protéines validées par « *Western blot* », nous avons pu confirmer l'interaction entre Ets-1 et certains de ces partenaires dans un contexte cellulaire. Ceci a été effectué grâce à des expériences de co-immunoprécipitation réalisées avec des extraits nucléaires issus de cellules MDA-MB-231, en utilisant un anticorps anti-Ets-1 conjugué à des

billes d'agarose. Les protéines fixées à Ets-1 endogène ont été éluées puis séparées par SDS-PAGE suivi d'un « *Western blot* » avec un anticorps dirigé contre le partenaire. Le résultat montre que les protéines PARP-1, RHA, SFPQ et le complexe DNA-PK (publié précédemment pour le complexe DNA-PK [138]) sont co-immunoprécipitées avec Ets-1 (Figure 48). Les expériences de co-immunoprécipitations ont également été menées pour la protéine hnRNP A1 sans succès à ce jour.

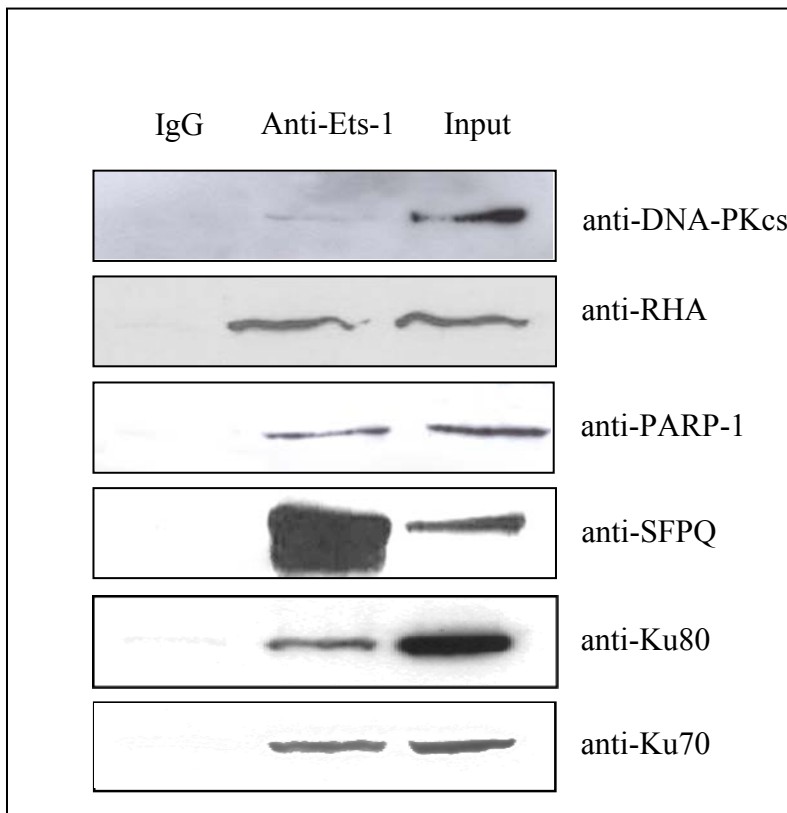


Figure 48 : Interaction entre Ets-1 et ses nouveaux partenaires dans un contexte cellulaire.

La protéine Ets-1 associée à ses partenaires protéiques est co-immunoprécipitée à partir des extraits des cellules MDA-MB-231, en utilisant l'anticorps anti-Ets-1 (C-20) conjugué à des billes d'agarose. Le contrôle correspond à une co-immunoprécipitation réalisée avec des IgG de lapin couplées à des billes d'agarose. L'input contient 3% des protéines nucléaires utilisées en co-immunoprécipitation. L'éluat a été analysé par Western-blot avec des anticorps spécifiques de chaque partenaire.

IV/ Conclusion et Discussion

Les résultats expérimentaux exposés dans ce chapitre ont permis la mise en évidence de nouveaux partenaires d'interaction d'Ets-1. Précédemment, de nombreux partenaires d'Ets-1 avaient été découverts à l'aide de techniques diverses telles que le « *GST pull-down* », le criblage en double hybride chez la levure ou encore la co-immunoprécipitation [259]. Cependant, ces travaux ont souvent souffert d'un fort *a priori* sur l'existence de ces interactions. C'est pourquoi, nous avons, pour la première fois, mis en place une stratégie d'identification des partenaires d'Ets-1 par « *streptavidin pull-down* ». Cette stratégie représente un outil performant et idéal, de par sa facilité d'adaptation et sa rapidité, pour la mise en évidence des partenaires d'une protéine. De plus, elle est sans *a priori* grâce à une

identification des polypeptides par spectrométrie de masse, là où les travaux antérieurs ont dû recourir à une identification par des anticorps dirigés contre les partenaires, ce qui présuppose de déjà soupçonner l'existence d'une interaction.

Ces nouveaux partenaires potentiels peuvent être séparés en quatre groupes fonctionnels (figure 49) : (1) des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (complexe DNA-PK et la PARP-1), (2) des enzymes responsables du remodelage de la chromatine (PARP-1 et la topoisomérase I), (3) des protéines qui participent à l'épissage alternatif et à la maturation des ARNm (les hnRNP et SFPQ) et enfin (4) des co-régulateurs reconnus de la transcription (RHA, PARP-1, complexe DNA-PK). Il est intéressant de noter les interconnexions qui existent entre ces différents groupes (Figure 49). En effet, les interactions directes observées de RHA avec le complexe DNA-PK et hnRNP A2/B1, de la topoisomérase I avec SFPQ et la phosphorylation d'hnRNP A1 par le complexe DNA-PK suggèrent que ces protéines pourraient se retrouver au sein des mêmes complexes dans la cellule (Figure 49).

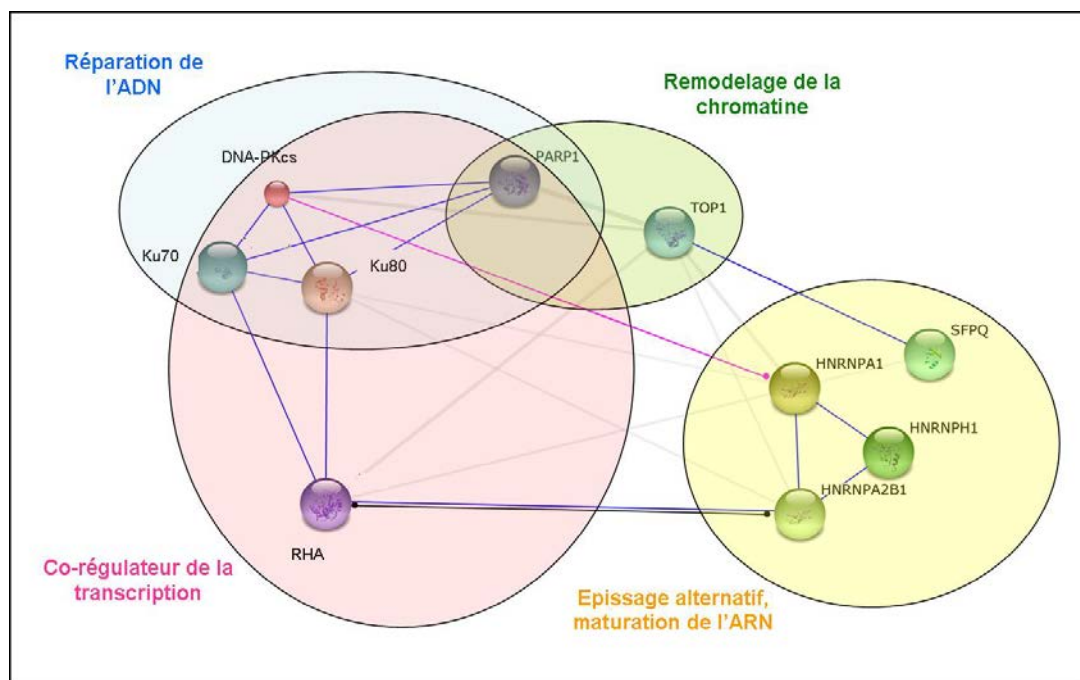


Figure 49 : Schéma représentant les interconnexions entre les nouveaux partenaires d'Ets-1 identifiés au cours de cette étude.

Les nouveaux partenaires d'Ets-1 sont représentés en quatre groupes délimités par des cercles. Les traits bleus joignant deux protéines indiquent qu'une interaction directe a été démontrée. Le trait rose signale que l'hnRNP A1 est un substrat de phosphorylation de la DNA-PKcs. Le trait noir montre un lien déterminé par analyse bioinformatique. Les autres traits reliant deux protéines indiquent qu'elles sont co-mentionnées dans une publication (traits fins) ou dans plusieurs (traits épais). Représentation faite à partir du logiciel en ligne STRING 9.0.

Il existe également des interconnexions entre les différents partenaires qui ont pu être validés par co-immunoprécipitation et certains membres de la famille Ets.

Nous avons déjà abordé en introduction de ce manuscrit, les liens qui unissent le complexe DNA-PK (voir Première partie Chapitre III §II-1-1-1-b) et la PARP-1 (voir Contexte et sujet de Thèse) aux membres de la famille Ets.

De plus, des études menées sur EWS-Fli-1, protéine de fusion retrouvée dans les sarcomes d'Ewing, ont montré qu'elle interagissait avec la RHA [509]. Cette interaction est très importante pour l'activité transcriptionnelle d'EWS-Fli-1 [509, 510]. En outre, les auteurs ont pu élaborer un composé permettant d'empêcher l'interaction entre EWS-Fli-1 et RHA, le YK-4-279 [510]. Celui-ci permet de cibler spécifiquement les cellules exprimant EWS-Fli-1 et de les faire entrer en apoptose, ce qui montre l'importance de cette interaction dans le contexte du sarcome d'Ewing [510, 511]. Récemment, des travaux ont pu montrer que l'YK-4-279 peut également inhiber l'activité pro-invasive de deux membres de la famille Ets, Erg et Er-81, dans le cancer de la prostate [512]. La RHA pourrait donc être un co-régulateur transcriptionnel essentiel pour tous les membres de la famille Ets, Ets-1 compris.

Enfin, la protéine SFPQ n'a été que récemment impliquée dans des mécanismes de transcription. Cependant, des travaux ont montré qu'elle régule l'expression des gènes de la prolactine et de p16^{INK4A} [513]. Or, ces deux gènes sont également ciblés par Ets-1. La protéine SFPQ ayant besoin d'interagir avec un facteur de transcription pour avoir une activité transcriptionnelle, ceci pourrait signifier une possible coopération entre SFPQ et Ets-1 sur ces deux gènes.

Cette étude nous a permis d'ouvrir de nouvelles voies d'investigation des fonctions transcriptionnelles d'Ets-1 en montrant une relation entre ce facteur de transcription et des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, dans l'épissage alternatif des ARNm ou encore dans le remodelage de la chromatine. L'étude de ces interactions devrait participer à une meilleure compréhension des diverses fonctions d'Ets-1, compte-tenu de l'importance fondamentale des interactions avec des partenaires protéiques dans la régulation de son activité transcriptionnelle.

Chapitre II : Le taux de protéines Ets-1 est régulé par la PARP-1 dans les cellules cancéreuses afin de prévenir les dommages à l'ADN

I/ Preamble

Les résultats sont présentés sous la forme d'un article rédigé en anglais et publié dans le journal « PLoS ONE ». Ceux-ci seront analysés et discutés au vu de l'intérêt qu'ils représentent dans la compréhension de la régulation d'Ets-1 dans les cellules cancéreuses.

II/ Résumé

Dans cette étude, nous avons caractérisé l'interaction fonctionnelle qui lie le facteur de transcription, Ets-1, à l'enzyme de réparation de l'ADN, la PARP-1. Nos résultats montrent que :

- Ets-1 interagit directement avec la PARP-1 dans un contexte cellulaire,
- Ets-1 stimule l'activité enzymatique de la PARP-1 *in vitro*,
- la PARP-1 PARyle Ets-1 *in vitro* et dans la cellule,
- la PARylation d'Ets-1 régule son activité transcriptionnelle sur le promoteur de la stromélysine-1,
 - l'inhibition de la PARylation d'Ets-1 engendre l'accumulation massive de cette oncoprotéine dans la cellule,
 - l'accumulation d'Ets-1 est toxique pour la cellule cancéreuse lorsque la PARP-1 est inhibée,
 - l'accumulation d'Ets-1 cumulée à l'inhibition de la PARP-1 augmente significativement le taux de dommages à l'ADN au sein des cellules cancéreuses.

L'ensemble de ces données montre que l'activité catalytique de la PARP-1 est essentielle à la régulation du taux de protéines Ets-1 dans la cellule cancéreuse. En cas, d'inhibition de la PARP-1, Ets-1 s'accumule dans la cellule et met en danger la survie cellulaire en provoquant une forte augmentation des dommages à l'ADN.

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0055883>

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0055883>

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0055883>

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0055883>

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0055883>

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0055883>

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0055883>

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0055883>

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0055883>

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0055883>

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0055883>

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0055883>

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0055883>

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0055883>

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0055883>

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0055883>

Supporting Information

Figure S1: MALDI-TOF spectrum of PARP-1 purified by streptavidin pull-down.

Figure S2: Sub-localisation of Ets-1 and PARP-1 in MDA-MB-231 cells by immunofluorescence. Ets-1 is visualised in red (Alexa Fluor® 594), and PARP-1 in green (Alexa Fluor® 388). The insets are close-ups of the boxed cells. Nuclei were visualised using DAPI stain. Cells were examined under a fluorescence microscope at $\times 40$ magnification. Scale bar = 20 μm .

Figure S3: Effect of PARP-1 catalytic inhibition on the level of Ets-1 and γH2AX . MDA-MB-231 cells were treated with PJ-34 (1 μM), 5-AIQ (1 μM) or ABT-888 (1 μM) for 20 h. Cell lysates (30 μg total proteins) were analysed by Western blot using different antibodies (see Materials and Methods) against Ets-1, γH2AX , p53 and β -Actin.

Figure S4: PARP-1 catalytic inhibition using ABT-888 leads to cancer cell death by necrosis. (A) Time-lapse imaging experiments. HeLa cells were grown in Hi-Q4 dishes until 70% confluence and transfected with empty pcDNA3 (250 μg ; left panel) or pcDNA3-Ets1 (250 μg ; right panel) vectors 24 h before being treated with ABT-888 (1 μM) or left untreated. Cells were stained with Hoechst 33242 (blue) and PI (red) for live-cell imaging and monitored for 20 h. Scale bar = 20 μm . (B) Graphical representation of the proportion of necrotic HeLa cells (%) at three time points (see Materials and Methods). (C) Flow cytometry cell-death detection: HeLa cells were grown in 6-well plates until 70% confluence and transfected with pcDNA3 (1 μg ; left panel) or pcDNA3-Ets1 (1 μg ; right panel) vectors for 24 h and left untreated (dashed lines) or treated with ABT-888 (solid lines) for an additional 20 h incubation. Necrotic cell death was then determined by flow cytometry after PI staining. Numbers under the horizontal bar represent the percentages of specific ABT-888-induced necrotic cell death in each condition. Flow cytometry profiles shown are representative of three replicate experiments.

Figure S5: Effect of PJ-34 and Doxorubicin on the MDA-MB-231 cells survival. (A) MDA-MB-231 cells were treated with PJ-34 (10 μM) and/or doxorubicin (500 nM) for 20 h. Cell lysates (30 μg total proteins) were analysed by Western blot using an anti-Ets-1 antibody (C-20). (B) Time-lapse imaging experiments of MDA-MB-231 cells treated with PJ-34 and doxorubicin. MDA-MB-231 cells were grown in Hi-Q4 dishes until 80% confluence, treated with doxorubicin (500 nM) and treated with PJ-34 (10 μM) or left untreated. Cells were

stained with Hoechst 33242 (blue) and PI (red) for live-cell imaging and monitored for 20 h. Scale bar = 20 μ M. (C) Graphical representation of the proportion of necrotic MDA-MB-231 cells (%) at three time points to summarise results from Fig. 5D and from (B).

Figure S6: Determination of γ H2AX-positive cells for statistical analyses. γ H2AX-positive cells were determined by counting γ H2AX foci, visualised here in red (Alexa Fluor[®] 594), in the cell nucleus from immunofluorescence experiments. Cells with no or less than 10 γ H2AX foci were considered to be negative (γ H2AX -; 1 and 2); while cells with more than 10 γ H2AX foci were considered to be positive (γ H2AX +; 3 and 4).

Figure S1

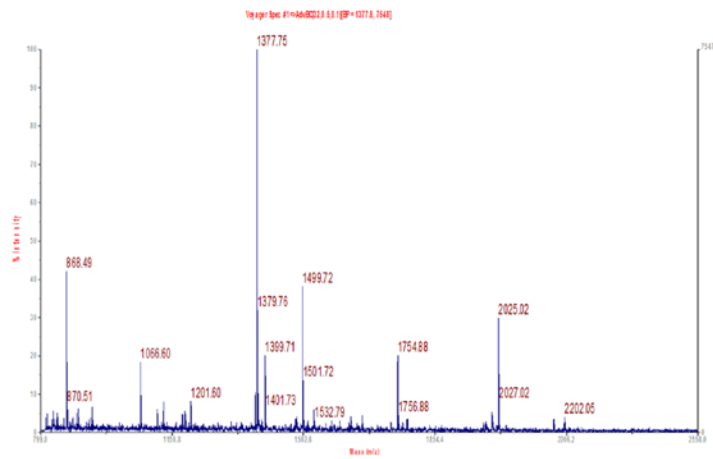


Figure S2

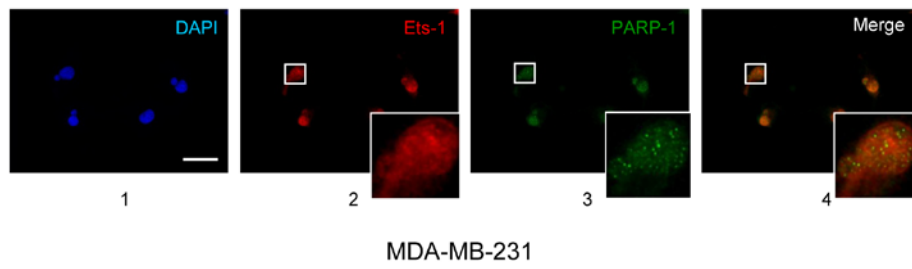


Figure S3

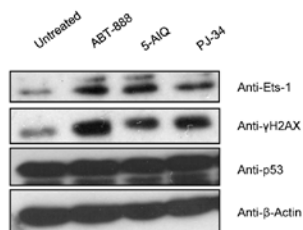


Figure S4

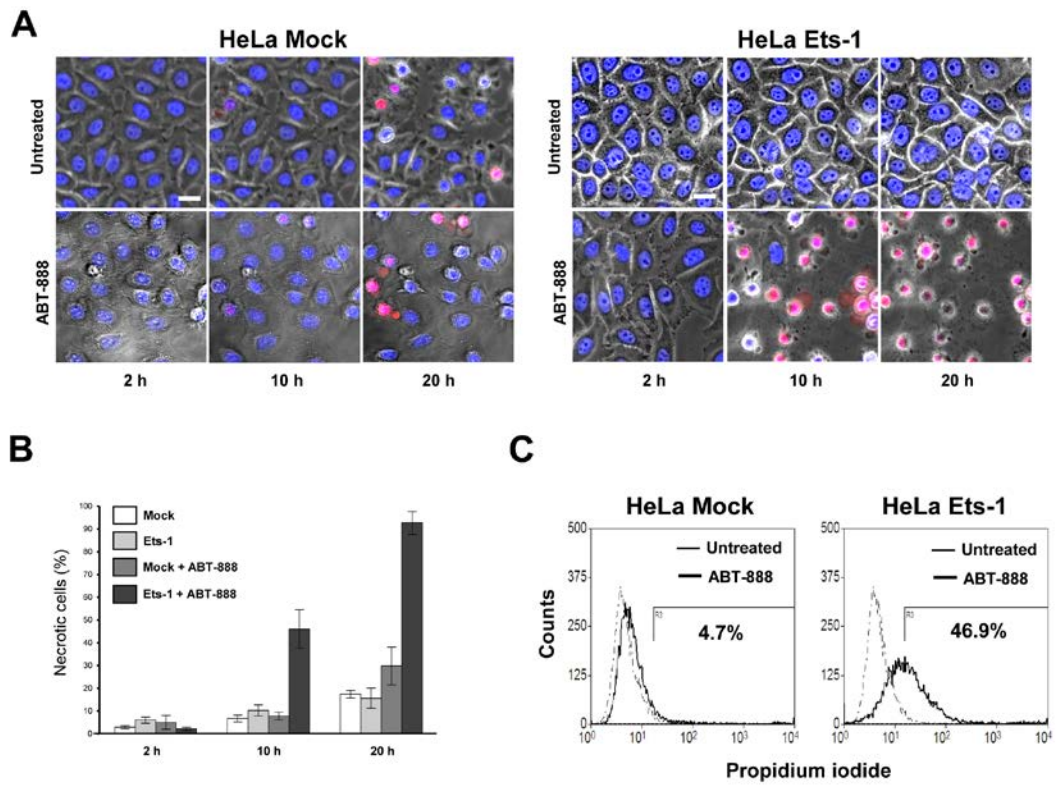


Figure S5

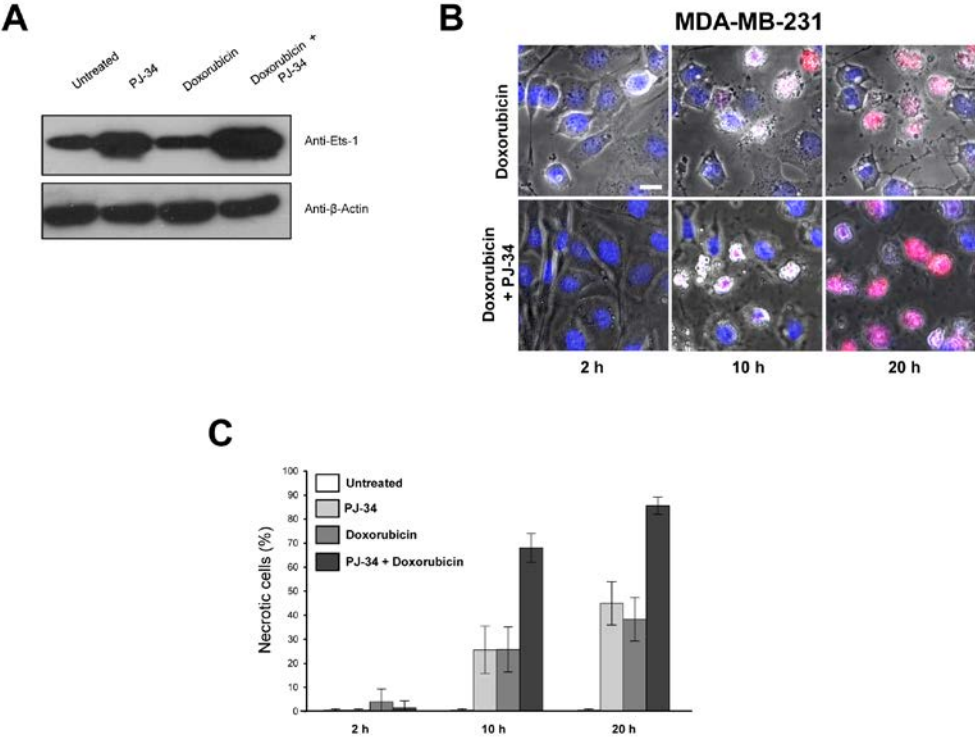
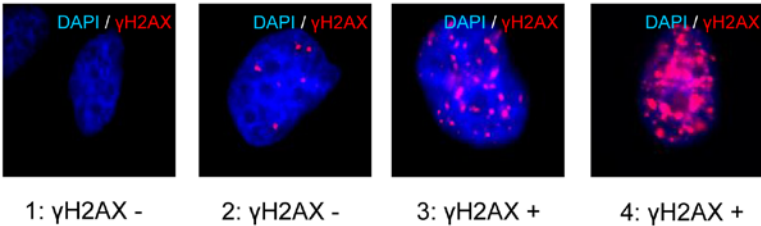


Figure S6



III/ Conclusion et discussion

La régulation d'Ets-1 par la PARP-1 donne un nouvel aperçu de la complexité des mécanismes qui permettent à une cellule cancéreuse de se maintenir dans un équilibre entre stress génotoxiques et prolifération cellulaire. En effet, la protéine Ets-1 est associée à des processus de stress cellulaires majeurs comme l'inflammation, l'hypoxie et la production de ROS (voir Introduction, Première partie, Chapitre IV). Ces processus sont très finement régulés, en conditions physiologiques, afin d'empêcher la cancérisation ou la mort cellulaire. Dans le cas des cellules cancéreuses, la plupart de ces mécanismes de régulation sont inactifs ou altérés et pourtant, la cellule survit. La grande question sous-jacente au rôle d'Ets-1 dans le cancer, est de savoir comment la cellule tumorale peut avoir une activité effrénée de prolifération, d'invasion, de migration et d'inflammation due à cette oncoprotéine sans pour autant conserver les mécanismes de régulation qui contrôlent Ets-1 dans une cellule normale.

Lors de ces travaux, nous avons pu montrer que l'enzyme PARP-1, dont l'activité peut être détournée au profit des cellules cancéreuses (voir Introduction, Deuxième Partie, Chapitre IV), se charge de modérer l'activité transcriptionnelle d'Ets-1 afin de contrôler l'effet génotoxique que peut avoir cette oncoprotéine. Il est assez intéressant de noter que cette régulation d'Ets-1 par la PARP-1 ressemble à celle que cette enzyme effectue sur le facteur de transcription AP-2 α [454]. En effet, la PARP-1 est un co-régulateur transcriptionnel positif d'Ets-1 et d'AP-2 α . La suppression de la PARP-1 diminue fortement l'activité transcriptionnelle de ces deux facteurs. Ce rôle de la PARP-1 est probablement lié au fait qu'elle peut permettre le recrutement d'activateurs de la transcription comme le complexe « Médiateur » (voir Introduction, Deuxième partie, Chapitre IV §I-3-2). Tant que le complexe formé du facteur de transcription et de la PARP-1 reste fixé sur le promoteur, la transactivation du gène cible est prolongée. Or, la plupart des gènes ne sont pas transcrits en continu. C'est pourquoi, il faut qu'il y ait un signal de dissociation du complexe transcriptionnel. Dans le cas des complexes formés par la PARP-1, c'est la PARylation des différentes protéines présentes qui permet cette dissociation (voir Introduction, Deuxième partie, Chapitre IV §I-3-2). C'est probablement pour cette raison que, dans le cas d'Ets-1 et d'AP-2 α , l'inhibition de la PARylation augmente l'activité de transactivation de ces deux facteurs alors que la suppression de la PARP-1 la diminue. Lorsque la PARP-1 est inhibée, elle peut former des complexes avec ces facteurs de transcription. Par contre, elle ne peut plus

les PARyler et donc les complexes transcriptionnels ne sont plus dissociés et la transactivation du promoteur est continue.

De plus, nous avons montré que l'inhibition de la PARylation d'Ets-1 engendre une accumulation massive de ce facteur de transcription dans la cellule. Or, il est désormais connu, qu'en plus de dissocier les complexes, la PARylation peut promouvoir l'ubiquitination des protéines et leur dégradation par le protéasome (voir Introduction, Deuxième partie, Chapitre III §II-2-5). Nous pouvons nous demander si c'est ce mécanisme qui est responsable de la régulation par PARylation du taux de protéines Ets-1. Nous avons pu démontrer que l'isoforme Ets-1 p27, qui est PARylée mais qui n'est pas dégradée par le protéasome car elle ne possède pas les sites d'ubiquitination, ne s'accumule pas lorsqu'il y a inhibition de la PARylation. Il existe donc bien un lien entre la PARylation d'Ets-1 et sa dégradation par le protéasome. Cependant il reste à démontrer que la PARylation d'Ets-1 favorise bien son ubiquitination.

