

Université de Montréal

PU.1, NF-IL6 et c-Jun forment un complexe transcriptionnel activant le promoteur proximal de l'Interleukine-1 $\beta$

par

Martin Lefrançois

**Programme de biologie moléculaire**

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en biologie moléculaire

Août 1998

© Martin Lefrançois, 1998



2000-11-11

Université de Montréal

Pr. F. ME-116 et c. sur l'impact du complexe transcriptionnel activant le promoteur proximal de l'histone H1

QH

506

1154

2000

N. 016

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de maîtrise en biologie moléculaire (M.Sc.)

Avril 1998

Montréal, Québec, 1998



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**PU.1, NF-IL6 et c-Jun forment un complexe transcriptionnel  
activant le promoteur proximal de l'Interleukine-1 $\beta$**

présenté par:

Martin Lefrançois

**a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:**

Dr Guy Sauvageau, président-rapporteur

Dr Trang Hoang, directrice

Dr René St-Arnaud, membre du jury

Mémoire accepté le:

99-10-26

## SOMMAIRE

L'Interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) est une cytokine pro-inflammatoire dont la transcription est fortement induite chez les macrophages activés en conditions de stress i.e. infections virale ou bactérienne, dommages tissulaires, etc... PU.1, un facteur de transcription à domaine ets, est le facteur déterminant pour l'expression histo-spécifique de l'IL-1 $\beta$ . Son expression est lympho/myéloïde et il se lie sur la portion proximale du promoteur de l'IL-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ 132) pour l'activer faiblement, d'un ordre d'environ cinq fois.

Nous démontrons ici que les facteurs de transcription à glissière de leucines NF-IL6 et c-Jun sont induits chez la lignée myéloïde TF-1 lors d'un traitement à la TPA, qui est un agent chimique mimant les situations de stress. De plus, lorsque ces facteurs sont transfectés chez la lignée cellulaire F9, qui est dépourvue d'activité AP-1 (Jun/Fos) endogène, ils permettent une activation puissante de l'IL-1 $\beta$ 132, de 200 à 800 fois. NF-IL6 seul ne peut y activer la transcription que d'environ trois fois en se liant sur un site consensus, alors que c-Jun seul est inactif car il n'y a pour lui aucun site consensus de liaison sur IL-1 $\beta$ 132. L'action transactivatrice de c-Jun lui est spécifique puisque JunB ou JunD sont incapables de la même action alors que c-Fos arrive même à abaisser l'activité transcriptionnelle de c-Jun. D'autre part, la mutation des sites PU.1 ou NF-IL6 sur IL-1 $\beta$ 132 empêche son induction par la TPA chez TF-1, ainsi qu'en co-transfection chez F9.

Enfin, seuls les domaines de transactivation et en glissière de leucines de c-Jun sont essentiels à sa coopération avec PU.1 et NF-IL6, alors que son domaine de liaison à l'ADN n'y est pas requis, ce qui est en accord avec l'absence de site de liaison sur le promoteur. Par contre, tous les domaines de PU.1 sont requis pour la synergie à trois, malgré que le domaine PEST ne soit pas essentiel à sa coopération avec NF-IL6 seul. Nous avons donc caractérisé une coopération à trois facteurs de transcription où l'action combinée de PU.1, NF-IL6 et c-Jun permet une induction transcriptionnelle histo-spécifique de l'IL-1 $\beta$  en conditions de stress. Il s'agit de la première démonstration d'une activité coactivatrice de c-Jun.



## TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY:.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	ix
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1 <i>Transcription générale.</i>.....</b>	<b>2</b>
1.1 La transcription et l'expression des gènes.....	2
1.2 Le complexe de préinitiation de la transcription.....	3
1.3 L'initiation de la transcription et la chromatine.....	3
1.4 L'hétérogénéité du complexe de préinitiation de la transcription.....	5
1.5 La transcription au niveau expérimental.....	5
<b>2 <i>Régulation de l'initiation de la transcription.</i>.....</b>	<b>6</b>
2.1 Régulation en cis: les régions promotrices.....	6
2.2 Régulation en trans: les facteurs de transcription.....	7
2.2.1 Modes d'action des facteurs de transcription.....	8
2.2.2 Modifications fonctionnelles des facteurs de transcription.....	9
2.2.3 Expression spatio-temporelle des facteurs de transcription.....	9
<b>3 <i>Les facteurs de transcription en hématopoïèse.</i>.....</b>	<b>10</b>
3.1 Les sites de l'hématopoïèse durant le développement.....	11
3.2 Régulation précoce de l'hématopoïèse par SCL.....	12
3.3 RBTN2 et LDB1 dans le maintien des précurseurs sanguins.....	13
3.4 Les gènes Hox et l'hématopoïèse.....	14

3.5	c-Myb et l'hématopoïèse définitive.....	16
3.6	GATA-1 et la différenciation érythroïde tardive.....	16
3.7	Régulation transcriptionnelle spécifique de chaque lignée.....	17
3.8	Conclusions .....	19
<b>4</b>	<b><i>L'Interleukine-1<math>\beta</math></i></b> .....	<b>21</b>
4.1	L'inflammation médiée par les macrophages.....	21
4.2	L'Interleukine-1 $\beta$ comme cytokine pro-inflammatoire.....	22
4.3	Contrôle rigoureux de la synthèse de l'Interleukine-1 $\beta$ .....	23
4.3.1	La régulation traductionnelle. ....	23
4.3.2	La ICE et la maturation protéique du pro-Interleukine-1 $\beta$ . ....	24
4.3.3	Les récepteurs de l'Interleukine-1 $\beta$ et l'antagoniste IL1Ra. ....	24
4.4	La régulation transcriptionnelle de l'Interleukine-1 $\beta$ .....	26
4.4.1	L'enhancer comme élément inductible de la transcription. ....	27
4.4.2	La répression transcriptionnelle de l'Interleukine-1 $\beta$ . ....	28
4.4.3	NF- $\kappa$ B comme activateur de l'Interleukine-1 $\beta$ . ....	28
4.4.4	PU.1, NF-IL6 et le promoteur de l'Interleukine-1 $\beta$ . ....	29
<b>5</b>	<b><i>Les régulateurs transcriptionnels du promoteur IL1<math>\beta</math></i></b> .....	<b>30</b>
5.1	PU.1.....	30
5.1.1	Un membre de la famille Ets. ....	31
5.1.2	Un facteur lympho/myéloïde spécifique.....	31
5.1.3	Liaison de PU.1 à l'ADN sous forme de monomère.....	32
5.1.4	Pip comme coactivateur de PU.1. ....	32
5.1.5	Participation de PU.1 dans des complexes protéiques.....	33
5.1.6	Gènes cibles de PU.1.....	34
5.2	NF-IL6.....	35
5.2.1	La famille des C/EBPs.....	35
5.2.2	NF-IL6 comme médiateur de la défense de l'organisme. ....	37
5.2.3	NF-IL6 est un facteur de transcription à glissière de leucines.....	37
5.2.4	Le système LIP/LAP dans la régulation fonctionnelle de NF-IL6. ....	37
5.2.5	La participation de NF-IL6 dans des complexes protéiques. ....	38

5.2.6	Gènes cibles hématopoïétiques de NF-IL6. ....	39
5.3	c-Jun. ....	40
5.3.1	Historique du complexe AP.1. ....	41
5.3.2	Les familles Jun et Fos. ....	41
5.3.3	La participation de c-Jun dans des complexes protéiques. ....	42
5.3.4	c-Jun est impliqué dans une variété de processus biologiques. ....	44
5.3.5	Gènes cibles hématopoïétiques de c-Jun. ....	44
<b>6</b>	<b><i>Objectif de travail.</i></b> .....	<b>45</b>
<b>PRÉSENTATION DU MANUSCRIT</b> .....		<b>46</b>
<b>TITLE: c-Jun functions as a coactivator of the myeloid transcription factors PU.1 and NF-IL6</b> .....		<b>47</b>
<b>ABSTRACT</b> .....		<b>48</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....		<b>49</b>
<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....		<b>51</b>
Plasmids. ....		51
Transfection protocols and luciferase assays. ....		53
Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). ....		53
Retroviral mediated gene transfer.....		54
Mammalian two-hybrid assays.....		55
<b>RESULTS</b> .....		<b>55</b>
Sequential induction of AP-1, C/EBP DNA binding activity and IL-1 $\beta$ promoter activity by TPA. ....		56
Characterization of protein complexes formed on the IL-1 $\beta$ proximal promoter region. ....		57
Synergistic activation of IL-1 $\beta$ 131 by PU.1, NF-IL6 and c-Jun: biologic specificity for c-Jun. ....		60
PU.1 transcriptional activity in the context of IL-1 $\beta$ 131 promoter sequence requires cooperation with an endogenous source of C/EBP.....		62

Role of PU.1, NF-IL6 and c-Jun in driving TPA-inducible response in hemopoietic cells. ....	63
PU.1, c-Jun and NF-IL6 interact <i>in vivo</i> . ....	64
The N terminal domain of PU.1 is required for the synergistic activation of IL-1 $\beta$ 131 with c-Jun. ....	65
The DNA binding region of c-Jun is not essential for cooperativity with PU.1. ....	65
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>67</b>
PU.1 as a weak transcription factor. ....	67
NF-IL6, a transcription factor with concealed activation potential. ....	68
c-Jun as a coactivator of PU.1. ....	68
Implications for macrophage activation and inflammatory reaction. ....	71
<b>REFERENCES</b> .....	<b>74</b>
<b>LEGENDS</b> .....	<b>82</b>
<b>FIGURES</b> .....	<b>89</b>
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION</b> .....	<b>97</b>
1 PU.1, NF-IL6, c-Jun et l'activation transcriptionnelle de l'interleukine1 $\beta$ ....	99
2 Régulation possible d'autres gènes monocytaires. ....	102
3 Régulation des mécanismes d'inflammation locale. ....	103
4 Modulation du complexe transcriptionnel. ....	104
5 Implication dans le développement de la leucémie myéloïde aiguë.....	106
6 Conclusion.....	107
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>109</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>140</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 0.</b>	Les facteurs de transcription hématopoïétiques	11
<b>Figure 1.</b>	Diagram of the proximal IL-1 $\beta$ promoter and probes used for EMSA.	89
<b>Figure 2.</b>	Coordinate induction of IL-1 $\beta$ promoter activity and AP-1 and C/EBP DNA binding activities by TPA.	90
<b>Figure 3.</b>	PU.1 preferentially binds to the IL1 $\beta$ -PU.1 probe while NF-IL6 preferentially binds to the IL1 $\beta$ -NFIL6 probe.	91
<b>Figure 4.</b>	NF-IL6 and c-Jun but not other Jun proteins cooperate with PU.1 in driving IL-1 $\beta$ 131 transcriptional activity.	92
<b>Figure 5.</b>	PU.1 binding to DNA is necessary but not sufficient to drive transcription from IL-1 $\beta$ 131 promoter sequences: role of NF-IL6.	93
<b>Figure 6.</b>	PU.1, NF-IL6 and c-Jun are required for IL-1 $\beta$ transcription in hemopoietic cells.	94
<b>Figure 7.</b>	PU.1, c-Jun and NF-IL6 interact <i>in vivo</i> in a mammalian two-hybrid system.	95
<b>Figure 8.</b>	Structure/function analysis of PU.1 and c-Jun	96

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADNc	ADN complémentaire
AML	"Acute Myeloblastic Leukemia"
AP-1	"Activator protein 1"
ARNm	ARN messenger
bZIP	"basic leucine zipper"
C/EBP	"CAAT/enhancer binding protein"
CBP	"CREB binding protein"
Cellules NK	Cellules "natural killers"
CHOP	"C/EBP homologous protein"
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPS	"Carbamoyl phosphate synthetase"
CREB	"cAMP response element binding protein"
Domaine Q	Domaine riche en glutamines
Cellules ES	"Embryonic Stem cells"
FOG	"Friend of GATA-1"
G-CSF	"Granulocyte-colony stimulating factor"
GM-CSF	"Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor"
HDAC	"Histone deacetylase"
HSE	"Heat shock element"
HSF	"Heat shock factor"
ICE	"IL-1 $\beta$ converting enzyme"
IL	Interleukine
IL1R (I ou II)	Récepteur de l'interleukine-1 (I ou II)
IL1Ra	Antagoniste du récepteur de l'interleukine-1
JAB1	"Jun activation-domain binding protein 1"
LAM	Lipoarabinomannan
LAP	"Liver-enriched transcription activating protein"

LDB-1	"LIM domain binding protein-1"
LIM (domaine)	Domaine riche en cystéines pouvant lier le zinc.
LMO2	"LIM-only protein-2"
MCP-1	"Macrophage chemoattractant protein-1"
M-CSF	"Macrophage-colony stimulating factor"
MDR1	"Multi-drug resistance-1"
MeCP	"Methyl CpG binding protein"
MLL	"Mixed-lineage leukemia"
MMP1	"Matrix metalloproteinase-1"
N-CoR	"Nuclear receptor co-repressor"
NF-E2	"Nuclear factor-erythroid-2"
NF-IL6	"Nuclear factor-interleukin-6"
NM	nanomolaire
Nt	Amino-terminal
PBGD	"Porphobilinogen deaminase"
Pbx-1	"Postbithorax-1"
PEST (Domaine)	Proline-acide glutamique-sérine-thréonine
Pip	"PU.1 interaction partner"
pM	picomolaire
PU.1	"Purine-rich-1"
Rb	Rétinoblastome
RBTN2	"Rhombotin-2"
RLU	"Relative light unit"
RT-PCR	"Reverse transcription-polymerase chain reaction"
SCL	"Stem cell leukemia"
SD	"Standard deviation"
SF	"Steel factor"
SMRT	"Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor"
SRF	"Serum response factor"

SS	"Super Shift"
STAT	"Signal transducer and activator of transcription"
SV40	"Simian virus 40"
TAF	"TBP associated factor"
T-ALL	"T acute lymphoblastic leukemia"
TBP	"TATA-box binding protein"
TF-1	Lignée cellulaire myélo/érythroïde
TFII	Facteur de transcription de base pour l'ARN polymérase II
TGF- $\beta$	"Transforming growth factor- $\beta$ "
TNF- $\alpha$	"Tumour necrosis factor- $\alpha$ "
TPA	Tetra phorbol acétate
TRE	"TPA response element"
TSG-6	"TNF-stimulated gene-6"
$\alpha$ -NAC	" $\alpha$ chain of the nascent polypeptide-associated complex"
$\mu$ g	microgramme



## CHAPITRE 1

### **INTRODUCTION**

# **1 Transcription générale.**

## **1.1 La transcription et l'expression des gènes.**

L'ensemble des protéines exprimées par une cellule va déterminer l'identité de cette cellule (ex.: cellule musculaire, nerveuse, hématopoïétique, etc...) ainsi que lui permettre d'accomplir des rôles qui lui sont propres (ex.: contraction, transmission d'influx, phagocytose, etc...). Il est donc primordial pour la cellule de contrôler de façon stricte l'expression des gènes. Pour cette raison, il y a plusieurs points de contrôle dans l'expression d'un gène soit au niveau de la transcription; de la stabilité de son ARNm, de sa maturation et de son exportation hors du noyau; de la traduction et de la maturation de la protéine produite (Darnell *et al.*, 1982).

Puisqu'elle constitue le premier point de contrôle, la transcription d'un gène est particulièrement bien régulée. Pour qu'un ARNm soit produit, il faut que le promoteur du gène soit disponible dans le réseau de chromatine, qu'un ensemble de facteurs de transcription précis soit présent dans le noyau et vienne interagir avec le promoteur, que cet ensemble de protéines donne lieu à un complexe transcriptionnel efficace dans son interaction avec la machinerie de transcription de base (qui serait elle-même dynamique et de composition différente pour différents gènes), qu'il y ait ensuite activation de l'ARN polymérase (on parle de l'ARN polymérase II dans le cas des gènes codant pour des protéines) puis élongation correcte de l'ARNm.