Enfin, nous avons vu que l'accumulation d'Ets-1 provoquée par l'inhibition de la PARP-1 est toxique pour la cellule cancéreuse et que cela augmente fortement son taux de dommages à l'ADN. Il est intéressant de constater que cet effet de sensibilisation aux dommages à l'ADN, sous inhibition de la PARP-1, a également été observé lors de l'expression de protéines de fusion Ets dans le cancer de la prostate et le sarcome d'Ewing (voir Introduction, Deuxième partie, Chapitre IV §III-1-2-3-b). La raison de l'accumulation de ces cassures dans l'ADN est encore sous investigation, néanmoins, nous supposons qu'elle pourrait être due à l'activité transcriptionnelle accrue d'Ets-1 surtout au vu de son rôle dans la production de ROS.

L'ensemble de ces données nous encourage à penser que la régulation du taux de protéines Ets-1 par la PARP-1 fait partie des régulations qui permettent aux cellules cancéreuses de contrôler le stress génotoxique causé par leur activité effrénée de prolifération. Au vu de l'importance de l'activité d'Ets-1 au sein des cancers (voir Introduction, Deuxième partie, Chapitre IV) et de la nécessité de trouver des biomarqueurs de sensibilité aux inhibiteurs de la PARP-1 en thérapie (voir Introduction, Deuxième partie, Chapitre IV), nous pouvons envisager d'approfondir nos connaissances sur cette accumulation toxique d'Ets-1 afin de pouvoir, peut-être un jour, utiliser les inhibiteurs de la PARP-1 afin de cibler et de réprimer spécifiquement les tumeurs exprimant Ets-1.

Chapitre III : Cartographie des domaines d'interaction entre l'oncoprotéine Ets-1 et les deux enzymes de réparation de l'ADN, DNA-PK et PARP-1

I/ Préambule

Afin de répondre à des problématiques concernant la nature de l'interaction entre Ets-1 et les deux enzymes de réparation de l'ADN, le complexe DNA-PK et la PARP-1, nous avons entrepris de cartographier les domaines protéiques impliqués dans ces interactions. Les résultats préliminaires seront exposés, analysés et discutés dans ce chapitre.

II/ Introduction

Des travaux publiés par notre groupe ont montré qu'Ets-1 peut stimuler l'activité kinasique du complexe DNA-PK en absence d'ADN [138]. Ce mécanisme, peu commun, a également été observé avec d'autres facteurs de transcription [514]. Cependant, le mécanisme moléculaire sous-jacent est peu caractérisé. Il a été avancé que ces facteurs de transcription peuvent activer le complexe DNA-PK en recrutant l'hétérodimère Ku80/Ku70 [514]. Le but de notre projet était donc de déterminer si Ets-1 était capable d'interagir avec l'un des Ku et d'ensuite cartographier le domaine minimal d'interaction pour les deux protéines afin de rechercher une raison à l'activation du complexe DNA-PK en absence d'ADN.

Lors des travaux que nous avons effectués sur l'interaction entre la PARP-1 et Ets-1 (voir Chapitre II), nous avons pu constater qu'Ets-1 peut aussi stimuler l'activité de PARylation de la PARP-1 en absence d'ADN. Nous avons donc décidé, comme pour le complexe DNA-PK, de rechercher la raison de cette stimulation dans la nature même des domaines d'interaction entre la PARP-1 et Ets-1.

III/ Résultats

III-1/ Cartographie des domaines d'interaction entre Ets-1 et le complexe DNA-PK

L'hétérodimère Ku se compose de deux sous-unités, Ku70 et Ku80. Afin de déterminer avec laquelle de ces deux protéines, Ets-1 interagit, nous avons produit, chez la bactérie (*E. coli*), Ku70 et Ku80 fusionnées en leur partie N-terminale avec la GST

(« glutathion S-transférase »). Ceci nous a permis d'effectuer des expériences de « *GST-pulldown* » en immobilisant les protéines GST-Ku70 ou GST-Ku 80 sur des billes de sépharose[®]/glutathion et en utilisant des protéines Ets-1 recombinantes non étiquetées (Figure 50a). Après lavage et élution, les protéines fixées ont été analysées par « *Western blot* » avec un anticorps dirigé contre la partie C-terminale d'Ets-1 (C20). Les résultats montrent qu'Ets-1 interagit avec la sous-unité Ku70 mais pas avec Ku80 (Figure 50b, colonnes 3 et 4). Nous avons ensuite produit des mutants GST-Ku70 délétés progressivement de leur partie N-terminale (mutants 1 à 4) ainsi qu'un mutant délété de sa partie C-terminale (mutant 5) (Figure 50a). Les résultats de « *GST-pulldown* » montrent qu'Ets-1 n'interagit qu'avec les mutants qui contiennent la partie N-terminale de Ku70 (mutant 1 à 4) et non avec le mutant 5 (Figure 50b, colonnes 5 à 9).

La zone d'interaction minimale avec Ets-1 caractérisée est contenue dans le mutant 4 (Figure 50). Elle se compose de l'extrémité C-terminale de Ku70. Elle contient une partie du domaine d'hétérodimérisation qui n'est plus fonctionnel dans ce mutant [515], mais contient surtout le domaine SAP (« *SAF-A/B*, *acinus* and *PIAS* ») qui est essentiel à la stabilisation de l'hétérodimère Ku, une fois qu'il est fixé sur une cassure double-brin de l'ADN [516].

Nous avons ensuite cherché à déterminer le domaine minimal d'interaction sur la protéine Ets-1. Les travaux menés par notre groupe ont montré que le complexe DNA-PK interagissait avec les trois isoformes connus d'Ets-1 [138]. Les seuls domaines communs à ses trois isoformes sont le domaine ETS et le domaine inhibiteur C-terminal qui constituent l'extrémité C-terminale d'Ets-1 (Ets-1 Δ N331, Figure 50a). Les expériences de « *GST-pulldown* » menées avec le mutant correspondant à l'extrémité C-terminale d'Ets-1 montrent que ce mutant interagit avec Ku70 et avec le domaine SAP (Figure 50b, colonnes 10 et 11). Par contre, il n'interagit pas avec la partie N-terminale de Ku70 (Figure 50b, colonne 12).

Nous avons donc pu démontrer qu'Ets-1 par son extrémité C-terminale contacte l'hétérodimère Ku *via* le domaine SAP de la sous-unité Ku70.

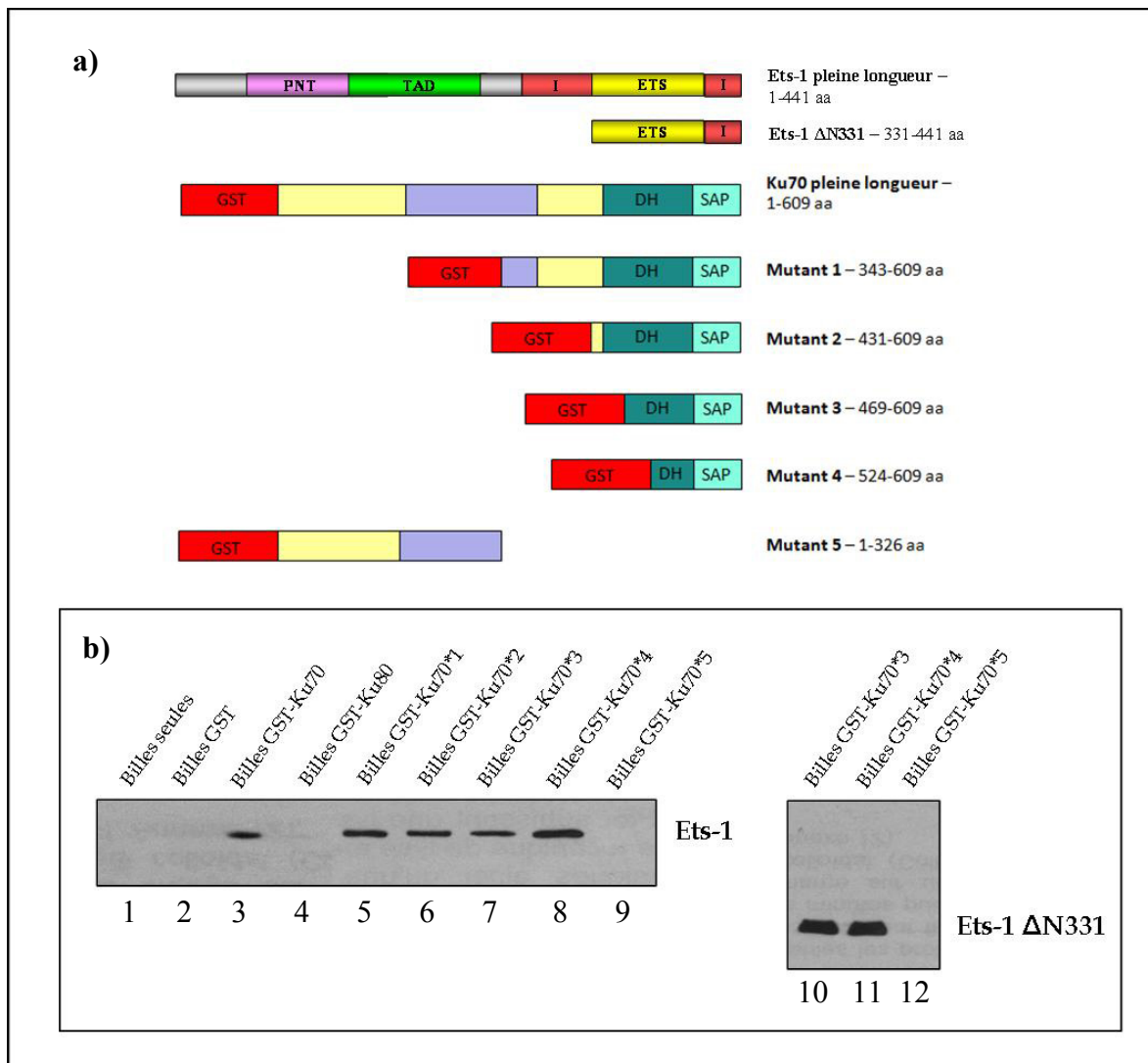


Figure 50 : Cartographie des zones minimales d'interaction entre Ets-1 et Ku70.

a) Schéma des mutants de délétion d'Ets-1 et de GST-Ku70 utilisés pour cartographier les domaines minimaux d'interaction entre Ets-1 et Ku70. Les différents domaines fonctionnels d'Ets-1 sont indiqués. Pour GST-Ku70, le domaine de liaison aux cassures double-brin est indiqué en violet clair, DH désigne le domaine d'hétérodimérisation entre Ku70 et Ku80 et est indiqué en vert foncé, enfin, le domaine SAP est représenté en bleu clair. La totalité des vecteurs d'expression procaryotes contenant pour GST-Ku80, GST-Ku70 et les mutants de délétion GST-Ku70 ont été gracieusement fournis par le Professeur S.P. Jackson (Cambridge, UK). b) Résultats des « GST pull-down » analysés par « Western blot » à l'aide d'un anticorps dirigé contre la partie C-terminale d'Ets-1 (C20). Dans toutes les conditions 1 à 9 les billes ont été incubées avec 1 µg de protéine Ets-1 pleine longueur. Pour les conditions 10 à 12 les billes ont été incubées avec 250 ng de protéine Ets-1 ΔN331.

III-2/ Cartographie des domaines d'interaction entre Ets-1 et la PARP-1 (résultats préliminaires)

Précédemment, nous avons démontré que la PARP-1 interagissait directement avec Ets-1 mais également avec l'isoforme Ets-1 p27 (voir Chapitre II, publication Figure 2) (Figure 51a et 52a, colonnes 1 à 3). Afin de déterminer par quel domaine la PARP-1 interagit avec Ets-1, nous avons effectué des expériences de « streptavidin pull-down » en utilisant des

protéines Ets-1 biotinylées immobilisées sur des billes de sépharose®/streptavidine et deux fragments de la PARP-1. Ces deux fragments ont été produits chez la bactérie (*E. coli*) et purifiés grâce à une étiquette 6His située en position N-terminale (Figure 51b). Ils correspondent aux deux fragments de clivage obtenus lors de l'apoptose par l'action de la caspase-3 à savoir : (1) une large portion C-terminale, appelée PARP-89, contenant le ZnFIII, le BRCT, le WGR, le PARP_Reg et le PARP_Cat, et (2) une courte portion N-terminale, appelée PARP-24, contenant le ZnFI et le ZnFII (Figure 51b) (voir Introduction, Deuxième partie, Chapitre II). Les résultats des expériences de « *streptavidin pull-down* » montrent qu'Ets-1 interagit avec le fragment PARP-89 (Figure 52a, colonnes 5 et 6) et non avec le fragment PARP-24 (Figure 52a, colonnes 7 et 8). Le domaine d'interaction d'Ets-1 sur la PARP-1 se situe donc dans la portion C-terminale de l'enzyme et non au niveau des deux premiers ZnF qui sont responsables de la liaison à l'ADN.

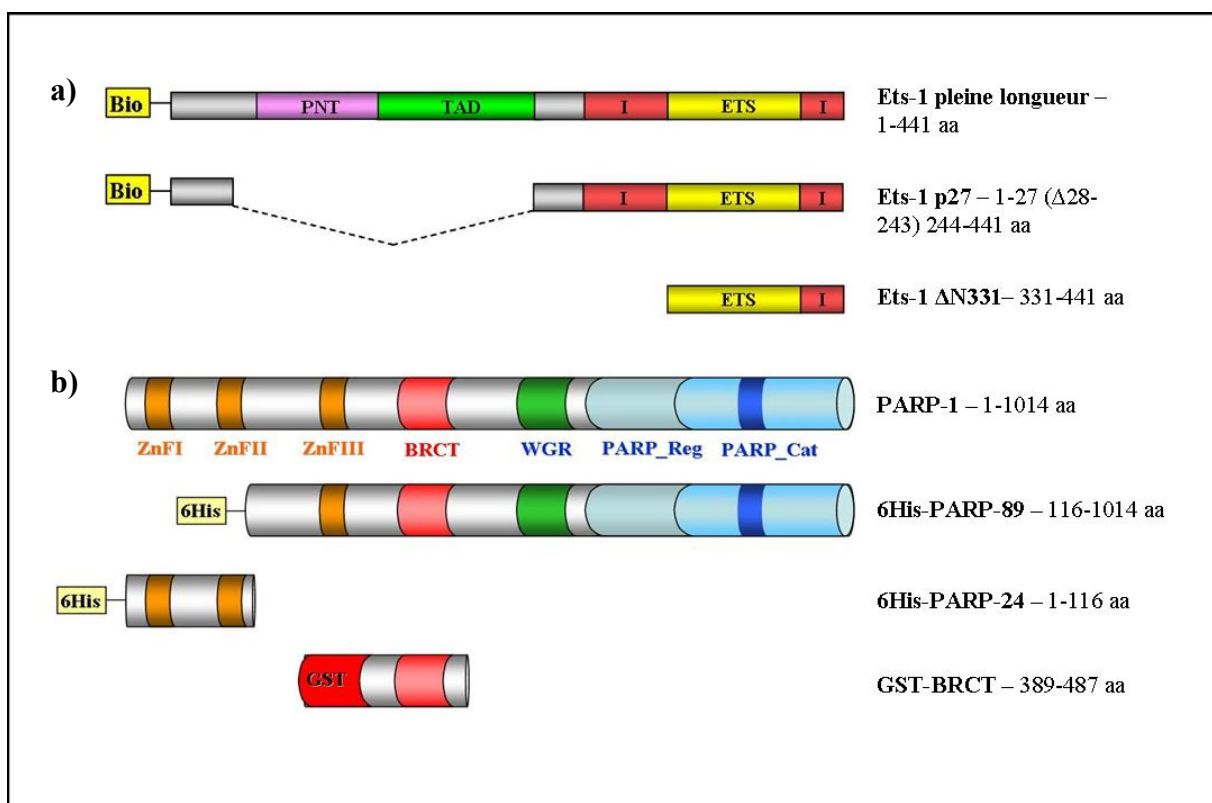


Figure 51 : Schéma des mutants de délétion utilisés pour cartographier les zones minimales d'interaction entre Ets-1 et la PARP-1.

a) Schéma représentant les deux isoformes biotinylées, Ets-1 pleine longueur (Ets-1) et Ets-1 p27, utilisées pour les expériences de « *streptavidin pull-down* » et de « *GST pull-down* » et le mutant de délétion Ets-1 Δ N331 utilisé lors des expériences de « *GST pull-down* ». Les différents domaines d'Ets-1 sont représentés. b) Schéma représentant la PARP-1, les deux fragments étiquetés 6His, PARP-89 et PARP-24, utilisés pour les expériences de « *streptavidin pull-down* » et le mutant de délétion fusionné à la GST correspondant au domaine BRCT utilisé lors des expériences de « *GST pull-down* ». Les différents domaines de la PARP-1 sont représentés. Les vecteurs d'expression procaryotes conduisant pour 6His-PARP-89 et 6His-PARP-24 ont été gracieusement fournis par le Professeur M. S. Satoh (Laval, CAN).

Nous avons ensuite entrepris de cloner les séquences codantes pour les domaines fonctionnels présents dans le fragment PARP-89 (ZnFIII, BRCT, WGR, PARP_Reg, PARP_Cat) afin de pouvoir produire des mutants de délétion correspondant à chaque domaine fusionné en position N-terminale à la GST. A ce jour, seul le mutant de délétion GST-BRCT a pu être produit (Figure 51b). Ce mutant de délétion a permis, en l'immobilisant sur des billes de sépharose[®]/glutathion, d'effectuer des expériences de « *GST pull-down* » en utilisant des protéines Ets-1 (pleine longueur) et Ets-1 p27. Les résultats démontrent que les deux isoformes d'Ets-1 interagissent avec le mutant GST-BRCT de la PARP-1 (Figure 52b, colonnes 1 à 6). Afin, de réduire encore la zone d'interaction sur Ets-1, nous avons également testé l'interaction entre le mutant GST-BRCT et le mutant Ets-1 ΔN331 par des expériences de « *GST pull-down* ». Les résultats confirment l'interaction entre les deux mutants (Figure 52b, colonnes 7 à 9). Nous avons donc pu ainsi déterminer qu'Ets-1 interagit par son extrémité C-terminale avec le domaine BRCT de la PARP-1.

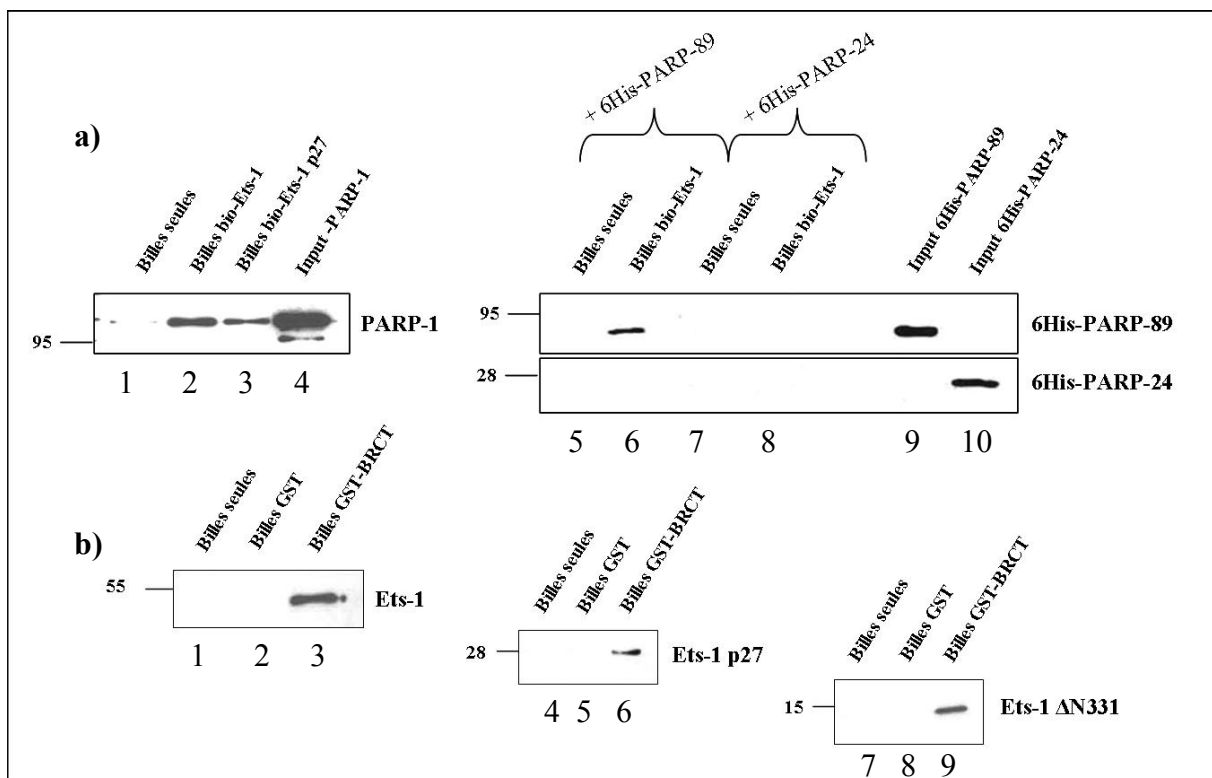


Figure 52 : Cartographie des zones minimales d'interaction entre Ets-1 et la PARP-1.

a) Résultats des « *streptavidin pull-down* » analysés par « *Western blot* » à l'aide d'un anticorps dirigé contre la partie C-terminale de la PARP-1 (panneau de gauche) ou contre l'étiquette 6His (panneau de droite). Dans les conditions 1 à 3 les billes ont été incubées avec 1 µg de protéine PARP-1, dans les conditions 5 et 6 avec 800 ng de protéine 6His-PARP-89 et dans les conditions 7 et 8 avec 220 ng de protéines 6His-PARP-24. Les « *Inputs* » correspondent aux quantités totales de protéines incubées. b) Résultats des « *GST pull-down* » analysés par « *Western blot* » à l'aide d'un anticorps dirigé contre la partie C-terminale d'Ets-1 (C20). Dans les conditions 1 à 3 les billes ont été incubées avec 1 µg de protéine Ets-1 (pleine longueur), dans les conditions 4 à 6 avec 500 ng de protéine Ets-1 p27 et dans les conditions 7 à 9 avec 250 ng de protéine Ets-1 ΔN331.

IV/ Conclusion et discussion

Lors de cette étude nous avons déterminé les zones minimales d'interaction entre Ets-1 et l'hétérodimère Ku du complexe DNA-PK. Nous avons pu montrer qu'Ets-1 contacte par son extrémité C-terminale, composée du domaine ETS et d'un domaine inhibiteur, le domaine SAP de la sous-unité Ku70. Or, des travaux ont démontré que les protéines capables de stimuler l'activité kinasique du complexe DNA-PK en absence d'ADN interagissent avec ce complexe *via* Ku70 [514, 517]. De plus, dans le cas des protéines à homéodomaine comme Oct-1, il a été observé que l'interaction se faisait via l'extrémité C-terminale de Ku70, et donc, par le domaine SAP [517]. Le domaine SAP est composé de trois hélices α et d'un long bras flexible [516]. Il s'agit donc d'un court domaine très mobile [516]. Il est essentiel au complexe DNA-PK. Lorsque l'hétérodimère Ku se lie aux cassures double-brin, le domaine SAP stabilise cette liaison en se fixant dans un sillon de l'ADN [516]. C'est cette stabilisation qui permet de recruter efficacement la DNA-PKcs via l'extrémité C-terminale de Ku80 [516]. Nous pouvons donc constater que ce mécanisme est un enchaînement complexe de changement conformationnel. Le domaine SAP, très flexible, lie l'ADN, il provoque un changement de conformation de Ku70 qui se transmet à Ku80 qui peut finalement recruter la DNA-PKcs. De ce fait, nous pouvons supposer que le domaine SAP pourrait fonctionner comme un interrupteur de l'activité kinasique du complexe DNA-PK. Cela laisse à penser qu'Ets-1 pourrait donc activer le complexe DNA-PK en interagissant avec le domaine SAP.

De plus, cette interaction entre Ets-1 et Ku70 pourrait expliquer certaines observations faites par notre groupe lors de la caractérisation fonctionnelle de l'interaction entre Ets-1 et le complexe DNA-PK. En effet, nous avons pu observer que la surexpression de Ku80 engendre une diminution de l'activité transcriptionnelle d'Ets-1 sur les promoteurs de la collagénase-1 (MMP-1) et de la stromélysine-1 (MMP-3) [138]. L'excès de Ku80 est connu pour favoriser la formation de complexes Ku80/DNA-PKcs, qui n'ont pas d'activité kinasique, au dépend du complexe actif Ku80/Ku70/DNA-PKcs [139]. Nous pouvons donc désormais penser que si Ets-1 n'interagit pas avec Ku80, cette sous-unité peut séquestrer la DNA-PKcs qui devient non accessible pour Ets-1. Cette oncoprotéine ne sera donc plus phosphorylée par le complexe DNA-PK, ce qui pourrait expliquer les conséquences négatives de l'excès de Ku80 sur son activité transcriptionnelle.

Ces résultats nous offrent donc un aperçu concret des modalités d'interaction entre Ets-1 et le complexe DNA-PK et aident à la compréhension du lien fonctionnel qui existe entre ces protéines.

Nous avons pu également démontrer l'interaction entre l'extrémité C-terminale d'Ets-1 et le domaine BRCT de la PARP-1.

Nous avons d'abord pu montrer qu'Ets-1 interagit avec le fragment PARP-89. Ceci confirme nos résultats montrant que l'interaction entre la PARP-1 et Ets-1 est indépendante de l'ADN car le fragment PARP-89 ne se lie pas à l'ADN [518].

L'interaction entre Ets-1 et le domaine BRCT donne également des informations sur le mécanisme de PARylation d'Ets-1. En effet, il a été observé que la plupart des protéines qui sont PARylées par la PARP-1 interagissent au niveau du domaine BRCT (voir Introduction, Deuxième partie, Chapitre II §II). Cela leur permet d'être à proximité du domaine catalytique de la PARP-1.

La question de départ était de comprendre comment Ets-1 stimule l'activité catalytique de la PARP-1. Très peu de choses sont connues au niveau moléculaire sur l'activation de la PARP-1. En effet, le mécanisme d'activation de la PARP-1 par l'ADN n'a été caractérisé que très récemment (voir Introduction, Deuxième partie, Chapitre II §I-2-1). Le BRCT n'est pas impliqué dans ce mécanisme mais, compte-tenu du fait que l'activation de la PARP-1 par Ets-1 se fait en absence d'ADN, il est parfaitement possible que les domaines de la PARP-1 responsables de l'activation soient différents. Il a d'ailleurs été démontré que le seul événement essentiel à l'activation de la PARP-1 est un changement conformationnel au sein du domaine PARP_Reg [305]. Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si une interaction au niveau du domaine BRCT peut engendrer un tel changement.

Enfin, à ce jour, nous ne pouvons pas affirmer qu'il n'existe pas d'autres zones d'interaction pour Ets-1 sur la PARP-1. En effet, nous n'avons pas pu effectuer d'expériences de « pull-down » avec les autres domaines du fragment PARP-89 (ZnFIII, WGR, PARP_Reg et PARP_Cat). Si l'on se réfère au cas de l'interaction entre AP-2 α et la PARP-1. Il existe une interaction entre AP-2 α et le BRCT mais également avec le domaine catalytique de la PARP-1 [454]. Or, comme la relation fonctionnelle entre AP-2 α et la PARP-1 est similaire à celle que l'enzyme partage avec Ets-1 (voir Résultats, Chapitre II, §III), nous pouvons donc imaginer qu'une zone de liaison puisse exister pour Ets-1 dans le domaine catalytique de la PARP-1. Cette éventualité devra être testée.

CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

La problématique guidant les travaux de notre groupe, a toujours été de comprendre la nature des régulations qui donnent à l'oncoprotéine Ets-1 sa spécificité d'action lors de la progression tumorale. Nous avons décrit, en introduction de ce manuscrit, certains mécanismes à l'origine de cette spécificité d'action. Ainsi, nous avons pu voir les modalités de liaison à l'ADN d'Ets-1 qui le différencie des autres membres de la famille Ets. Parmi celles-ci, la reconnaissance de variations dans la séquence consensus de liaison à l'ADN ou encore la fixation sur des organisations particulières d'EBS telles que les EBS en palindrome. Nous avons aussi abordé l'auto-inhibition de liaison à l'ADN d'Ets-1 qui a une fonction majeure dans la sélection des gènes cibles de l'oncoprotéine ; cette auto-inhibition est régulée par de nombreux mécanismes qui font appel à des modifications post-traductionnelles d'Ets-1 ou à des interactions protéine-protéine.

L'objectif de cette Thèse était d'identifier de nouveaux partenaires protéiques d'Ets-1 afin de pouvoir comprendre comment ses partenaires, par des interactions protéine-protéine ou par des modifications post-traductionnelles, peuvent réguler finement la spécificité d'action d'Ets-1 dans le contexte du cancer. Les résultats obtenus au cours de cette Thèse apportent des éléments supplémentaires à cette compréhension et définissent de nouvelles régulations de l'oncoprotéine Ets-1.

Identification de nouveaux partenaires de l'oncoprotéine Ets-1

Lors de l'identification de partenaires d'interaction d'une protéine, le choix de la stratégie à utiliser est un élément déterminant. Dans le cas d'Ets-1, les stratégies employées ont toujours eu comme défaut d'être basées sur la présomption de l'existence d'une interaction. Cela a permis d'identifier un bon nombre de partenaires protéiques d'Ets-1 mais a aussi eu pour conséquence de trop souvent confiner cette oncoprotéine à un simple rôle de facteur de transcription. En effet, ces partenaires sont pour la plupart soit eux-mêmes des facteurs de transcription soit des co-régulateurs transcriptionnels.

Pourtant, l'analyse des fonctions d'Ets-1 montre que cette oncoprotéine est capable de s'intégrer dans de nombreux processus comme le développement embryonnaire, la migration et l'invasion cellulaire, l'inflammation ou encore l'apoptose. La régulation de ces processus

nécessite qu'Ets-1 soit en contact direct avec des protéines qui fonctionnent comme des senseurs intégrant les différentes voies de signalisation. Certes, des travaux ont montré qu'Ets-1 était la cible de plusieurs kinases telles qu'Erk-2 et la CaMKII. Néanmoins, l'action de ces enzymes ne suffit pas à expliquer comment Ets-1 peut avoir des rôles aussi diversifiés qui semblent indiquer l'implication d'autres voies de signalisation.

L'utilisation d'une stratégie, sans *a priori*, d'identification des partenaires d'interaction d'Ets-1 nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un lien inédit entre l'activité transcriptionnelle de cette oncoprotéine et des enzymes de réparation de l'ADN, comme le complexe DNA-PK et la PARP-1, qui fonctionnent comme de véritables senseurs du stress cellulaire. En effet, leur activité varie en fonction du niveau de stress ce qui leur permet de réguler différemment leurs partenaires en fonction du contexte cellulaire. Ceci pourrait expliquer pourquoi la régulation de l'activité transcriptionnelle d'Ets-1 est tellement dépendante du contexte cellulaire et comment Ets-1 peut intervenir à la fois dans la prolifération de la cellule et dans l'apoptose. De plus, nous avons également montré qu'Ets-1 peut recruter des partenaires impliqués dans l'épissage alternatif et la maturation des ARNm. Ces données laissent penser que toutes ces protéines pourraient être rassemblées au sein d'un même complexe macromoléculaire multifonctionnel qui fonctionnerait comme un carrefour d'intégration des voies de signalisation cellulaire.

Les perspectives à la fin de cette étude sont vastes. Il faudra tout d'abord évaluer l'impact de chacun des nouveaux partenaires, dont l'interaction a été validée, sur l'activité transcriptionnelle d'Ets-1 comme nous l'avons fait avec le complexe DNA-PK et la PARP-1. D'après les données présentes dans la littérature, il semblerait que la RHA et SFPQ sont probablement des co-régulateurs positifs de l'activité transcriptionnelle d'Ets-1. En effet, la RHA stimule l'activité transcriptionnelle d'EWS-Fli-1, d'Erg et d'Er-81 (voir p. 159). Quant à SFPQ, son expression augmente lors de la cancérisation et elle stimule la transactivation de gènes cibles d'Ets-1 comme la prolactine et p16^{INK4A} (voir p. 159). Cette hypothèse pourra être confirmée par des expériences d'ARN interférence visant à réprimer l'expression de la RHA et de SFPQ au sein de cellules exprimant Ets-1. Nous pourrions alors observer les variations d'expression des gènes cibles d'Ets-1 en effectuant des expériences de RT-PCR quantitative et ainsi déterminer si l'expression de la RHA et de SFPQ favorise ou non l'activité transcriptionnelle d'Ets-1. Une fois ceci déterminé, nous pourrions alors envisager de regarder si toutes ces protéines (DNA-PK, PARP-1, RHA, SFPQ et Ets-1) se retrouvent dans un même complexe au sein de la cellule et tenter de comprendre comment elles peuvent

interagir entre elles. Ceci permettrait d'établir un modèle de régulation qui pourrait faire le lien entre l'intégration des voies de signalisation, la transcription et le contrôle de la maturation de l'ARNm transcrit.

Régulation du taux de protéine Ets-1 par l'enzyme PARP-1

Nous avons pu démontrer que la PARP-1 régule, par PARylation, le taux de protéine Ets-1 dans les cellules cancéreuses. Cette régulation permet de conserver un taux stable d'Ets-1 afin d'empêcher que son accumulation provoque dans la cellule des dommages à l'ADN ce qui aboutit à la mort cellulaire. L'ensemble des données exposées en Introduction montre que la hausse de l'activité de la PARP-1 coïncide souvent avec l'expression d'Ets-1. En effet, Ets-1 stimule la prolifération cellulaire lors de la transition G1/S du cycle cellulaire, là où l'expression de la PARP-1 est la plus forte (voir p. 70 et p. 111). L'activité de la PARP-1 est également plus élevée lors de la différenciation de l'endoderme, des lymphocytes B et des neurones (voir p. 140) ; processus dans lesquels l'expression d'Ets-1 est aussi essentielle (voir respectivement p. 51, p. 75 et p. 81).

De plus, la dérégulation de l'activité de la PARP-1 correspond de la même manière à une perturbation du taux d'Ets-1. Ainsi, lors de la sénescence réplivative, le taux de PARylation chute dans la cellule (voir p. 137) alors que la protéine Ets-1 s'accumule fortement (voir p. 71), ce qui est en parfaite corrélation avec nos résultats obtenus dans les cellules cancéreuses. Enfin, lors de l'apoptose, la PARP-1 et Ets-1 sont toutes les deux clivées par la caspase-3 afin de ne pas perturber l'aboutissement de la mort cellulaire (voir p. 72 et p. 138).

La PARP-1 et Ets-1 semblent également en relation lors de certaines pathologies. L'expression d'Ets-1 est fortement liée à de nombreux cancers (voir p. 83-84) tout comme l'augmentation de l'expression de la PARP-1 et de la PARylation (voir p. 141-142). Ce rapport se retrouve aussi dans la polyarthrite rhumatoïde et l'athérosclérose (voir p. 87-88 et p.146).

Il semblerait donc que lorsque l'activité transcriptionnelle d'Ets-1 est requise, l'activité de la PARP-1 augmente afin de compenser le stress cellulaire que pourrait provoquer l'expression de cette oncoprotéine. A l'inverse, la perturbation de cet équilibre entre l'activité transcriptionnelle d'Ets-1 et la PARylation aurait pour conséquence la sénescence ou la mort cellulaire.

Afin de comprendre comment s'établit cet équilibre, il est nécessaire de caractériser le mécanisme précis qui permet à la PARP-1 de réguler le taux d'Ets-1. Nous savons d'ores et déjà que ce mécanisme passe par la PARylation d'Ets-1 dans sa partie C-terminale. De plus, nous avons montré que l'accumulation d'Ets-1 lors de l'inhibition de la PARylation était probablement liée à un défaut de sa dégradation par le protéasome.

Tout d'abord, il serait intéressant de déterminer les sites exacts de PARylation dans la séquence d'Ets-1. Cette identification est complexe car il n'existe pas de séquence consensus de PARylation. Cependant, il est possible de déterminer par spectrométrie de masse quel fragment de la protéine Ets-1, obtenu par digestion trypsique, est PARylé. Cela permettrait de grandement réduire la zone d'investigation. Par la suite, il faudra procéder à une mutation ponctuelle et systématique de chaque acide glutamique, aspartique et lysine. Ces mutants d'Ets-1 devront alors être produits sous forme de protéines recombinantes et leur PARylation devra être évaluée *in vitro*. Il y a dix résidus d'acide glutamique, dix-neuf résidus d'acide aspartique et dix-sept résidus de lysine dans la partie C-terminale d'Ets-1. L'étape de réduction de la zone d'investigation par spectrométrie de masse paraît donc indispensable, surtout qu'il existe vingt-quatre sites de clivage potentiels pour la trypsine dans la partie C-terminale d'Ets-1 (d'après le logiciel en ligne *PeptideCutter*). Cela permettrait de réduire efficacement la zone PARylée à quelques acides aminés.

Ensuite, il faudra démontrer le lien entre la PARylation d'Ets-1 et son ubiquitination qui est responsable de sa dégradation par le protéasome. L'existence d'E3 ligases, qui ubiquitylent les protéines PARylées, va dans ce sens (voir p. 119). Afin de démontrer que l'inhibition de la PARylation peut diminuer l'ubiquitination d'Ets-1, des co-transfections transitoires peuvent être effectuées avec un vecteur d'expression d'Ets1 et un vecteur exprimant de l'ubiquitine étiquetée 6His dans des cellules HeLa. Ces cellules seront soumises ou non à l'inhibition de la PARP-1 ainsi qu'à un inhibiteur du protéasome (MG132) pour éviter la dégradation des protéines ubiquitinées. Les protéines couplées à de l'ubiquitine 6His seront ensuite purifiées. Après analyse par « *Western Blot* », la quantité d'Ets-1 ubiquitylée dans la cellule pourra alors être évaluée. Si cette quantité est inférieure lors de l'inhibition de la PARylation, ce sera la démonstration que cette modification post-traductionnelle favorise l'ubiquitination d'Ets-1.

Enfin, il serait nécessaire de savoir quelle E3 ligase pourrait être responsable de l'ubiquitination des protéines Ets-1 PARylée. Dans ce but, il faudrait tout d'abord savoir quelles E3 ligases sont exprimées dans les cellules où nous avons pu observer une accumulation d'Ets-1 lors de l'inhibition de la PARP-1 (cellules HeLa, MDA-MB-231, MCF-7 et HEK-293). Les deux plus connues sont RNF146 et CHFR. Néanmoins, d'autres E3 ligases pouvant être stimulées par la PARylation ont été identifiées [304]. Celles qui sont exprimées dans les différentes lignées cellulaires que nous avons utilisées pourront alors être réprimées par ARN interférence. Si l'une de ces enzymes est impliquée dans la dégradation d'Ets-1, sa suppression provoquera l'accumulation de l'oncoprotéine.

L'accumulation d'Ets-1 provoque l'augmentation des dommages à l'ADN lors de l'inhibition de la PARP-1

Nous avons constaté que l'accumulation d'Ets-1 lors de l'inhibition de la PARP-1 conduit à l'augmentation de dommages à l'ADN sous forme de cassures double-brin caractérisées par la phosphorylation des histones H2AX. Si nous avons pu démontrer que ces dommages étaient spécifiquement liés à Ets-1, les raisons de ce phénomène restent à éclaircir.

En tant que facteur provoquant l'inflammation et la migration cellulaire, Ets-1 est connu pour stimuler la production de ROS qui interviennent dans ces deux processus. En effet, Ets-1 permet l'expression de protéines impliquées dans la production de l'H₂O₂, comme la sous-unité du complexe NADPH oxydase, p47phox, ou dans la production de NO*, telle que l'enzyme iNOS [519, 520]. De plus, la métalloprotéase stromélysine-1 (MMP-3), dont l'expression augmente lors de l'accumulation d'Ets-1, permet l'activation du complexe NADPH et donc augmente la production d'H₂O₂ [521]. Dans l'hypothèse où l'accumulation d'Ets-1 lors de l'inhibition de la PARP-1 engendrerait une plus forte production de ROS, ceux-ci pourraient provoquer l'altération de bases qui seraient converties en cassures simple-brin de l'ADN. Comme la PARP-1 inhibée ne peut plus prendre en charge ces cassures, elles seraient converties en cassures double-brin lors de la phase S du cycle cellulaire. Afin de confirmer cette hypothèse, nous devons : (1) montrer l'augmentation d'expression de p47phox ou d'iNOS lors de l'accumulation d'Ets-1 par RT-PCR quantitative, (2) observer une plus forte production de ROS, par leur dosage, et (3) démontrer qu'il y a altération des bases

de l'ADN par l'attaque de ROS en utilisant des marqueurs spécifiques de ce genre de lésion comme la détection de 8-Oxo-2'-deoxyguanosines.

Il est également possible que l'accumulation d'Ets-1 augmente le nombre de dommages double-brin de l'ADN en accélérant le cycle cellulaire. En effet, Ets-1 favorise la transition G1/S. Cette transition permet normalement le contrôle de l'intégrité du génome avant la phase S de réplication de l'ADN. Si le fort taux d'Ets-1 permet de forcer le passage en phase S, cela pourrait provoquer l'aggravation de dommages à l'ADN déjà présents en phase G1 et qui auraient dû être réparés avant la transition vers la phase S. Pour confirmer cela, des expériences pourront être menées en cytométrie de flux afin de déterminer si les cellules, accumulant Ets-1 lors de l'inhibition de la PARP-1, ont tendance à entrer plus rapidement en phase S avant de mourir des conséquences de l'augmentation des dommages à l'ADN.

Enfin, nous ne pouvons pas écarter une implication directe d'Ets-1 dans les mécanismes de réparation de l'ADN. De très récents travaux ont montré qu'Ets-1 permettait la répression de l'expression des protéines BRCA1/2 et que cela sensibilisait les cellules à l'inhibition de la PARP-1 [497]. Ces résultats ont été obtenus par la suractivation de la voie Erk-2 qui permet de stimuler fortement l'activité transcriptionnelle d'Ets-1. Nous pouvons supposer que l'accumulation d'Ets-1 pourrait avoir les mêmes conséquences que la suractivation d'Erk-2 et donc engendrer le renforcement de la répression de l'expression de BRCA1/2. Cela pourra être confirmé par l'analyse de l'expression de BRCA1/2 par RT-PCR quantitative dans des cellules qui accumulent Ets-1 lors de l'inhibition de la PARP-1.

Utilisation des inhibiteurs de la PARP-1 dans une stratégie de ciblage des tumeurs exprimant Ets-1

Les travaux menés lors de cette Thèse laissent penser que l'expression d'Ets-1 pourrait constituer un biomarqueur de sensibilité aux inhibiteurs de la PARP-1. En effet, sous inhibition de la PARP-1, les cellules cancéreuses qui accumulent Ets-1 sont victimes de nombreux dommages à l'ADN qui les conduit à leur mort. Ces résultats sont en parfaite corrélation avec les travaux qui présentent également les protéines de fusion Ets comme biomarqueurs de sensibilité à la PARP-1 (voir p. 144-145). Néanmoins, dans le cas d'Ets-1, l'accumulation de cette oncoprotéine dans les cellules cancéreuses pourrait être un sujet

d'inquiétude quant à l'émergence de cellules résistantes au traitement par inhibition de la PARP-1, et qui pourrait être potentiellement plus agressive du fait d'un taux d'Ets-1 plus élevé. Cette possibilité doit donc être sérieusement étudiée.

Tout d'abord, Ets-1 est un facteur de transcription, et donc, son action pro-tumorale passe avant tout par la transactivation de gènes cibles qui codent pour des protéines directement impliquées dans des processus de cancérisation tels que la migration, l'invasion ou la néo-angiogenèse. Un fort taux d'Ets-1 n'a donc des conséquences pro-tumorales que si l'expression de ce genre de gènes cibles est stimulée. De plus, Ets-1 transactive également des gènes impliqués dans la sénescence et l'apoptose. Il est particulièrement intéressant de noter que ces gènes contiennent principalement des EBS de faible affinité pour Ets-1 (*caspase1*), des EBS où l'oncoprotéine est en compétition pour leur liaison avec certains de ses co-répresseurs (*p16ink4a*) ou encore des EBS dégénérés (*tp53*). Ils sont donc préférentiellement activés grâce à un fort taux d'Ets-1 dans la cellule. C'est pourquoi, une analyse par RT-PCR quantitative pourra être effectuée sur des ARNm de différents gènes cibles d'Ets-1 en présence ou non d'inhibiteurs de la PARP-1 et qui sont soit : (1) impliqués dans la cancérisation comme les métalloprotéases stromélysine-1, gélatinase-B et collagénase-1 ainsi que l'uPA, soit (2) connus pour leur activité anticancéreuse comme p16^{INK4a}, p53 ou la caspase-1. Ceci nous permettra d'évaluer la pertinence d'une thérapie anticancéreuse ciblant Ets-1 via des inhibiteurs de la PARP-1 en nous faisant présager le devenir des cellules accumulant l'oncoprotéine.

Ensuite, afin de mieux appréhender les conséquences cellulaires de l'accumulation d'Ets-1 lors de l'inhibition de la PARP-1, nous devons étudier le phénotype tumoral de cellules cancéreuses traitées par ces inhibiteurs et exprimant ou non Ets-1. Nous pourrions alors évaluer : (1) la croissance cellulaire, (2) la transformation des cellules par des expériences de croissance sans ancrage en agar mou, (3) le pouvoir invasif des cellules par des tests en chambre d'invasion MatrigelTM et (4) l'émergence de cellules résistantes au traitement et déterminer si celle-ci est due à un fort taux d'Ets-1. Ceci nous permettra de vérifier, si le ciblage des cellules cancéreuses exprimant Ets-1 par les inhibiteurs de la PARP-1, s'avère une stratégie envisageable.

Enfin, Ets-1 est impliquée dans la résistance aux agents de chimiothérapie comme le cisplatine, la doxorubicine, la gemcitabine ou encore le paclitaxel. Nous pourrions donc déterminer si l'utilisation d'inhibiteurs de la PARP-1 combinés à ces chimiothérapies permet de contourner la résistance induite par Ets-1, ou si au contraire, du fait de l'accumulation de l'oncoprotéine cette résistance augmente.

Il est essentiel d'évaluer les conséquences d'une accumulation d'Ets-1 due à l'action des inhibiteurs de la PARP-1. Si celle-ci est néfaste pour les cellules cancéreuses, non seulement l'expression d'Ets-1 serait considérée comme un biomarqueur de sensibilité au traitement, mais cela pourrait représenter également la toute première voie thérapeutique pouvant cibler spécifiquement les tumeurs exprimant Ets-1.

Etude des interactions entre Ets-1 et les deux enzymes DNA-PK et PARP-1

Nous avons pu mettre en évidence qu'Ets-1 interagit *via* son extrémité C-terminale (Ets-1 Δ N331) avec le domaine SAP de la sous-unité Ku70 ainsi qu'avec le domaine BRCT de la PARP-1.

Une perspective de cette étude serait de déterminer la structure tridimensionnelle des complexes formés par l'extrémité C-terminale d'Ets-1 avec d'une part le domaine SAP de Ku70 et d'autre part le domaine BRCT de la PARP-1. Les structures de la partie C-terminale d'Ets-1, du domaine BRCT et du domaine SAP ont été résolues soit par radiocristallographie, soit par RMN (voir p. 27 et p. 104) [516]. Par conséquent, nous pourrions tenter de co-cristalliser ces domaines en interaction afin de déterminer les zones de contact essentielles et de déterminer la structure du complexe. En outre, du fait de l'existence des données structurales pour chacun des domaines, il devrait être également possible de compléter cette approche structurale par la modélisation moléculaire des complexes. Ces études structurales devraient permettre de mettre en évidence les résidus essentiels à ces interactions. Il sera alors possible de cribler de nombreux composés chimiques, au sein des banques d'inhibiteurs d'interaction existantes, afin de trouver des molécules capables d'inhiber spécifiquement l'interaction entre Ets-1 et la PARP-1 ou entre Ets-1 et Ku70.

Ceci devrait aboutir à l'utilisation de ces inhibiteurs d'interaction pour : (1) étudier les conséquences de ces inhibitions sur le devenir cellulaire en terme de survie et de phénotypes, (2) trouver une alternative plus spécifique à l'utilisation d'inhibiteurs catalytiques de la PARP-1 ou du complexe DNA-PK pour comprendre comment ceux-ci régulent l'activité transcriptionnelle d'Ets-1 et (3) évaluer, éventuellement, l'intérêt de ces inhibitions au sein d'une stratégie thérapeutique.

En conclusion, l'identification des partenaires protéiques d'Ets-1 ainsi que la compréhension de la régulation de son activité sont essentielles pour appréhender la fonction de ce facteur mais illustrent surtout la complexité de son mode d'action. En effet, Ets-1 est très finement régulée en fonction du contexte cellulaire. La moindre perturbation de cette régulation peut aboutir à la déstabilisation de l'homéostasie de la cellule. La complexité des mécanismes qui contrôlent l'activité d'Ets-1 fait que celle-ci agira d'une façon donnée dans un contexte bien précis. Cette complexité apparaît donc, de façon paradoxale, comme un événement clef de la spécificité d'action d'Ets-1. En d'autres termes, c'est grâce à cette complexité qu'Ets-1 peut réguler spécifiquement les nombreux processus cellulaires dont il est l'effecteur.

ANNEXE

Matériel et méthode complémentaire

Clonage de la séquence codant pour le domaine BRCT de la PARP-1 dans le vecteur pGEX-2TK.

Pour produire la protéine de fusion GST-BRCT, la séquence du domaine BRCT de la PARP-1 humaine a été amplifiée par PCR en utilisant les *primers* suivants :

5'-CAGTAGGGATCCGCTGCTGTGAACTCCTCTGC-3',

5'-GTCAACGAATTCGGACAAGATGTGCGCTAAGA-3'.

Elle a ensuite été clonée, entre deux sites de restriction pour les enzymes BamHI et EcoRI, dans un vecteur d'expression procaryote pGEX-2TK (GE Healthcare®) qui permet la fusion avec la séquence de la GST en position N-terminale.

Expression et purification des protéines Ets-1 biotinylées

Les protéines Ets-1 biotinylées ont été produites grâce au principe du système Impact-T7™ adapté pour induire la biotinylation [508]. Les bactéries (*E. coli*, ER2566, New England Biolabs®) ont été transformées avec deux vecteurs, pTyb2-tag-Ets-1 et pCY216-*BirA* (codant la biotine ligase *BirA*). Plusieurs clones bactériens sont mis en culture dans 50 ml de milieu 2XTY (caséine digérée 1,6 %, extrait de levure 1 %, NaCl 0,5 %), en présence d'ampicilline (50 µg/mL), de chloramphénicol (10 µg/mL) et de glucose (0,5 %), à 30°C sous agitation rotative. Lorsque la densité optique atteint une valeur de 1, la culture est diluée au ½ en ajoutant 50 ml de milieu 2XTY, additionné d'ampicilline (50 µg/mL), de chloramphénicol (10 µg/ml), de glucose (0,5 %) et de vitamine B1 (2,5 µg/mL), puis remise sous agitation rotative à 37°C, jusqu'à atteindre sa phase exponentielle. La suspension bactérienne est ensuite centrifugée à 4 000 g durant 10 minutes. Le culot est repris dans 200 ml de milieu 2XTY, additionné d'ampicilline (50 µg/mL), de chloramphénicol (10 µg/mL), de vitamine B1 (2,5 µg/mL), de biotine (2,5 µg/mL), d'arabinose (0,01 %), et d'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) (0,3 mM) (Roche®) et mis sous agitation à 30°C pendant trois heures. Afin de purifier Ets-1 biotinylée, 200 mL de culture bactérienne sont centrifugés à 4 000 g pendant 10 minutes. Le culot est rincé dans 25 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline) et centrifugé à 2 700 g pendant 15 minutes. Le culot bactérien est ensuite repris dans 20 mL de tampon de colonne (Tris 50 mM, EDTA 0,1 mM, NaCl 150 mM, pH=8,0), en présence de

DNase I (20 µg/mL) (Roche®) et d'inhibiteurs de protéases Complete™ C (Roche®). Puis, les bactéries sont lysées grâce à l'EmulsiFlex-C3 (Avestin®). Le lysat bactérien est centrifugé à 12 000 g. Le surnageant est chargé sur une colonne de 5 mL de billes de chitine, (Chitin Beads™, New England Biolabs®). Après lavage de la colonne, les billes sont incubées dans une solution de DTT (30 mM) pendant environ 16 heures à 4 °C. Les protéines Ets-1 biotinylées sont alors éluées avec 7 mL de tampon de colonne et conservées à -80 °C.

Expression et purification des protéines étiquetées 6His et fusionnées à la GST

Les vecteurs pGEX-2TK codant pour GST-Ku80, GST-Ku70 et les différents mutants GST-Ku70 ont été obtenus auprès du Professeur Jackson, Université de Cambridge, Royaume-Uni [515]. Les vecteurs pET32a-6His-PARP-24 et pET32a-6His-PARP-89 nous ont été gracieusement fournis par le Professeur Satoh, Université de Laval, Québec, Canada [326]. Les vecteurs ont été utilisés pour la transformation de bactéries *E. coli* (BL21-(DE3)-pLysS). Plusieurs clones bactériens sont mis en culture dans 50 mL de milieu 2XTY, en présence d'ampicilline (50 µg/mL), et de glucose (0,5 %), à 30 °C sous agitation rotative. Lorsque la densité optique atteint une valeur de 1, la culture est diluée au ½ en ajoutant 50 ml de milieu 2XTY, additionné d'ampicilline (50 µg/mL), de glucose (0,5 %) et de vitamine B1 (2,5 µg/mL), puis remise sous agitation rotative à 30 °C, jusqu'à atteindre sa phase exponentielle. La suspension bactérienne est alors centrifugée à 4 000 g durant 10 minutes et le surnageant est ôté. Le culot est repris dans 200 mL de milieu 2XTY, additionné d'ampicilline (50 µg/mL), de vitamine B1 (2,5 µg/mL) et d'IPTG (0,3 mM). L'induction se déroule à 30 °C, sous agitation, durant environ 16 heures. Les bactéries sont lysées comme précédemment décrit. Pour les protéines fusionnées à la GST, elles sont purifiées sur 1 mL de billes d'agarose/glutathion (GST-bind™ Resin, Novagen®) à 4 °C, sous agitation rotative, pendant 16 heures. Après lavage de la colonne, les billes chargées de protéines fusionnées à la GST sont conservées à 4°C. Pour les protéines étiquetées 6His, elles sont purifiées sur 1 mL de billes de sépharose®/Nickel (His Catch™, Biorline®) à 4 °C, sous agitation rotative, pendant 16 heures. Après lavage de la colonne, les protéines sont éluées par une solution d'imidazole (30 mM) (Sigma-Aldrich®) et conservées à -80 °C. Les protéines étiquetées 6His sont détectées lors des « *Western Blot* » grâce à l'anticorps de lapin anti-Poly-His H-15 (Santa Cruz Biotechnology®).