## 1.2 Le complexe de préinitiation de la transcription.

Dans des conditions expérimentales où sont utilisées des constructions d'ADN plasmidiques, donc où l'ADN n'est pas enroulé autour des histones, l'initiation de la transcription se fait par l'assemblage séquentiel d'un réseau de protéines sur le site d'initiation de la transcription; c'est le complexe de préinitiation (revue par Roeder, 1996). Ce complexe est composé de plusieurs sous-complexes nommés les TFIIs qui sont eux mêmes composés de plusieurs polypeptides (Dymlacht *et al.*, 1991; revue par Roeder, 1996). Le premier TFII à venir s'installer sur l'ADN est TFIID (Van Dyke *et al.*, 1988). Celui-ci vient se lier à l'ADN au niveau de la boîte TATA qui est située 25 à 30 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription. Le composant de TFIID qui reconnaît la boîte TATA est le TBP (*TATA-box Binding Protein*) (Kao *et al.*, 1990). Lors de la liaison de celui-ci en présence de TFII B, il se produit une importante courbure de la région promotrice qui est le reflet de l'action dynamique des protéines sur l'ADN (Nikolov *et al.*, 1995). Après l'arrivée du TFIID, il y a liaison coopérative d'autres TFIIs (ils seront six au total) ainsi que de l'ARN polymérase II (Buratowski *et al.*, 1989; Nikolov *et al.*, 1995; Leuther *et al.*, 1996). La formation d'un complexe de préinitiation assez stable permet ensuite l'activation de la transcription qui implique la phosphorylation par TFII H de l'ARN polymérase II et/ou d'autres composants du complexe (Feaver *et al.*, 1991; Okhuma *et al.*, 1994).

## 1.3 L'initiation de la transcription et la chromatine.

*In vivo*, la machinerie de transcription doit composer avec le fait que les promoteurs ne sont pas naturellement disponibles puisqu'ils sont enroulés autour d'histones dans un réseau très dense; la chromatine (Wolffe *et al.*, 1994). En plus de jouer un rôle structural essentiel, les histones se trouvent donc à jouer, en surplus, le rôle de répresseurs de la transcription et doivent alors être déplacés le moment venu pour permettre l'établissement du complexe de préinitiation.

Le moyen employé par la cellule pour relâcher la chromatine est l'acétylation des histones (Turner *et al.*, 1991; revue par Grunstein, 1997). L'ajout d'un résidu acétyle, qui possède une charge acide, diminue l'affinité des histones pour l'ADN. Il est maintenant connu que certaines protéines possèdent une activité histone acétyltransférase qui leur permet de déplacer les histones. Parmi celles-ci, on compte un membre du complexe de préinitiation, TAF<sub>II</sub>250, ainsi que des coactivateurs transcriptionnels tels que CBP/p300 (Imhof *et al.*, 1997). Le mécanisme inverse de désacétylation est aussi utilisé lorsque l'expression d'un gène doit être réprimée. Il existe donc certaines protéines ayant une activité histone désacétylase telles que HDAC1 et HDAC2 qui favorisent la réassociation des histones à l'ADN (Nagy *et al.*, 1997; revue par Wolffe, 1996). Ces enzymes sont étroitement couplées à des corépresseurs parmi lesquels mSin3a et N-CoR/SMRT sont les mieux caractérisés (Laherty *et al.*, 1997; Alland *et al.*, 1997). Le rôle des corépresseurs est de faire le pont entre les protéines médiant la répression et l'enzyme de désacétylation.

Un autre moyen employé par la cellule pour réprimer la transcription de certains gènes est la méthylation de l'ADN (revue par Kass *et al.*, 1997). Il est connu depuis longtemps que la méthylation des gènes corrèle avec leur répression. En fait, 60 à 90% des îlots CpG du génome humain sont méthylés et on a longtemps cru que leur répression était passive, c'est à dire qu'ils étaient réprimés par l'incapacité des facteurs de transcription à lier l'ADN méthylé. Cependant, après la découverte des protéines MeCP1 et MeCP2 (Meehan *et al.*, 1989; Lewis *et al.*, 1992), on a plutôt cru que la méthylation de l'ADN était à la base d'un mécanisme actif de répression transcriptionnelle. Ces deux protéines pouvaient reconnaître l'ADN méthylé et déplacer l'histone H1 (Nan *et al.*, 1997). Il leur était donc possible de se lier aux séquences méthylées et de recruter les histones. Récemment, il a été démontré que MeCP2 peut interagir avec mSin3A et HDAC pour conduire à la désacétylation des histones et à la répression transcriptionnelle (Nan *et al.*, 1998). Finalement, certaines protéines telles que

BRG1 (Fryer et Archer, 1998) sont capables de déplacer les histones et favorisent ainsi l'accès des promoteurs à la machinerie de base de la transcription.

#### **1.4 L'hétérogénéité du complexe de préinitiation de la transcription.**

Dans la cellule, le complexe de préinitiation de la transcription est dynamique et se trouve aussi à remplir d'autres fonctions que celle de diriger la transcription adéquate des gènes. En effet, il existe de plus en plus d'évidences voulant que *in vivo* l'ARN polymérase II soit préassociée à un complexe protéique incluant des protéines modulatrices de la chromatine, des protéines Srb et certains TFIIIs pour former un imposant complexe nommé le médiateur (revue par Bjorklund et Kim, 1996). De plus, certains composants de la machinerie de transcription de base sont partagés avec d'autres systèmes essentiels à la cellule. Par exemple, la kinase du cycle cellulaire, composée de MO15/cdk7 et de la cycline H, est aussi un composant du TFIIH (Shiekhattar *et al.*, 1995; Serizawa *et al.*, 1995) ce qui implique potentiellement une régulation croisée entre les deux systèmes. Enfin, la machinerie de transcription est aussi couplée à la machinerie d'épissage de l'ARNm (Dantonel *et al.*, 1997).

#### **1.5 La transcription au niveau expérimental.**

L'implication du complexe de préinitiation avait d'abord été caractérisé sur de l'ADN nu, exempt d'histones. Cependant, les données obtenues dans des contextes se rapprochant plus de la situation cellulaire normale montrent un complexe plus dynamique, moins statique. Très peu, sinon aucun des constituants du complexe de préinitiation ne semble être essentiel à la transcription de tous les gènes (Oelgeschlager *et al.*, 1998; Lee et Lis, 1998). La composition du complexe de préinitiation présent sur un promoteur donné pourrait être due en grande partie à l'identité des facteurs de transcription présents sur le

promoteur et vice-versa (il est difficile ici de dire quel processus précède l'autre). En effet, un complexe comme le médiateur pourrait déplacer les histones (revue par Bjorklund et Kim, 1996), mais il a été montré que les facteurs de transcription c-Jun et c-Fos sont capables du même exploit (Ng *et al.*, 1997). Dans un tel contexte, il devient très important de connaître le réseau de facteurs de transcription interagissant avec un promoteur. Le système le plus approprié pour répondre à cette question reste encore le modèle *in vitro* employant de l'ADN plasmidique ou de l'ADN nu. Les résultats obtenus de cette façon pourront par la suite être validés *in vivo*.

## **2 Régulation de l'initiation de la transcription.**

L'initiation de la transcription d'un gène dépend de deux éléments: les régions promotrices et les facteurs de transcription. Le réseau de facteurs de transcription qui vont reconnaître et lier des séquences d'ADN précises à l'intérieur des régions promotrices va déterminer s'il y aura ou non activation de la transcription.

### **2.1 Régulation en cis: les régions promotrices.**

Le premier élément, les régions promotrices, est un élément de régulation en cis. C'est un élément intrinsèque au gène; la séquence de l'ADN ne changera pas et les sites de transcription resteront toujours les mêmes. Ce qui peut varier cependant c'est l'accessibilité de l'ADN qui peut être méthylé, masqué par les nucléosomes (voir section 1.3) ou encore par d'autres facteurs de transcription, c'est donc dire qu'il peut y avoir compétition de liaison pour un même site de transcription (Wu *et al.*, 1997). De plus, après liaison d'une protéine à l'ADN, il y aura modification (courbure, repliement, etc...) des séquences avoisinantes qui pourra influencer la liaison d'une seconde protéine (Kerppola et Curran, 1993). De

façon générale, les régions promotrices comprennent deux éléments; 1) le promoteur, qui comprend les régions environnantes au site d'initiation de la transcription (+1) et 2) l'enhancer qui est typiquement situé à des kilobases en amont ou en aval du site d'initiation. Il existe aussi certains cas où des séquences d'ADN éloignées du promoteur amènent la répression d'un gène, ces séquences sont alors appelées des silenceurs (Vacher et Tilghman, 1990). Le promoteur et l'enhancer (ou le silenceur) coopèrent pour réguler l'initiation de la transcription car l'arrangement des facteurs de transcription qui y sont liés permet de recruter et de stabiliser le complexe de préinitiation sur l'ADN, tout en déterminant sa composition.

## **2.2 Régulation en trans: les facteurs de transcription.**

Le deuxième élément régissant l'initiation de la transcription est le réseau de facteurs de transcription. Ces facteurs régulent la transcription d'un gène en trans; par opposition aux régions promotrices, ils ne sont pas intrinsèques au gène mais fournis par l'environnement cellulaire. Un facteur de transcription est une protéine qui peut fonctionnellement influencer (activer, réprimer ou déterminer) la transcription d'un gène cible. Il ne doit pas nécessairement interagir directement avec les régions promotrices pour le faire.

Pour pouvoir moduler la transcription d'un gène cible, un facteur de transcription doit premièrement avoir avec lui tous les partenaires nécessaires à son interaction (directe ou non) avec l'ADN, deuxièmement être dans une conformation propice pour accomplir sa fonction et évidemment être exprimé dans la cellule.

### 2.2.1 Modes d'action des facteurs de transcription.

La majorité des facteurs de transcription connus peuvent lier l'ADN sur des séquences de nucléotides définies (consensus). Parmi eux, certains peuvent agir seuls, sans l'aide d'aucun partenaire, comme c'est le cas de Ets-1, de PU.1 ou des facteurs à doigts de zinc de la famille GATA (Fisher *et al.*, 1991; Kodandapani *et al.*, 1996; Clore *et al.*, 1994). Par contre, plusieurs autres doivent absolument avoir un partenaire pour lier l'ADN comme c'est le cas des facteurs à glissière de leucines, tels c-Jun, c-Fos et les C/EBPs, ou des facteurs à motifs hélice-boucle-hélice comme SCL, E2A et MyoD. Tous ces facteurs doivent former des dimères pour lier l'ADN. Certains d'entre eux peuvent former des homodimères (par exemple c-Jun/c-Jun ou E2A/E2A), alors que d'autres ont absolument besoin d'un autre partenaire pour former des hétérodimères comme c'est le cas de c-Fos ou de SCL. Enfin, d'autres facteurs de transcription sont tout à fait incapables de lier l'ADN et doivent être recrutés sur le promoteur comme c'est le cas de FOG, de RBTN2/LMO2 ou même de *Retinoblastoma* (RB) et de CBP/p300 (Tsang *et al.*, 1997; Merika *et al.*, 1998; Chrivia *et al.*, 1993).

Il n'y a pas si longtemps, on pensait que l'interaction entre les facteurs de transcription se faisait exclusivement au sein d'une même famille (ex.: E2A et MyoD, famille hélice-boucle-hélice); il y a maintenant de plus en plus d'exemples démontrant qu'un facteur d'une certaine famille peut très bien interagir avec un facteur d'une autre famille (Osada *et al.*, 1997) comme c'est le cas de c-Jun avec PU.1 (Bassuk et Leiden; 1995) lorsqu'ils sont situés sur des sites adjacents. Ceci permet la formation de complexes transcriptionnels imposants.

En résumé, l'interchangeabilité des partenaires d'un facteur de transcription ainsi que sa capacité d'interaction avec une variété de protéines de plusieurs familles confèrent une grande souplesse aux mécanismes de transcription grâce à la possibilité d'utiliser un même facteur de transcription pour des desseins différents. De plus, elle permet aussi une régulation très serrée de la transcription dans la mesure où l'absence d'un seul facteur dans un complexe peut



complètement empêcher celui-ci d'être fonctionnel (Merika *et al.*, 1998; Therrien et Drouin, 1991).

### **2.2.2 Modifications fonctionnelles des facteurs de transcription.**

Un autre moyen employé par la cellule pour contrôler la transcription des gènes est la modification physique des facteurs de transcription. La modification la plus courante est la phosphorylation. Il est possible de réguler un facteur de transcription en lui ajoutant un ou plusieurs résidu(s) phosphate(s). Par exemple, l'ajout d'un résidu phosphate (de charge acide) au niveau du domaine de liaison à l'ADN (qui est en général de charge alcaline) peut bloquer la liaison du facteur à l'ADN (Hardy *et al.*, 1993; Oehler *et al.*, 1993). Par contre, l'ajout d'un tel résidu dans un domaine de transactivation (normalement de charge acide) peut améliorer la transactivation (Hoeck et Groner, 1990; Hagmeyer *et al.*, 1993). Dans certains cas, la phosphorylation est même essentielle à l'interaction avec un partenaire (Chrivia *et al.*, 1993; Eisenbeis *et al.*, 1995). La phosphorylation d'un facteur de transcription est le fruit de l'intégration de signaux provenant de la surface cellulaire par le biais de voies de transduction du signal et impliquant un réseau de kinases (revues par Seger et Krebs 1995; Treisman, 1996).

### **2.2.3 Expression spatio-temporelle des facteurs de transcription.**

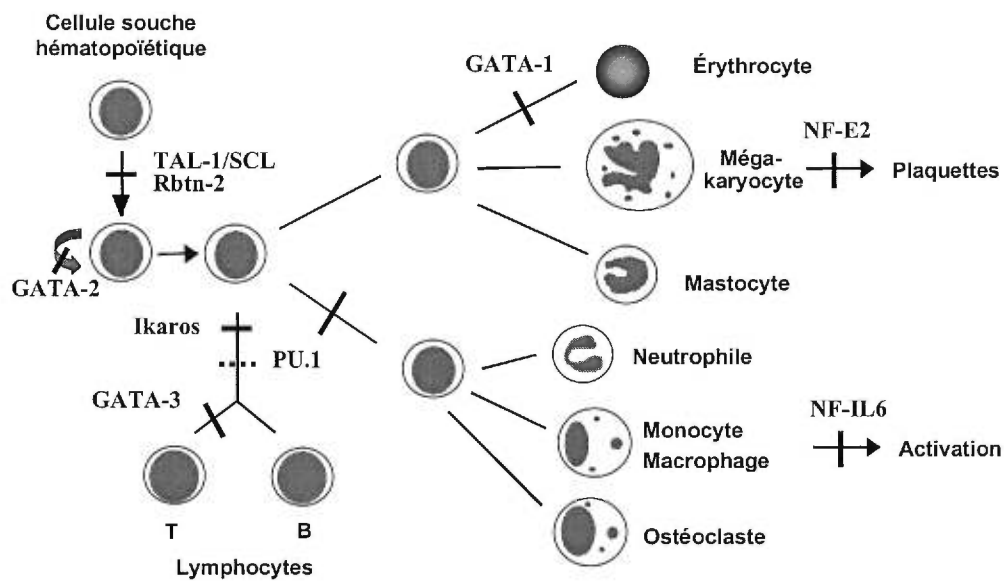
Parmi tous les facteurs de transcription existants, certains sont exprimés dans tous les tissus soit de façon constitutive ou en réponse à des stimuli exogènes; leur expression est dite ubiquiste. Par contre, certains autres ont une expression restreinte et peuvent aussi être inductibles tandis que d'autres sont exprimés spécifiquement dans un ou quelques tissus et sont rarement inductibles par des stimuli exogènes. Ces derniers facteurs sont particulièrement intéressants car ils ne sont normalement pas de puissants activateurs de leurs gènes cibles.

Pourtant leur invalidation génique chez la souris empêche le développement des tissus où ils sont normalement exprimés, et ce à partir du stade de développement où leur expression serait normalement détectable. Le système hématopoïétique est particulièrement dépendant des facteurs de croissance et des facteurs de transcription pour permettre le développement de ses différentes lignées et l'obtention de cellules différenciées qui seront aptes à accomplir leurs fonctions.

### **3 Les facteurs de transcription en hématopoïèse.**

L'hématopoïèse se définit comme le processus de développement des différentes lignées (myéloïde, lymphoïde, érythroïde,...) à partir d'une cellule souche pluripotente qui se divise peu et qui a le potentiel de se régénérer elle-même. Le développement de chaque lignée est dépendant de l'expression spécifique de récepteurs membranaires et des molécules intracellulaires permettant l'intégration des signaux qu'ils génèrent dans la cellule. Les facteurs de transcription régulant l'expression de ces gènes jouent donc un rôle crucial dans l'établissement de l'hématopoïèse. L'ensemble de ces facteurs de transcription ont été découverts principalement par deux méthodes: la première est par l'étude des gènes cibles et des protéines interagissant au niveau de leur promoteur, la seconde est par l'étude des translocations chromosomiques impliquées dans les leucémies. La Figure 0 illustre l'importance des facteurs de transcription pour le développement des lignées hématopoïétiques déterminée par des études d'invalidation génique chez la souris. Cette figure ne peut cependant pas rendre compte des rôles plus tardifs de ceux-ci sur la maturation des lignées affectées ou encore d'effets plus raffinés des facteurs sur la maturation plus précoce des lignées.

Figure 0.- Les facteurs de transcription hématopoïétiques



### 3.1 Les sites de l'hématopoïèse durant le développement.

Pour bien comprendre la régulation transcriptionnelle de l'hématopoïèse, il faut d'abord en apprécier toute la dynamique. En effet, l'implantation du système hématopoïétique n'est pas un phénomène statique et la production des cellules pluripotentes ne se produit pas toujours au même endroit durant le développement. Par des études effectuées chez la souris, il a été déterminé qu'il y a plusieurs années qu'un organe extra-embryonnaire, le sac vitellin, était le premier endroit où des cellules hématopoïétiques pluripotentes étaient détectées, soit au jour 7,5 *post-coitum* (Russel et Bernstein, 1966). Cependant, plus récemment, il a été démontré que des cellules d'origine intra-embryonnaire, lorsqu'elles sont mises en culture avant l'implantation de la circulation sanguine, peuvent aussi permettre le développement de colonies hématopoïétiques à un temps encore plus précoce. La splanchnopleure paraaortique et/ou l'axe AGM (aorte/gonades/mésonephrons), qui sont d'origine mésodermale, seraient donc les sites intra-embryonnaires où débute l'hématopoïèse (Cumano *et al.*, 1996; Medvinsky *et al.*, 1996).

Par la suite, vers le jour 10,5 pc, l'hématopoïèse se transporte au niveau du foie foetal pour finalement aller s'implanter pour de bon dans la moelle osseuse chez l'adulte (Moore et Metcalfe, 1970; Johnson et Moore 1975). Tout au long de ce processus de développement, l'hématopoïèse est soumise à une rigoureuse régulation transcriptionnelle qui débute dès son implantation à partir du mésoderme.

### 3.2 Régulation précoce de l'hématopoïèse par SCL.

Le gène codant pour la protéine SCL/tal-1 a été identifié en raison de son implication dans plusieurs translocations chromosomiques associées avec des leucémies de types lymphoblastiques aiguës (Begley *et al.*, 1989). En situation normale, SCL n'est pas exprimé chez des lymphocytes T. L'expression de SCL est habituellement détectée à des stades de différenciation très précoces de l'hématopoïèse et même au niveau du système vasculaire (Begley *et al.*, 1989b; Kallianpur *et al.*, 1994). L'inactivation génique de SCL chez la souris conduit à une mort embryonnaire au jour 9,5 et à l'absence totale d'hématopoïèse intra-embryonnaire et extra-embryonnaire au niveau du sac vitellin (Shivdasani *et al.*, 1995) (Figure 0).

De telles observations témoignent du rôle essentiel de SCL dans l'établissement initial de l'hématopoïèse à partir du mésoderme embryonnaire. Cependant, on ne peut exclure d'éventuelles fonctions de SCL à des stades plus tardifs du développement sanguin (Hoang *et al.*, 1996; Robb *et al.*, 1996). Pour l'instant, le récepteur membranaire c-kit est le seul gène cible connu pour SCL (Krosl *et al.*, 1998). c-kit et son ligand, le *Steel Factor*, sont impliqués dans le maintien de la survie des précurseurs hématopoïétiques.

Au niveau moléculaire, SCL est un facteur de transcription de la famille hélice-boucle-hélice. Il ne peut lier l'ADN seul et doit dimériser avec une autre protéine pour le faire. Un partenaire connu de SCL est le facteur de transcription

ubiquiste E2A (Voronova *et al.*, 1994). La possibilité pour SCL d'avoir différents partenaires pourrait lui permettre d'avoir différents gènes cibles et d'exercer des effets multiples durant le développement sanguin. *In vitro*, SCL coopère d'ailleurs avec E47, RBTN2, LDB1 et GATA-1 pour former un complexe imposant liant une séquence d'ADN idéale, mais artificielle (Wadman *et al.*, 1997).

### 3.3 RBTN2 et LDB1 dans le maintien des précurseurs sanguins.

Il devient de plus en plus évident que les rôles biologiques de SCL et RBTN2 sont inter-reliés. RBTN2 est un facteur à domaine LIM (motif a doigt de zinc riche en cystéine) qui est incapable de lier l'ADN, il s'agit d'un coactivateur de la transcription. Son expression est élevée dans l'hématopoïèse et il peut interagir directement avec SCL (Valge-Archer *et al.*, 1994). Il a, lui aussi, été identifié au niveau d'une translocation chromosomique donnant lieu à une leucémie lymphoblastique aiguë (Rabbitts *et al.*, 1997). Chez ces blastes leucémiques, on retrouve alors RBTN2 complexé avec SCL (Larson *et al.*, 1996). De plus, l'invalidation génique de RBTN2 amène le même phénotype que celui de SCL, soit la mort de l'embryon au jour 9,5 causée par l'absence d'hématopoïèse (Warren *et al.*, 1994) (Figure 0). Il semble donc que l'interaction physique de RBTN2 avec SCL ait un impact biologique et qu'elle soit essentielle pour passer aux stades de différenciation ultérieurs. De façon intéressante, la surexpression de RBTN2 cause un blocage de la différenciation érythroïde. À ce niveau, il peut interagir avec les protéines GATA-1 et LDB1 (Osada *et al.*, 1995; Visvader *et al.*, 1997).

LDB1, est un autre facteur à domaine LIM qui est exprimé au niveau du foie foetal puis de la lignée érythroïde (Agulnick *et al.*, 1996). Sa surexpression chez des proérythroblastes conduit elle aussi à un blocage de leur différenciation (Visvader *et al.*, 1997).

RBTN2 et LDB1 sont donc importants pour le maintien des précurseurs hématopoïétiques et ils constituent une barrière qui doit être franchie pour accéder aux prochains stades de différenciation.

### 3.4 Les gènes Hox et l'hématopoïèse.

Les gènes Hox sont des facteurs de transcription à homéodomaines reconnus pour leur implication dans l'établissement des axes lors du développement embryonnaire (revue par Marshall *et al.*, 1996). Plusieurs translocations chromosomiques causant des leucémies impliquent aussi les gènes des groupes (*clusters*) Hox. Les gènes situés dans la portion 3' des groupes Hox sont exprimés chez les progéniteurs plus précoces de l'hématopoïèse alors que ceux situés vers la portion 5' sont répandus de façon plus diffuse tout au long du développement des cellules sanguines, pour finalement voir leur expression s'effacer vers la fin de la maturation des lignées.

La surexpression des gènes HoxB3, HoxB4 ou Hox 2,4 par infection rétrovirale de cellules de moelle osseuse ensuite transplantées chez la souris, a donné lieu à l'augmentation des populations de cellules hématopoïétiques primitives (Sauvageau *et al.*, 1995; Sauvageau *et al.*, 1997; Perkins et Cory, 1993).

Par contre, la surexpression de gènes des portions 5' des groupes Hox donne lieu à des altérations de l'hématopoïèse qui sont plus tardives. D'abord la surexpression de HoxA9 produit un abaissement de la quantité de leucocytes et de précurseurs myélo/érythroïdes (Helgason *et al.*, 1996) alors que la surepression de HoxA10, elle, perturbe la différenciation lymphoïde et myéloïde pour conduire à un état de leucémie myéloblastique aiguë (Thorsteinsdottir *et al.*, 1997). Ces résultats corroborent bien le fait que les gènes Hox situés en 5' ont une expression moins précoce que ceux situés en 3'.

De plus, l'invalidation génique de Hox11 chez la souris montre le phénotype le plus spectaculaire. Le développement de la rate s'effectue normalement au jour 11,5 pour ensuite s'arrêter un jour plus tard. À ce stade, les cellules rentrent massivement en apoptose (Dear *et al.*, 1995). Hox11 a donc un rôle à jouer dans la survie des cellules de la rate mais pas dans leur implantation initiale dans la rate.

Enfin, les gènes modulateurs des Hox ont aussi leur mot à dire dans l'homéostasie des cellules sanguines. D'abord le gène MLL a été découvert par son implication dans une translocation chromosomique n'affectant qu'un allèle et causant l'AML. La souris hétérozygote pour le gène MLL montre des défauts de segmentation et meurt avant la naissance, l'expression des Hox chez cette souris est abaissée (Yu *et al.*, 1995). L'hématopoïèse embryonnaire de cette souris est affectée puisque des cellules en culture provenant de son sac vitellin forment moins de colonies et elles contiennent moins de cellules qui prennent plus de temps à se développer (Hess *et al.*, 1997). Ceci reflète un rôle pour MLL dans la prolifération et la différenciation des progéniteurs. De plus, une souris transgénique pour la fusion MLL-AF9 recrée une condition d'AML (Corral *et al.*, 1996).

Pbx-1, une protéine qui peut interagir physiquement avec les produits des gènes Hox (Chang *et al.*, 1995; Phelan *et al.*, 1995; Neuteboom *et al.*, 1995), est aussi impliquée dans une translocation chromosomique produisant une protéine de fusion avec E2A et conduisant à une leucémie de type T-ALL (*Acute Lymphoblastic Leukemia*).

Enfin, les gènes de la famille Polycomb (revue par Gould, 1997), qui sont des régulateurs négatifs des gènes Hox, sont exprimés de façon croissante dans la différenciation des cellules sanguines (sauf en ce qui attrait à Bmi-1 qui a une expression décroissante) (Lessard *et al.*, 1998). Ils pourraient donc eux aussi être d'importants modulateurs de l'hématopoïèse.

### 3.5 c-Myb et l'hématopoïèse définitive.

c-Myb est un facteur de transcription à hélice-tour-hélice (Gabrielsen *et al.*, 1991) qui ne joue pas un rôle essentiel dans l'hématopoïèse primitive c'est-à-dire lorsqu'elle a lieu au niveau du sac vitellin. Cependant, l'inactivation génique de c-Myb affecte de façon significative l'hématopoïèse définitive au niveau du foie foetal. L'absence de c-Myb n'empêche pas le développement des lignées mais abaisse significativement le nombre de cellules de chacune d'elles (sauf dans le cas des mégakaryocytes qui ne sont pas affectés) ainsi que la quantité de progéniteurs; les souris meurent tout de même *in utero* au jour 15 (Mucenski *et al.*, 1991). Le rôle de c-Myb dans l'évolution des cellules sanguines serait donc plus quantitatif que qualitatif c'est à dire qu'il pourrait être un régulateur de la prolifération des progéniteurs.

### 3.6 GATA-1 et la différenciation érythroïde tardive.

Le facteur de transcription à doigts de zinc GATA-1 a été identifié par une approche de gène cible (Tsai *et al.*, 1989). En effet, GATA-1 se lie à plusieurs promoteurs érythroïdes et est exprimé chez les progéniteurs hématopoïétiques ainsi que dans les lignées érythroïde, mégakaryocytaire, mastocytaire et d'éosinophiles. L'absence de GATA-1 chez la souris conduit à un arrêt de la différenciation érythroïde au stade de proérythroblaste pour conduire à l'apoptose (Pevny *et al.*, 1991; Weiss *et al.*, 1995) (Figure 0). GATA-1 est donc crucial dans la maturation terminale des érythrocytes en prévenant l'apoptose lors de la différenciation de la lignée. Puisqu'il est exprimé plus tôt dans le développement hématopoïétique, il pourrait aussi avoir un rôle à jouer à ce niveau qui pourrait être redondant avec un autre facteur de sa famille: GATA-2. En effet, en absence de GATA-1, l'expression de GATA-2 augmente significativement (Weiss *et al.*, 1994) ce qui suggère une compensation fonctionnelle de celui-ci au niveau des



progéniteurs qui ne serait cependant plus suffisante dans le développement tardif de la lignée érythroïde.

GATA-2 est exprimé à un niveau plus précoce mais l'inactivation génique de celui-ci n'empêche pas l'établissement de l'hématopoïèse embryonnaire (Tsai *et al.*, 1994) ce qui le positionne en aval de SCL, RBTN2 et LDB1 quant à son implication dans l'hématopoïèse (Figure 0). Une surexpression de GATA-2 chez des précurseurs érythroïdes bloque leur différenciation et promouvoit leur prolifération (Briegel *et al.*, 1993). La fonction biologique de GATA-2 serait donc de favoriser l'expansion du bassin de progéniteurs; un rôle bien plus précoce que celui de GATA-1 et ayant un impact sur plusieurs lignées.

Quant à GATA-3, le dernier membre de la famille exprimé durant le développement des cellules sanguines, il a un patron d'expression très vaste chez l'humain. En effet, il est présent dans le cerveau, le placenta, le système nerveux central et périphérique, le foie ainsi que chez les lymphocytes T. Il fut difficile d'élucider le rôle hématopoïétique de GATA-3 par l'étude de la souris GATA-3<sup>-/-</sup> car celle-ci meurt au jour embryonnaire 12 et souffre de malformations sévères au niveau du cerveau et de la moelle épinière en plus de montrer des saignements internes importants (Pandolfi *et al.*, 1995). L'étude des cellules embryonnaires (ES) GATA-3<sup>-/-</sup> a permis de contourner les problèmes rencontrés chez la souris et d'étudier la fonction hématopoïétique de GATA-3. GATA-3 n'est pas essentiel au développement des lymphocytes B, des lignées monocytaires ou érythroïde. Par contre, il est absolument requis pour la maturation des thymocytes vers le stade de lymphocyte T matures (Ting *et al.*, 1996) (Figure 0).

### **3.7 Régulation transcriptionnelle spécifique de chaque lignée.**

Il existe dans l'hématopoïèse quelques exemples de facteurs de transcription qui sont exprimés spécifiquement dans une seule lignée ou encore qui ne sont essentiels qu'au développement d'une seule lignée, comme c'est le

cas de GATA-1 chez la lignée érythroïde. Le promoteur de la  $\beta$ -globine a d'ailleurs permis de découvrir deux autres facteurs déterminants dans la différenciation de lignées spécifiques.

D'abord, EKLF lie le promoteur de la  $\beta$ -globine sur une séquence CACCC. C'est le criblage différentiel d'une librairie d'ADNc de cellules érythroleucémiques qui a permis son identification (Miller *et al.*, 1993). Les souris déficientes en EKLF meurent *in utero* car elles sont incapables de synthétiser la  $\beta$ -globine (Nuez *et al.*, 1995; Perkins *et al.*, 1995). Ceci donne à EKLF un rôle érythropoïétique très tardif.

NF-E2 est un facteur à glissière de leucines qui a aussi été découvert par sa liaison au promoteur de la  $\beta$ -globine (Andrews *et al.*, 1993). Il y reconnaît, sur le promoteur de la  $\beta$ -globine et sur celui de la PBGD, une séquence apparentée à un site AP-1 (Mignotte *et al.*, 1989) où il lie l'ADN sous forme de dimère associé à un partenaire, la sous-unité p18. Cependant, l'invalidation génique de NF-E2 n'affecte que les étapes terminales de la différenciation mégakaryocytaire impliquant la production des plaquettes (Shivdasani *et al.*, 1995) (Figure 0).