GST pull-down

20 μ L de billes d'agarose/glutathion chargées des différentes protéines de fusion GST de billes sont saturées dans 100 μ L de solution de SAB (17 mg/mL) sous agitation rotative, pendant 30 minutes à 4 °C. Puis elles sont incubées soit avec 1 μ g de protéine Ets-1, soit avec 500 ng de protéine Ets-1 p27 soit avec 250 ng de protéine Δ N331 pendant 1 heure à 4°C, sous agitation rotative. Les billes sont ensuite rincées 8 fois dans 500 μ l de tampon de colonne additionné de Triton X-100 (0,5 %) et d'IGEPAL (0,5 %). Les protéines fixées sont enfin éluées par ébullition dans du tampon Laemmli.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Leprince, D., A. Gegonne, J. Coll, C. de Taisne, A. Schneeberger, C. Lagrou, and D. Stehelin (1983) *A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26*. Nature. **306**(5941): p. 395-7.
2. Nunn, M.F., P.H. Seeburg, C. Moscovici, and P.H. Duesberg (1983) *Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene*. Nature. **306**(5941): p. 391-5.
3. Radke, K., H. Beug, S. Kornfeld, and T. Graf (1982) *Transformation of both erythroid and myeloid cells by E26, an avian leukemia virus that contains the myb gene*. Cell. **31**(3 Pt 2): p. 643-53.
4. Souza, L.M., J.N. Strommer, R.L. Hillyard, M.C. Komaromy, and M.A. Baluda (1980) *Cellular sequences are present in the presumptive avian myeloblastosis virus genome*. Proc Natl Acad Sci U S A. **77**(9): p. 5177-81.
5. de Taisne, C., A. Gegonne, D. Stehelin, A. Bernheim, and R. Berger (1984) *Chromosomal localization of the human proto-oncogene c-ets*. Nature. **310**(5978): p. 581-3.
6. Gegonne, A., D. Leprince, M. Duterque-Coquillaud, B. Vandebunder, A. Flourens, J. Ghysdael, B. Debuire, and D. Stehelin (1987) *Multiple domains for the chicken cellular sequences homologous to the v-ets oncogene of the E26 retrovirus*. Mol Cell Biol. **7**(2): p. 806-12.
7. Lautenberger, J.A., L.A. Burdett, M.A. Gunnell, S. Qi, D.K. Watson, S.J. O'Brien, and T.S. Papas (1992) *Genomic dispersal of the ets gene family during metazoan evolution*. Oncogene. **7**(9): p. 1713-9.
8. Degnan, B.M., S.M. Degnan, T. Naganuma, and D.E. Morse (1993) *The ets multigene family is conserved throughout the Metazoa*. Nucleic Acids Res. **21**(15): p. 3479-84.
9. Laudet, V., C. Hanni, D. Stehelin, and M. Duterque-Coquillaud (1999) *Molecular phylogeny of the ETS gene family*. Oncogene. **18**(6): p. 1351-9.
10. Oikawa, T. and T. Yamada (2003) *Molecular biology of the Ets family of transcription factors*. Gene. **303**: p. 11-34.
11. Graves, B.J. and J.M. Petersen (1998) *Specificity within the ets family of transcription factors*. Adv Cancer Res. **75**: p. 1-55.
12. Wei, G.H., G. Badis, M.F. Berger, T. Kivioja, K. Palin, M. Enge, M. Bonke, A. Jolma, M. Varjosalo, A.R. Gehrke, J. Yan, S. Talukder, M. Turunen, M. Taipale, H.G. Stunnenberg, E. Ukkonen, T.R. Hughes, M.L. Bulyk, and J. Taipale (2010) *Genome-wide analysis of ETS-family DNA-binding in vitro and in vivo*. Embo J. **29**(13): p. 2147-60.
13. Sementchenko, V.I. and D.K. Watson (2000) *Ets target genes: past, present and future*. Oncogene. **19**(55): p. 6533-48.
14. Mackereth, C.D., M. Scharpf, L.N. Gentile, S.E. MacIntosh, C.M. Slupsky, and L.P. McIntosh (2004) *Diversity in structure and function of the Ets family PNT domains*. J Mol Biol. **342**(4): p. 1249-64.
15. Li, R., H. Pei, and D.K. Watson (2000) *Regulation of Ets function by protein - protein interactions*. Oncogene. **19**(55): p. 6514-23.
16. Tootle, T.L. and I. Rebay (2005) *Post-translational modifications influence transcription factor activity: a view from the ETS superfamily*. Bioessays. **27**(3): p. 285-98.
17. Seth, A. and D.K. Watson (2005) *ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer*. Eur J Cancer. **41**(16): p. 2462-78.
18. Donaldson, L.W., J.M. Petersen, B.J. Graves, and L.P. McIntosh (1996) *Solution structure of the ETS domain from murine Ets-1: a winged helix-turn-helix DNA binding motif*. Embo J. **15**(1): p. 125-34.
19. Garvie, C.W., J. Hagman, and C. Wolberger (2001) *Structural studies of Ets-1/Pax5 complex formation on DNA*. Mol Cell. **8**(6): p. 1267-76.
20. Werner, M.H., G.M. Clore, C.L. Fisher, R.J. Fisher, L. Trinh, J. Shiloach, and A.M. Gronenborn (1997) *Correction of the NMR structure of the ETS1/DNA complex*. J Biomol NMR. **10**(4): p. 317-28.
21. Liang, H., X. Mao, E.T. Olejniczak, D.G. Nettesheim, L. Yu, R.P. Meadows, C.B. Thompson, and S.W. Fesik (1994) *Solution structure of the ets domain of Fli-1 when bound to DNA*. Nat Struct Biol. **1**(12): p. 871-5.
22. Kodandapani, R., F. Pio, C.Z. Ni, G. Piccialli, M. Klemsz, S. McKercher, R.A. Maki, and K.R. Ely (1996) *A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS-domain-DNA complex*. Nature. **380**(6573): p. 456-60.
23. Batchelor, A.H., D.E. Piper, F.C. de la Brousse, S.L. McKnight, and C. Wolberger (1998) *The structure of GABPalpha/beta: an ETS domain- ankyrin repeat heterodimer bound to DNA*. Science. **279**(5353): p. 1037-41.

24. Mo, Y., B. Vaessen, K. Johnston, and R. Marmorstein (1998) *Structures of SAP-1 bound to DNA targets from the E74 and c-fos promoters: insights into DNA sequence discrimination by Ets proteins.* Mol Cell. **2**(2): p. 201-12.
25. Mo, Y., B. Vaessen, K. Johnston, and R. Marmorstein (2000) *Structure of the elk-1-DNA complex reveals how DNA-distal residues affect ETS domain recognition of DNA.* Nat Struct Biol. **7**(4): p. 292-7.
26. Wang, Y., L. Feng, M. Said, S. Balderman, Z. Fayazi, Y. Liu, D. Ghosh, and A.M. Gulick (2005) *Analysis of the 2.0 Å crystal structure of the protein-DNA complex of the human PDEF Ets domain bound to the prostate specific antigen regulatory site.* Biochemistry. **44**(19): p. 7095-106.
27. Goroncy, A., T. Kigawa, S. Koshiba, N. Kobayashi, N. Tochio, M. Inoue, and S. Yokoyama (2006) *Solution structure of the ETS-domain of the Ets domain transcription factor.* En préparation. (PDB : **1WXX**).
28. Hallikas, O. and J. Taipale (2006) *High-throughput assay for determining specificity and affinity of protein-DNA binding interactions.* Nat Protoc. **1**(1): p. 215-22.
29. Nye, J.A., J.M. Petersen, C.V. Gunther, M.D. Jonsen, and B.J. Graves (1992) *Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif.* Genes Dev. **6**(6): p. 975-90.
30. Bosselut, R., J. Levin, E. Adjadj, and J. Ghysdael (1993) *A single amino-acid substitution in the Ets domain alters core DNA binding specificity of Ets1 to that of the related transcription factors Elf1 and E74.* Nucleic Acids Res. **21**(22): p. 5184-91.
31. Hollenhorst, P.C., A.A. Shah, C. Hopkins, and B.J. Graves (2007) *Genome-wide analyses reveal properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family.* Genes Dev. **21**(15): p. 1882-94.
32. Choi, Y.S. and S. Sinha (2006) *Determination of the consensus DNA-binding sequence and a transcriptional activation domain for ESE-2.* Biochem J. **398**(3): p. 497-507.
33. Szymczyzna, B.R. and C.H. Arrowsmith (2000) *DNA binding specificity studies of four ETS proteins support an indirect read-out mechanism of protein-DNA recognition.* J Biol Chem. **275**(37): p. 28363-70.
34. Qiao, F. and J.U. Bowie (2005) *The many faces of SAM.* Sci STKE. **2005**(286): p. re7.
35. Slupsky, C.M., L.N. Gentile, L.W. Donaldson, C.D. Mackereth, J.J. Seidel, B.J. Graves, and L.P. McIntosh (1998) *Structure of the Ets-1 pointed domain and mitogen-activated protein kinase phosphorylation site.* Proc Natl Acad Sci U S A. **95**(21): p. 12129-34.
36. Kim, C.A., M.L. Phillips, W. Kim, M. Gingery, H.H. Tran, M.A. Robinson, S. Faham, and J.U. Bowie (2001) *Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression.* Embo J. **20**(15): p. 4173-82.
37. Seidel, J.J. and B.J. Graves (2002) *An ERK2 docking site in the Pointed domain distinguishes a subset of ETS transcription factors.* Genes Dev. **16**(1): p. 127-37.
38. Carrere, S., A. Verger, A. Flourens, D. Stehelin, and M. Duterque-Coquillaud (1998) *Erg proteins, transcription factors of the Ets family, form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains.* Oncogene. **16**(25): p. 3261-8.
39. Abramczyk, O., M.A. Rainey, R. Barnes, L. Martin, and K.N. Dalby (2007) *Expanding the repertoire of an ERK2 recruitment site: cysteine footprinting identifies the D-recruitment site as a mediator of Ets-1 binding.* Biochemistry. **46**(32): p. 9174-86.
40. Gegonne, A., B. Punyammalee, B. Rabault, R. Bosselut, S. Seneca, M. Crabeel, and J. Ghysdael (1992) *Analysis of the DNA binding and transcriptional activation properties of the Ets1 oncoprotein.* New Biol. **4**(5): p. 512-9.
41. Garnier, J., J.F. Gibrat, and B. Robson (1996) *GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence.* Methods Enzymol. **266**: p. 540-53.
42. Mitchell, P.J. and R. Tjian (1989) *Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins.* Science. **245**(4916): p. 371-8.
43. Augustijn, K.D., D.L. Duval, R. Wechselberger, R. Kaptein, A. Gutierrez-Hartmann, and P.C. van der Vliet (2002) *Structural characterization of the PIT-1/ETS-1 interaction: PIT-1 phosphorylation regulates PIT-1/ETS-1 binding.* Proc Natl Acad Sci U S A. **99**(20): p. 12657-62.
44. Bradford, A.P., C. Wasylyk, B. Wasylyk, and A. Gutierrez-Hartmann (1997) *Interaction of Ets-1 and the POU-homeodomain protein GHF-1/Pit-1 reconstitutes pituitary-specific gene expression.* Mol Cell Biol. **17**(3): p. 1065-74.
45. Garvie, C.W., M.A. Pufall, B.J. Graves, and C. Wolberger (2002) *Structural analysis of the autoinhibition of Ets-1 and its role in protein partnerships.* J Biol Chem. **277**(47): p. 45529-36.
46. Lee, G.M., L.W. Donaldson, M.A. Pufall, H.S. Kang, I. Pot, B.J. Graves, and L.P. McIntosh (2005) *The structural and dynamic basis of Ets-1 DNA binding autoinhibition.* J Biol Chem. **280**(8): p. 7088-99.

47. Skalicky, J.J., L.W. Donaldson, J.M. Petersen, B.J. Graves, and L.P. McIntosh (1996) *Structural coupling of the inhibitory regions flanking the ETS domain of murine Ets-1*. Protein Sci. **5**(2): p. 296-309.
48. Hagman, J. and R. Grosschedl (1992) *An inhibitory carboxyl-terminal domain in Ets-1 and Ets-2 mediates differential binding of ETS family factors to promoter sequences of the mb-1 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A. **89**(19): p. 8889-93.
49. Lim, F., N. Kraut, J. Framptom, and T. Graf (1992) *DNA binding by c-Ets-1, but not v-Ets, is repressed by an intramolecular mechanism*. Embo J. **11**(2): p. 643-52.
50. Jonsen, M.D., J.M. Petersen, Q.P. Xu, and B.J. Graves (1996) *Characterization of the cooperative function of inhibitory sequences in Ets-1*. Mol Cell Biol. **16**(5): p. 2065-73.
51. Pufall, M.A. and B.J. Graves (2002) *Autoinhibitory domains: modular effectors of cellular regulation*. Annu Rev Cell Dev Biol. **18**: p. 421-62.
52. Gangwar, S.P., S. Dey, and A.K. Saxena (2012) *Structural modeling and DNA binding autoinhibition analysis of ergp55, a critical transcription factor in prostate cancer*. PLoS One. **7**(6): p. e39850.
53. Green, S.M., H.J. Coyne, 3rd, L.P. McIntosh, and B.J. Graves (2010) *DNA binding by the ETS protein TEL (ETV6) is regulated by autoinhibition and self-association*. J Biol Chem. **285**(24): p. 18496-504.
54. Myszka, D.G., M.D. Jonsen, and B.J. Graves (1998) *Equilibrium analysis of high affinity interactions using BIACORE*. Anal Biochem. **265**(2): p. 326-30.
55. Bellacosa, A., K. Datta, S.E. Bear, C. Patriotis, P.A. Lazo, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, and P.N. Tsichlis (1994) *Effects of provirus integration in the Tpl-1/Ets-1 locus in Moloney murine leukemia virus-induced rat T-cell lymphomas: levels of expression, polyadenylation, transcriptional initiation, and differential splicing of the Ets-1 mRNA*. J Virol. **68**(4): p. 2320-30.
56. Jorcyk, C.L., D.K. Watson, G.J. Mavrothalassitis, and T.S. Papas (1991) *The human ETS1 gene: genomic structure, promoter characterization and alternative splicing*. Oncogene. **6**(4): p. 523-32.
57. Majerus, M.A., F. Bibollet-Ruche, J.B. Telliez, B. Wasyluk, and B. Bailleul (1992) *Serum, AP-1 and Ets-1 stimulate the human ets-1 promoter*. Nucleic Acids Res. **20**(11): p. 2699-703.
58. Barrett, J.M., M.A. Puglia, G. Singh, and R.G. Tozer (2002) *Expression of Ets-related transcription factors and matrix metalloproteinase genes in human breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat. **72**(3): p. 227-32.
59. Naito, S., S. Shimizu, S. Maeda, J. Wang, R. Paul, and J.A. Fagin (1998) *Ets-1 is an early response gene activated by ET-1 and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol. **274**(2 Pt 1): p. C472-80.
60. Wang, D.Y., V.C. Yang, and J.K. Chen (1997) *Oxidized LDL inhibits vascular endothelial cell morphogenesis in culture*. In Vitro Cell Dev Biol Anim. **33**(4): p. 248-55.
61. Seth, A. and T.S. Papas (1990) *The c-ets-1 proto-oncogene has oncogenic activity and is positively autoregulated*. Oncogene. **5**(12): p. 1761-7.
62. Chen, J.H. and C.D. Wright (1993) *PEA3, Oct 1 and Oct 2 positively regulate the human ETS1 promoter*. Oncogene. **8**(12): p. 3375-83.
63. Oka, T., A. Rairkar, and J.H. Chen (1991) *Structural and functional analysis of the regulatory sequences of the ets-1 gene*. Oncogene. **6**(11): p. 2077-83.
64. So, E.N. and D.L. Crowe (2000) *Characterization of a retinoic acid responsive element in the human ets-1 promoter*. IUBMB Life. **50**(6): p. 365-70.
65. Wilson, L.A., A. Gemin, R. Espiritu, and G. Singh (2005) *ets-1 is transcriptionally up-regulated by H2O2 via an antioxidant response element*. Faseb J. **19**(14): p. 2085-7.
66. Oikawa, M., M. Abe, H. Kurosawa, W. Hida, K. Shirato, and Y. Sato (2001) *Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1*. Biochem Biophys Res Commun. **289**(1): p. 39-43.
67. Chen, J.H., S. Jeha, and T. Oka (1993) *Negative regulatory elements in the human ETS1 gene promoter*. Oncogene. **8**(1): p. 133-9.
68. Heinemeyer, T., E. Wingender, I. Reuter, H. Hermjakob, A.E. Kel, O.V. Kel, E.V. Ignatieva, E.A. Ananko, O.A. Podkolodnaya, F.A. Kolpakov, N.L. Podkolodny, and N.A. Kolchanov (1998) *Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL*. Nucleic Acids Res. **26**(1): p. 362-7.
69. Gordon, S., G. Akopyan, H. Garban, and B. Bonavida (2006) *Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology*. Oncogene. **25**(8): p. 1125-42.
70. Iotsova, V., P. Crepieux, C. Montpellier, V. Laudet, and D. Stehelin (1996) *TATA-less promoters of some Ets-family genes are efficiently repressed by wild-type p53*. Oncogene. **13**(11): p. 2331-7.
71. Raouf, A., V. Li, I. Kola, D.K. Watson, and A. Seth (2000) *The Ets1 proto-oncogene is upregulated by retinoic acid: characterization of a functional retinoic acid response element in the Ets1 promoter*. Oncogene. **19**(15): p. 1969-74.

72. Vary, C.P., V. Li, A. Raouf, R. Kitching, I. Kola, C. Franceschi, M. Venanzoni, and A. Seth (2000) *Involvement of Ets transcription factors and targets in osteoblast differentiation and matrix mineralization*. *Exp Cell Res*. **257**(1): p. 213-22.
73. Ohnishi, Y., O. Lieger, M. Attygalla, T. Iizuka, and K. Kakudo (2008) *Effects of epidermal growth factor on the invasion activity of the oral cancer cell lines HSC3 and SAS*. *Oral Oncol*. **44**(12): p. 1155-9.
74. Watabe, T., K. Yoshida, M. Shindoh, M. Kaya, K. Fujikawa, H. Sato, M. Seiki, S. Ishii, and K. Fujinaga (1998) *The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor*. *Int J Cancer*. **77**(1): p. 128-37.
75. Gilles, F., M.B. Raes, D. Stehelin, B. Vandenbunder, and V. Fafeur (1996) *The c-ets-1 proto-oncogene is a new early-response gene differentially regulated by cytokines and growth factors in human fibroblasts*. *Exp Cell Res*. **222**(2): p. 370-8.
76. Iwasaka, C., K. Tanaka, M. Abe, and Y. Sato (1996) *Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells*. *J Cell Physiol*. **169**(3): p. 522-31.
77. Liu, S., Y. Liang, H. Huang, L. Wang, Y. Li, J. Li, X. Li, and H. Wang (2005) *ERK-dependent signaling pathway and transcriptional factor Ets-1 regulate matrix metalloproteinase-9 production in transforming growth factor-beta1 stimulated glomerular podocytes*. *Cell Physiol Biochem*. **16**(4-6): p. 207-16.
78. Fafeur, V., D. Tulasne, C. Queva, C. Vercamer, V. Dimster, V. Mattot, D. Stehelin, X. Desbiens, and B. Vandenbunder (1997) *The ETS1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter factor-stimulated MDCK epithelial cells*. *Cell Growth Differ*. **8**(6): p. 655-65.
79. Tanaka, K., M. Abe, and Y. Sato (1999) *Roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the signal transduction of basic fibroblast growth factor in endothelial cells during angiogenesis*. *Jpn J Cancer Res*. **90**(6): p. 647-54.
80. Watanabe, D., H. Takagi, K. Suzuma, I. Suzuma, H. Oh, H. Ohashi, S. Kemmochi, A. Uemura, T. Ojima, E. Suganami, N. Miyamoto, Y. Sato, and Y. Honda (2004) *Transcription factor Ets-1 mediates ischemia- and vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization*. *Am J Pathol*. **164**(5): p. 1827-35.
81. Naito, T., Y. Tanihata, H. Nishimura, T. Tanaka, C. Higuchi, T. Taguchi, and T. Sanaka (2005) *Expression of matrix metalloproteinase-9 associated with ets-1 proto-oncogene in rat tubulointerstitial cells*. *Nephrol Dial Transplant*. **20**(11): p. 2333-48.
82. Goetze, S., U. Kintscher, K. Kaneshiro, W.P. Meehan, A. Collins, E. Fleck, W.A. Hsueh, and R.E. Law (2001) *TNFalpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2*. *Atherosclerosis*. **159**(1): p. 93-101.
83. Stamatovic, S.M., R.F. Keep, M. Mostarica-Stojkovic, and A.V. Andjelkovic (2006) *CCL2 regulates angiogenesis via activation of Ets-1 transcription factor*. *J Immunol*. **177**(4): p. 2651-61.
84. Naito, S., S. Shimizu, M. Matsuu, M. Nakashima, T. Nakayama, S. Yamashita, and I. Sekine (2002) *Ets-1 upregulates matrix metalloproteinase-1 expression through extracellular matrix adhesion in vascular endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*. **291**(1): p. 130-8.
85. Znoyko, I., M. Trojanowska, and A. Reuben (2006) *Collagen binding alpha2beta1 and alpha1beta1 integrins play contrasting roles in regulation of Ets-1 expression in human liver myofibroblasts*. *Mol Cell Biochem*. **282**(1-2): p. 89-99.
86. Ghosh, S., M. Basu, and S.S. Roy (2012) *ETS-1 protein regulates vascular endothelial growth factor-induced matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-13 expression in human ovarian carcinoma cell line SKOV-3*. *J Biol Chem*. **287**(18): p. 15001-15.
87. Smith, A.M., V.J. Findlay, S.G. Bandurraga, E. Kistner-Griffin, L.S. Spruill, A. Liu, A.R. Golshayan, and D.P. Turner (2012) *ETS1 transcriptional activity is increased in advanced prostate cancer and promotes the castrate-resistant phenotype*. *Carcinogenesis*. **33**(3): p. 572-80.
88. Lincoln, D.W., 2nd, P.G. Phillips, and K. Bove (2003) *Estrogen-induced Ets-1 promotes capillary formation in an in vitro tumor angiogenesis model*. *Breast Cancer Res Treat*. **78**(2): p. 167-78.
89. Pearse, D.D., R.X. Tian, J. Nigro, J.B. Iorgulescu, L. Puzis, and E.A. Jaimes (2008) *Angiotensin II increases the expression of the transcription factor ETS-1 in mesangial cells*. *Am J Physiol Renal Physiol*. **294**(5): p. F1094-100.
90. Shimizu, S., M. Kageyama, M. Yasuda, D. Sasaki, S. Naito, T. Yamamoto, and Y. Kiuchi (2004) *Stimulation of in vitro angiogenesis by nitric oxide through the induction of transcription factor ETS-1*. *Int J Biochem Cell Biol*. **36**(1): p. 114-22.

91. Ogawa, D., T. Nomiya, T. Nakamachi, E.B. Heywood, J.F. Stone, J.P. Berger, R.E. Law, and D. Brummer (2006) *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses telomerase activity in vascular smooth muscle cells*. *Circ Res.* **98**(7): p. e50-9.
92. Goetze, S., U. Kintscher, S. Kim, W.P. Meehan, K. Kaneshiro, A.R. Collins, E. Fleck, W.A. Hsueh, and R.E. Law (2001) *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit nuclear but not cytosolic extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase-regulated steps in vascular smooth muscle cell migration*. *J Cardiovasc Pharmacol.* **38**(6): p. 909-21.
93. Igarashi, T., M. Abe, M. Oikawa, T. Nukiwa, and Y. Sato (2001) *Retinoic acids repress the expression of ETS-1 in endothelial cells*. *Tohoku J Exp Med.* **194**(1): p. 35-43.
94. Schroen, D.J. and C.E. Brinckerhoff (1996) *Inhibition of rabbit collagenase (matrix metalloproteinase-1; MMP-1) transcription by retinoid receptors: evidence for binding of RARs/RXRs to the -77 AP-1 site through interactions with c-Jun*. *J Cell Physiol.* **169**(2): p. 320-32.
95. Collyn d'Hooghe, M., S. Galiegue-Zouitina, D. Szymiczek, D. Lantoine, S. Quief, M.H. Loucheux-Lefebvre, and J.P. Kerckaert (1993) *Quantitative and qualitative variation of ETS-1 transcripts in hematologic malignancies*. *Leukemia.* **7**(11): p. 1777-85.
96. Laitem, C., G. Leprivier, S. Choul-Li, A. Begue, D. Monte, D. Larsimont, P. Dumont, M. Duterque-Coquillaud, and M. Aumercier (2009) *Ets-1 p27: a novel Ets-1 isoform with dominant-negative effects on the transcriptional properties and the subcellular localization of Ets-1 p51*. *Oncogene.* **28**(20): p. 2087-99.
97. Reddy, E.S. and V.N. Rao (1988) *Structure, expression and alternative splicing of the human c-ets-1 proto-oncogene*. *Oncogene Res.* **3**(3): p. 239-46.
98. Lionneton, F., E. Lelievre, D. Baillat, D. Stehelin, and F. Soncin (2003) *Characterization and functional analysis of the p42Ets-1 variant of the mouse Ets-1 transcription factor*. *Oncogene.* **22**(57): p. 9156-64.
99. Pogoniec, P., K.E. Boulukos, R. Bosselut, C. Boyer, A.M. Schmitt-Verhulst, and J. Ghysdael (1990) *Identification of a Ets1 variant protein unaffected in its chromatin and in vitro DNA binding capacities by T cell antigen receptor triggering and intracellular calcium rises*. *Oncogene.* **5**(4): p. 603-10.
100. Koizumi, S., R.J. Fisher, S. Fujiwara, C. Jorczyk, N.K. Bhat, A. Seth, and T.S. Papas (1990) *Isoforms of the human ets-1 protein: generation by alternative splicing and differential phosphorylation*. *Oncogene.* **5**(5): p. 675-81.
101. Huang, C.C., T.S. Papas, and N.K. Bhat (1997) *A variant form of ETS1 induces apoptosis in human colon cancer cells*. *Oncogene.* **15**(7): p. 851-6.
102. Li, R., H. Pei, and T. Papas (1999) *The p42 variant of ETS1 protein rescues defective Fas-induced apoptosis in colon carcinoma cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(7): p. 3876-81.
103. Ballschmieter, P., M. Braig, R.K. Lindemann, A. Nordheim, and J. Dittmer (2003) *Splicing variant DeltaVII-Ets1 is downregulated in invasive Ets1-expressing breast cancer cells*. *Int J Oncol.* **22**(4): p. 849-53.
104. Buggy, Y., T.M. Maguire, G. McGreal, E. McDermott, A.D. Hill, N. O'Higgins, and M.J. Duffy (2004) *Overexpression of the Ets-1 transcription factor in human breast cancer*. *Br J Cancer.* **91**(7): p. 1308-15.
105. Shaikhibrahim, Z., J. Ochsenfahrt, K. Fuchs, and N. Wernert (2012) *Novel identification of the ETS-1 splice variants p42 and p27 in prostate cancer cell lines*. *Oncol Rep.* **27**(5): p. 1321-4.
106. Fleischman, L.F., L. Holtzelaw, J.T. Russell, G. Mavrothalassitis, and R.J. Fisher (1995) *ets-1 in astrocytes: expression and transmitter-evoked phosphorylation*. *Mol Cell Biol.* **15**(2): p. 925-31.
107. Pei, H., C. Li, Y. Adereth, T. Hsu, D.K. Watson, and R. Li (2005) *Caspase-1 is a direct target gene of ETS1 and plays a role in ETS1-induced apoptosis*. *Cancer Res.* **65**(16): p. 7205-13.
108. Higuchi, T., F.O. Bartel, M. Masuya, T. Deguchi, K.W. Henderson, R. Li, R.C. Muisse-Helmericks, M.J. Kern, D.K. Watson, and D.D. Spyropoulos (2007) *Thymomegaly, microsplenias, and defective homeostatic proliferation of peripheral lymphocytes in p51-Ets1 isoform-specific null mice*. *Mol Cell Biol.* **27**(9): p. 3353-66.
109. Inui, M., G. Martello, and S. Piccolo (2010) *MicroRNA control of signal transduction*. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11**(4): p. 252-63.
110. Bentwich, I., A. Avniel, Y. Karov, R. Aharonov, S. Gilad, O. Barad, A. Barzilai, P. Einat, U. Einav, E. Meiri, E. Sharon, Y. Spector, and Z. Bentwich (2005) *Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs*. *Nat Genet.* **37**(7): p. 766-70.
111. Gill, J.G., E.M. Langer, R.C. Lindsley, M. Cai, T.L. Murphy, and K.M. Murphy (2012) *Snail promotes the cell-autonomous generation of Flk1(+) endothelial cells through the repression of the microRNA-200 family*. *Stem Cells Dev.* **21**(2): p. 167-76.
112. Chan, Y.C., S. Khanna, S. Roy, and C.K. Sen (2011) *miR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induce angiogenic response of endothelial cells*. *J Biol Chem.* **286**(3): p. 2047-56.