Le développement lymphocytaire est dépendant d'un facteur de transcription qui lui est propre: Ikaros. En réalité, le gène Ikaros encode cinq différents facteurs de transcription à doigts de zinc en raison d'un mécanisme d'épissage alternatif (Molnar et Georgopoulos; 1994). Chacune de ces cinq protéines a un pouvoir transcriptionnel, une localisation cellulaire et un patron d'expression lymphoïde qui lui est propre. Une souris homozygote pour une délétion du domaine N-terminal en doigts de zinc d'Ikaros a été générée. Celle-ci est dépourvue de lymphocytes T et B, de cellules NK et de tous ses progéniteurs lymphoïdes alors que les lignées érythroïde et myéloïde ne sont pas affectées (Georgopoulos *et al.*, 1994). Ikaros a donc un rôle à jouer au niveau de la différenciation des cellules pluripotentes en précurseurs lymphoïdes (Figure 0). Fait étonnant, la souris hétérozygote pour cette même mutation, elle, développe des lymphomes, ce qui permet de croire que Ikaros est aussi impliqué dans les mécanismes de prolifération (Winandy et Georgopoulos, 1995). De plus, au

niveau du noyau, Ikaros colocalise avec les régions de l'hétérochromatine où se trouvent des gènes lymphocytaires qui sont réprimés (Brown *et al.*, 1997). Le mécanisme d'action de Ikaros reste toujours largement méconnu mais son apport au niveau de l'homéostasie du développement lymphoïde est indéniable.

Enfin, la lignée myéloïde possède, elle aussi, un facteur de transcription qui est essentiel à son développement, il s'agit de la protéine PU.1. PU.1 est un facteur lympho/myéloïde spécifique qui régule la transcription d'une importante quantité de gènes caractéristiques de la lignée myéloïde. PU.1 sera décrit en détails à la section 5.1.

### **3.8 Conclusions**

L'ensemble du chapitre 3 prouve sans l'ombre d'un doute que les facteurs de transcription jouent un rôle capital dans l'établissement et dans le développement des lignées hématopoïétiques. Il existe à ce jour deux principaux modèles qui tentent d'expliquer comment la cellule souche hématopoïétique (ainsi que les cellules multi et bipotentes) prennent la décision de se commettre vers une lignée au détriment d'une autre; ce sont les modèles déterministe et inductible. Le modèle déterministe suggère que c'est la liaison des facteurs de croissance, tels que le G-CSF, le GM-CSF, le M-CSF ou le SF, sur leurs récepteurs membranaires qui va dicter à la cellule de devenir, par exemple, myéloïde plutôt qu'érythroïde. Par opposition, le modèle inductible suppose que les facteurs de croissance, en se liant à leur récepteur, vont permettre la survie et/ou la prolifération des progéniteurs sans d'aucune façon diriger leur destinée. Ce modèle implique que les progéniteurs sont déjà programmés à suivre une certaine voie de différenciation. Un modèle hybride qui intégrerait les principes de ces deux modèles est aussi une possibilité à envisager.

Bien qu'étant presque opposés, ces deux modèles impliquent tout de même un rôle important des facteurs de transcription. Dans le modèle déterministe, les

facteurs de transcription doivent servir d'effecteurs des signaux reçus par les récepteurs membranaires, qui leurs sont transmis par le biais des voies de transduction des signaux. Les facteurs histo-spécifiques devraient alors être ciblés pour permettre l'expression des gènes spécifiques de la lignée. Quant à lui, le modèle inductible suppose que les récepteurs ne sont pas déterminants pour le devenir de la cellule, ce qui implique qu'autre chose dans la cellule doit remplir cette fonction. Les facteurs de transcription histo-spécifiques deviennent alors des candidats de choix pour ce rôle.

Peu importe le modèle auquel nous adhérons, il convient de dire que c'est la coopération fonctionnelle entre les facteurs de croissance (avec leur récepteurs) et les facteurs de transcription qui permet l'établissement, le développement et le maintien du système hématopoïétique.

Le même type de coopération se produit chez les cellules différenciées du système hématopoïétique. Par exemple, le macrophage exprime à sa surface différents récepteurs lui permettant de détecter la présence de particules néfastes pour l'organisme. Lorsque ces récepteurs sont activés, il doit répondre en synthétisant des cytokines pro-inflammatoires pour conduire au mécanisme d'inflammation locale. La synthèse des récepteurs de surface, des cytokines ainsi que d'autres protéines caractéristiques du macrophage est largement contrôlée au niveau transcriptionnel. Les travaux rapportés ici portent sur le contrôle transcriptionnel d'une cytokine pro-inflammatoire comme marqueur moléculaire de la transcription spécifique au macrophage: l'Interleukine-1 $\beta$ .

## 4 *L'Interleukine-1 $\beta$*

### 4.1 L'inflammation médiée par les macrophages.

L'inflammation est le mécanisme par lequel l'organisme réagit à la présence d'un agent pathogène. En situation d'inflammation, les cellules situées au niveau du site d'infection vont réagir en produisant un réseau de cytokines parmi lesquelles on compte les interleukines 3, 6 et 8, ainsi que le GM-CSF, le G-CSF et le M-CSF puis, surtout, les cytokines pro-inflammatoires que sont le TNF- $\alpha$  et l'Interleukine-1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) (revue par Dinarello, 1996). Parmi les cellules capables de produire de l'IL1 $\beta$ , on retrouve les cellules de la peau et des muqueuses qui sont plus disposées à être exposées à des agents extérieurs et qui produisent d'ailleurs toujours un certain niveau d'IL1 $\beta$  (Hauser *et al.*, 1986). Cependant, les principaux producteurs d'IL1 $\beta$  sont les macrophages qui, eux, ne produisent l'IL1 $\beta$  qu'en situation de stress (Beuscher *et al.*, 1990).

Une des fonctions biologiques du macrophage est de protéger l'organisme contre les particules envahissantes, telles que les virus et les bactéries. Il protège aussi l'organisme contre les dommages tissulaires causés, entre autres, lors de l'irradiation des cellules par les rayons ultraviolets. À sa surface, le macrophage possède des récepteurs tel que le récepteur Mac-1 (Issekutz et Issekutz, 1992; Relman *et al.*, 1990) qui lui permettent de détecter la présence de particules indésirables. Mac-1 reconnaît les lipopolysaccharides (LPS) qui sont les principaux composants de la paroi des bactéries gram négatives. Le macrophage possède aussi des récepteurs pour une variété de cytokines conduisant à l'inflammation. Suite à l'activation de ces récepteurs, il y aura entre autre production d'IL1 $\beta$  par les macrophages qui sont maintenant dits activés.

Lorsque le macrophage est activé, il va libérer un réseau de cytokines. Parmi celles-ci, certaines ont un pouvoir chimioattracteur comme l'IL8 et la *Macrophage Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) ce qui va permettre d'attirer les

leucocytes vers le site d'inflammation (Tangirala *et al.*, 1997). Il y aura aussi libération de TNF- $\alpha$  et d'IL1 $\beta$  ce qui provoquera la libération par les cellules cibles de différentes cytokines en plus d'induire, entre autres, la synthèse de l'oxyde nitrique synthétase (NOS) (Kunz *et al.*, 1994), de la phospholipase A2 (Bomalaski *et al.*, 1992) et des facteurs de transcription c-Jun et c-Fos (Muegge *et al.*, 1993). Tout ceci engendrera la libération de cytokines, de radicaux libres, de protéases et de lipides médiateurs d'inflammation au niveau du site d'infection. En plus d'activer la production de cytokines, d'enzymes, de facteurs de transcription, etc..., l'IL1 $\beta$  abaisse aussi l'expression de gènes de maintien (*housekeeping*) de la cellule tels que les gènes des cytochromes et de l'albumine.

#### **4.2 L'Interleukine-1 $\beta$ comme cytokine pro-inflammatoire.**

Une expression exagérée d'IL1 $\beta$  peut avoir de graves effets sur les cellules cibles. D'ailleurs, les niveaux d'IL1 $\beta$  sont élevés chez les patients souffrant d'arthrite rhumatoïde, une maladie causée par un phénomène d'inflammation chronique (Gowen *et al.*, 1983). Dans un tel optique, il importe de bien contrôler la production de cette cytokine, c'est pour cette raison qu'il existe des mécanismes de rétro-inhibition de sa synthèse. En effet, l'IL1 $\beta$  stimule la production de TGF- $\beta$  chez les cellules cibles (Dubois *et al.*, 1990), alors que celui-ci a un pouvoir anti-inflammatoire. De plus, il y a aussi libération de glucocorticoïdes durant l'inflammation et ceux-ci sont capables de bloquer la transcription de l'IL1 $\beta$  probablement en empêchant l'action transactivatrice des facteurs AP-1 (Yang-Yen *et al.*, 1990).

Parmi les événements observés lors d'une inflammation, on note de la fièvre, de l'hypoglycémie et de la perte de poids. L'inactivation du gène de l'IL1 $\beta$  chez la souris n'affecte pas le développement normal mais empêche l'établissement d'une réaction inflammatoire locale et l'apparition de tels signes

(Zheng *et al.*, 1995). Ceci confirme le rôle capital et non-redondant de l'IL1 $\beta$  dans l'inflammation locale. Enfin, l'expression inappropriée d'IL1 $\beta$  chez des blastes leucémiques permet de supposer que cette cytokine soit impliquée dans une régulation autocrine de la prolifération de ces blastes (Cozzolino *et al.*, 1989). L'IL1 $\beta$  y activerait la production de GM-CSF qui viendrait, lui, se lier aux récepteurs de la même cellule et activer sa prolifération (Rodriguez-Cimadevilla *et al.*, 1990).

### **4.3 Contrôle rigoureux de la synthèse de l'Interleukine-1 $\beta$ .**

Le chemin menant de la transcription du gène de l'IL1 $\beta$  à la liaison de la cytokine à son récepteur est parsemé d'embûches. En effet, puisqu'une expression inappropriée d'IL1 $\beta$  peut être dangereuse pour l'organisme; il faut que la production de la cytokine soit rigoureusement contrôlée.

#### **4.3.1 La régulation traductionnelle.**

D'abord, il y a un important contrôle de l'initiation de la transcription dont il sera question à la section 5. Par la suite, la traduction de l'ARNm est ralentie par la présence de structures secondaires stables dans la portion 5' non-traduite du transcrit. De plus, la cytokine est produite sous une forme immature de 34 kDa: le pro-IL1 $\beta$ . Celui-ci doit ensuite être clivé par une enzyme qui lui est spécifique, l'enzyme de conversion de l'Interleukine-1 $\beta$  (ICE), pour donner la forme mature de l'IL1 $\beta$  de 17 kDa (Cerretti *et al.*, 1992; Thornberry *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1994).

#### 4.3.2 La ICE et la maturation protéique du pro-Interleukine-1 $\beta$ .

L'enzyme ICE est le premier membre de la famille des caspases, lesquels présentent une forte homologie de séquence et sont presque tous impliqués dans les voies apoptotiques. Cependant, il n'existe aucune évidence à ce jour d'une implication quelconque de l'enzyme ICE dans l'apoptose malgré son homologie avec ced-3 de *C.Elegans* (Miura *et al.*, 1993). L'invalidation génique de l'enzyme ICE chez la souris ne donne d'ailleurs lieu à aucun défaut apoptotique. Par contre, cette souris est incapable de produire de l'IL1 $\beta$  lorsqu'on lui administre des LPS; il y a alors accumulation de pro-IL $\beta$  et la souris meurt d'un choc septique (Li *et al.*, 1995).

Pour qu'ait lieu la maturation de l'IL1 $\beta$  par l'enzyme ICE, il faut premièrement que celle-ci soit présente sous sa forme active. Sa maturation se fait par un mécanisme d'autoclivage qui produit deux peptides, respectivement les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . La forme active est un regroupement de deux sous-unités  $\alpha$  et de deux sous-unités  $\beta$  qui peut alors cliver le pro-IL1 $\beta$  (Walker *et al.*, 1994; Gu *et al.*, 1995). Les mécanismes régissant l'autoclivage de la ICE sont encore méconnus à ce jour. L'expression ectopique du gène de la ICE chez des cellules COS non-stimulées est suffisante pour obtenir la forme active de l'enzyme composée des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . En fait, des variations de concentrations d'enzyme ou de température sont suffisantes *in vitro* pour permettre l'autoclivage de l'enzyme (Thornberry *et al.*, 1992).

#### 4.3.3 Les récepteurs de l'Interleukine-1 $\beta$ et l'antagoniste IL1Ra.

La génération d'une protéine mature d'IL1 $\beta$  n'est pas encore un gage de son action biologique. En effet, une fois sécrétée hors de la cellule productrice,



l'IL1 $\beta$  doit aller se lier à son récepteur sur la cellule cible. Cependant, il existe deux formes de récepteurs de l'IL1 $\beta$ : les récepteurs IL1RI (Sims *et al.*, 1988) et IL1RII (Colotta *et al.*, 1993). Parmi eux, seul le récepteur IL1RI est capable de transmettre un signal à l'intérieur de la cellule (Sims *et al.*, 1993; Rodriguez *et al.*, 1996). De plus, ces deux récepteurs sont aussi présents sous des formes solubles (Symons *et al.*, 1991). C'est donc dire que l'IL1 $\beta$  peut se lier à quatre formes différentes de récepteurs dont seul IL1RI sous sa forme transmembranaire peut transmettre un signal. La liaison de IL1 $\beta$  à IL1RI est en plus défavorisée par le fait que l'affinité de la cytokine est beaucoup plus forte pour IL1RII.

Finalement, un dernier point de contrôle s'ajoute à la liste: IL1Ra. IL1Ra signifie *IL1 Receptor Antagonist* et cette protéine est un antagoniste naturel de l'IL1 $\beta$  (Hannum *et al.*, 1990; Carter *et al.*, 1990; Eisenberg *et al.*, 1990). L'IL1 $\beta$  est la seule cytokine qui possède un antagoniste naturel. IL1Ra a une forte affinité pour IL1RI et est exprimé à des niveaux souvent cent fois plus élevés que IL1 $\beta$  (Dripps *et al.*, 1991). De plus, IL1Ra n'est exprimé que dans les cellules pouvant aussi générer IL1 $\beta$ .

En résumé, l'action biologique de l'IL1 $\beta$  est contrôlable au niveau de l'initiation de la transcription, de la traduction, de la maturation protéique et de la liaison à son récepteur. À ce niveau, l'expression des différents récepteurs ainsi que leurs concentrations relatives, couplée à la présence possible de l'IL1Ra au niveau d'une même cellule permettent une régulation stricte de l'expression de l'IL1 $\beta$ . Ceci reflète bien à quel point l'Interleukine-1 $\beta$  et les effets qu'elle produit sont importants pour les mécanismes de défense de la cellule.

#### 4.4 La régulation transcriptionnelle de l'Interleukine-1 $\beta$ .

Le gène humain de l'IL1 $\beta$  a été cloné il y a déjà 13 ans (March *et al.*, 1985) il est d'une longueur de 9,7kb et constitué de 7 exons; on le retrouve sur le bras long du chromosome 2 humain (Webb *et al.*, 1986) où sont aussi situés les gènes codant pour l'IL1 $\alpha$  et l'IL1Ra. L'IL1 $\beta$  pourrait d'ailleurs avoir évolué d'une transcription inverse de l'IL1 $\alpha$  (Clark *et al.*, 1986). Quant à elles, les régions promotrices régissant la transcription du gène IL1 $\beta$  comprennent les 4,4 kilobases situées directement en amont du site (+1) d'initiation de la transcription (Bensi *et al.*, 1990). Cependant, des travaux récents démontrent aussi l'importance de séquences situées à l'intérieur de l'intron 1 dans la transcription de l'IL1 $\beta$  et conduisant à la production d'un second ARNm plus court débutant à la position +559 (Zhang et Duff, 1998).

L'initiation de la transcription est, sans l'ombre d'un doute, une étape déterminante dans la production de l'IL1 $\beta$ , c'est pourquoi l'intégration de signaux provenant de plusieurs facteurs de transcription contribue à son déclenchement. La régulation en cis est déterminée par deux principales régions promotrices de l'IL1 $\beta$ : un enhancer distal qui est délimité par les positions -3134 et -2729 ainsi qu'un promoteur proximal qui comprend la région située entre la position -132 et le site d'initiation de la transcription (Bensi *et al.*, 1990; Shirakawa *et al.*, 1993). Entre ces deux éléments on retrouve une région inhibitrice de la transcription du gène.

L'enhancer ainsi que le promoteur sont capables d'agir de façons indépendantes. En effet, lorsque la portion enhancer de l'IL1 $\beta$  est mise en amont d'un promoteur hétérologue, celui de c-Fos, la transcription de c-Fos devient inductible par des conditions de stress cellulaire, et ce dans une multitude de lignées cellulaires. À l'inverse, si l'enhancer du virus SV40 est mis en amont du promoteur de l'IL1 $\beta$ , cette construction ne devient inductible que chez les cellules normalement capable de synthétiser l'IL1 $\beta$  (Shirakawa *et al.*, 1993). C'est donc

dire que, dans un contexte normal, il y a coopération fonctionnelle entre l'enhancer et le promoteur de l'IL1 $\beta$ .

#### 4.4.1 L'enhancer comme élément inductible de la transcription.

L'enhancer est composé de sites de liaison caractéristiques. C'est d'abord l'utilisation de composés chimiques mimant les situations de stress cellulaire qui a permis de cerner la séquence enhancer de l'IL1 $\beta$  (Bensi *et al.*, 1990; Shirakawa *et al.*, 1993; Gray *et al.*, 1994). Parmi ces composés on compte le TPA (ou PMA) qui est un ester de phorbol, l'AMP cyclique, les lipopolysaccharides (LPS) qui sont des constituants des bactéries gram négatives, le lipoarabinomannan (LAM) qui est un constituant des mycobactéries et, enfin, des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL1 $\beta$  elle-même (Dinarello *et al.*, 1987).

L'ajout d'un cocktail composé de TPA, d'AMP cyclique et de LPS aux lignées monocytaires humaines THP-1 et U937 a d'abord permis de démontrer la présence d'un site CRE/ATF fonctionnel à l'intérieur de l'enhancer (Gray *et al.*, 1994). De la même façon, l'utilisation des LPS a aussi permis d'identifier un site NF-IL6 fonctionnel dans l'enhancer de l'IL1 $\beta$  murin (Godambe *et al.*, 1995). Par la suite, des traitements à l'IL1 $\beta$  ou aux LPS ont permis de décrire la liaison des facteurs NF-IL6 et CREB (Tsukada *et al.*, 1994) ainsi que d'un facteur relié aux STATs (Tsukada *et al.*, 1996) sur un nouvel élément baptisé LILRE pour *LPS and IL1 $\beta$  Responsive Element*. Il est important de remarquer que tous ces facteurs de transcription sont eux-mêmes inductibles dans des conditions de stress: NF-IL6 est induit de façon transcriptionnelle par l'utilisation de TPA (Akira *et al.*, 1992), CREB doit être phosphorylé pour avoir une action activatrice sur la transcription de l'IL1 $\beta$  et dans le cas contraire il peut même empêcher la transactivation par NF-IL6 (Tsukada *et al.*, 1994) alors que les STATs doivent aussi être phosphorylés par les tyrosine kinases Jak pour ensuite agir comme facteurs de transcription au niveau du noyau (revue par Ihle et Kerr, 1995). Des sites de liaison pour les facteurs de

transcription de la famille AP-1 ainsi qu'un site de liaison pour NF- $\kappa$ B sont aussi présents dans l'enhancer (Shirakawa *et al.*, 1993) mais leur apport à l'induction transcriptionnelle du gène n'a pu être déterminée à ce jour.

#### **4.4.2 La répression transcriptionnelle de l'Interleukine-1 $\beta$ .**

Un autre aspect important de la régulation transcriptionnelle de l'IL1 $\beta$  est la répression. En effet, la transcription du gène ne doit pas seulement être activée en condition de stress mais aussi être stoppée lorsque la cytokine n'est plus requise. Les études de délétion des régions promotrices ont montré que la portion située entre les positions -685 et -395 réduisait la transcription du gène chez la lignée cellulaire THP-1. Cette répression est attribuable à la présence d'un élément de réponse aux glucocorticoïdes qui sont reconnus pour leur effet anti-inflammatoire (Zhang *et al.*, 1997). De plus, il y a un site de liaison pour les protéines du choc thermique qui est présent dans le promoteur de l'IL1 $\beta$  en position -67. Ce site est reconnu par le facteur de transcription HSF-1 et la liaison de celui-ci à ce site abaisse l'induction du promoteur par les LPS (Cahill *et al.*, 1996). Il est donc possible qu'en conditions d'inflammation, lorsqu'il y a élévation de la température corporelle, il y ait activation des facteurs de transcription du choc thermique, liaison de ceux-ci au promoteur et rétro-inhibition de la transcription. D'ailleurs, l'IL1 $\beta$  peut activer les gènes HSF dans un mécanisme de rétro-inhibition (Freshney *et al.*, 1994).

#### **4.4.3 NF- $\kappa$ B comme activateur de l'Interleukine-1 $\beta$ .**

Mis à part l'élément de réponse aux glucocorticoïdes, le seul autre site de transcription fonctionnel connu se trouvant hors du promoteur ou de l'enhancer est un site NF- $\kappa$ B. Le site NF- $\kappa$ B se situe en position -300 et l'utilisation notamment de TPA et de LPS a permis de montrer la liaison d'un dimère des sous-unité p50

et p65 de NF- $\kappa$ B sur ce site, puis la transactivation subséquente du promoteur chez les cellules U937 (Hiscott *et al.*, 1993). Les sous-unités de NF- $\kappa$ B sont normalement complexées à leur inhibiteur naturel, I $\kappa$ B, au niveau du cytoplasme et ce n'est qu'après stimulation par les LPS ou le TPA que celles-ci sont libérées et prennent le chemin du noyau (Zabel *et al.*, 1990).

#### 4.4.4 PU.1, NF-IL6 et le promoteur de l'Interleukine-1 $\beta$ .

Enfin, la transcription histo-spécifique de l'IL1 $\beta$  est médiée par le promoteur (Shirakawa *et al.* 1993). Le promoteur IL1 $\beta$  ne contient que peu de sites de transcription, on y trouve un site de régulation négative le HSE (*Heat Shock Element*) décrit à la section 4.4.2, deux sites potentiels de liaison pour NF-IL6 et trois sites potentiels de liaison pour PU.1. Parmi ces sites, seuls les sites NF-IL6, en position -90, et PU.1, en position -45, sont fonctionnels.

Le facteur de transcription qui dirige l'expression histo-spécifique de l'IL1 $\beta$  est le facteur lympho/myéloïde spécifique PU.1. Des expériences de retardement sur gel ont d'abord démontré que la liaison au site -45 était beaucoup plus stable que celle sur les sites -109/-102 qui se chevauchent. De plus, lors d'expériences de transactivation, la mutation du site en position -45 abolit entièrement la transactivation du promoteur ce qui démontre bien que les sites PU.1 -109/-102 n'ont pas un effet déterminant sur la transcription du gène (Kominato *et al.*, 1995). Le site PU.1 en position -45 est aussi impliqué dans l'induction du promoteur par les LPS (Hunninghake *et al.*, 1992). En effet, la délétion de ce site empêche l'induction de la transcription par les LPS ou par les protéines IE1 et IE2 du cytomégalo virus humain chez la lignée monocyttaire THP-1. Cependant, il reste à déterminer si PU.1 n'est pas induit par les LPS ou si PU.1 coopère avec d'autres protéines inductibles.

Le promoteur de l'IL1 $\beta$  possède aussi deux sites de liaison pour le facteur de transcription inductible NF-IL6. Au départ, les deux sites ont été identifiés

comme étant importants dans l'induction de la transcription par les LAMs, une induction médiée par NF-IL6 (Zhang et Rom, 1993). Cependant, à cette époque, la liaison de PU.1 au promoteur n'était pas bien caractérisée et les mutations générées sur le site NF-IL6 situé en position -35 (qui chevauche le site PU.1), affectaient aussi l'intégrité du site PU.1. D'ailleurs, ces résultats ont ensuite été mis en doute (Buras *et al.*, 1994). Le site NF-IL6 en position -90 demeure cependant un site fonctionnel (Zhang et Rom, 1993) et NF-IL6 pourrait être un partenaire potentiel de PU.1 dans l'induction transcriptionnelle du promoteur.

Le virus *Human T-cell Leukemia Virus* (HTLV-1), en plus d'être la cause de certaines leucémies de type ATLL (*Acute T-cell Leukemia/Lymphoma*), est aussi la cause de plusieurs maladies inflammatoires. Ce virus a la capacité d'infecter les monocytes/macrophages (De Revel *et al.*, 1993) et produit la protéine Tax. Cette protéine est capable de potentialiser l'induction transcriptionnelle du promoteur de l'IL1 $\beta$  par les LPS. Tax agit sur le promoteur en y stabilisant la liaison de NF-IL6 et de PU.1 sur leurs sites de liaison respectifs (Tsukada *et al.*, 1997). Il est donc possible de croire qu'il existe chez les macrophages un coactivateur inductible capable d'avoir un mécanisme d'action similaire.

## **5 Les régulateurs transcriptionnels du promoteur IL1 $\beta$ .**

### **5.1 PU.1**

Le facteur de transcription PU.1/Spi-1/Sfpi-1 a été découvert simultanément de deux façons différentes. D'une part, PU.1 a été identifié comme un site fréquent d'intégration du provirus SFFV (*Spleen Focus Forming Virus*) produisant un blocage de la différenciation érythrocytaire et une accumulation d'érythroblastes, un événement caractéristique de l'érythroleucémie de Friend (Moreau-Gachelin *et al.*, 1988). D'autre part, le criblage d'une librairie d'ADNc, dans le but de trouver une protéine capable d'interagir avec le promoteur du gène

codant pour le CMH de classe II 1-Ab, a permis de cloner le gène encodant le facteur de transcription PU.1 (Klemsz *et al.*, 1990; Goebel *et al.*, 1990). Celui-ci s'est ensuite avéré être l'homologue de Spi-1 (Moreau-Gachelin *et al.*, 1990; Goebel *et al.*, 1990). L'homologue humain de PU.1 a par la suite aussi été cloné (Ray *et al.*, 1990).

### 5.1.1 Un membre de la famille Ets.

PU.1 fait partie de la famille des facteurs de transcription à domaine Ets (revue par Seth *et al.*, 1992) dont le prototype est ets-1 (Watson *et al.*, 1988). Un domaine Ets est une région permettant la liaison à l'ADN qui est composée de deux hélices  $\alpha$  jointes par un tour (Karim *et al.*, 1990). La structure cristallographique de PU.1 a d'ailleurs confirmé l'interaction de ce motif avec la séquence de nucléotides 5'-GGAA/T-3' (Pio *et al.*, 1995; Kodandapani *et al.*, 1996). Dans la même famille que PU.1 on retrouve aussi ets-1, ets-2, erg, elk-1, fli-1 et Spi-B parmi lesquels seul PU.1 est exprimé chez les macrophages.

### 5.1.2 Un facteur lympho/myéloïde spécifique.

L'invalidation génique de PU.1 chez la souris provoque une mort périnatale. L'embryon ne génère pas de lymphocytes B et de monocytes/macrophages alors que le développement normal des neutrophiles et des lymphocytes T est aussi affecté (Scott *et al.*, 1994; McKercher *et al.*, 1996). Cependant, il est probable que le développement des neutrophiles et des lymphocytes T soit dérégulé suite au manque d'interactions cellulaires importantes (McKercher *et al.*, 1996). Enfin, l'embryon développe aussi une ostéopétrose sévère (Tondravi *et al.*, 1997), alors que le développement des érythrocytes et des mégakaryocytes ne semble pas être affecté. De plus, la surexpression de PU.1 chez des érythroblastes conduit à leur immortalisation (Schuetze *et al.*, 1993) ce qui ne manque pas de rappeler les

observations notées dans l'érythroleucémie de Friend. PU.1 joue donc un rôle déterminant dans l'établissement des lignées de lymphocytes B et de monocytes/macrophages.

### 5.1.3 Liaison de PU.1 à l'ADN sous forme de monomère.

Au niveau moléculaire, PU.1 s'associe à l'ADN sous forme de monomère où il reconnaît la séquence consensus 5'-GGAA/T-3' (Karim *et al.*, 1990) riche en purines. L'acronyme PU.1 tient d'ailleurs pour « *Purine rich* ». Au plan structural, il est constitué de trois domaines fonctionnels importants. D'abord un domaine de transactivation situé en position N-terminale. Ce domaine comprend deux sous-domaines: le premier étant riche en acides aminés acides et le second en résidus glutamines. Chacun de ces sous-domaines est requis pour une activation transcriptionnelle optimale (Klemsz *et al.*, 1996), cependant la portion riche en acides aminés acides n'est pas requise au cours du développement normal des monocytes (Fisher *et al.*, 1998). PU.1 possède aussi un domaine PEST (proline-acide glutamique-sérine-thréonine), lequel semble faciliter la dégradation d'une protéine (Hargrove *et al.*, 1989; Ghoda *et al.*, 1992; Salama *et al.*, 1994). Dans ce même domaine, se trouve un site de phosphorylation de PU.1 en position 148. Enfin, le troisième et dernier domaine d'importance est le domaine Ets qui permet la liaison à l'ADN.

### 5.1.4 Pip comme coactivateur de PU.1.

À lui seul, PU.1 n'est pas un puissant activateur de la transcription. Il induit normalement l'activité promotrice de l'ordre de cinq fois ce qui est caractéristique des protéines de la famille Ets ainsi que des facteurs déterminant d'histor-spécificité. On pourrait donc s'attendre à ce que PU.1 interagisse avec un coactivateur comme c'est le cas, par exemple, de Elk-1 avec le SRF (Shore *et al.*,



1994). Pourtant, un seul coactivateur direct de PU.1 est connu à ce jour; Pip (*PU.1 interaction partner*) aussi connu sous les noms de NF-EM5, LSIRF et ICSAT (Pongubala *et al.*, 1992; Eisenbeis *et al.*, 1995; Yamagata *et al.*, 1996). Ce facteur ne peut interagir avec PU.1 que si celui-ci est phosphorylé à la position 148 (Pongubala *et al.*, 1993; Eisenbeis *et al.*, 1995) et nécessite aussi la présence avoisinante de la séquence de nucléotides 5'-GAAACC-3' reconnue par Pip. Par contre Pip ne peut agir comme transactivateur à lui seul puisqu'il possède un motif d'autoinhibition qui masque son domaine de liaison à l'ADN. Lors d'une interaction avec PU.1, le domaine de liaison à l'ADN est libéré et peut alors accomplir sa fonction (Brass *et al.*, 1996). L'expression de Pip est par contre restreinte aux lymphocytes (Eisenbeis *et al.*, 1995), il n'existe donc à ce jour aucun coactivateur connu de PU.1 dans la lignée myéloïde.

#### **5.1.5 Participation de PU.1 dans des complexes protéiques.**

Il est connu que PU.1 se trouve souvent à lier l'ADN près d'autres facteurs de transcription comme c'est le cas sur l'enhancer de l'immunoglobuline  $\kappa$  3' où il lie l'ADN avec Pip et à proximité de E2A et du complexe AP-1 (c-Jun/c-Fos). Dans ces conditions, une délétion du domaine de transactivation de PU.1 n'affecte en rien l'action transactivatrice du complexe protéique (Pongubala *et al.*, 1997). Cette observation renforce encore davantage la notion selon laquelle PU.1 serait à lui seul un faible activateur de la transcription mais un important modulateur de celle-ci.