113. Hur, K., Y. Toiyama, M. Takahashi, F. Balaguer, T. Nagasaka, J. Koike, H. Hemmi, M. Koi, C.R. Boland, and A. Goel (2012) *MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis*. Gut. **Epub ahead of print**.
114. Zhu, N., D. Zhang, S. Chen, X. Liu, L. Lin, X. Huang, Z. Guo, J. Liu, Y. Wang, W. Yuan, and Y. Qin (2011) *Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration*. Atherosclerosis. **215**(2): p. 286-93.
115. Wu, Y.H., T.F. Hu, Y.C. Chen, Y.N. Tsai, Y.H. Tsai, C.C. Cheng, and H.W. Wang (2011) *The manipulation of miRNA-gene regulatory networks by KSHV induces endothelial cell motility*. Blood. **118**(10): p. 2896-905.
116. Mattia, G., M.C. Errico, F. Felicetti, M. Petrini, L. Bottero, L. Tomasello, P. Romania, A. Boe, P. Segnalini, A. Di Virgilio, M.P. Colombo, and A. Care (2011) *Constitutive activation of the ETS-1-miR-222 circuitry in metastatic melanoma*. Pigment Cell Melanoma Res. **24**(5): p. 953-65.
117. Itoh, T., M. Ando, Y. Tsukamasa, and Y. Akao (2012) *Expression of BMP-2 and Ets1 in BMP-2-stimulated mouse pre-osteoblast differentiation is regulated by microRNA-370*. FEBS Lett. **586**(12): p. 1693-701.
118. Itoh, T., S. Takeda, and Y. Akao (2010) *MicroRNA-208 modulates BMP-2-stimulated mouse preosteoblast differentiation by directly targeting V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*. J Biol Chem. **285**(36): p. 27745-52.
119. Romania, P., V. Lulli, E. Pelosi, M. Biffoni, C. Peschle, and G. Marzali (2008) *MicroRNA 155 modulates megakaryopoiesis at progenitor and precursor level by targeting Ets-1 and Meis1 transcription factors*. Br J Haematol. **143**(4): p. 570-80.
120. Du, C., C. Liu, J. Kang, G. Zhao, Z. Ye, S. Huang, Z. Li, Z. Wu, and G. Pei (2009) *MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis*. Nat Immunol. **10**(12): p. 1252-9.
121. Zhang, Y., L.X. Yan, Q.N. Wu, Z.M. Du, J. Chen, D.Z. Liao, M.Y. Huang, J.H. Hou, Q.L. Wu, M.S. Zeng, W.L. Huang, Y.X. Zeng, and J.Y. Shao (2011) *miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer*. Cancer Res. **71**(10): p. 3552-62.
122. Wei, W., Z. Hu, H. Fu, Y. Tie, H. Zhang, Y. Wu, and X. Zheng (2012) *MicroRNA-1 and microRNA-499 downregulate the expression of the ets1 proto-oncogene in HepG2 cells*. Oncol Rep. **28**(2): p. 701-6.
123. Xu, C., S. Liu, H. Fu, S. Li, Y. Tie, J. Zhu, R. Xing, Y. Jin, Z. Sun, and X. Zheng (2010) *MicroRNA-193b regulates proliferation, migration and invasion in human hepatocellular carcinoma cells*. Eur J Cancer. **46**(15): p. 2828-36.
124. Huang, C., K. Jacobson, and M.D. Schaller (2004) *MAP kinases and cell migration*. J Cell Sci. **117**(Pt 20): p. 4619-28.
125. Zhang, W. and H.T. Liu (2002) *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*. Cell Res. **12**(1): p. 9-18.
126. Yang, B.S., C.A. Hauser, G. Henkel, M.S. Colman, C. Van Beveren, K.J. Stacey, D.A. Hume, R.A. Maki, and M.C. Ostrowski (1996) *Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2*. Mol Cell Biol. **16**(2): p. 538-47.
127. Dalle, S., T. Martin-Denavit, and L. Thomas (2006) *[Genotypic hypervariability of melanoma: a therapeutic challenge]*. Med Sci (Paris). **22**(2): p. 178-82.
128. Cowley, D.O. and B.J. Graves (2000) *Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition*. Genes Dev. **14**(3): p. 366-76.
129. Paumelle, R., D. Tulasne, Z. Kherrouche, S. Plaza, C. Leroy, S. Reveneau, B. Vandebunder, and V. Fafeur (2002) *Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway*. Oncogene. **21**(15): p. 2309-19.
130. Yordy, J.S. and R.C. Muike-Helmericks (2000) *Signal transduction and the Ets family of transcription factors*. Oncogene. **19**(55): p. 6503-13.
131. Wasylyk, B., C. Wasylyk, P. Flores, A. Begue, D. Leprince, and D. Stehelin (1990) *The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation*. Nature. **346**(6280): p. 191-3.
132. Bradford, A.P., K.E. Conrad, P.H. Tran, M.C. Ostrowski, and A. Gutierrez-Hartmann (1996) *GHF-1/Pit-1 functions as a cell-specific integrator of Ras signaling by targeting the Ras pathway to a composite Ets-1/GHF-1 response element*. J Biol Chem. **271**(40): p. 24639-48.
133. Bradford, A.P., K.E. Conrad, C. Wasylyk, B. Wasylyk, and A. Gutierrez-Hartmann (1995) *Functional interaction of c-Ets-1 and GHF-1/Pit-1 mediates Ras activation of pituitary-specific gene expression: mapping of the essential c-Ets-1 domain*. Mol Cell Biol. **15**(5): p. 2849-57.

134. Foulds, C.E., M.L. Nelson, A.G. Blaszcak, and B.J. Graves (2004) *Ras/mitogen-activated protein kinase signaling activates Ets-1 and Ets-2 by CBP/p300 recruitment*. Mol Cell Biol. **24**(24): p. 10954-64.
135. Jayaraman, G., R. Srinivas, C. Duggan, E. Ferreira, S. Swaminathan, K. Somasundaram, J. Williams, C. Hauser, M. Kurkinen, R. Dhar, S. Weitzman, G. Buttice, and B. Thimmapaya (1999) *p300/cAMP-responsive element-binding protein interactions with ets-1 and ets-2 in the transcriptional activation of the human stromelysin promoter*. J Biol Chem. **274**(24): p. 17342-52.
136. Lindemann, R.K., M. Braig, P. Ballschmieter, T.A. Guise, A. Nordheim, and J. Dittmer (2003) *Protein kinase Calpha regulates Ets1 transcriptional activity in invasive breast cancer cells*. Int J Oncol. **22**(4): p. 799-805.
137. Vetter, M., S.G. Blumenthal, R.K. Lindemann, J. Manns, S. Wesselborg, C. Thomssen, and J. Dittmer (2005) *Ets1 is an effector of protein kinase Calpha in cancer cells*. Oncogene. **24**(4): p. 650-61.
138. Choul-li, S., H. Drobecq, and M. Aumercier (2009) *DNA-dependent protein kinase is a novel interaction partner for Ets-1 isoforms*. Biochem Biophys Res Commun. **390**(3): p. 839-44.
139. Marangoni, E., N. Foray, M. O'Driscoll, S. Douc-Rasy, J. Bernier, J. Bourhis, and P. Jeggo (2000) *A Ku80 fragment with dominant negative activity imparts a radiosensitive phenotype to CHO-K1 cells*. Nucleic Acids Res. **28**(23): p. 4778-82.
140. Pufall, M.A., G.M. Lee, M.L. Nelson, H.S. Kang, A. Velyvis, L.E. Kay, L.P. McIntosh, and B.J. Graves (2005) *Variable control of Ets-1 DNA binding by multiple phosphates in an unstructured region*. Science. **309**(5731): p. 142-5.
141. Rabault, B. and J. Ghysdael (1994) *Calcium-induced phosphorylation of ETS1 inhibits its specific DNA binding activity*. J Biol Chem. **269**(45): p. 28143-51.
142. Carafoli, E. (2004) *Calcium signaling: a historical account*. Biol Res. **37**(4): p. 497-505.
143. Bayer, K.U. and H. Schulman (2001) *Regulation of signal transduction by protein targeting: the case for CaMKII*. Biochem Biophys Res Commun. **289**(5): p. 917-23.
144. Fink, C.C. and T. Meyer (2002) *Molecular mechanisms of CaMKII activation in neuronal plasticity*. Curr Opin Neurobiol. **12**(3): p. 293-9.
145. Fisher, C.L., J. Ghysdael, and J.C. Cambier (1991) *Ligation of membrane Ig leads to calcium-mediated phosphorylation of the proto-oncogene product, Ets-1*. J Immunol. **146**(6): p. 1743-9.
146. Valentine, M.A., A.J. Czernik, N. Rachie, H. Hidaka, C.L. Fisher, J.C. Cambier, and K. Bomsztyk (1995) *Anti-immunoglobulin M activates nuclear calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in human B lymphocytes*. J Exp Med. **182**(6): p. 1943-9.
147. Liu, H. and T. Grundstrom (2002) *Calcium regulation of GM-CSF by calmodulin-dependent kinase II phosphorylation of Ets1*. Mol Biol Cell. **13**(12): p. 4497-507.
148. Baillat, D., A. Begue, D. Stehelin, and M. Aumercier (2002) *ETS-1 transcription factor binds cooperatively to the palindromic head to head ETS-binding sites of the stromelysin-1 promoter by counteracting autoinhibition*. J Biol Chem. **277**(33): p. 29386-98.
149. Bohren, K.M., V. Nadkarni, J.H. Song, K.H. Gabbay, and D. Owerbach (2004) *A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus*. J Biol Chem. **279**(26): p. 27233-8.
150. Hay, R.T. (2005) *SUMO: a history of modification*. Mol Cell. **18**(1): p. 1-12.
151. Rodriguez, M.S., C. Dargemont, and R.T. Hay (2001) *SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting*. J Biol Chem. **276**(16): p. 12654-9.
152. Gill, G. (2004) *SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?* Genes Dev. **18**(17): p. 2046-59.
153. Pickart, C.M. (2001) *Mechanisms underlying ubiquitination*. Annu Rev Biochem. **70**: p. 503-33.
154. Wilson, V.G. and P.R. Heaton (2008) *Ubiquitin proteolytic system: focus on SUMO*. Expert Rev Proteomics. **5**(1): p. 121-35.
155. Guo, B., S.H. Yang, J. Witty, and A.D. Sharrocks (2007) *Signalling pathways and the regulation of SUMO modification*. Biochem Soc Trans. **35**(Pt 6): p. 1414-8.
156. Ji, Z., C. Degerny, N. Vintonenko, J. Deheuninck, B. Foveau, C. Leroy, J. Coll, D. Tulasne, J.L. Baert, and V. Fafeur (2007) *Regulation of the Ets-1 transcription factor by sumoylation and ubiquitinylation*. Oncogene. **26**(3): p. 395-406.
157. Nishida, T., M. Terashima, and K. Fukami (2006) *PIASy-mediated repression of the Ets-1 is independent of its sumoylation*. Biochem Biophys Res Commun. **345**(4): p. 1536-46.
158. Macauley, M.S., W.J. Errington, M. Scharpf, C.D. Mackereth, A.G. Blaszcak, B.J. Graves, and L.P. McIntosh (2006) *Beads-on-a-string, characterization of ETS-1 sumoylated within its flexible N-terminal sequence*. J Biol Chem. **281**(7): p. 4164-72.
159. Hahn, S.L., B. Wasyluk, and P. Criqui-Filipe (1997) *Modulation of ETS-1 transcriptional activity by huUBC9, a ubiquitin-conjugating enzyme*. Oncogene. **15**(12): p. 1489-95.

160. Nishida, T., M. Terashima, K. Fukami, and Y. Yamada (2007) *PIASy controls ubiquitination-dependent proteasomal degradation of Ets-1*. *Biochem J.* **405**(3): p. 481-8.
161. Escobar-Cabrera, E., M. Okon, D.K. Lau, C.F. Dart, A.M. Bonvin, and L.P. McIntosh (2011) *Characterizing the N- and C-terminal Small ubiquitin-like modifier (SUMO)-interacting motifs of the scaffold protein DAXX*. *J Biol Chem.* **286**(22): p. 19816-29.
162. Li, R., H. Pei, D.K. Watson, and T.S. Papas (2000) *EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS1 target genes*. *Oncogene.* **19**(6): p. 745-53.
163. Murakami, Y., S. Yamagoe, K. Noguchi, Y. Takebe, N. Takahashi, Y. Uehara, and H. Fukazawa (2006) *Ets-1-dependent expression of vascular endothelial growth factor receptors is activated by latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through interaction with Daxx*. *J Biol Chem.* **281**(38): p. 28113-21.
164. Yang, C., L.H. Shapiro, M. Rivera, A. Kumar, and P.K. Brindle (1998) *A role for CREB binding protein and p300 transcriptional coactivators in Ets-1 transactivation functions*. *Mol Cell Biol.* **18**(4): p. 2218-29.
165. Kalkhoven, E. (2004) *CBP and p300: HATs for different occasions*. *Biochem Pharmacol.* **68**(6): p. 1145-55.
166. Czuwara-Ladykowska, J., V.I. Sementchenko, D.K. Watson, and M. Trojanowska (2002) *Ets1 is an effector of the transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling pathway and an antagonist of the profibrotic effects of TGF-beta*. *J Biol Chem.* **277**(23): p. 20399-408.
167. Lee, C.G., H.K. Kwon, A. Sahoo, W. Hwang, J.S. So, J.S. Hwang, C.S. Chae, G.C. Kim, J.E. Kim, H.S. So, E.S. Hwang, R. Grenningloh, I.C. Ho, and S.H. Im (2012) *Interaction of Ets-1 with HDAC1 represses IL-10 expression in Th1 cells*. *J Immunol.* **188**(5): p. 2244-53.
168. Dickinson, L.A., J.W. Trauger, E.E. Baird, P.B. Dervan, B.J. Graves, and J.M. Gottesfeld (1999) *Inhibition of Ets-1 DNA binding and ternary complex formation between Ets-1, NF-kappaB, and DNA by a designed DNA-binding ligand*. *J Biol Chem.* **274**(18): p. 12765-73.
169. Kim, W.Y., M. Sieweke, E. Ogawa, H.J. Wee, U. Englmeier, T. Graf, and Y. Ito (1999) *Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains*. *Embo J.* **18**(6): p. 1609-20.
170. Tian, G., B. Erman, H. Ishii, S.S. Gangopadhyay, and R. Sen (1999) *Transcriptional activation by ETS and leucine zipper-containing basic helix-loop-helix proteins*. *Mol Cell Biol.* **19**(4): p. 2946-57.
171. Wheat, W., D. Fitzsimmons, H. Lennox, S.R. Krautkramer, L.N. Gentile, L.P. McIntosh, and J. Hagman (1999) *The highly conserved beta-hairpin of the paired DNA-binding domain is required for assembly of Pax-Ets ternary complexes*. *Mol Cell Biol.* **19**(3): p. 2231-41.
172. Fitzsimmons, D., R. Lutz, W. Wheat, H.M. Chamberlin, and J. Hagman (2001) *Highly conserved amino acids in Pax and Ets proteins are required for DNA binding and ternary complex assembly*. *Nucleic Acids Res.* **29**(20): p. 4154-65.
173. Gu, T.L., T.L. Goetz, B.J. Graves, and N.A. Speck (2000) *Auto-inhibition and partner proteins, core-binding factor beta (CBFbeta) and Ets-1, modulate DNA binding by CBFalpha2 (AML1)*. *Mol Cell Biol.* **20**(1): p. 91-103.
174. Sun, W., B.J. Graves, and N.A. Speck (1995) *Transactivation of the Moloney murine leukemia virus and T-cell receptor beta-chain enhancers by cbf and ets requires intact binding sites for both proteins*. *J Virol.* **69**(8): p. 4941-9.
175. Goetz, T.L., T.L. Gu, N.A. Speck, and B.J. Graves (2000) *Auto-inhibition of Ets-1 is counteracted by DNA binding cooperativity with core-binding factor alpha2*. *Mol Cell Biol.* **20**(1): p. 81-90.
176. Wasyluk, C., A. Gutman, R. Nicholson, and B. Wasyluk (1991) *The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins*. *Embo J.* **10**(5): p. 1127-34.
177. Baillat, D., C. Laitem, G. Leprivier, C. Margerin, and M. Aumercier (2009) *Ets-1 binds cooperatively to the palindromic Ets-binding sites in the p53 promoter*. *Biochem Biophys Res Commun.* **378**(2): p. 213-7.
178. Venanzoni, M.C., L.R. Robinson, D.R. Hodge, I. Kola, and A. Seth (1996) *ETS1 and ETS2 in p53 regulation: spatial separation of ETS binding sites (EBS) modulate protein: DNA interaction*. *Oncogene.* **12**(6): p. 1199-1204.
179. Baillat, D., G. Leprivier, D. Regnier, N. Vintonenko, A. Begue, D. Stehelin, and M. Aumercier (2006) *Stromelysin-1 expression is activated in vivo by Ets-1 through palindromic head-to-head Ets binding sites present in the promoter*. *Oncogene.* **25**(42): p. 5764-76.
180. Lamber, E.P., L. Vanhille, L.C. Textor, G.S. Kachalova, M.H. Sieweke, and M. Wilmanns (2008) *Regulation of the transcription factor Ets-1 by DNA-mediated homo-dimerization*. *Embo J.* **27**(14): p. 2006-17.

181. Leprivier, G., D. Baillat, A. Begue, B. Hartmann, and M. Aumercier (2009) *Ets-1 p51 and p42 isoforms differentially modulate Stromelysin-1 promoter according to induced DNA bend orientation*. *Nucleic Acids Res.* **37**(13): p. 4341-52.
182. Xu, D., T.J. Wilson, D. Chan, E. De Luca, J. Zhou, P.J. Hertzog, and I. Kola (2002) *Ets1 is required for p53 transcriptional activity in UV-induced apoptosis in embryonic stem cells*. *Embo J.* **21**(15): p. 4081-93.
183. Sahin, A., M. Velten, T. Pietsch, P. Knuefermann, A.F. Okuducu, J.C. Hahne, and N. Wernert (2005) *Inactivation of Ets 1 transcription factor by a specific decoy strategy reduces rat C6 glioma cell proliferation and mmp-9 expression*. *Int J Mol Med.* **15**(5): p. 771-6.
184. Taniguchi, H., Y. Fujiwara, Y. Doki, Y. Sugita, I. Sohma, H. Miyata, S. Takiguchi, T. Yasuda, N. Tomita, R. Morishita, and M. Monden (2007) *Gene therapy using ets-1 transcription factor decoy for peritoneal dissemination of gastric cancer*. *Int J Cancer.* **121**(7): p. 1609-17.
185. Tanaka, H., Y. Terada, T. Kobayashi, T. Okado, S. Inoshita, M. Kuwahara, A. Seth, Y. Sato, and S. Sasaki (2004) *Expression and function of Ets-1 during experimental acute renal failure in rats*. *J Am Soc Nephrol.* **15**(12): p. 3083-92.
186. Singh, A.K., M. Swarnalatha, and V. Kumar (2011) *c-ETS1 facilitates G1/S-phase transition by up-regulating cyclin E and CDK2 genes and cooperates with hepatitis B virus X protein for their deregulation*. *J Biol Chem.* **286**(25): p. 21961-70.
187. Roussel, M.F., J.N. Davis, J.L. Cleveland, J. Ghysdael, and S.W. Hiebert (1994) *Dual control of myc expression through a single DNA binding site targeted by ets family proteins and E2F-1*. *Oncogene.* **9**(2): p. 405-15.
188. Lambert, P.F., M.J. Ludford-Menting, N.J. Deacon, I. Kola, and R.R. Doherty (1997) *The nfkb1 promoter is controlled by proteins of the Ets family*. *Mol Biol Cell.* **8**(2): p. 313-23.
189. Gu, L., N. Zhu, H.W. Findley, W.G. Woods, and M. Zhou (2004) *Identification and characterization of the IKKalpha promoter: positive and negative regulation by ETS-1 and p53, respectively*. *J Biol Chem.* **279**(50): p. 52141-9.
190. Zhang, C., M.M. Kavurma, A. Lai, and L.M. Khachigian (2003) *Ets-1 protects vascular smooth muscle cells from undergoing apoptosis by activating p21WAF1/Cip1: ETS-1 regulates basal and and inducible p21WAF1/Cip1: ETS-1 regulates basal and inducible p21WAF1/Cip1 transcription via distinct cis-acting elements in the p21WAF1/Cip1 promoter*. *J Biol Chem.* **278**(30): p. 27903-9.
191. Seth, A., S. Giunta, C. Franceschi, I. Kola, and M.C. Venanzoni (1999) *Regulation of the human stress response gene GADD153 expression: role of ETS1 and FLI-1 gene products*. *Cell Death Differ.* **6**(9): p. 902-7.
192. Bardeesy, N. and N.E. Sharpless (2006) *RAS unplugged: negative feedback and oncogene-induced senescence*. *Cancer Cell.* **10**(6): p. 451-3.
193. Ohtani, N., Z. Zebedee, T.J. Huot, J.A. Stinson, M. Sugimoto, Y. Ohashi, A.D. Sharrocks, G. Peters, and E. Hara (2001) *Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence*. *Nature.* **409**(6823): p. 1067-70.
194. Huot, T.J., J. Rowe, M. Harland, S. Drayton, S. Brookes, C. Gooptu, P. Purkis, M. Fried, V. Bataille, E. Hara, J. Newton-Bishop, and G. Peters (2002) *Biallelic mutations in p16(INK4a) confer resistance to Ras- and Ets-induced senescence in human diploid fibroblasts*. *Mol Cell Biol.* **22**(23): p. 8135-43.
195. Nakazawa, Y., M. Suzuki, N. Manabe, T. Yamada, F. Kihara-Negishi, T. Sakurai, D.G. Tenen, A. Iwama, M. Mochizuki, and T. Oikawa (2007) *Cooperative interaction between ETS1 and GFII1 transcription factors in the repression of Bax gene expression*. *Oncogene.* **26**(24): p. 3541-50.
196. Sampath, J., D. Sun, V.J. Kidd, J. Grenet, A. Gandhi, L.H. Shapiro, Q. Wang, G.P. Zambetti, and J.D. Schuetz (2001) *Mutant p53 cooperates with ETS and selectively up-regulates human MDR1 not MRP1*. *J Biol Chem.* **276**(42): p. 39359-67.
197. Koskela, K. and O. Lassila (2003) *Single-cell analysis of Ets-1 transcription factor expression during lymphocyte activation and apoptosis*. *Scand J Immunol.* **57**(1): p. 56-61.
198. Yu, Z. and D.M. Shah (2007) *Curcumin down-regulates Ets-1 and Bcl-2 expression in human endometrial carcinoma HEC-1-A cells*. *Gynecol Oncol.* **106**(3): p. 541-8.
199. Choul-Li, S., C. Leroy, G. Leprivier, C. Laitem, D. Tulasne, and M. Aumercier (2010) *Caspase cleavage of Ets-1 p51 generates fragments with transcriptional dominant-negative function*. *Biochem J.* **426**(2): p. 229-41.
200. Teruyama, K., M. Abe, T. Nakano, C. Iwasaka-Yagi, S. Takahashi, S. Yamada, and Y. Sato (2001) *Role of transcription factor Ets-1 in the apoptosis of human vascular endothelial cells*. *J Cell Physiol.* **188**(2): p. 243-52.
201. Kola, I., S. Brookes, A.R. Green, R. Garber, M. Tymms, T.S. Papas, and A. Seth (1993) *The Ets1 transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with*

- mesodermal cells involved in morphogenetic processes such as organ formation.* Proc Natl Acad Sci U S A. **90**(16): p. 7588-92.
202. Maroulakou, I.G., T.S. Papas, and J.E. Green (1994) *Differential expression of ets-1 and ets-2 proto-oncogenes during murine embryogenesis.* Oncogene. **9**(6): p. 1551-65.
203. Bories, J.C., D.M. Willerford, D. Grevin, L. Davidson, A. Camus, P. Martin, D. Stehelin, and F.W. Alt (1995) *Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene.* Nature. **377**(6550): p. 635-8.
204. Muthusamy, N., K. Barton, and J.M. Leiden (1995) *Defective activation and survival of T cells lacking the Ets-1 transcription factor.* Nature. **377**(6550): p. 639-42.
205. Wei, G., R. Srinivasan, C.Z. Cantemir-Stone, S.M. Sharma, R. Santhanam, M. Weinstein, N. Muthusamy, A.K. Man, R.G. Oshima, G. Leone, and M.C. Ostrowski (2009) *Ets1 and Ets2 are required for endothelial cell survival during embryonic angiogenesis.* Blood. **114**(5): p. 1123-30.
206. Lettice, L.A., I. Williamson, J.H. Wiltshire, S. Peluso, P.S. Devenney, A.E. Hill, A. Essafi, J. Hagman, R. Mort, G. Grimes, C.L. DeAngelis, and R.E. Hill (2012) *Opposing functions of the ETS factor family define Shh spatial expression in limb buds and underlie polydactyly.* Dev Cell. **22**(2): p. 459-67.
207. Maroulakou, I.G. and D.B. Bowe (2000) *Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network.* Oncogene. **19**(55): p. 6432-42.
208. Barton, K., N. Muthusamy, C. Fischer, C.N. Ting, T.L. Walunas, L.L. Lanier, and J.M. Leiden (1998) *The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice.* Immunity. **9**(4): p. 555-63.
209. Eyquem, S., K. Chemin, M. Fasseu, and J.C. Bories (2004) *The Ets-1 transcription factor is required for complete pre-T cell receptor function and allelic exclusion at the T cell receptor beta locus.* Proc Natl Acad Sci U S A. **101**(44): p. 15712-7.
210. Walunas, T.L., B. Wang, C.R. Wang, and J.M. Leiden (2000) *Cutting edge: the Ets1 transcription factor is required for the development of NK T cells in mice.* J Immunol. **164**(6): p. 2857-60.
211. Eyquem, S., K. Chemin, M. Fasseu, M. Chopin, F. Sigaux, A. Cumano, and J.C. Bories (2004) *The development of early and mature B cells is impaired in mice deficient for the Ets-1 transcription factor.* Eur J Immunol. **34**(11): p. 3187-96.
212. Wang, D., S.A. John, J.L. Clements, D.H. Percy, K.P. Barton, and L.A. Garrett-Sinha (2005) *Ets-1 deficiency leads to altered B cell differentiation, hyperresponsiveness to TLR9 and autoimmune disease.* Int Immunol. **17**(9): p. 1179-91.
213. Maier, H., J. Colbert, D. Fitzsimmons, D.R. Clark, and J. Hagman (2003) *Activation of the early B-cell-specific mb-1 (Ig-alpha) gene by Pax-5 is dependent on an unmethylated Ets binding site.* Mol Cell Biol. **23**(6): p. 1946-60.
214. Maier, H., R. Ostraat, S. Parenti, D. Fitzsimmons, L.J. Abraham, C.W. Garvie, and J. Hagman (2003) *Requirements for selective recruitment of Ets proteins and activation of mb-1/Ig-alpha gene transcription by Pax-5 (BSAP).* Nucleic Acids Res. **31**(19): p. 5483-9.
215. McCarthy, K.M., D. McDevit, A. Andreucci, R. Reeves, and B.S. Nikolajczyk (2003) *HMGAI co-activates transcription in B cells through indirect association with DNA.* J Biol Chem. **278**(43): p. 42106-14.
216. John, S.A., J.L. Clements, L.M. Russell, and L.A. Garrett-Sinha (2008) *Ets-1 regulates plasma cell differentiation by interfering with the activity of the transcription factor Blimp-1.* J Biol Chem. **283**(2): p. 951-62.
217. Jabrane-Ferrat, N. and B.M. Peterlin (1994) *Ets-1 activates the DRA promoter in B cells.* Mol Cell Biol. **14**(11): p. 7314-21.
218. Nguyen, H.V., E. Mouly, K. Chemin, R. Luinaud, R. Despres, J.P. Ferman, B. Arnulf, and J.C. Bories (2012) *The Ets-1 transcription factor is required for Stat1-mediated T-bet expression and IgG2a class switching in mouse B cells.* Blood. **119**(18): p. 4174-81.
219. Bhat, N.K., C.B. Thompson, T. Lindsten, C.H. June, S. Fujiwara, S. Koizumi, R.J. Fisher, and T.S. Papas (1990) *Reciprocal expression of human ETS1 and ETS2 genes during T-cell activation: regulatory role for the protooncogene ETS1.* Proc Natl Acad Sci U S A. **87**(10): p. 3723-7.
220. Clements, J.L., S.A. John, and L.A. Garrett-Sinha (2006) *Impaired generation of CD8+ thymocytes in Ets-1-deficient mice.* J Immunol. **177**(2): p. 905-12.
221. Ramirez, K., K.J. Chandler, C. Spaulding, S. Zandi, M. Sigvardsson, B.J. Graves, and B.L. Kee (2012) *Gene Deregulation and Chronic Activation in Natural Killer Cells Deficient in the Transcription Factor ETS1.* Immunity. **36**(6): p. 921-32.
222. Russell, L. and L.A. Garrett-Sinha (2010) *Transcription factor Ets-1 in cytokine and chemokine gene regulation.* Cytokine. **51**(3): p. 217-26.