PU.1 est donc capable de contacts directs avec d'autres facteurs de transcription *in vitro*. Il peut interagir d'abord avec la protéine *Retinoblastoma* (RB) qui est un important modulateur du cycle cellulaire, ainsi qu'avec le complexe TFIID, un important constituant de la machinerie basale de transcription (Hagemeier *et al.*, 1993). PU.1 peut aussi établir des contacts physiques avec c-Jun par le biais de son domaine Ets (Bassuk et Leiden, 1995), alors que c'est

surtout le domaine en glissière de leucines de c-Jun qui est impliqué dans l'interaction et peut-être même une portion de son domaine de liaison à l'ADN. Il est à noter que ce type d'interaction pourrait avoir une grande implication biologique puisqu'il est conservé dans l'évolution. En effet, chez la Drosophile, les facteurs de transcription JUN et ETS interagissent physiquement et cette interaction est essentielle au développement adéquat du photorécepteur R7 de l'oeil (Treier *et al.*, 1995). De plus, PU.1 est aussi capable de contacts directs avec d'autres facteurs à glissière de leucines soit NF-IL6 et C/EBP $\delta$  (Hsu *et al.*, 1994; Nagulapalli *et al.*, 1995).

#### 5.1.6 Gènes cibles de PU.1.

Finalement, PU.1 est essentiel à la transcription de plusieurs gènes spécifiques aux lymphocytes B (Pongubala *et al.*, 1992; Eisenbeis *et al.*, 1993; Nelsen *et al.*, 1993) et module aussi la transcription de la plupart des gènes spécifiquement exprimés dans la lignée myéloïde, tels que la chaîne  $\alpha$  du récepteur au GM-CSF (Hohaus *et al.*, 1995), les récepteurs au G-CSF (Smith *et al.*, 1996) et au M-CSF (Zhang *et al.*, 1994), le récepteur *scavenger* (Moulton *et al.*, 1994), la macrosialine (l'homologue murin de CD68) (Li *et al.*, 1998) et le proto-oncogène c-fes (Heydemann *et al.*, 1996). De plus, PU.1 est même capable d'autoréguler sa propre transcription (Chen *et al.*, 1995). Il est à noter que PU.1 est un activateur de la transcription des gènes codant pour CD11b (Pahl *et al.*, 1993) et CD18 (Rosmarin *et al.*, 1995) soit les deux chaînes composant le récepteur Mac-1; alors qu'il réprime la transcription du gène de CD11c, qui peut normalement interagir avec CD18 et empêcher la formation de Mac-1 (Lopez-Rodriguez *et al.*, 1997). Finalement, il est aussi essentiel à la transcription de l'Interleukine-1 $\beta$  (Kominato *et al.*, 1995), un important modulateur de la réponse inflammatoire. PU.1 est donc considéré comme étant le facteur directeur de la transcription des gènes spécifiques à la lignée myéloïde.

## 5.2 NF-IL6.

NF-IL6 (C/EBP $\beta$ , CRP2) est un autre facteur de transcription impliqué dans la régulation de gènes qui sont spécifiquement exprimés chez les macrophages. L'expression de NF-IL6 n'est pourtant pas restreinte aux macrophages ou même au système hématopoïétique. En effet, bien que son expression soit faible au départ, elle est induite de façon abondante dans une variété de tissus suite à des situations de stress, telle qu'une stimulation par les lipopolysaccharides (LPS) ou par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL8 ou l'IL1 $\beta$  (Revue par Akira *et al.*, 1992).

### 5.2.1 La famille des C/EBPs.

NF-IL6 a d'abord été découvert par une approche de gène cible en tant que facteur nucléaire capable d'induire la transcription du gène de l'Interleukine-6 suite à une stimulation cellulaire par l'Interleukine-1 $\beta$  (Isshiki *et al.*, 1990). Le gène humain relié à ce facteur nucléaire a ensuite été cloné par criblage d'une librairie de phages en utilisant la séquence de nucléotides qu'il pouvait lier sur le promoteur de l'Interleukine-6 comme appât (Akira *et al.*, 1990). NF-IL6 montre une forte homologie avec la protéine C/EBP (maintenant appelé C/EBP $\alpha$ ) (Akira *et al.*, 1990), qui est un facteur de transcription exprimé surtout chez les adipocytes et les hépatocytes où il y joue un rôle capital dans le maintien de l'homéostasie énergétique (Wang *et al.*, 1995). Il a donc été possible de créer la famille des C/EBPs (*CAAT/enhancer binding proteins*) où NF-IL6 a hérité du nom de C/EBP $\beta$ . Il existait alors déjà un autre membre à cette famille, C/EBP $\gamma$  (Ig-C/EBP), ayant une expression ubiquiste mais particulièrement forte chez les précurseurs de lymphocytes B (Roman *et al.*, 1990). Depuis il s'est aussi greffé d'autres membres à la famille; d'abord C/EBP $\delta$  (NF-IL6 $\beta$ , CRP3) qui a été découvert par criblage

d'une banque d'ADN génomique humaine avec une sonde provenant du domaine de liaison à l'ADN de NF-IL6 (Kinoshita *et al.*, 1992). Ce facteur de transcription a un patron d'expression similaire à NF-IL6, dans la mesure où il est très peu exprimé dans des conditions normales mais où son expression est fortement augmentée dans plusieurs tissus en réponse au stress. De plus C/EBP $\delta$  peut hétérodimériser avec NF-IL6 et activer la transcription du promoteur de l'IL-6 *in vitro* (Kinoshita *et al.*, 1992). CHOP (GADD153) est un autre membre de la même famille, celui-ci est cependant incapable de lier l'ADN mais peut hétérodimériser avec C/EBP $\alpha$  ainsi qu'avec NF-IL6 (Ron et Habener, 1992). Enfin le dernier né de la famille est C/EBP $\epsilon$ . Il a été découvert lors d'une quête pour un facteur de transcription ayant un rôle similaire au facteur aviaire NF-M (Burk *et al.*, 1993), soit de pouvoir réguler spécifiquement la transcription de gènes myéloïdes. C/EBP $\epsilon$  a été retracé par *RT-PCR* sur des ARNm provenant de la lignée leucémique promyélocytaire HL60, en utilisant des oligonucléotides dérivés des régions les plus homologues des protéines C/EBPs (Chumakov *et al.*, 1997). L'expression de l'ARNm de C/EBP $\epsilon$  est restreinte à des lignées cellulaires provenant du système hématopoïétique, plus précisément des lignées bloquées au stade promyélocytaire et myéloblastique-tardif (Chumakov *et al.*, 1997).

Tous les membres de la famille sont donc exprimés à différents stades de l'hématopoïèse. C/EBP $\alpha$  est aussi exprimé chez les précurseurs précoces de la lignée myéloïde pour ensuite voir son expression diminuer en cours de différenciation puis s'éteindre, alors que l'expression de NF-IL6 augmente sans cesse tout au long de la différenciation myéloïde (Scott *et al.*, 1992; Natsuka *et al.*, 1992). Il existe donc un certain chevauchement dans l'expression de ces facteurs, ce qui amène la possibilité de voir les différents dimères  $\alpha/\beta$  jouer un rôle régulateur de la différenciation.

Il est à noter que NF-IL6 est aussi exprimé chez des cellules de carcinomes humains (Hsu *et al.*, 1993), alors que sa forme tronquée, LIP (voir section 5.2.4), qui est exprimée chez la lignée érythroleucémique humaine K562, peut se lier au promoteur de la  $\beta$ -globine et en bloquer la transcription (Wall *et al.*, 1996). NF-IL6

semble donc être un facteur de transcription qui est employé à plusieurs sauces mais c'est son rôle à titre de facteur inductible par le stress chez les macrophages qui est le mieux caractérisé à ce jour.

### **5.2.2 NF-IL6 comme médiateur de la défense de l'organisme.**

L'invalidation génique de NF-IL6 chez la souris ne produit, à première vue, aucun effet. La souris est viable mais elle est cependant incapable de monter une réponse bactéricide ou tumoricide (Tanaka *et al.*, 1995). Récemment, d'autres répercussions de l'invalidation de C/EBP $\beta$  ont aussi été observées dans le développement des glandes mammaires de la souris (Robinson *et al.*, 1998; Seagroves *et al.*, 1998). Par contre, NF-IL6 ne semble pas être requis pour un développement normal du système hématopoïétique mais jouerait plutôt un rôle important dans les mécanismes de défense de l'hôte.

### **5.2.3 NF-IL6 est un facteur de transcription à glissière de leucines.**

Du point de vue moléculaire, NF-IL6, comme tous les autres C/EBPs, est un facteur de transcription à glissière de leucines. Un motif en glissière de leucines est un domaine permettant la dimérisation protéique avec un partenaire ayant un domaine analogue. Il s'agit d'un motif où les leucines sont espacées de façon régulière par sept à dix acides aminés pour se retrouver toutes alignées et former un interface de dimérisation (Landschulz *et al.*, 1988). Le domaine en glissière de leucines de NF-IL6 est situé en position C-terminale de la protéine, il est précédé par une région basique permettant la liaison à l'ADN et par un domaine de transactivation situé en position N-terminale.

### **5.2.4 Le système LIP/LAP dans la régulation fonctionnelle de NF-IL6.**

NF-IL6 est l'homologue humain de LAP chez le rat. L'ARNm de LAP peut donner lieu à deux protéines différentes par un mécanisme d'utilisation de deux différents codons de départ par le ribosome. L'utilisation du premier codon génère la protéine entière, LAP (*Liver enriched transcriptional Activator Protein*) alors que l'utilisation du second codon génère une protéine tronquée n'ayant pas de domaine de transactivation, LIP (*Liver enriched transcriptional Inhibitor Protein*). LIP peut ensuite dimériser avec LAP et empêcher son activité transcriptionnelle, c'est donc le ratio de LIP et de LAP présent dans la cellule à un moment donné qui détermine si LAP pourra activer ou non la transcription de ses gènes cibles (Descombes *et al.*, 1991). Chez l'humain, NF-IL6 ne possède pas deux mais bien trois codons de départ. Il y a donc trois protéines qui peuvent être produites et c'est le ratio des trois qui va déterminer l'effet de NF-IL6. Ici, seule la forme la plus courte est entièrement dépourvue de domaine de transactivation (Hsu *et al.*, 1993).

### **5.2.5 La participation de NF-IL6 dans des complexes protéiques.**

NF-IL6 lie l'ADN sous forme de dimère à la séquence consensus 5'-T/GTNNGNAAT/G-3' (Natsuka *et al.*, 1992). Tel que mentionné plus tôt, il a la capacité de former des hétérodimères avec d'autres membres de sa famille mais il peut aussi dimériser avec d'autres facteurs à glissière de leucines, les facteurs c-Jun et c-Fos (AP-1) (Hsu *et al.*, 1994). Les facteurs AP-1 sont incapables de se lier à des sites NF-IL6. Lorsqu'un multimère de sites NF-IL6 est mis en amont d'un gène rapporteur, les facteurs AP-1 répriment la transcription par NF-IL6 en utilisant un mécanisme de séquestration (Hsu *et al.*, 1994). Un tel multimère n'existe cependant sur aucun promoteur naturel et d'ailleurs dans un contexte différent, celui du promoteur du gène TSG-6, NF-IL6 et AP-1 lient tous deux leurs séquences consensus et coopèrent dans l'induction de la transcription (Klampfer *et al.*, 1994).

NF-IL6 est aussi capable d'interagir avec des facteurs n'ayant pas de motif à glissière de leucines comme c'est le cas avec PU.1 (voir section 5.1.5). Tout comme dans le cas de PU.1, NF-IL6 peut aussi interagir avec la protéine RB, celle-ci joue alors un rôle de coactivateur de la transcription (Chen *et al.*, 1996). Enfin, NF-IL6 peut interagir avec d'autres facteurs de transcription comme Sp1 (Lee *et al.*, 1997) ou la sous-unité p50 de NF- $\kappa$ B (LeClair *et al.*, 1992).

L'activité transcriptionnelle de NF-IL6 est donc modulable par la présence des facteurs de transcription avec lesquels il peut interagir ainsi que par le ratio de ses différentes formes tronquées. Il y a aussi d'autres niveaux de modulation de la fonction ou de l'accessibilité de NF-IL6. D'abord NF-IL6 peut être phosphorylé à l'intérieur et à proximité de son domaine en glissière de leucines par la *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) (Wegner *et al.*, 1992; Natsuka *et al.*, 1993). De plus, l'AMPc peut stimuler le transport de NF-IL6 du cytoplasme vers le noyau (Metz *et al.*, 1991). NF-IL6 est un facteur de transcription qui est soumis à un contrôle fonctionnel rigoureux ce qui témoigne de l'importance de l'expression de ses gènes cibles pour le devenir de la cellule.

### **5.2.6 Gènes cibles hématopoïétiques de NF-IL6.**

Une quantité importante de gènes impliqués dans les processus de différenciation terminale des macrophages et de la réaction inflammatoire sont des gènes cibles de NF-IL6. D'abord le gène de la collagénase-1 est transactivé dans la lignée monocyttaire U937 après un traitement au TPA, conduisant à la différenciation terminale de cette lignée en macrophage. Cette transactivation est le résultat d'une action conjointe de NF-IL6 avec le complexe AP-1 (Doyle *et al.*, 1997). Dans les mêmes conditions, le gène MDR1 (*Multi Drug Resistance 1*) est aussi induit par NF-IL6 (Combates *et al.*, 1997). Ce gène code pour la glycoprotéine-P, une protéine transmembranaire induite de façon importante dans les situations de stress qui confère aussi une résistance à la chimiothérapie

lorsqu'elle est exprimée chez une cellule tumorale. Puis, le gène (*TNF*)-*stimulated gene-6* (TSG-6) est lui aussi activé par NF-IL6 chez les fibroblastes en conditions d'inflammation (Klampfer *et al.*, 1995). Enfin, les gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 et IL-1 $\beta$  sont tous activés par NF-IL6. TNF- $\alpha$  peut être directement activé par le biais d'un site NF-IL6 situé en position -101 (Wedel *et al.*, 1996). Les promoteurs de l'IL-6 et de l'IL-8 sont tous deux activés par une coopération fonctionnelle de NF-IL6 avec NF- $\kappa$ B (Matsusaka *et al.*, 1993). D'ailleurs, l'activation promotrice de l'IL-6 implique deux sites NF-IL6 situés en positions proximales (positions -153 et -83) en plus d'un site NF- $\kappa$ B à la position -72 (Zhang *et al.*, 1994). De son côté, le promoteur de l'IL-8 contient aussi un site NF-IL6 proximal (-94) adjacent au site NF- $\kappa$ B (-82), le site NF-IL6 chevauche un site de liaison pour le facteur de transcription Oct-1 et la liaison sur ce site serait compétitive (Wu *et al.*, 1997). Enfin, le promoteur de l'Interleukine-1 $\beta$  possède à son tour deux sites NF-IL6 situés près du site d'initiation de la transcription (en positions -90 et -35). L'implication du site NF-IL6 en position -35 dans la régulation transcriptionnelle du gène est cependant controversée puisque ce site chevauche le site de liaison pour la protéine PU.1 et ne serait peut être pas accessible *in vivo* (Zhang *et al.*, 1993; Buras *et al.*, 1994; Kominato *et al.*, 1995). Pour terminer il est maintenant évident que NF-IL6 est un modulateur clé de l'expression des gènes inflammatoires. Cependant son expression dans plusieurs tissus ne peut faire de lui le facteur qui dirige l'expression adéquate de ces gènes seulement dans les tissus ou cellules qui doivent les exprimer. Pour ce faire, NF-IL6 devra agir de concert avec un facteur histo-spécifique tel que PU.1.

### 5.3 c-Jun.

À l'instar de NF-IL6, c-Jun est aussi un facteur de transcription à glissière de leucines qui est induit chez les monocytes en conditions de stress. Il s'agit en



plus d'une autre protéine étant exprimée dans tous les tissus, donc ayant une expression ubiquiste.

### 5.3.1 Historique du complexe AP.1.

c-Jun est une partie du complexe transcriptionnel AP-1 (*Activator protein 1*). AP-1 a d'abord été découvert comme facteur de transcription activant le gène de la métallothionine IIa (Lee *et al.*, 1987), ainsi qu'en tant que responsable de la reconnaissance d'éléments de réponse au TPA (*TPA Response Elements* ou TREs) (Angel *et al.*, 1987). La séquence de nucléotides alors reconnue est 5'-TGA G/C TCA-3'. La purification du complexe AP-1 par colonnes d'affinité a par la suite montré que celui-ci n'était pas une seule protéine mais était plutôt constitué de plusieurs polypeptides (Lee *et al.*, 1987; Angel *et al.*, 1987). C'est grâce à la découverte de l'oncogène viral *v-jun* (Maki *et al.*, 1987) et à l'observation que celui-ci pouvait reconnaître un site AP-1 consensus, qu'ont pu être utilisés des anticorps dirigés contre *v-jun* pour détecter la présence de son homologue cellulaire *c-jun* dans le complexe AP-1 (Bohmann *et al.*, 1987). Par la suite, des expériences de coimmunoprécipitation au moyen d'anticorps dirigés contre c-fos et c-jun ont permis de montrer que la forme majoritaire du complexe AP-1 était composée des protéines c-jun et c-fos (Chiu *et al.*, 1988).

### 5.3.2 Les familles Jun et Fos.

Depuis la caractérisation du complexe AP-1, d'autres facteurs de transcription à glissière de leucines présentant une homologie avec c-Jun ou c-Fos ont été identifiés. Ceci a permis de créer les familles Jun et Fos dont c-Jun et c-Fos sont les prototypes. À l'intérieur de la famille Jun on retrouve, en plus de c-Jun, JunB (Ryder *et al.*, 1988), JunD (Hirai *et al.*, 1989) et l'homologue viral v-Jun.

De son côté, la famille Fos comprend c-Fos, FosB (Zerial *et al.*, 1989), Fra1 (Cohen *et al.*, 1988), Fra2 (Matsui *et al.*, 1990) et l'homologue viral v-Fos.

Au niveau fonctionnel, les membres de la famille Jun forment des homodimères et des hétérodimères avec des membres de leur propre famille pour ensuite reconnaître un TRE. Par contre, les facteurs de la famille Fos sont incapables de former des homodimères ou d'interagir entre eux. Leur hétérodimérisation avec des membres de la famille Jun donne cependant lieu à des dimères plus stables et à des transactivateurs plus puissants (Nakabeppu *et al.*, 1988; Ryseck *et al.*, 1991). Depuis, il a été montré que l'identité des partenaires du complexe AP-1 est déterminante pour leur capacité à activer la transcription de leur gènes cibles (Nakabeppu *et al.*, 1991; Kobierski *et al.*, 1991; Deng *et al.*, 1993;).

Il existe aussi une forte régulation des complexes AP-1 par les membres de la famille CREB (*cAMP Response Element Binding proteins*), une famille de facteurs à glissière de leucines reconnaissant des éléments de réponse à l'AMPc (CRE). Plusieurs d'entre eux peuvent dimériser avec des facteurs des familles Jun/Fos pour moduler leur activité. Par exemple, ATF-2 (un membre de la famille CREB) peut dimériser avec c-Jun et le recruter sur un site CRE alors que l'affinité du dimère pour un TRE est bien moindre (Hai *et al.*, 1991).

### **5.3.3 La participation de c-Jun dans des complexes protéiques.**

En plus de sa capacité à former différents dimères impliquant des facteurs à glissière de leucines, il y a de plus en plus d'évidences démontrant que c-Jun est impliqué dans des complexes transcriptionnels de plus grande envergure où il agit en collaboration avec des facteurs de transcription de plusieurs types différents. Dans certaines conditions, les homodimères de c-Jun peuvent même être de meilleurs activateurs que les hétérodimères c-Jun/c-Fos ce qui donne aux

protéines Jun et Fos une plus grande souplesse au niveau des fonctions qu'elles peuvent accomplir.

Par exemple, la protéine  $\alpha$ -NAC ( *$\alpha$  chain of the Nascent polypeptide-Associated Complex*), qui est exprimée durant l'ossification, agit comme coactivatrice spécifique d'homodimères de c-Jun en stabilisant la liaison de ce dernier sur l'ADN, en abaissant la constante de dissociation. Par contre,  $\alpha$ -NAC est incapable de coopérer avec des hétérodimères c-Jun/c-Fos pour activer la transcription (Moreau *et al.*, 1998). JAB1 est un autre partenaire connu de c-Jun (Claret *et al.*, 1996).

Un autre exemple où c-Jun peut agir sans c-Fos dans un complexe transcriptionnel a lieu au niveau de l'enhancer du gène de l'Interferon  $\beta$  (IFN $\beta$ ), sur lequel il se forme un complexe protéique imposant, appelé « l'*enhanceosome* ». Il comprend un hétérodimère c-Jun/ATF-2, deux protéines IRF-1 et NF- $\kappa$ B. L'agencement des domaines de transactivation de ces protéines permet ensuite le recrutement du coactivateur CBP (*CREB Binding Protein*). L'absence de l'un ou l'autre de ces facteurs de transcription empêche le recrutement de CBP (Merika *et al.*, 1998).

De plus, *in vitro* la protéine Rétinoblastome (RB), qui est un régulateur essentiel du cycle cellulaire (revue par Weinberg, 1995), s'associe physiquement avec la protéine c-Jun et active la transcription *via* un site AP-1. RB agit alors à titre de coactivateur de c-Jun (Nead *et al.*, 1998). Il peut aussi s'associer avec le récepteur des glucocorticoïdes (Yang-Yen *et al.*, 1990) ou avec MyoD (Bengal *et al.*, 1992) conduisant dans les deux cas vers une inhibition de la transcription des gènes cibles des partenaires. c-Jun est enfin capable d'interagir avec les composants de la machinerie de transcription de base TFIIIE-34 et TFIIIF (Martin *et al.*, 1996) et même de déplacer un complexe de nucléosome *in vitro* (cette fois en présence de c-Fos) (Ng *et al.*, 1997).

#### **5.3.4 c-Jun est impliqué dans une variété de processus biologiques.**

En étant capable d'autant d'interaction protéique avec des composants clés de la machinerie cellulaire; c-Jun se donne la possibilité d'avoir beaucoup d'impact sur le sort d'une cellule. C'est pourquoi, dans différents systèmes, c-Jun peut avoir un effet sur la prolifération, la différenciation, l'apoptose ou encore la réponse aux situations de stress.

En interagissant avec MyoD (revue par Weintraub *et al.*, 1991; 1993), qui est la pierre angulaire du développement musculaire, c-Jun empêche la différenciation musculaire et promouvoit la prolifération des cellules (Bengal *et al.*, 1992). Par contre, chez des fibroblastes de la lignée NIH-3T3, l'expression de c-Jun déclenche les mécanismes apoptotiques (Bossy-Wetzel *et al.*, 1997). Enfin, la transcription de c-Jun est induite fortement et rapidement lorsqu'une cellule est soumise à une irradiation aux rayons ultraviolets. En fait elle est induite plus fortement que n'importe lequel autre gène de réponse précoce (Devary *et al.*, 1991). Un tel éventail d'effets biologiques médiés par un seul et même facteur est plutôt rare ce qui fait de c-Jun un régulateur capital de l'homéostasie cellulaire.

#### **5.3.5 Gènes cibles hématopoïétiques de c-Jun.**

Le système hématopoïétique n'échappe pas à la loi de c-Jun. En effet, c-Jun et les facteurs AP-1 sont exprimés de façon variable durant la maturation des cellules sanguines. L'expression des facteurs de transcription c-Jun, JunB, JunD et c-Fos est augmentée lorsqu'une population cellulaire enrichie en myéloblastes est induite à se différencier en granulocytes ou en macrophages (Lord *et al.*, 1993). De plus, tel que mentionné plus tôt, c-Jun est capable d'interagir physiquement avec le facteur PU.1 qui est déterminant dans la transcription de gènes monocytaires (Bassuk et Leiden, 1995). c-Jun peut aussi interagir avec NF-IL6, qui est induit dans les mêmes conditions (Hsu *et al.*, 1994; Combates *et al.*, 1997). Finalement, plusieurs gènes induits durant la différenciation

monocytaire possèdent des sites de liaison pour les facteurs AP-1 dans leur promoteur tels que: MMP-1 qui code pour une collagénase (Westermarck *et al.*, 1997), MDR1 (Combates *et al.*, 1997), le récepteur *Scavenger* (Horvai *et al.*, 1995; Moulton *et al.*, 1994), TSG-6 (Klampfer *et al.*, 1995) et l'Interleukine-1 $\beta$  au niveau de son enhancer distal (Shirakawa *et al.*, 1993). Autant d'évidences circonstanciées tendent à montrer que c-Jun pourrait très bien jouer un rôle actif dans la transcription des gènes exprimés chez le macrophage.

## **6 Objectif de travail.**

Le but de ce travail est de démontrer que c-Jun est capable d'agir à titre de coactivateur dans la transcription du promoteur de l'Interleukine-1 $\beta$ . En effet, le promoteur IL1 $\beta$  proximal à lui seul reste inductible par des conditions de stress, et ce malgré l'absence de sites AP-1 consensus de liaison pour c-Jun. Dans ces conditions, les facteurs de transcription NF-IL6 et c-Jun sont induits alors que PU.1 est constitutivement présent chez le macrophage. Puisque PU.1 et NF-IL6 possèdent tous deux des sites de liaison fonctionnels sur le promoteur et que c-Jun est capable d'une interaction physique avec chacun d'eux *in vitro*, il est donc possible qu'il puisse agir comme un cofacteur qui ne lierait pas l'ADN mais établirait un complexe transcriptionnel plus stable et puissant. Il n'existe aucune autre situation connue à ce jour où c-Jun agit à titre de coactivateur. Cependant, son implication dans un nombre grandissant de complexes multi-protéiques, son action transactivatrice sur plusieurs gènes hématopoïétiques et le fait qu'un grand nombre de promoteurs myéloïdes inductibles possèdent des combinaisons de sites PU.1 et NF-IL6 (ou C/EBP) sont autant de points qui nous permettent de croire au bien fondé de notre hypothèse.

## CHAPITRE 2

### **PRÉSENTATION DU MANUSCRIT**

**c-Jun functions as a coactivator of the myeloid transcription  
factors PU.1 and NF-IL6**

Martin Lefrançois<sup>1</sup>, Alain Moreau<sup>1</sup>, André Bédard<sup>2</sup>, Pierre Forest<sup>1</sup>,  
Mona Nemer<sup>1,3</sup>, Daniel G Tenen<sup>4</sup>, Trang Hoang<sup>1,3</sup>

From the <sup>1</sup>Clinical Research Institute of Montreal, Montréal, Québec,  
Canada H2W 1R7; the <sup>3</sup>Departments of Pharmacology, Biochemistry and  
Molecular Biology, University of Montreal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7;  
and the <sup>2</sup>Department of Biology, York University, North York ON, Canada M3J  
1P3; <sup>4</sup>Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston,  
Massachusetts 02115.

Running title: c-Jun as a coactivator of PU.1 and NF-IL6

Correspondence to:  
Trang Hoang, PhD  
Laboratory of Hemopoiesis and Leukemia  
Clinical Research Institute of Montreal  
110 Pine West, Montreal H2W 1R7  
Canada  
EMail: [hoangt@ircm.umontreal.ca](mailto:hoangt@ircm.umontreal.ca)  
Fax: (514) 987 5513

## ABSTRACT

Macrophages produce Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) on activation by pro-inflammatory stimuli, which are mimicked by TPA. In CD11b positive myeloid cells, TPA induces expression of two bZip transcription factors, NF-IL6 and c-Jun. These inductions coincide with an elevation of IL-1 $\beta$  mRNA and of IL-1 $\beta$  promoter activity. The crucial role of c-Jun is underscored by the fact that TPA fails to induce IL-1 $\beta$  mRNA in hemopoietic cells expressing a c-Jun antisense construct. Surprisingly, the proximal and monocyte-specific IL-1 $\beta$  promoter (IL-1 $\beta$ 131) remains TPA-inducible despite the lack of a canonical AP-1 binding site. TPA inducibility, nonetheless, depends entirely on the integrity of the DNA binding sites for both NF-IL6 and the lympho/myeloid transcription factor PU.1. Furthermore, cotransfection of PU.1, NF-IL6 and c-Jun in a heterologous cell line produced a 200 to 800 fold synergistic transactivation of IL-1 $\beta$ 131. Consistent with the lack of an AP-1 sequence in IL-1 $\beta$ 131, the DNA binding domain of c-Jun is dispensable, whereas the entire N terminal and the leucine zipper domains of c-Jun are required for co-activation of PU.1 transcriptional activity. Finally, PU.1 interacts simultaneously with NF-IL6 and c-Jun in a mammalian two-hybrid assay. Together, our results provide evidence for a tripartite complex between a tissue specific transcription factor PU.1, constitutively expressed in monocytes, and two inducible factors, c-Jun and NF-IL6, which defines a combinatorial code for macrophage function in stress response. In this complex, c-Jun but not JunB nor JunD exhibits the properties of a stress-induced transcriptional coactivator.



## INTRODUCTION

Transcriptional regulation of gene expression is controlled by the binding of specific transcription factors to their cognate DNA sequences. In general, these transcription factors can form homodimers or heterodimers through motifs such as the leucine zipper (LZ) or helix-loop-helix (HLH) motifs. For example, c-Jun, a leucine zipper transcription factor, can either homodimerize or heterodimerize with other members of the AP-1 family such as c-Fos (reviewed in reference (2)) to activate the expression of target genes through binding to a typical AP-1 consensus sequence. There is, however, accumulating evidence to suggest that the activation of a single target gene requires the combinatorial interaction of several transcription factors (3;5;50), even more so in the execution of a specific gene expression program (45;57). Thus, c-Jun has been shown to physically interact with PU.1 (3), an Ets-like transcription factor (28), and enhance the transcription of monocyte-specific genes that include macrosialin or the scavenger receptor, through binding to AP-1 sites in their enhancer or proximal promoter regions (33;39). Similarly, PU.1 participates in a large complex with PIP (PU.1-interacting partner), c-Jun and c-Fos through binding to the immunoglobulin  $\kappa$  3' enhancer and contributes to enhancer activity (51). In this complex, both PU.1 and c-Jun/c-Fos are anchored to the enhancer *via* their respective binding sites while PIP acts as a transcriptional coactivator. The transcriptional properties of c-Jun can also be modulated through association with tissue specific coactivators, as reported for  $\alpha$ -NAC (alpha chain of the nascent polypeptide associated complex and coactivator) which is specifically expressed in bones during development (38) and JAB-1, a c-Jun coactivator (10). In contrast to the above, c-Jun interaction with MyoD, a basic HLH myogenic transcription factor (5) or with the glucocorticoid receptor occurs in the absence of DNA binding and results in functional antagonism and inhibition of transcription.

PU.1 function is essential for the generation of granulocytes and macrophages *in vitro* (62) and *in vivo* (37;55). PU.1 binds the consensus sequence PuGAA as a monomer and drives the transcription of several myelo-monocytic genes *in vitro*, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), the gene encoding the receptor for macrophage colony stimulating factor c-fms (70), GM-CSF receptor  $\alpha$  (23), CD11b (20;46), CD18 (52), Fc $\gamma$ R1 and NRAMP1, and induces myeloid lineage commitment (44).