223. Blumenthal, S.G., G. Aichele, T. Wirth, A.P. Czernilofsky, A. Nordheim, and J. Dittmer (1999) *Regulation of the human interleukin-5 promoter by Ets transcription factors. Ets1 and Ets2, but not Elf-1, cooperate with GATA3 and HTLV-I Tax1.* J Biol Chem. **274**(18): p. 12910-6.
224. Wang, J. and I.G. Young (2007) *Eosinophilic inflammation: mechanisms regulating IL-5 transcription in human T lymphocytes.* Allergy. **62**(10): p. 1131-8.
225. Bendre, M.S., D. Gaddy-Kurten, T. Mon-Foote, N.S. Akel, R.A. Skinner, R.W. Nicholas, and L.J. Suva (2002) *Expression of interleukin 8 and not parathyroid hormone-related protein by human breast cancer cells correlates with bone metastasis in vivo.* Cancer Res. **62**(19): p. 5571-9.
226. Bendre, M.S., D.C. Montague, T. Peery, N.S. Akel, D. Gaddy, and L.J. Suva (2003) *Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease.* Bone. **33**(1): p. 28-37.
227. Kramer, B., K. Wiegmann, and M. Kronke (1995) *Regulation of the human TNF promoter by the transcription factor Ets.* J Biol Chem. **270**(12): p. 6577-83.
228. Minami, T., K. Tachibana, T. Imanishi, and T. Doi (1998) *Both Ets-1 and GATA-1 are essential for positive regulation of platelet factor 4 gene expression.* Eur J Biochem. **258**(2): p. 879-89.
229. Lulli, V., P. Romania, O. Morsilli, M. Gabbianelli, A. Pagliuca, S. Mazzeo, U. Testa, C. Peschle, and G. Marzali (2006) *Overexpression of Ets-1 in human hematopoietic progenitor cells blocks erythroid and promotes megakaryocytic differentiation.* Cell Death Differ. **13**(7): p. 1064-74.
230. Lemarchandel, V., J. Ghysdael, V. Mignotte, C. Rahuel, and P.H. Romeo (1993) *GATA and Ets cis-acting sequences mediate megakaryocyte-specific expression.* Mol Cell Biol. **13**(1): p. 668-76.
231. Deveaux, S., A. Filipe, V. Lemarchandel, J. Ghysdael, P.H. Romeo, and V. Mignotte (1996) *Analysis of the thrombopoietin receptor (MPL) promoter implicates GATA and Ets proteins in the coregulation of megakaryocyte-specific genes.* Blood. **87**(11): p. 4678-85.
232. Seth, A., L. Robinson, D.M. Thompson, D.K. Watson, and T.S. Papas (1993) *Transactivation of GATA-1 promoter with ETS1, ETS2 and ERGB/Hu-FLI-1 proteins: stabilization of the ETS1 protein binding on GATA-1 promoter sequences by monoclonal antibody.* Oncogene. **8**(7): p. 1783-90.
233. Marzali, G., E. Perrotti, R. Ilari, V. Lulli, E.M. Coccia, R. Moret, L.C. Kuhn, U. Testa, and A. Battistini (2002) *Role of Ets-1 in transcriptional regulation of transferrin receptor and erythroid differentiation.* Oncogene. **21**(52): p. 7933-44.
234. Sieweke, M.H., H. Tekotte, J. Frampton, and T. Graf (1996) *MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation.* Cell. **85**(1): p. 49-60.
235. Tanaka, K., N. Oda, C. Iwasaka, M. Abe, and Y. Sato (1998) *Induction of Ets-1 in endothelial cells during reendothelialization after denuding injury.* J Cell Physiol. **176**(2): p. 235-44.
236. Tomita, N., R. Morishita, Y. Taniyama, H. Koike, M. Aoki, H. Shimizu, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda, and T. Ogihara (2003) *Angiogenic property of hepatocyte growth factor is dependent on upregulation of essential transcription factor for angiogenesis, ets-1.* Circulation. **107**(10): p. 1411-7.
237. Yasuda, M., Y. Ohzeki, S. Shimizu, S. Naito, A. Ohtsuru, T. Yamamoto, and Y. Kuroiwa (1999) *Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells.* Life Sci. **64**(4): p. 249-58.
238. Pourtier-Manzanedo, A., C. Vercamer, E. Van Belle, V. Mattot, F. Mouquet, and B. Vandenbunder (2003) *Expression of an Ets-1 dominant-negative mutant perturbs normal and tumor angiogenesis in a mouse ear model.* Oncogene. **22**(12): p. 1795-806.
239. Arderiu, G., E. Pena, R. Aledo, S. Espinosa, and L. Badimon (2012) *Ets-1 transcription is required in tissue factor driven microvessel formation and stabilization.* Angiogenesis. **Epub ahead of print.**
240. Chen, Z., R.J. Fisher, C.W. Riggs, J.S. Rhim, and J.A. Lautenberger (1997) *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by ETS1 antisense oligonucleotides.* Cancer Res. **57**(10): p. 2013-9.
241. Oda, N., M. Abe, and Y. Sato (1999) *ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta3.* J Cell Physiol. **178**(2): p. 121-32.
242. Oettgen, P. (2010) *The role of ets factors in tumor angiogenesis.* J Oncol. **2010**: p. 767384.
243. Sato, Y., K. Teruyama, T. Nakano, N. Oda, M. Abe, K. Tanaka, and C. Iwasaka-Yagi (2001) *Role of transcription factors in angiogenesis: Ets-1 promotes angiogenesis as well as endothelial apoptosis.* Ann N Y Acad Sci. **947**: p. 117-23.
244. Oettgen, P. (2006) *Regulation of vascular inflammation and remodeling by ETS factors.* Circ Res. **99**(11): p. 1159-66.
245. Santiago, F.S. and L.M. Khachigian (2004) *Ets-1 stimulates platelet-derived growth factor A-chain gene transcription and vascular smooth muscle cell growth via cooperative interactions with Sp1.* Circ Res. **95**(5): p. 479-87.

246. Liu, M.Y., M. Eyries, C. Zhang, F.S. Santiago, and L.M. Khachigian (2006) *Inducible platelet-derived growth factor D-chain expression by angiotensin II and hydrogen peroxide involves transcriptional regulation by Ets-1 and Sp1*. *Blood*. **107**(6): p. 2322-9.
247. Bonello, M.R., Y.V. Bobryshev, and L.M. Khachigian (2005) *Peroxide-inducible Ets-1 mediates platelet-derived growth factor receptor-alpha gene transcription in vascular smooth muscle cells*. *Am J Pathol*. **167**(4): p. 1149-59.
248. Dandre, F. and G.K. Owens (2004) *Platelet-derived growth factor-BB and Ets-1 transcription factor negatively regulate transcription of multiple smooth muscle cell differentiation marker genes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **286**(6): p. H2042-51.
249. Raouf, A. and A. Seth (2000) *Ets transcription factors and targets in osteogenesis*. *Oncogene*. **19**(55): p. 6455-63.
250. Sato, M., E. Morii, T. Komori, H. Kawahata, M. Sugimoto, K. Terai, H. Shimizu, T. Yasui, H. Ogihara, N. Yasui, T. Ochi, Y. Kitamura, Y. Ito, and S. Nomura (1998) *Transcriptional regulation of osteopontin gene in vivo by PEBP2alphaA/CBFA1 and ETS1 in the skeletal tissues*. *Oncogene*. **17**(12): p. 1517-25.
251. Geisinger, M.T., R. Astaiza, T. Butler, S.N. Popoff, S.L. Planey, and J.A. Arnott (2012) *Ets-1 is essential for connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) induction by TGF-beta1 in osteoblasts*. *PLoS One*. **7**(4): p. e35258.
252. Kalyani, A.J. and M.S. Rao (1998) *Cell lineage in the developing neural tube*. *Biochem Cell Biol*. **76**(6): p. 1051-68.
253. Kiyota, T., A. Kato, and Y. Kato (2007) *Ets-1 regulates radial glia formation during vertebrate embryogenesis*. *Organogenesis*. **3**(2): p. 93-101.
254. Sun, P. and H.H. Loh (2001) *Transcriptional regulation of mouse delta-opioid receptor gene: role of Ets-1 in the transcriptional activation of mouse delta-opioid receptor gene*. *J Biol Chem*. **276**(48): p. 45462-9.
255. Theveneau, E., J.L. Duband, and M. Altabef (2007) *Ets-1 confers cranial features on neural crest delamination*. *PLoS One*. **2**(11): p. e1142.
256. Betancur, P., M. Bronner-Fraser, and T. Sauka-Spengler (2010) *Genomic code for Sox10 activation reveals a key regulatory enhancer for cranial neural crest*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**(8): p. 3570-5.
257. Rothhammer, T., J.C. Hahne, A. Florin, I. Poser, F. Soncin, N. Wernert, and A.K. Bosserhoff (2004) *The Ets-1 transcription factor is involved in the development and invasion of malignant melanoma*. *Cell Mol Life Sci*. **61**(1): p. 118-28.
258. Gao, Z., G.H. Kim, A.C. Mackinnon, A.E. Flagg, B. Bassett, J.U. Earley, and E.C. Svensson (2010) *Ets1 is required for proper migration and differentiation of the cardiac neural crest*. *Development*. **137**(9): p. 1543-51.
259. Dittmer, J. (2003) *The biology of the Ets1 proto-oncogene*. *Mol Cancer*. **2**: p. 29.
260. de Nigris, F., T. Mega, N. Berger, M.V. Barone, M. Santoro, G. Viglietto, P. Verde, and A. Fusco (2001) *Induction of ETS-1 and ETS-2 transcription factors is required for thyroid cell transformation*. *Cancer Res*. **61**(5): p. 2267-75.
261. Kita, D., T. Takino, M. Nakada, T. Takahashi, J. Yamashita, and H. Sato (2001) *Expression of dominant-negative form of Ets-1 suppresses fibronectin-stimulated cell adhesion and migration through down-regulation of integrin alpha5 expression in U251 glioma cell line*. *Cancer Res*. **61**(21): p. 7985-91.
262. Sahin, A., C. Vercamer, A. Kaminski, T. Fuchs, A. Florin, J.C. Hahne, V. Mattot, A. Pourtier-Manzanedo, T. Pietsch, V. Fafeur, and N. Wernert (2009) *Dominant-negative inhibition of Ets 1 suppresses tumor growth, invasion and migration in rat C6 glioma cells and reveals differentially expressed Ets 1 target genes*. *Int J Oncol*. **34**(2): p. 377-89.
263. Kitange, G., M. Kishikawa, T. Nakayama, S. Naito, M. Iseki, and S. Shibata (1999) *Expression of the Ets-1 proto-oncogene correlates with malignant potential in human astrocytic tumors*. *Mod Pathol*. **12**(6): p. 618-26.
264. Lincoln, D.W., 2nd and K. Bove (2005) *The transcription factor Ets-1 in breast cancer*. *Front Biosci*. **10**: p. 506-11.
265. Trojanowska, M. (2000) *Ets factors and regulation of the extracellular matrix*. *Oncogene*. **19**(55): p. 6464-71.
266. Behrens, P., M. Mathiak, E. Mangold, S. Kirdorf, A. Wellmann, F. Fogt, M. Rothe, A. Florin, and N. Wernert (2003) *Stromal expression of invasion-promoting, matrix-degrading proteases MMP-1 and -9 and the Ets 1 transcription factor in HNPCC carcinomas and sporadic colorectal cancers*. *Int J Cancer*. **107**(2): p. 183-8.

267. Behrens, P., M. Rothe, A. Florin, A. Wellmann, and N. Wernert (2001) *Invasive properties of serous human epithelial ovarian tumors are related to Ets-1, MMP-1 and MMP-9 expression*. *Int J Mol Med*. **8**(2): p. 149-54.
268. Behrens, P., M. Rothe, A. Wellmann, J. Krischler, and N. Wernert (2001) *The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP 1 and MMP 9 in the stroma of pre-invasive breast cancer*. *J Pathol*. **194**(1): p. 43-50.
269. Davidson, B., I. Goldberg, W.H. Gotlieb, J. Kopolovic, B. Risberg, G. Ben-Baruch, and R. Reich (2003) *Coordinated expression of integrin subunits, matrix metalloproteinases (MMP), angiogenic genes and Ets transcription factors in advanced-stage ovarian carcinoma: a possible activation pathway?* *Cancer Metastasis Rev*. **22**(1): p. 103-15.
270. Wernert, N., F. Gilles, V. Fafeur, F. Bouali, M.B. Raes, C. Pyke, T. Dupressoir, G. Seitz, B. Vandenbunder, and D. Stehelin (1994) *Stromal expression of c-Ets1 transcription factor correlates with tumor invasion*. *Cancer Res*. **54**(21): p. 5683-8.
271. Ozaki, I., T. Mizuta, G. Zhao, H. Yotsumoto, T. Hara, S. Kajihara, A. Hisatomi, T. Sakai, and K. Yamamoto (2000) *Involvement of the Ets-1 gene in overexpression of matrilysin in human hepatocellular carcinoma*. *Cancer Res*. **60**(22): p. 6519-25.
272. Yin, J.J., K. Selander, J.M. Chirgwin, M. Dallas, B.G. Grubbs, R. Wieser, J. Massague, G.R. Mundy, and T.A. Guise (1999) *TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development*. *J Clin Invest*. **103**(2): p. 197-206.
273. Gilmore, J.L., J.A. Scott, Z. Bouizar, A. Robling, S.E. Pitfield, D.J. Riese, 2nd, and J. Foley (2008) *Amphiregulin-EGFR signaling regulates PTHrP gene expression in breast cancer cells*. *Breast Cancer Res Treat*. **110**(3): p. 493-505.
274. Nishihara, M., T. Kanematsu, T. Taguchi, and M.S. Razzaque (2007) *PTHrP and tumorigenesis: is there a role in prognosis?* *Ann N Y Acad Sci*. **1117**: p. 385-92.
275. Dennis, J.W., M. Granovsky, and C.E. Warren (1999) *Glycoprotein glycosylation and cancer progression*. *Biochim Biophys Acta*. **1473**(1): p. 21-34.
276. Ko, J.H., E. Miyoshi, K. Noda, A. Ekuni, R. Kang, Y. Ikeda, and N. Taniguchi (1999) *Regulation of the GnT-V promoter by transcription factor Ets-1 in various cancer cell lines*. *J Biol Chem*. **274**(33): p. 22941-8.
277. Wernert, N., M.B. Raes, P. Lassalle, M.P. Dehouck, B. Gosselin, B. Vandenbunder, and D. Stehelin (1992) *c-ets1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans*. *Am J Pathol*. **140**(1): p. 119-27.
278. Fujimoto, J., I. Aoki, H. Toyoki, S. Khatun, E. Sato, H. Sakaguchi, and T. Tamaya (2004) *Clinical implications of expression of ETS-1 related to angiogenesis in metastatic lesions of ovarian cancers*. *Oncology*. **66**(5): p. 420-8.
279. Fujimoto, J., I. Aoki, H. Toyoki, S. Khatun, and T. Tamaya (2002) *Clinical implications of expression of ETS-1 related to angiogenesis in uterine cervical cancers*. *Ann Oncol*. **13**(10): p. 1598-604.
280. Fujimoto, J., I. Aoki, H. Toyoki, S. Khatun, and T. Tamaya (2002) *Clinical implications of expression of ETS-1 related to angiogenesis in uterine endometrial cancers*. *Ann Oncol*. **13**(10): p. 1605-11.
281. Tokuhara, K., Y. Ogata, M. Nakagawa, and K. Shirouzu (2003) *Ets-1 expression in vascular endothelial cells as an angiogenic and prognostic factor in colorectal carcinoma*. *Int Surg*. **88**(1): p. 25-33.
282. Valter, M.M., A. Hugel, H.J. Huang, W.K. Cavenee, O.D. Wiestler, T. Pietsch, and N. Wernert (1999) *Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis*. *Cancer Res*. **59**(21): p. 5608-14.
283. Holzmeister, J., B. Ludewig, G. Pauli, and D. Simon (1993) *Sequence specific binding of the transcription factor c-Ets1 to the human immunodeficiency virus type I long terminal repeat*. *Biochem Biophys Res Commun*. **197**(3): p. 1229-33.
284. Bassuk, A.G., R.T. Anandappa, and J.M. Leiden (1997) *Physical interactions between Ets and NF-kappaB/NFAT proteins play an important role in their cooperative activation of the human immunodeficiency virus enhancer in T cells*. *J Virol*. **71**(5): p. 3563-73.
285. Sieweke, M.H., H. Tekotte, U. Jarosch, and T. Graf (1998) *Cooperative interaction of ets-1 with USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells*. *Embo J*. **17**(6): p. 1728-39.
286. Yang, H.C., L. Shen, R.F. Siliciano, and J.L. Pomerantz (2009) *Isolation of a cellular factor that can reactivate latent HIV-1 without T cell activation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**(15): p. 6321-6.
287. Gitlin, S.D., J. Dittmer, R.C. Shin, and J.N. Brady (1993) *Transcriptional activation of the human T-lymphotropic virus type I long terminal repeat by functional interaction of Tax1 and Ets1*. *J Virol*. **67**(12): p. 7307-16.

288. Bosselut, R., J.F. Duvall, A. Gegonne, M. Bailly, A. Hemar, J. Brady, and J. Ghysdael (1990) *The product of the c-ets-1 proto-oncogene and the related Ets2 protein act as transcriptional activators of the long terminal repeat of human T cell leukemia virus HTLV-1*. *Embo J.* **9**(10): p. 3137-44.
289. Redlich, K., H.P. Kiener, G. Schett, M. Tohidast-Akrad, E. Selzer, I. Radda, G.H. Stummvoll, C.W. Steiner, M. Groger, P. Bitzan, P. Zenz, J.S. Smolen, and G. Steiner (2001) *Overexpression of transcription factor Ets-1 in rheumatoid arthritis synovial membrane: regulation of expression and activation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha*. *Arthritis Rheum.* **44**(2): p. 266-74.
290. Sun, H.B. and H. Yokota (2001) *Messenger-RNA expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and transcription factors in rheumatic synovial cells under mechanical stimuli*. *Bone.* **28**(3): p. 303-9.
291. Gao, B., K. Calhoun, and D. Fang (2006) *The proinflammatory cytokines IL-1beta and TNF-alpha induce the expression of Synoviolin, an E3 ubiquitin ligase, in mouse synovial fibroblasts via the Erk1/2-ETS1 pathway*. *Arthritis Res Ther.* **8**(6): p. R172.
292. Peters, C.L., C.J. Morris, P.I. Mapp, D.R. Blake, C.E. Lewis, and V.R. Winrow (2004) *The transcription factors hypoxia-inducible factor 1alpha and Ets-1 colocalize in the hypoxic synovium of inflamed joints in adjuvant-induced arthritis*. *Arthritis Rheum.* **50**(1): p. 291-6.
293. Wernert, N., H.P. Justen, M. Rothe, P. Behrens, S. Dreschers, T. Neuhaus, A. Florin, A. Sachinidis, H. Vetter, and Y. Ko (2002) *The Ets 1 transcription factor is upregulated during inflammatory angiogenesis in rheumatoid arthritis*. *J Mol Med (Berl).* **80**(4): p. 258-66.
294. Naito, T., M.S. Razzaque, A. Nazneen, D. Liu, H. Nihei, T. Koji, and T. Taguchi (2000) *Renal expression of the Ets-1 proto-oncogene during progression of rat crescentic glomerulonephritis*. *J Am Soc Nephrol.* **11**(12): p. 2243-55.
295. Mizui, M., Y. Isaka, Y. Takabatake, Y. Sato, H. Kawachi, F. Shimizu, S. Takahara, T. Ito, and E. Imai (2006) *Transcription factor Ets-1 is essential for mesangial matrix remodeling*. *Kidney Int.* **70**(2): p. 298-305.
296. Higashida, T., H. Kanno, M. Nakano, K. Funakoshi, and I. Yamamoto (2008) *Expression of hypoxia-inducible angiogenic proteins (hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and E26 transformation-specific-1) and plaque hemorrhage in human carotid atherosclerosis*. *J Neurosurg.* **109**(1): p. 83-91.
297. Katsume, A., M. Okigaki, A. Matsui, J. Che, Y. Adachi, E. Kishita, S. Yamaguchi, K. Ikeda, T. Ueyama, S. Matoba, H. Yamada, and H. Matsubara (2011) *Early inflammatory reactions in atherosclerosis are induced by proline-rich tyrosine kinase/reactive oxygen species-mediated release of tumor necrosis factor-alpha and subsequent activation of the p21Cip1/Ets-1/p300 system*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **31**(5): p. 1084-92.
298. Chambon, P., J.D. Weill, and P. Mandel (1963) *Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme*. *Biochem Biophys Res Commun.* **11**: p. 39-43.
299. Kim, M.Y., T. Zhang, and W.L. Kraus (2005) *Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: 'PAR-laying' NAD+ into a nuclear signal*. *Genes Dev.* **19**(17): p. 1951-67.
300. Ame, J.C., C. Spenlehauer, and G. de Murcia (2004) *The PARP superfamily*. *Bioessays.* **26**(8): p. 882-93.
301. Schreiber, V., F. Dantzer, J.C. Ame, and G. de Murcia (2006) *Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule*. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**(7): p. 517-28.
302. Gibson, B.A. and W.L. Kraus (2012) *New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs*. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **13**(7): p. 411-24.
303. Wang, Z., G.A. Michaud, Z. Cheng, Y. Zhang, T.R. Hinds, E. Fan, F. Cong, and W. Xu (2012) *Recognition of the iso-ADP-ribose moiety in poly(ADP-ribose) by WWE domains suggests a general mechanism for poly(ADP-ribosylation)-dependent ubiquitination*. *Genes Dev.* **26**(3): p. 235-40.
304. Kalisch, T., J.C. Ame, F. Dantzer, and V. Schreiber (2012) *New readers and interpretations of poly(ADP-ribosylation)*. *Trends Biochem Sci.* **37**(9): p. 381-90.
305. Langelier, M.F., J.L. Planck, S. Roy, and J.M. Pascal (2012) *Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1*. *Science.* **336**(6082): p. 728-32.
306. Smith, S., I. Giriati, A. Schmitt, and T. de Lange (1998) *Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres*. *Science.* **282**(5393): p. 1484-7.
307. Hakme, A., H.K. Wong, F. Dantzer, and V. Schreiber (2008) *The expanding field of poly(ADP-ribosylation) reactions. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series*. *EMBO Rep.* **9**(11): p. 1094-100.
308. Hakme, A., A. Huber, P. Dolle, and V. Schreiber (2008) *The macroPARP genes Parp-9 and Parp-14 are developmentally and differentially regulated in mouse tissues*. *Dev Dyn.* **237**(1): p. 209-15.

309. Ruf, A., G. de Murcia, and G.E. Schulz (1998) *Inhibitor and NAD⁺ binding to poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and homology modeling*. *Biochemistry*. **37**(11): p. 3893-900.
310. Ruf, A., J. Menissier de Murcia, G. de Murcia, and G.E. Schulz (1996) *Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**(15): p. 7481-5.
311. Ruf, A., V. Rolli, G. de Murcia, and G.E. Schulz (1998) *The mechanism of the elongation and branching reaction of poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis*. *J Mol Biol*. **278**(1): p. 57-65.
312. Nagashima, T., F. Hayashi, and S. Yokoyama (2005) *Solution structure of WGR domain of poly(ADP-ribose) polymerase-I*. En préparation.
313. Cohen-Armon, M., L. Visochek, D. Rozensal, A. Kalal, I. Geistrikh, R. Klein, S. Bendetz-Nezer, Z. Yao, and R. Seger (2007) *DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation*. *Mol Cell*. **25**(2): p. 297-308.
314. Hassa, P.O. and M.O. Hottiger (2008) *The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases*. *Front Biosci*. **13**: p. 3046-82.
315. Krishnakumar, R. and W.L. Kraus (2010) *The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets*. *Mol Cell*. **39**(1): p. 8-24.
316. Luo, X. and W.L. Kraus (2012) *On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1*. *Genes Dev*. **26**(5): p. 417-32.
317. Kanai, M., K. Hanashiro, S.H. Kim, S. Hanai, A.H. Boulares, M. Miwa, and K. Fukasawa (2007) *Inhibition of Crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribosylation)*. *Nat Cell Biol*. **9**(10): p. 1175-83.
318. Altmeyer, M., S. Messner, P.O. Hassa, M. Fey, and M.O. Hottiger (2009) *Molecular mechanism of poly(ADP-ribosylation) by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites*. *Nucleic Acids Res*. **37**(11): p. 3723-38.
319. Boehler, C. and F. Dantzer (2011) *PARP-3, a DNA-dependent PARP with emerging roles in double-strand break repair and mitotic progression*. *Cell Cycle*. **10**(7): p. 1023-4.
320. Leung, C.C. and J.N. Glover (2011) *BRCT domains: easy as one, two, three*. *Cell Cycle*. **10**(15): p. 2461-70.
321. Tao, Z., P. Gao, and H.W. Liu (2009) *Identification of the ADP-ribosylation sites in the PARP-1 automodification domain: analysis and implications*. *J Am Chem Soc*. **131**(40): p. 14258-60.
322. Loeffler, P.A., M.J. Cuneo, G.A. Mueller, E.F. DeRose, S.A. Gabel, and R.E. London (2011) *Structural studies of the PARP-1 BRCT domain*. *BMC Struct Biol*. **11**: p. 37.
323. Petrucco, S. (2003) *Sensing DNA damage by PARP-like fingers*. *Nucleic Acids Res*. **31**(23): p. 6689-99.
324. Ali, A.A., G. Timinszky, R. Arribas-Bosacoma, M. Kozlowski, P.O. Hassa, M. Hassler, A.G. Ladurner, L.H. Pearl, and A.W. Oliver (2012) *The zinc-finger domains of PARP1 cooperate to recognize DNA strand breaks*. *Nat Struct Mol Biol*. **19**(7): p. 685-92.
325. Langelier, M.F., D.D. Ruhl, J.L. Planck, W.L. Kraus, and J.M. Pascal (2010) *The Zn3 domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction*. *J Biol Chem*. **285**(24): p. 18877-87.
326. Huambachano, O., F. Herrera, A. Rancourt, and M.S. Satoh (2011) *Double-stranded DNA binding domain of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and molecular insight into the regulation of its activity*. *J Biol Chem*. **286**(9): p. 7149-60.
327. Clark, N.J., M.A. Kramer, U.M. Muthurajan, and K. Luger (2012) *Alternative binding modes of Poly (ADP-ribose) Polymerase 1 to free DNA and nucleosomes*. *J Biol Chem*.
328. Langelier, M.F., J.L. Planck, S. Roy, and J.M. Pascal (2011) *Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity*. *J Biol Chem*. **286**(12): p. 10690-701.
329. Eustermann, S., H. Videler, J.C. Yang, P.T. Cole, D. Gruszka, D. Veprintsev, and D. Neuhaus (2011) *The DNA-binding domain of human PARP-1 interacts with DNA single-strand breaks as a monomer through its second zinc finger*. *J Mol Biol*. **407**(1): p. 149-70.
330. Audebert, M., B. Salles, and P. Calsou (2008) *Effect of double-strand break DNA sequence on the PARP-1 NHEJ pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*. **369**(3): p. 982-8.
331. Audebert, M., B. Salles, M. Weinfeld, and P. Calsou (2006) *Involvement of polynucleotide kinase in a poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent DNA double-strand breaks rejoining pathway*. *J Mol Biol*. **356**(2): p. 257-65.
332. Audebert, M., B. Salles, and P. Calsou (2004) *Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining*. *J Biol Chem*. **279**(53): p. 55117-26.

333. Spagnolo, L., J. Barbeau, N.J. Curtin, E.P. Morris, and L.H. Pearl (2012) *Visualization of a DNA-PK/PARP1 complex*. *Nucleic Acids Res.* **40**(9): p. 4168-77.
334. Kraus, W.L. (2008) *Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation*. *Curr Opin Cell Biol.* **20**(3): p. 294-302.
335. de Murcia, G., V. Schreiber, M. Molinete, B. Saulier, O. Poch, M. Masson, C. Niedergang, and J. Menissier de Murcia (1994) *Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase*. *Mol Cell Biochem.* **138**(1-2): p. 15-24.
336. Ogura, T., N. Takenouchi, M. Yamaguchi, A. Matsukage, T. Sugimura, and H. Esumi (1990) *Striking similarity of the distribution patterns of the poly(ADP-ribose) polymerase and DNA polymerase beta among various mouse organs*. *Biochem Biophys Res Commun.* **172**(2): p. 377-84.
337. Menegazzi, M., G. Grassi-Zucconi, A. Carcerero De Prati, T. Ogura, P. Poltronieri, H. Nyunoya, Y. Shiratori-Nyunoya, M. Miwa, and H. Suzuki (1991) *Differential expression of poly(ADP-ribose) polymerase and DNA polymerase beta in rat tissues*. *Exp Cell Res.* **197**(1): p. 66-74.
338. Cesarone, C.F., L. Scarabelli, P. Giannoni, G. Gallo, and M. Orunesu (1990) *Relationship between poly(ADP-ribose) polymerase activity and DNA synthesis in cultured hepatocytes*. *Biochem Biophys Res Commun.* **171**(3): p. 1037-43.
339. Wein, K.H., R. Netzker, and K. Brand (1993) *Cell cycle-related expression of poly(ADP-ribosyl)transferase in proliferating rat thymocytes*. *Biochim Biophys Acta.* **1176**(1-2): p. 69-76.
340. Suzuki, H., K. Uchida, H. Shima, T. Sato, T. Okamoto, T. Kimura, and M. Miwa (1987) *Molecular cloning of cDNA for human poly(ADP-ribose) polymerase and expression of its gene during HL-60 cell differentiation*. *Biochem Biophys Res Commun.* **146**(2): p. 403-9.
341. Prasad, S.C., P.J. Thraves, K.G. Bhatia, M.E. Smulson, and A. Dritschilo (1990) *Enhanced poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase activity and gene expression in Ewing's sarcoma cells*. *Cancer Res.* **50**(1): p. 38-43.
342. Chabert, M.G., C.P. Niedergang, F. Hog, M. Partisani, and P. Mandel (1992) *Poly(ADPR)polymerase expression and activity during proliferation and differentiation of rat astrocyte and neuronal cultures*. *Biochim Biophys Acta.* **1136**(2): p. 196-202.
343. Bhatia, M., J.B. Kirkland, and K.A. Meckling-Gill (1995) *Modulation of poly(ADP-ribose) polymerase during neutrophilic and monocytic differentiation of promyelocytic (NB4) and myelocytic (HL-60) leukaemia cells*. *Biochem J.* **308** (Pt 1): p. 131-7.
344. Salminen, A., M. Helenius, T. Lahtinen, P. Korhonen, T. Tapiola, H. Soininen, and V. Solovyan (1997) *Down-regulation of Ku autoantigen, DNA-dependent protein kinase, and poly(ADP-ribose) polymerase during cellular senescence*. *Biochem Biophys Res Commun.* **238**(3): p. 712-6.
345. Burkle, A., C. Brabeck, J. Diefenbach, and S. Beneke (2005) *The emerging role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in longevity*. *Int J Biochem Cell Biol.* **37**(5): p. 1043-53.
346. Menegazzi, M., F. Gerosa, M. Tommasi, K. Uchida, M. Miwa, T. Sugimura, and H. Suzuki (1988) *Induction of poly(ADP-ribose) polymerase gene expression in lectin-stimulated human T lymphocytes is dependent on protein synthesis*. *Biochem Biophys Res Commun.* **156**(2): p. 995-9.
347. McNerney, R., M. Tavasolli, S. Shall, A. Brazinski, and A. Johnstone (1989) *Changes in mRNA levels of poly(ADP-ribose) polymerase during activation of human lymphocytes*. *Biochim Biophys Acta.* **1009**(2): p. 185-7.
348. Ogura, T., H. Nyunoya, M. Takahashi-Masutani, M. Miwa, T. Sugimura, and H. Esumi (1990) *Characterization of a putative promoter region of the human poly(ADP-ribose) polymerase gene: structural similarity to that of the DNA polymerase beta gene*. *Biochem Biophys Res Commun.* **167**(2): p. 701-10.
349. Yokoyama, Y., T. Kawamoto, Y. Mitsuuchi, T. Kurosaki, K. Toda, H. Ushiro, M. Terashima, H. Sumimoto, I. Kuribayashi, Y. Yamamoto, and et al. (1990) *Human poly(ADP-ribose) polymerase gene. Cloning of the promoter region*. *Eur J Biochem.* **194**(2): p. 521-6.
350. Vidakovic, M., A. Gluch, J. Qiao, A. Oumard, M. Frisch, G. Poznanovic, and J. Bode (2009) *PARP-1 expression in the mouse is controlled by an autoregulatory loop: PARP-1 binding to an upstream S/MAR element and to a novel recognition motif in its promoter suppresses transcription*. *J Mol Biol.* **388**(4): p. 730-50.
351. Laniel, M.A., G.G. Poirier, and S.L. Guerin (2001) *Nuclear factor 1 interferes with Sp1 binding through a composite element on the rat poly(ADP-ribose) polymerase promoter to modulate its activity in vitro*. *J Biol Chem.* **276**(23): p. 20766-73.
352. Doetsch, M., A. Gluch, G. Poznanovic, J. Bode, and M. Vidakovic (2012) *YY1-Binding Sites Provide Central Switch Functions in the PARP-1 Gene Expression Network*. *PLoS One.* **7**(8): p. e44125.
353. Oei, S.L., J. Griesenbeck, M. Schweiger, V. Babich, A. Kropotov, and N. Tomilin (1997) *Interaction of the transcription factor YY1 with human poly(ADP-ribosyl) transferase*. *Biochem Biophys Res Commun.* **240**(1): p. 108-11.

354. Zaniolo, K., S. Desnoyers, S. Leclerc, and S.L. Guerin (2007) *Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) gene expression through the post-translational modification of Spl: a nuclear target protein of PARP-1*. *BMC Mol Biol.* **8**: p. 96.
355. Soldatenkov, V.A., A. Albor, B.K. Patel, R. Dreszer, A. Dritschilo, and V. Notario (1999) *Regulation of the human poly(ADP-ribose) polymerase promoter by the ETS transcription factor*. *Oncogene.* **18**(27): p. 3954-62.
356. Soldatenkov, V.A., I.N. Trofimova, A. Rouzaut, F. McDermott, A. Dritschilo, and V. Notario (2002) *Differential regulation of the response to DNA damage in Ewing's sarcoma cells by ETS1 and EWS/FLI-1*. *Oncogene.* **21**(18): p. 2890-5.
357. Kotova, E., N. Lodhi, M. Jarnik, A.D. Pinnola, Y. Ji, and A.V. Tulin (2011) *Drosophila histone H2A variant (H2Av) controls poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) activation in chromatin*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**(15): p. 6205-10.
358. Petesich, S.J. and J.T. Lis (2012) *Activator-induced spread of poly(ADP-ribose) polymerase promotes nucleosome loss at Hsp70*. *Mol Cell.* **45**(1): p. 64-74.
359. Midorikawa, R., Y. Takei, and N. Hirokawa (2006) *KIF4 motor regulates activity-dependent neuronal survival by suppressing PARP-1 enzymatic activity*. *Cell.* **125**(2): p. 371-83.
360. D'Amours, D., S. Desnoyers, I. D'Silva, and G.G. Poirier (1999) *Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions*. *Biochem J.* **342** (Pt 2): p. 249-68.
361. Menissier de Murcia, J., M. Ricoul, L. Tartier, C. Niedergang, A. Huber, F. Dantzer, V. Schreiber, J.C. Ame, A. Dierich, M. LeMeur, L. Sabatier, P. Chambon, and G. de Murcia (2003) *Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse*. *Embo J.* **22**(9): p. 2255-63.
362. Schreiber, V., J.C. Ame, P. Dolle, I. Schultz, B. Rinaldi, V. Fraulob, J. Menissier-de Murcia, and G. de Murcia (2002) *Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1*. *J Biol Chem.* **277**(25): p. 23028-36.
363. Boehler, C., L.R. Gauthier, O. Mortusewicz, D.S. Biard, J.M. Saliou, A. Bresson, S. Sanglier-Cianferani, S. Smith, V. Schreiber, F. Boussin, and F. Dantzer (2011) *Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**(7): p. 2783-8.
364. Loseva, O., A.S. Jemth, H.E. Bryant, H. Schuler, L. Lehtio, T. Karlberg, and T. Helleday (2010) *PARP-3 is a mono-ADP-ribosylase that activates PARP-1 in the absence of DNA*. *J Biol Chem.* **285**(11): p. 8054-60.
365. Mao, Z., C. Hine, X. Tian, M. Van Meter, M. Au, A. Vaidya, A. Seluanov, and V. Gorbunova (2011) *SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1*. *Science.* **332**(6036): p. 1443-6.
366. Gagne, J.P., X. Moreel, P. Gagne, Y. Labelle, A. Droit, M. Chevalier-Pare, S. Bourassa, D. McDonald, M.J. Hendzel, C. Prigent, and G.G. Poirier (2009) *Proteomic investigation of phosphorylation sites in poly(ADP-ribose) polymerase-1 and poly(ADP-ribose) glycohydrolase*. *J Proteome Res.* **8**(2): p. 1014-29.
367. Kauppinen, T.M., W.Y. Chan, S.W. Suh, A.K. Wiggins, E.J. Huang, and R.A. Swanson (2006) *Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(18): p. 7136-41.
368. Wright, R.H., G. Castellano, J. Bonet, F. Le Dily, J. Font-Mateu, C. Ballare, A.S. Nacht, D. Soronellas, B. Oliva, and M. Beato (2012) *CDK2-dependent activation of PARP-1 is required for hormonal gene regulation in breast cancer cells*. *Genes Dev.* **26**(17): p. 1972-83.
369. Zhang, S., Y. Lin, Y.S. Kim, M.P. Hande, Z.G. Liu, and H.M. Shen (2007) *c-Jun N-terminal kinase mediates hydrogen peroxide-induced cell death via sustained poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation*. *Cell Death Differ.* **14**(5): p. 1001-10.
370. Bauer, P.I., G. Farkas, L. Buday, G. Mikala, G. Meszaros, E. Kun, and A. Farago (1992) *Inhibition of DNA binding by the phosphorylation of poly ADP-ribose polymerase protein catalysed by protein kinase C*. *Biochem Biophys Res Commun.* **187**(2): p. 730-6.
371. Beckert, S., F. Farrahi, Q. Perveen Ghani, R. Aslam, H. Scheuenstuhl, S. Coerper, A. Konigsrainer, T.K. Hunt, and M.Z. Hussain (2006) *IGF-I-induced VEGF expression in HUVEC involves phosphorylation and inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase*. *Biochem Biophys Res Commun.* **341**(1): p. 67-72.
372. Bolin, C., M.T. Boudra, M. Fernet, L. Vaslin, V. Pennaneach, T. Zaremba, D. Biard, F.P. Cordelieres, V. Favaudon, F. Megnin-Chanet, and J. Hall (2012) *The impact of cyclin-dependent kinase 5 depletion on poly(ADP-ribose) polymerase activity and responses to radiation*. *Cell Mol Life Sci.* **69**(6): p. 951-62.
373. Dhariwala, F.A. and M.S. Rajadhyaksha (2008) *An unusual member of the Cdk family: Cdk5*. *Cell Mol Neurobiol.* **28**(3): p. 351-69.

374. Ariumi, Y., M. Masutani, T.D. Copeland, T. Mimori, T. Sugimura, K. Shimotohno, K. Ueda, M. Hatanaka, and M. Noda (1999) *Suppression of the poly(ADP-ribose) polymerase activity by DNA-dependent protein kinase in vitro*. *Oncogene*. **18**(32): p. 4616-25.
375. Hassa, P.O., C. Buerki, C. Lombardi, R. Imhof, and M.O. Hottiger (2003) *Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1*. *J Biol Chem*. **278**(46): p. 45145-53.
376. Hassa, P.O., S.S. Haenni, C. Buerki, N.I. Meier, W.S. Lane, H. Owen, M. Gersbach, R. Imhof, and M.O. Hottiger (2005) *Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription*. *J Biol Chem*. **280**(49): p. 40450-64.
377. Pavri, R., B. Lewis, T.K. Kim, F.J. Dilworth, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, G. de Murcia, R. Evans, P. Chambon, and D. Reinberg (2005) *PARP-1 determines specificity in a retinoid signaling pathway via direct modulation of mediator*. *Mol Cell*. **18**(1): p. 83-96.
378. Haenni, S.S., P.O. Hassa, M. Altmeyer, M. Fey, R. Imhof, and M.O. Hottiger (2008) *Identification of lysines 36 and 37 of PARP-2 as targets for acetylation and auto-ADP-ribosylation*. *Int J Biochem Cell Biol*. **40**(10): p. 2274-83.
379. Messner, S., M. Altmeyer, H. Zhao, A. Pozivil, B. Roschitzki, P. Gehrig, D. Rutishauser, D. Huang, A. Caflisch, and M.O. Hottiger (2010) *PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails*. *Nucleic Acids Res*. **38**(19): p. 6350-62.
380. Rajamohan, S.B., V.B. Pillai, M. Gupta, N.R. Sundaresan, K.G. Birukov, S. Samant, M.O. Hottiger, and M.P. Gupta (2009) *SIRT1 promotes cell survival under stress by deacetylation-dependent deactivation of poly(ADP-ribose) polymerase I*. *Mol Cell Biol*. **29**(15): p. 4116-29.
381. Martin, N., K. Schwamborn, V. Schreiber, A. Werner, C. Guillier, X.D. Zhang, O. Bischof, J.S. Seeler, and A. Dejean (2009) *PARP-1 transcriptional activity is regulated by sumoylation upon heat shock*. *Embo J*. **28**(22): p. 3534-48.
382. Stilmann, M., M. Hinz, S.C. Arslan, A. Zimmer, V. Schreiber, and C. Scheidereit (2009) *A nuclear poly(ADP-ribose)-dependent signalosome confers DNA damage-induced IkappaB kinase activation*. *Mol Cell*. **36**(3): p. 365-78.
383. Andrabi, S.A., H.C. Kang, J.F. Haince, Y.I. Lee, J. Zhang, Z. Chi, A.B. West, R.C. Koehler, G.G. Poirier, T.M. Dawson, and V.L. Dawson (2011) *Iduna protects the brain from glutamate excitotoxicity and stroke by interfering with poly(ADP-ribose) polymer-induced cell death*. *Nat Med*. **17**(6): p. 692-9.
384. Kang, H.C., Y.I. Lee, J.H. Shin, S.A. Andrabi, Z. Chi, J.P. Gagne, Y. Lee, H.S. Ko, B.D. Lee, G.G. Poirier, V.L. Dawson, and T.M. Dawson (2011) *Iduna is a poly(ADP-ribose) (PAR)-dependent E3 ubiquitin ligase that regulates DNA damage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**(34): p. 14103-8.
385. Callow, M.G., H. Tran, L. Phu, T. Lau, J. Lee, W.N. Sandoval, P.S. Liu, S. Bheddah, J. Tao, J.R. Lill, J.A. Hongo, D. Davis, D.S. Kirkpatrick, P. Polakis, and M. Costa (2011) *Ubiquitin ligase RNF146 regulates tankyrase and Axin to promote Wnt signaling*. *PLoS One*. **6**(7): p. e22595.
386. Levaot, N., O. Voytyuk, I. Dimitriou, F. Sircoulomb, A. Chandrakumar, M. Deckert, P.M. Krzyzanowski, A. Scotter, S. Gu, S. Janmohamed, F. Cong, P.D. Simoncic, Y. Ueki, J. La Rose, and R. Rottapel (2011) *Loss of Tankyrase-mediated destruction of 3BP2 is the underlying pathogenic mechanism of cherubism*. *Cell*. **147**(6): p. 1324-39.
387. Zhang, Y., S. Liu, C. Mickanin, Y. Feng, O. Charlat, G.A. Michaud, M. Schirle, X. Shi, M. Hild, A. Bauer, V.E. Myer, P.M. Finan, J.A. Porter, S.M. Huang, and F. Cong (2011) *RNF146 is a poly(ADP-ribose)-directed E3 ligase that regulates axin degradation and Wnt signalling*. *Nat Cell Biol*. **13**(5): p. 623-9.
388. Kashima, L., M. Idogawa, H. Mita, M. Shitashige, T. Yamada, K. Ogi, H. Suzuki, M. Toyota, H. Ariga, Y. Sasaki, and T. Tokino (2012) *CHFR protein regulates mitotic checkpoint by targeting PARP-1 protein for ubiquitination and degradation*. *J Biol Chem*. **287**(16): p. 12975-84.
389. Meyer-Ficca, M.L., R.G. Meyer, D.L. Coyle, E.L. Jacobson, and M.K. Jacobson (2004) *Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments*. *Exp Cell Res*. **297**(2): p. 521-32.
390. Slade, D., M.S. Dunstan, E. Barkauskaite, R. Weston, P. Lafite, N. Dixon, M. Ahel, D. Leys, and I. Ahel (2011) *The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase*. *Nature*. **477**(7366): p. 616-20.
391. Oka, S., J. Kato, and J. Moss (2006) *Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase*. *J Biol Chem*. **281**(2): p. 705-13.
392. Yu, S.W., S.A. Andrabi, H. Wang, N.S. Kim, G.G. Poirier, T.M. Dawson, and V.L. Dawson (2006) *Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**(48): p. 18314-9.
393. Smith, B.C., W.C. Hallows, and J.M. Denu (2009) *A continuous microplate assay for sirtuins and nicotinamide-producing enzymes*. *Anal Biochem*. **394**(1): p. 101-9.

394. Kolisek, M., A. Beck, A. Fleig, and R. Penner (2005) *Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels*. *Mol Cell*. **18**(1): p. 61-9.
395. Wahlberg, E., T. Karlberg, E. Kouznetsova, N. Markova, A. Macchiarulo, A.G. Thorsell, E. Pol, A. Frostell, T. Ekblad, D. Oncu, B. Kull, G.M. Robertson, R. Pellicciari, H. Schuler, and J. Weigelt (2012) *Family-wide chemical profiling and structural analysis of PARP and tankyrase inhibitors*. *Nat Biotechnol*. **30**(3): p. 283-8.
396. de Murcia, J.M., C. Niedergang, C. Trucco, M. Ricoul, B. Dutrillaux, M. Mark, F.J. Oliver, M. Masson, A. Dierich, M. LeMeur, C. Walztinger, P. Chambon, and G. de Murcia (1997) *Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**(14): p. 7303-7.
397. Trucco, C., F.J. Oliver, G. de Murcia, and J. Menissier-de Murcia (1998) *DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines*. *Nucleic Acids Res*. **26**(11): p. 2644-9.
398. Dantzer, F., G. de La Rubia, J. Menissier-De Murcia, Z. Hostomsky, G. de Murcia, and V. Schreiber (2000) *Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1*. *Biochemistry*. **39**(25): p. 7559-69.
399. Godon, C., F.P. Cordeliers, D. Biard, N. Giocanti, F. Megnin-Chanet, J. Hall, and V. Favaudon (2008) *PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility*. *Nucleic Acids Res*. **36**(13): p. 4454-64.
400. Strom, C.E., F. Johansson, M. Uhlen, C.A. Szigartyo, K. Erixon, and T. Helleday (2011) *Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate*. *Nucleic Acids Res*. **39**(8): p. 3166-75.
401. Vodenicharov, M.D., F.R. Sallmann, M.S. Satoh, and G.G. Poirier (2000) *Base excision repair is efficient in cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase I*. *Nucleic Acids Res*. **28**(20): p. 3887-96.
402. Ciccia, A. and S.J. Elledge (2010) *The DNA damage response: making it safe to play with knives*. *Mol Cell*. **40**(2): p. 179-204.
403. Yap, T.A., S.K. Sandhu, C.P. Carden, and J.S. de Bono (2011) *Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors: Exploiting a synthetic lethal strategy in the clinic*. *CA Cancer J Clin*. **61**(1): p. 31-49.
404. De Vos, M., V. Schreiber, and F. Dantzer (2012) *The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art*. *Biochem Pharmacol*. **84**(2): p. 137-46.
405. Noren Hooten, N., K. Kompaniez, J. Barnes, A. Lohani, and M.K. Evans (2011) *Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1)*. *J Biol Chem*. **286**(52): p. 44679-90.
406. Heale, J.T., A.R. Ball, Jr., J.A. Schmiesing, J.S. Kim, X. Kong, S. Zhou, D.F. Hudson, W.C. Earnshaw, and K. Yokomori (2006) *Condensin I interacts with the PARP-1-XRCC1 complex and functions in DNA single-strand break repair*. *Mol Cell*. **21**(6): p. 837-48.
407. Harris, J.L., B. Jakob, G. Taucher-Scholz, G.L. Dianov, O.J. Becherel, and M.F. Lavin (2009) *Aprataxin, poly-ADP ribose polymerase 1 (PARP-1) and apurinic endonuclease 1 (APE1) function together to protect the genome against oxidative damage*. *Hum Mol Genet*. **18**(21): p. 4102-17.
408. Wilson, S.H. and T.A. Kunkel (2000) *Passing the baton in base excision repair*. *Nat Struct Biol*. **7**(3): p. 176-8.
409. Frouin, I., G. Maga, M. Denegri, F. Riva, M. Savio, S. Spadari, E. Prospero, and A.I. Scovassi (2003) *Human proliferating cell nuclear antigen, poly(ADP-ribose) polymerase-1, and p21waf1/cip1. A dynamic exchange of partners*. *J Biol Chem*. **278**(41): p. 39265-8.
410. Gudmundsdottir, K. and A. Ashworth (2006) *The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability*. *Oncogene*. **25**(43): p. 5864-74.
411. Meyer, R., M. Muller, S. Beneke, J.H. Kupper, and A. Burkle (2000) *Negative regulation of alkylation-induced sister-chromatid exchange by poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity*. *Int J Cancer*. **88**(3): p. 351-5.
412. Yang, Y.G., U. Cortes, S. Patnaik, M. Jasin, and Z.Q. Wang (2004) *Ablation of PARP-1 does not interfere with the repair of DNA double-strand breaks, but compromises the reactivation of stalled replication forks*. *Oncogene*. **23**(21): p. 3872-82.
413. Schultz, N., E. Lopez, N. Saleh-Gohari, and T. Helleday (2003) *Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination*. *Nucleic Acids Res*. **31**(17): p. 4959-64.
414. Bryant, H.E., E. Petermann, N. Schultz, A.S. Jemth, O. Loseva, N. Issaeva, F. Johansson, S. Fernandez, P. McGlynn, and T. Helleday (2009) *PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination*. *Embo J*. **28**(17): p. 2601-15.
415. Ying, S., F.C. Hamdy, and T. Helleday (2012) *Mre11-dependent degradation of stalled DNA replication forks is prevented by BRCA2 and PARP1*. *Cancer Res*. **72**(11): p. 2814-21.

416. Sugimura, K., S. Takebayashi, H. Taguchi, S. Takeda, and K. Okumura (2008) *PARP-1 ensures regulation of replication fork progression by homologous recombination on damaged DNA*. *J Cell Biol.* **183**(7): p. 1203-12.
417. Sung, P. and H. Klein (2006) *Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions*. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**(10): p. 739-50.
418. Gottipati, P., B. Vischioni, N. Schultz, J. Solomons, H.E. Bryant, T. Djureinovic, N. Issaeva, K. Sleeth, R.A. Sharma, and T. Helleday (2010) *Poly(ADP-ribose) polymerase is hyperactivated in homologous recombination-defective cells*. *Cancer Res.* **70**(13): p. 5389-98.
419. Lieber, M.R. (2010) *The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway*. *Annu Rev Biochem.* **79**: p. 181-211.
420. Rosidi, B., M. Wang, W. Wu, A. Sharma, H. Wang, and G. Iliakis (2008) *Histone H1 functions as a stimulatory factor in backup pathways of NHEJ*. *Nucleic Acids Res.* **36**(5): p. 1610-23.
421. Wang, M., W. Wu, W. Wu, B. Rosidi, L. Zhang, H. Wang, and G. Iliakis (2006) *PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways*. *Nucleic Acids Res.* **34**(21): p. 6170-82.
422. Cheng, Q., N. Barboule, P. Frit, D. Gomez, O. Bombarde, B. Couderc, G.S. Ren, B. Salles, and P. Calsou (2011) *Ku counteracts mobilization of PARP1 and MRN in chromatin damaged with DNA double-strand breaks*. *Nucleic Acids Res.* **39**(22): p. 9605-19.
423. Robert, I., F. Dantzer, and B. Reina-San-Martin (2009) *Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination*. *J Exp Med.* **206**(5): p. 1047-56.
424. Ruscetti, T., B.E. Lehnert, J. Halbrook, H. Le Trong, M.F. Hoekstra, D.J. Chen, and S.R. Peterson (1998) *Stimulation of the DNA-dependent protein kinase by poly(ADP-ribose) polymerase*. *J Biol Chem.* **273**(23): p. 14461-7.
425. Poirier, G.G., G. de Murcia, J. Jongstra-Bilen, C. Niedergang, and P. Mandel (1982) *Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **79**(11): p. 3423-7.
426. Huletsky, A., G. de Murcia, S. Muller, M. Hengartner, L. Menard, D. Lamarre, and G.G. Poirier (1989) *The effect of poly(ADP-ribosylation) on native and H1-depleted chromatin. A role of poly(ADP-ribosylation) on core nucleosome structure*. *J Biol Chem.* **264**(15): p. 8878-86.
427. Wacker, D.A., D.D. Ruhl, E.H. Balagamwala, K.M. Hope, T. Zhang, and W.L. Kraus (2007) *The DNA binding and catalytic domains of poly(ADP-ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure and transcription*. *Mol Cell Biol.* **27**(21): p. 7475-85.
428. Quenet, D., R. El Ramy, V. Schreiber, and F. Dantzer (2009) *The role of poly(ADP-ribosylation) in epigenetic events*. *Int J Biochem Cell Biol.* **41**(1): p. 60-5.
429. Krishnakumar, R., M.J. Gamble, K.M. Frizzell, J.G. Berrocal, M. Kininis, and W.L. Kraus (2008) *Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes*. *Science.* **319**(5864): p. 819-21.
430. Gamble, M.J. and R.P. Fisher (2007) *SET and PARP1 remove DEK from chromatin to permit access by the transcription machinery*. *Nat Struct Mol Biol.* **14**(6): p. 548-55.
431. Pinnola, A., N. Naumova, M. Shah, and A.V. Tulin (2007) *Nucleosomal core histones mediate dynamic regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 protein binding to chromatin and induction of its enzymatic activity*. *J Biol Chem.* **282**(44): p. 32511-9.
432. Klenova, E. and R. Ohlsson (2005) *Poly(ADP-ribosylation) and epigenetics. Is CTCF PART of the plot?* *Cell Cycle.* **4**(1): p. 96-101.
433. Yu, W., V. Ginjala, V. Pant, I. Chernukhin, J. Whitehead, F. Docquier, D. Farrar, G. Tavoosidana, R. Mukhopadhyay, C. Kanduri, M. Oshimura, A.P. Feinberg, V. Lobanenkov, E. Klenova, and R. Ohlsson (2004) *Poly(ADP-ribosylation) regulates CTCF-dependent chromatin insulation*. *Nat Genet.* **36**(10): p. 1105-10.
434. Farrar, D., S. Rai, I. Chernukhin, M. Jagodic, Y. Ito, S. Yammine, R. Ohlsson, A. Murrell, and E. Klenova (2010) *Mutational analysis of the poly(ADP-ribosylation) sites of the transcription factor CTCF provides an insight into the mechanism of its regulation by poly(ADP-ribosylation)*. *Mol Cell Biol.* **30**(5): p. 1199-216.
435. Kolthur-Seetharam, U., F. Dantzer, M.W. McBurney, G. de Murcia, and P. Sassone-Corsi (2006) *Control of AIF-mediated cell death by the functional interplay of SIRT1 and PARP-1 in response to DNA damage*. *Cell Cycle.* **5**(8): p. 873-7.
436. Zhang, T. and W.L. Kraus (2009) *SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD(+) metabolism and signaling to the control of cellular functions*. *Biochim Biophys Acta.* **1804**(8): p. 1666-75.

437. Akiyama, T., S. Takasawa, K. Nata, S. Kobayashi, M. Abe, N.J. Shervani, T. Ikeda, K. Nakagawa, M. Unno, S. Matsuno, and H. Okamoto (2001) *Activation of Reg gene, a gene for insulin-producing beta - cell regeneration: poly(ADP-ribose) polymerase binds Reg promoter and regulates the transcription by autopoly(ADP-ribosylation)*. Proc Natl Acad Sci U S A. **98**(1): p. 48-53.
438. Butler, A.J. and C.P. Ordahl (1999) *Poly(ADP-ribose) polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription*. Mol Cell Biol. **19**(1): p. 296-306.
439. Huang, K., W.E. Tidymann, K.U. Le, E. Kirsten, E. Kun, and C.P. Ordahl (2004) *Analysis of nucleotide sequence-dependent DNA binding of poly(ADP-ribose) polymerase in a purified system*. Biochemistry. **43**(1): p. 217-23.
440. Nirodi, C., S. NagDas, S.P. Gygi, G. Olson, R. Aebersold, and A. Richmond (2001) *A role for poly(ADP-ribose) polymerase in the transcriptional regulation of the melanoma growth stimulatory activity (CXCL1) gene expression*. J Biol Chem. **276**(12): p. 9366-74.
441. Zhang, Z., E.F. Hildebrandt, C.M. Simbulan-Rosenthal, and M.G. Anderson (2002) *Sequence-specific binding of poly(ADP-ribose) polymerase-1 to the human T cell leukemia virus type-1 tax responsive element*. Virology. **296**(1): p. 107-16.
442. Amiri, K.I., H.C. Ha, M.E. Smulson, and A. Richmond (2006) *Differential regulation of CXC ligand 1 transcription in melanoma cell lines by poly(ADP-ribose) polymerase-1*. Oncogene. **25**(59): p. 7714-22.
443. Ambrose, H.E., V. Papadopoulou, R.W. Beswick, and S.D. Wagner (2007) *Poly-(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) binds in a sequence-specific manner at the Bcl-6 locus and contributes to the regulation of Bcl-6 transcription*. Oncogene. **26**(42): p. 6244-52.
444. Soldatenkov, V.A., S. Chasovskikh, V.N. Potaman, I. Trofimova, M.E. Smulson, and A. Dritschilo (2002) *Transcriptional repression by binding of poly(ADP-ribose) polymerase to promoter sequences*. J Biol Chem. **277**(1): p. 665-70.
445. Ju, B.G., D. Solum, E.J. Song, K.J. Lee, D.W. Rose, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld (2004) *Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase IIdelta-dependent neurogenic gene activation pathway*. Cell. **119**(6): p. 815-29.
446. Kraus, W.L. and J.T. Lis (2003) *PARP goes transcription*. Cell. **113**(6): p. 677-83.
447. Ogino, H., T. Nozaki, A. Gunji, M. Maeda, H. Suzuki, T. Ohta, Y. Murakami, H. Nakagama, T. Sugimura, and M. Masutani (2007) *Loss of Parp-1 affects gene expression profile in a genome-wide manner in ES cells and liver cells*. BMC Genomics. **8**: p. 41.
448. Simbulan-Rosenthal, C.M., D.H. Ly, D.S. Rosenthal, G. Konopka, R. Luo, Z.Q. Wang, P.G. Schultz, and M.E. Smulson (2000) *Misregulation of gene expression in primary fibroblasts lacking poly(ADP-ribose) polymerase*. Proc Natl Acad Sci U S A. **97**(21): p. 11274-9.
449. Zingarelli, B., P.W. Hake, M. O'Connor, A. Denenberg, S. Kong, and B.J. Aronow (2003) *Absence of poly(ADP-ribose)polymerase-1 alters nuclear factor-kappa B activation and gene expression of apoptosis regulators after reperfusion injury*. Mol Med. **9**(5-8): p. 143-53.
450. Wang, Z.Q., B. Auer, L. Stingl, H. Berghammer, D. Haidacher, M. Schweiger, and E.F. Wagner (1995) *Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosylation) develop normally but are susceptible to skin disease*. Genes Dev. **9**(5): p. 509-20.
451. Hassa, P.O. and M.O. Hottiger (2002) *The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders*. Cell Mol Life Sci. **59**(9): p. 1534-53.
452. Olabisi, O.A., N. Soto-Nieves, E. Nieves, T.T. Yang, X. Yang, R.Y. Yu, H.Y. Suk, F. Macian, and C.W. Chow (2008) *Regulation of transcription factor NFAT by ADP-ribosylation*. Mol Cell Biol. **28**(9): p. 2860-71.
453. Brenner, J.C., B. Ateeq, Y. Li, A.K. Yocum, Q. Cao, I.A. Asangani, S. Patel, X. Wang, H. Liang, J. Yu, N. Palanisamy, J. Siddiqui, W. Yan, X. Cao, R. Mehra, A. Sabolch, V. Basrur, R.J. Lonigro, J. Yang, S.A. Tomlins, C.A. Maher, K.S. Elenitoba-Johnson, M. Hussain, N.M. Navone, K.J. Pienta, S. Varambally, F.Y. Feng, and A.M. Chinnaiyan (2011) *Mechanistic rationale for inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in ETS gene fusion-positive prostate cancer*. Cancer Cell. **19**(5): p. 664-78.
454. Li, M., P. Naidu, Y. Yu, N.A. Berger, and P. Kannan (2004) *Dual regulation of AP-2alpha transcriptional activation by poly(ADP-ribose) polymerase-1*. Biochem J. **382**(Pt 1): p. 323-9.
455. Ju, B.G., V.V. Lunyak, V. Perissi, I. Garcia-Bassets, D.W. Rose, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld (2006) *A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription*. Science. **312**(5781): p. 1798-802.
456. Wang, H., R. Fang, J.Y. Cho, T.A. Libermann, and P. Oettgen (2004) *Positive and negative modulation of the transcriptional activity of the ETS factor ESE-1 through interaction with p300, CREB-binding protein, and Ku 70/86*. J Biol Chem. **279**(24): p. 25241-50.
457. Ishiguro, A., M. Ideta, K. Mikoshiba, D.J. Chen, and J. Aruga (2007) *ZIC2-dependent transcriptional regulation is mediated by DNA-dependent protein kinase, poly(ADP-ribose) polymerase, and RNA helicase A*. J Biol Chem. **282**(13): p. 9983-95.

458. Wong, R.H., I. Chang, C.S. Hudak, S. Hyun, H.Y. Kwan, and H.S. Sul (2009) *A role of DNA-PK for the metabolic gene regulation in response to insulin*. *Cell*. **136**(6): p. 1056-72.
459. Shall, S. and G. de Murcia (2000) *Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?* *Mutat Res*. **460**(1): p. 1-15.
460. Welsby, I., D. Hutin, and O. Leo (2012) *Complex roles of members of the ADP-ribosyl transferase super family in immune defences: looking beyond PARP1*. *Biochem Pharmacol*. **84**(1): p. 11-20.
461. Earle, E., A. Saxena, A. MacDonald, D.F. Hudson, L.G. Shaffer, R. Saffery, M.R. Cancilla, S.M. Cutts, E. Howman, and K.H. Choo (2000) *Poly(ADP-ribose) polymerase at active centromeres and neocentromeres at metaphase*. *Hum Mol Genet*. **9**(2): p. 187-94.
462. Bakondi, E., P. Bai, E.E. Szabo, J. Hunyadi, P. Gergely, C. Szabo, and L. Virag (2002) *Detection of poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissues using biotinylated NAD substrate*. *J Histochem Cytochem*. **50**(1): p. 91-8.
463. Chang, P., M.K. Jacobson, and T.J. Mitchison (2004) *Poly(ADP-ribose) is required for spindle assembly and structure*. *Nature*. **432**(7017): p. 645-9.
464. Ohanna, M., S. Giuliano, C. Bonet, V. Imbert, V. Hofman, J. Zangari, K. Bille, C. Robert, B. Bressac-de Paillerets, P. Hofman, S. Rocchi, J.F. Peyron, J.P. Lacour, R. Ballotti, and C. Bertolotto (2011) *Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome (PNAS)*. *Genes Dev*. **25**(12): p. 1245-61.
465. Beneke, S. and A. Burkle (2007) *Poly(ADP-ribosyl)ation in mammalian ageing*. *Nucleic Acids Res*. **35**(22): p. 7456-65.
466. Grube, K. and A. Burkle (1992) *Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**(24): p. 11759-63.
467. Lebel, M., J. Lavoie, I. Gaudreault, M. Bronsard, and R. Drouin (2003) *Genetic cooperation between the Werner syndrome protein and poly(ADP-ribose) polymerase-1 in preventing chromatid breaks, complex chromosomal rearrangements, and cancer in mice*. *Am J Pathol*. **162**(5): p. 1559-69.
468. von Kobbe, C., J.A. Harrigan, A. May, P.L. Opresko, L. Dawut, W.H. Cheng, and V.A. Bohr (2003) *Central role for the Werner syndrome protein/poly(ADP-ribose) polymerase I complex in the poly(ADP-ribosyl)ation pathway after DNA damage*. *Mol Cell Biol*. **23**(23): p. 8601-13.
469. Lee, J.W., J. Harrigan, P.L. Opresko, and V.A. Bohr (2005) *Pathways and functions of the Werner syndrome protein*. *Mech Ageing Dev*. **126**(1): p. 79-86.
470. Wang, Y., V.L. Dawson, and T.M. Dawson (2009) *Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos*. *Exp Neurol*. **218**(2): p. 193-202.
471. Munoz-Gamez, J.A., J.M. Rodriguez-Vargas, R. Quiles-Perez, R. Aguilar-Quesada, D. Martin-Oliva, G. de Murcia, J. Menissier de Murcia, A. Almendros, M. Ruiz de Almodovar, and F.J. Oliver (2009) *PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage*. *Autophagy*. **5**(1): p. 61-74.
472. David, K.K., S.A. Andrabi, T.M. Dawson, and V.L. Dawson (2009) *Parthanatos, a messenger of death*. *Front Biosci*. **14**: p. 1116-28.
473. Wang, Y., N.S. Kim, J.F. Haince, H.C. Kang, K.K. David, S.A. Andrabi, G.G. Poirier, V.L. Dawson, and T.M. Dawson (2011) *Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos)*. *Sci Signal*. **4**(167): p. ra20.
474. Gao, F., S.W. Kwon, Y. Zhao, and Y. Jin (2009) *PARP1 poly(ADP-ribosyl)ates Sox2 to control Sox2 protein levels and FGF4 expression during embryonic stem cell differentiation*. *J Biol Chem*. **284**(33): p. 22263-73.
475. Lai, Y.S., C.W. Chang, K.M. Pawlik, D. Zhou, M.B. Renfrow, and T.M. Townes (2012) *SRY (sex determining region Y)-box2 (Sox2)/poly ADP-ribose polymerase 1 (Parp1) complexes regulate pluripotency*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109**(10): p. 3772-7.
476. Ambrose, H.E., S. Willimott, R.W. Beswick, F. Dantzer, J.M. de Murcia, J. Yelamos, and S.D. Wagner (2009) *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1)-deficient mice demonstrate abnormal antibody responses*. *Immunology*. **127**(2): p. 178-86.
477. Quenet, D., V. Gasser, L. Fouillen, F. Cammas, S. Sanglier-Cianferani, R. Losson, and F. Dantzer (2008) *The histone subcode: poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) and Parp-2 control cell differentiation by regulating the transcriptional intermediary factor TIF1beta and the heterochromatin protein HP1alpha*. *Faseb J*. **22**(11): p. 3853-65.
478. Erener, S., A. Mirsaidi, M. Hesse, A.N. Taden, H. Ellingsgaard, R. Kostadinova, M.Y. Donath, P.J. Richards, and M.O. Hottiger (2012) *ARTD1 deletion causes increased hepatic lipid accumulation in mice fed a high-fat diet and impairs adipocyte function and differentiation*. *Faseb J*. **26**(6): p. 2631-8.
479. Nasta, F., F. Laudisi, M. Sambucci, M.M. Rosado, and C. Pioli (2010) *Increased Foxp3+ regulatory T cells in poly(ADP-Ribose) polymerase-1 deficiency*. *J Immunol*. **184**(7): p. 3470-7.

480. Boehler, C., L. Gauthier, J. Yelamos, A. Noll, V. Schreiber, and F. Dantzer (2011) *Phenotypic characterization of Parp-1 and Parp-2 deficient mice and cells*. *Methods Mol Biol.* **780**: p. 313-36.
481. Bai, P., C. Canto, A. Brunyanszki, A. Huber, M. Szanto, Y. Cen, H. Yamamoto, S.M. Houten, B. Kiss, H. Oudart, P. Gergely, J. Menissier-de Murcia, V. Schreiber, A.A. Sauve, and J. Auwerx (2011) *PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure*. *Cell Metab.* **13**(4): p. 450-60.
482. Bai, P., C. Canto, H. Oudart, A. Brunyanszki, Y. Cen, C. Thomas, H. Yamamoto, A. Huber, B. Kiss, R.H. Houtkooper, K. Schoonjans, V. Schreiber, A.A. Sauve, J. Menissier-de Murcia, and J. Auwerx (2011) *PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation*. *Cell Metab.* **13**(4): p. 461-8.
483. Asher, G., H. Reinke, M. Altmeyer, M. Gutierrez-Arcelus, M.O. Hottiger, and U. Schibler (2010) *Poly(ADP-ribose) polymerase 1 participates in the phase entrainment of circadian clocks to feeding*. *Cell.* **142**(6): p. 943-53.
484. Burkart, V., Z.Q. Wang, J. Radons, B. Heller, Z. Herceg, L. Stingl, E.F. Wagner, and H. Kolb (1999) *Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin*. *Nat Med.* **5**(3): p. 314-9.
485. Bai, P. and C. Canto (2012) *The Role of PARP-1 and PARP-2 Enzymes in Metabolic Regulation and Disease*. *Cell Metab.* **16**(3): p. 290-5.
486. Masutani, M., H. Nakagama, and T. Sugimura (2005) *Poly(ADP-ribosyl)ation in relation to cancer and autoimmune disease*. *Cell Mol Life Sci.* **62**(7-8): p. 769-83.
487. Morrison, C., G.C. Smith, L. Stingl, S.P. Jackson, E.F. Wagner, and Z.Q. Wang (1997) *Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis*. *Nat Genet.* **17**(4): p. 479-82.
488. Tong, W.M., M.P. Hande, P.M. Lansdorp, and Z.Q. Wang (2001) *DNA strand break-sensing molecule poly(ADP-Ribose) polymerase cooperates with p53 in telomere function, chromosome stability, and tumor suppression*. *Mol Cell Biol.* **21**(12): p. 4046-54.
489. Zaremba, T., P. Ketzer, M. Cole, S. Coulthard, E.R. Plummer, and N.J. Curtin (2009) *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 polymorphisms, expression and activity in selected human tumour cell lines*. *Br J Cancer.* **101**(2): p. 256-62.
490. Bieche, I., G. de Murcia, and R. Lidereau (1996) *Poly(ADP-ribose) polymerase gene expression status and genomic instability in human breast cancer*. *Clin Cancer Res.* **2**(7): p. 1163-7.
491. Domagala, P., T. Huzarski, J. Lubinski, K. Gugala, and W. Domagala (2011) *PARP-1 expression in breast cancer including BRCA1-associated, triple negative and basal-like tumors: possible implications for PARP-1 inhibitor therapy*. *Breast Cancer Res Treat.* **127**(3): p. 861-9.
492. Ossovskaya, V., I.C. Koo, E.P. Kaldjian, C. Alvares, and B.M. Sherman (2010) *Upregulation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types*. *Genes Cancer.* **1**(8): p. 812-21.
493. Quiles-Perez, R., J.A. Munoz-Gamez, A. Ruiz-Extremera, F. O'Valle, L. Sanjuan-Nunez, A.B. Martin-Alvarez, D. Martin-Oliva, T. Caballero, P. Munoz de Rueda, J. Leon, R. Gonzalez, J. Muntane, F.J. Oliver, and J. Salmeron (2010) *Inhibition of poly adenosine diphosphate-ribose polymerase decreases hepatocellular carcinoma growth by modulation of tumor-related gene expression*. *Hepatology.* **51**(1): p. 255-66.
494. Noshu, K., H. Yamamoto, M. Mikami, H. Taniguchi, T. Takahashi, Y. Adachi, A. Imamura, K. Imai, and Y. Shinomura (2006) *Overexpression of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in the early stage of colorectal carcinogenesis*. *Eur J Cancer.* **42**(14): p. 2374-81.
495. Csete, B., Z. Lengyel, Z. Kadar, and Z. Battyani (2009) *Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase-1 expression in cutaneous malignant melanomas as a new molecular marker of aggressive tumor*. *Pathol Oncol Res.* **15**(1): p. 47-53.
496. Farmer, H., N. McCabe, C.J. Lord, A.N. Tutt, D.A. Johnson, T.B. Richardson, M. Santarosa, K.J. Dillon, I. Hickson, C. Knights, N.M. Martin, S.P. Jackson, G.C. Smith, and A. Ashworth (2005) *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy*. *Nature.* **434**(7035): p. 917-21.
497. Ibrahim, Y.H., C. Garcia-Garcia, V. Serra, L. He, K. Torres-Lockhart, A. Prat, P. Anton, P. Cozar, M. Guzman, J. Grueso, O. Rodriguez, M.T. Calvo, C. Aura, O. Diez, I.T. Rubio, J. Perez, J. Rodon, J. Cortes, L.W. Ellisen, M. Scaltriti, and J. Baselga (2012) *PI3K inhibition impairs BRCA1/2 expression and sensitizes BRCA proficient triple negative breast cancer to PARP inhibition*. *Cancer Discov.* **Epub ahead of print.**
498. Basu, B., T.A. Yap, L.R. Molife, and J.S. de Bono (2012) *Targeting the DNA damage response in oncology: past, present and future perspectives*. *Curr Opin Oncol.* **24**(3): p. 316-24.

499. Brenner, J.C., F.Y. Feng, S. Han, S. Patel, S.V. Goyal, L.M. Bou-Maroun, M. Liu, R. Lonigro, J.R. Prensner, S.A. Tomlins, and A.M. Chinnaiyan (2012) *PARP-1 inhibition as a targeted strategy to treat Ewing's sarcoma*. *Cancer Res.* **72**(7): p. 1608-13.
500. Garnett, M.J., E.J. Edelman, S.J. Heidorn, C.D. Greenman, A. Dastur, K.W. Lau, P. Greninger, I.R. Thompson, X. Luo, J. Soares, Q. Liu, F. Iorio, D. Surdez, L. Chen, R.J. Milano, G.R. Bignell, A.T. Tam, H. Davies, J.A. Stevenson, S. Barthorpe, S.R. Lutz, F. Kogera, K. Lawrence, A. McLaren-Douglas, X. Mitropoulos, T. Mironenko, H. Thi, L. Richardson, W. Zhou, F. Jewitt, T. Zhang, P. O'Brien, J.L. Boisvert, S. Price, W. Hur, W. Yang, X. Deng, A. Butler, H.G. Choi, J.W. Chang, J. Baselga, I. Stamenkovic, J.A. Engelman, S.V. Sharma, O. Delattre, J. Saez-Rodriguez, N.S. Gray, J. Settleman, P.A. Futreal, D.A. Haber, M.R. Stratton, S. Ramaswamy, U. McDermott, and C.H. Benes (2012) *Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells*. *Nature*. **483**(7391): p. 570-5.
501. Ledford, H. (2012) *Drug candidates derailed in case of mistaken identity*. *Nature*. **483**(7391): p. 519.
502. Patel, A.G., S.B. De Lorenzo, K.S. Flatten, G.G. Poirier, and S.H. Kaufmann (2012) *Failure of iniparib to inhibit poly(ADP-Ribose) polymerase in vitro*. *Clin Cancer Res.* **18**(6): p. 1655-62.
503. Ma, W., C.J. Halweg, D. Menendez, and M.A. Resnick (2012) *Differential effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition on DNA break repair in human cells are revealed with Epstein-Barr virus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**(17): p. 6590-5.
504. Peralta-Leal, A., J.M. Rodriguez-Vargas, R. Aguilar-Quesada, M.I. Rodriguez, J.L. Linares, M.R. de Almodovar, and F.J. Oliver (2009) *PARP inhibitors: new partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases*. *Free Radic Biol Med.* **47**(1): p. 13-26.
505. Giansanti, V., F. Dona, M. Tillhon, and A.I. Scovassi (2010) *PARP inhibitors: new tools to protect from inflammation*. *Biochem Pharmacol.* **80**(12): p. 1869-77.
506. Mabley, J.G., P. Jagtap, M. Perretti, S.J. Getting, A.L. Salzman, L. Virag, E. Szabo, F.G. Soriano, L. Liaudet, G.E. Abdelkarim, G. Hasko, A. Marton, G.J. Southan, and C. Szabo (2001) *Anti-inflammatory effects of a novel, potent inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase*. *Inflamm Res.* **50**(11): p. 561-9.
507. Gonzalez-Rey, E., R. Martinez-Romero, F. O'Valle, R. Aguilar-Quesada, C. Conde, M. Delgado, and F.J. Oliver (2007) *Therapeutic effect of a poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor on experimental arthritis by downregulating inflammation and Th1 response*. *PLoS One.* **2**(10): p. e1071.
508. Laitem, C., S. Choul-Li, D. Baillat, A. Begue, and M. Aumercier (2008) *Efficient system for biotinylated recombinant Ets-1 production in Escherichia coli: a useful tool for studying interactions between Ets-1 and its partners*. *Protein Expr Purif.* **62**(1): p. 53-63.
509. Toretsky, J.A., V. Erkizan, A. Levenson, O.D. Abaan, J.D. Parvin, T.P. Cripe, A.M. Rice, S.B. Lee, and A. Uren (2006) *Oncoprotein EWS-FLII activity is enhanced by RNA helicase A*. *Cancer Res.* **66**(11): p. 5574-81.
510. Erkizan, H.V., Y. Kong, M. Merchant, S. Schlottmann, J.S. Barber-Rotenberg, L. Yuan, O.D. Abaan, T.H. Chou, S. Dakshanamurthy, M.L. Brown, A. Uren, and J.A. Toretsky (2009) *A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLII interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma*. *Nat Med.* **15**(7): p. 750-6.
511. Barber-Rotenberg, J.S., S.P. Selvanathan, Y. Kong, H.V. Erkizan, T.M. Snyder, S.P. Hong, C.L. Kobs, N.L. South, S. Summer, P.J. Monroe, M. Chruszcz, V. Dobrev, P.N. Tosso, L.J. Scher, W. Minor, M.L. Brown, S.J. Metallo, A. Uren, and J.A. Toretsky (2012) *Single enantiomer of YK-4-279 demonstrates specificity in targeting the oncogene EWS-FLII*. *Oncotarget.* **3**(2): p. 172-82.
512. Rahim, S., E.M. Beauchamp, Y. Kong, M.L. Brown, J.A. Toretsky, and A. Uren (2011) *YK-4-279 inhibits ERG and ETV1 mediated prostate cancer cell invasion*. *PLoS One.* **6**(4): p. e19343.
513. Guillaumond, F., B. Boyer, D. Becquet, S. Guillen, L. Kuhn, J. Garin, M. Belghazi, O. Bosler, J.L. Franc, and A.M. Francois-Bellan (2011) *Chromatin remodeling as a mechanism for circadian prolactin transcription: rhythmic NONO and SFPQ recruitment to HLTF*. *Faseb J.* **25**(8): p. 2740-56.
514. Ko, L. and W.W. Chin (2003) *Nuclear receptor coactivator thyroid hormone receptor-binding protein (TRBP) interacts with and stimulates its associated DNA-dependent protein kinase*. *J Biol Chem.* **278**(13): p. 11471-9.
515. Gell, D. and S.P. Jackson (1999) *Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex*. *Nucleic Acids Res.* **27**(17): p. 3494-502.
516. Hu, S., J.M. Pluth, and F.A. Cucinotta (2012) *Putative binding modes of Ku70-SAP domain with double strand DNA: a molecular modeling study*. *J Mol Model.* **18**(5): p. 2163-74.
517. Schild-Poulter, C., L. Pope, W. Giffin, J.C. Kochan, J.K. Ngsee, M. Traykova-Andonova, and R.J. Hache (2001) *The binding of Ku antigen to homeodomain proteins promotes their phosphorylation by DNA-dependent protein kinase*. *J Biol Chem.* **276**(20): p. 16848-56.
518. Soldani, C. and A.I. Scovassi (2002) *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update*. *Apoptosis.* **7**(4): p. 321-8.

519. Ni, W., Y. Zhan, H. He, E. Maynard, J.A. Balschi, and P. Oettgen (2007) *Ets-1 is a critical transcriptional regulator of reactive oxygen species and p47(phox) gene expression in response to angiotensin II*. *Circ Res.* **101**(10): p. 985-94.
520. Switzer, C.H., R.Y. Cheng, L.A. Ridnour, S.A. Glynn, S. Ambs, and D.A. Wink (2012) *Ets-1 is a transcriptional mediator of oncogenic nitric oxide signaling in estrogen receptor-negative breast cancer*. *Breast Cancer Res.* **14**(5): p. R125.
521. Radisky, D.C., D.D. Levy, L.E. Littlepage, H. Liu, C.M. Nelson, J.E. Fata, D. Leake, E.L. Godden, D.G. Albertson, M.A. Nieto, Z. Werb, and M.J. Bissell (2005) *Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability*. *Nature.* **436**(7047): p. 123-7.
522. Bonvin, A.M., R. Boelens, and R. Kaptein (2005) *NMR analysis of protein interactions*. *Curr Opin Chem Biol.* **9**(5): p. 501-8.