NF-IL6, a bZIP transcription factor which is upregulated in macrophages (43) is a member of the C/EBP (CAAT/enhancer binding protein) family also referred to as C/EBP $\beta$  (8;15). PU.1, NF-IL6 and AP-1 have all been implicated in the transcription of IL-1 $\beta$ , a pro-inflammatory cytokine (7;24;29;56;60;61;73). IL-1 $\beta$  is induced in many cell types by a large variety of stimuli that evoke a stress-like response, including viruses (21;24;25), lipopolysaccharide (LPS) (17), phorbol esters (6;56), ionizing radiations (9) and ICAM-1 cross-linking (31). The latter induces AP-1 activity which enhances IL-1 $\beta$  transcription through binding to AP-1 sites in the LPS-responsive distal enhancer (between -3134 and -2729) (31), while PU.1 directs monocyte expression of IL-1 $\beta$  through binding to a PU.1 consensus sequence between -50 and -39 of the proximal IL-1 $\beta$  promoter (29). Activated macrophages represent a major source of IL-1 $\beta$ , which is itself involved in a cytokine cascade that serves to exacerbate an inflammatory response and results in tissue damage (reviewed by Dinarello (12)). We therefore studied the transcriptional control of IL-1 $\beta$ , in order to define the molecular regulation of macrophage activation. In the present study, we provide functional evidence for the protein complex formed on the proximal IL-1 $\beta$  promoter in response to TPA. We show that the transcriptional activity of PU.1, a lymphoid/monocyte specific

transcription factor is amplified by association with stress inducible c-Jun and NF-IL6, establishing a combinatorial code for macrophage response to injury.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture.**

The erythro-monocytic TF-1 cell line (26) was a kind gift from Dr Kitamura (DNAX, Palo Alto, CA). The cells were maintained in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Gibco, Grand Island, NY) supplemented with fetal calf serum (FCS; 10%) and GM-CSF (200 pmol/L) and were passaged three times weekly at a concentration of  $1.5 \times 10^5$ /mL.

Jurkat T cells and K562 erythroid cells were also maintained in IMDM supplemented with FCS (10%) and were passaged three times weekly at concentrations of  $1.5 \times 10^5$ /mL and  $1 \times 10^5$ /mL respectively. HeLa epithelial cells and F9 embryonic carcinoma cells were also passaged three times weekly at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/ 60mm dish.

**TPA induction experiments.** TF-1 and HeLa cell lines were transfected as described earlier and incubated for 24 hours and 40 hours respectively in IMDM supplemented with FCS (10%) and 1 nM TPA (22). GM-CSF (200 pM) was also added for TF-1 cells. The cells were then lysed and subjected to a luciferase assay.

### **Plasmids.**

The IL-1 $\beta$  4.4 CAT containing 4.4 kb upstream sequences of the human IL-1 $\beta$  gene (21) was generously provided by Dr John Hiscott (Lady Davis Institute, Montreal) and was used as a template to generate luciferase reporter constructs.

First, the IL-1 $\beta$  promoter region extending from -302 to + 11 bp of the IL-1 $\beta$  gene was amplified through PCR with the following oligonucleotides: IL-1P-302 (5'-TGA AGC TTG GTA CCT AAC GTG GGA AAA TCC-3') and IL-1P-+11 (5'-AAG CTT AGA TCT AGA GGT TTG GTA TCT G-3'). The PCR fragment was digested with *KpnI* and *BglII* (sequences underlined) and cloned into the same sites of the promoterless vector pXP2 to yield the IL-1 $\beta$ 302 construct, which was sequenced, digested with *HindIII* and religated to generate the IL-1 $\beta$ 131 construct. The IL-1 $\beta$ 131 construct thus contains sequences extending from -131 to +11 bp of the IL-1 $\beta$  promoter cloned upstream of the luciferase reporter gene. Mutagenesis of the PU.1 (NF $\beta$ A) site at position -47 and of the NF-IL6 site at -91 of the -131/+11 promoter fragment were generated by overlapping PCR mutagenesis using the mutated oligonucleotides: mPU.1 :5'-TC AGC CTC CTA CTT AGG CTT TTG AAA GCT A -'3, mNF-IL6: 5'-TAA CTT GA CCG TGA ATT CAG GTA TTC AAC AG-'3. To generate the IL-1 $\beta$ 4400 construct (-4400/+11), IL-1 $\beta$ 4.4CAT was digested with *Sall* and *HindIII*, and cloned into the *BamHI* and *HindIII* sites of IL-1 $\beta$ 302. The *Sall* site of the insert and the *BamHI* site of the vector were blunted with the Klenow polymerase fragment before cloning.

The full length murine PU.1 cDNA (47) was cloned as an *EcoRI* fragment in the MSCV-neo expression vector and the N terminal and PEST domain deletants of PU.1 were gifts of Dr. Marian Elliott Koshland (Berkeley, CA) and Dr. Michael Klemsz (Houston, TN) respectively. NF-IL6 was provided by Dr. Gretchen Darlington (Indianapolis, IN). The full length murine c-Jun cDNA as well as the basic domain ( $\Delta$ 251-276) and the leucine zipper ( $\Delta$ 281-313) deletants cloned in pSV-SPORT1 (Gibco, Grand Island, NY) expression vector were generous gifts of Dr. Pierre Paradis (Montréal, Qué.). Wild type human c-Jun, c-Fos, JunB and JunD cDNAs as well as the transactivation domain deletant  $\Delta$ 6-194 of c-Jun cloned together with the Rous Sarcoma Virus (RSV) promoter in pUC19 were gifts of Dr. Michael Karin (La Jolla, Ca). CMV-driven expression vectors for c-Jun fused

to the activation domain of GAL4 (38) and PU.1 fused to GAL4 DNA binding domain (72) are described in detail elsewhere (Zhang, P., submitted). The reporter construct for the mammalian two-hybrid assay contained the luciferase gene driven by the minimal thymidine kinase promoter and 5 GAL4 UAS.

### **Transfection protocols and luciferase assays.**

TF-1 were transfected by electroporation. Cells were passaged 24 hours before electroporation at a concentration of  $3 \times 10^5$  cells/mL. Exponentially growing cells were then concentrated at  $2.5 \times 10^7$  cells/mL and electroporated at 350 mV using a Bio-Rad electroporator with 12  $\mu$ g of reporter DNA, 2 $\mu$ g of RSV-GH used as an internal control for the experiment, and different molar ratios of expression vectors; the total amount of transfected DNA was 30  $\mu$ g with the balance made up of pGEM4 as a carrier DNA. Cell lysates were prepared 12 hours after transfection, normalised for growth hormone content and assayed for luciferase activity. HeLa and F9 cell lines were subjected to calcium phosphate transfection, as previously described (34). HeLa cells were passaged 24 hours before transfection at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/60 mm dish and F9 cells at  $1 \times 10^4$  cells/60 mm dish. The cells were transfected with 1  $\mu$ g of reporter DNA, 250 ng of CMV- $\beta$ gal and different molar ratios of expression vectors; the total amount of DNA transfected was normalised with pGEM4. Cell lysates were prepared 40 hours after transfection, normalised for growth hormone content and assayed for luciferase activity. RSV-luc was used as an external control for all the transfections and pXP2 was also transfected as a negative control.

### **Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).**

EMSAs were performed by incubating  $^{32}$ P-labeled double stranded oligonucleotide probes (20-50 fmol) together with 5  $\mu$ g of TF-1 nuclear extracts or

a 1  $\mu$ L portion of *in vitro* translation reaction for PU.1 or c-Jun. All the reactions were incubated at 4°C for 10 min. in the presence of 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L double stranded poly(dIdC) (Pharmacia Biotech, Sweden), in a final volume of 20  $\mu$ L. Where indicated, a 200 fold molar excess of unlabeled competitor was added to the reaction mix. For supershift experiments, 1  $\mu$ g of purified polyclonal anti-PU.1 (sc-356 X), anti-C/EBP $\alpha$  (sc-61 X), anti-C/EBP $\beta$  (sc-150 X), anti-C/EBP $\delta$  (sc-636 X), anti-C/EBP $\epsilon$  (sc-158 X) or anti-c-Jun (KM-1) (sc-822 X) antibody (all from Santa Cruz) were added to the reaction. The PU.1 antibody is directed against amino acids 251-271, all the anti-C/EBPs are directed against the carboxy terminal portion of the corresponding C/EBP and the anti-c-Jun against amino acids 56-69. DNA binding conditions, nuclear extract preparation and labelling of the probes were performed as described previously (46). The reaction products were finally resolved through electrophoresis on a 4% polyacrylamide gel (bisacrylamide:acrylamide at a 1:19 ratio) in 0.25X TBE buffer (45 mM Tris-borate, 1mM EDTA) at 150 volts at 4°C. The retarded protein complexes were then exposed to a PhosphorImager screen for quantification. The oligonucleotides that were used as probes and/or competitors are shown in Fig. 1.

### **Retroviral mediated gene transfer.**

TF-1 cells were engineered to stably express a c-Jun antisense construct using the murine stem cell virus (MSCV) (19), as described previously (32). Briefly, the entire coding region of c-Jun was cloned in the antisense orientation in the MSCV retroviral vector. Amphotropic viruses were produced by transient transfection into the BING packaging cell line (48). For retroviral infection,  $1 \times 10^6$  exponentially growing TF-1 cells were presensitized with polybrene at 2  $\mu$ g/ml for 24 hours and co-cultured with virus-producing cells for another 24 hours. Non

adherent TF-1 cells were separated from the infected fibroblasts. A polyclonal population was analysed 7 days after selection in G418 at 1 mg/ml.

### **Mammalian two-hybrid assays.**

F9 cells were co-transfected with combinations of cytomegalovirus (CMV)-driven expression vectors for the GAL4 DNA binding domain (GAL4-DBD) (300ng) or the PU.1 GAL4-DBD fusion protein (300 ng) and c-Jun GAL4 activation domain (GAL4-AD) (30 ng and 300 ng). Where indicated, NF-IL6 was co-transfected with the two fusion proteins at 300 ng. The reporter gene used was 5xGal4-tx-109 (1µg) and transfection efficiency was monitored with the β-galactosidase expression vector (1 µg). Similar level of expression were achieved for each recombinant protein (data not shown).

All transfections were performed through calcium phosphate precipitation and cells were harvested 24 hours post-transfection. Luciferase and β-galactosidase activities were assayed as previously described (36).

## **RESULTS**

The induction of IL-1β gene expression is governed mainly by two regulatory regions, a cell type-independent distal enhancer element located between -3757 and -2729 upstream of the transcription initiation site, and a proximal cell type-specific region located between -131 to +11 (6;56). The LPS response is determined by members of the C/EBP family of transcription factor, i.e. NF-IL6 (16;56), and STAT family (61) through the distal enhancer, whereas IL-1β expression in monocytes depends on PU.1 binding sequences within the proximal region (Fig. 1A) (29). This region also contains NF-IL6 consensus sequences (7;16;43;73).

### **Sequential induction of AP-1, C/EBP DNA binding activity and IL-1 $\beta$ promoter activity by TPA.**

In order to define the transcription factors involved in TPA response, we have determined the kinetics of induction of the full length IL-1 $\beta$ 4400 by TPA and mapped the TPA-response element through a number of nested deletions and chimeric constructs, in both IL-1 $\beta$  expressing cells (TF-1) and non expressing cells (Hela, Jurkat, K562). TF-1 cells co-express erythroid markers (glycophorin A) and monocytic markers (CD11b) (22). On TPA induction, the cells switch to the monocytic pathway and upregulate IL-1 $\beta$  mRNA (22). In TF-1 cells, IL-1 $\beta$ 4400 was stimulated by TPA as early as 6 h post induction and remained high up to 24 hours after TPA exposure (Fig. 2A). Mapping studies also confirmed the presence of a distal enhancer between -4000 and -2500 (data not shown), as previously reported (56). IL-1 $\beta$ 131 in which promoter sequences were deleted to -131 bp was still induced by more than 15 fold by TPA (Fig. 2A). In contrast, an RSV-luciferase construct, delivered as a control to another set of cells, was typically induced by 1.2 to 2 fold. Furthermore, there was only a two-fold variation in luciferase activity driven off the IL-1 $\beta$ 131 promoter construct in HeLa cells in response to TPA (not shown). Together our results indicate the presence of a cell type-specific TPA response element within the proximal IL-1 $\beta$  promoter region.

We next determined the transcription factors that are induced by TPA through Northern blotting and gel shift assays. Northern blotting indicates an early induction of c-Jun at 30-60 min followed by a stronger induction at 4-6 h that precedes the induction of IL-1 $\beta$  mRNA, whereas JunB was not affected (data not shown). Furthermore, PU.1 mRNA levels remained constant over 24-48 hours. EMSAs were performed using TF-1 nuclear extracts prepared at the indicated times following TPA exposure (Fig. 2B). As expected, there was a rapid induction



of AP-1 complex formation on a TPA response element (TRE), which was clearly visible at 2-4 h, and remained constant from 6 to 24 hours. This complex was displaced by competition with a 200 fold molar excess of cold double strand TRE oligonucleotide and was supershifted with a c-Jun-specific (Fig. 2B upper panel, lanes 8 and 10, respectively) as well as a JunD-specific antibody (Fig. 2B, lane 12), allowing for the identification of both c-Jun and JunD in this complex. DNA binding activity by members of the C/EBP family, determined using a functional consensus binding site from the carbamoyl phosphate synthetase (CPS) promoter (63), showed three distinct bands which were displaced with an unlabeled competitor (data not shown) and supershifted with a NFIL6 (C/EBP $\beta$ )-specific antibody (Fig. 2B middle panel, lane 11) as well as a C/EBP $\delta$  specific antibody (lane 12). There was a basal level of C/EBP DNA binding activity which was abruptly increased to high levels at 24 hours (Fig. 2B, middle panel). Finally, PU.1 DNA binding activity was determined with the IL1 $\beta$ -PU.1 probe that covers the PU.1 sequence as described in Fig. 1A. Co-incubation with an anti-PU.1 consistently results in a significant decrease in intensity of the PU.1 containing complex as shown (lane 10, bottom panel). In contrast to NF-IL6 and AP-1, PU.1 DNA binding activity was not affected by TPA exposure (Fig. 2B).

### **Characterization of protein complexes formed on the IL-1 $\beta$ proximal promoter region.**

Despite the presence of several consensus sequences for PU.1 and NF-IL6 within the IL-1 $\beta$ 131 proximal promoter region, two were previously shown to be functionally required, the PU.1 binding sequence at -47 (29) and the upstream NF-IL6 binding site at -91 (73). In addition, gel shift assays revealed band shift

patterns that were typical of PU.1 and NF-IL6 binding, together with a number of slowly migrating complexes that remained unexplored. To further characterize the proteins binding to these two regions, we generated radioactive probes spanning the proximal PU.1 site (IL1 $\beta$ -PU.1) or the upstream NF-IL6 site (IL1 $\beta$ -NFIL6) (Fig. 1) and performed electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) using TPA-induced TF-1 nuclear extracts (Fig. 3A, lanes 1-12 and Fig. 3B, lanes 1-17). EMSAs using the IL1 $\beta$ -PU.1 probe produced three specific complexes labelled C1 to C3. The C3 complex contained PU.1 since it was displaced by the c-fms PU.1 sequence (Fig. 3A, compare lanes 1 and 4) but not by an IL-1 $\beta$  oligonucleotide mutated in the PU.1 site (mPU.1) (Fig. 3A, lane 3) and was also specifically supershifted with an anti-PU.1 antibody (lanes 9, and 10). In contrast, the C1 complex was not displaced by the c-fms PU.1 site (lane 4) but rather by the CPS oligonucleotide, which suggests the presence of a member of the C/EBP family within the C1 complex. Finally, the C2 complex was displaced by self competition (lane 2) and by the c-fms PU.1 site (lane 4) but not by any other oligonucleotide, suggesting that it also contains PU.1. It is not clear whether the C2 complex is supershifted by anti PU.1 (Fig. 3A, lanes 9 and 10) because of the smear caused by the antibody. Interestingly, the C2 complex was also specifically disrupted by an anti-c-Jun antibody (lane 12), which suggests that it includes both PU.1 and c-Jun. It is worth noting, however, that the C2 complex could not be competed by the TRE oligonucleotide (Fig. 3A, lane 5), consistent with at least two possibilities: in the C2 complex, either c-Jun does not directly bind DNA, or alternatively, that its DNA binding site preference is altered and differs from a canonical AP-1 sequence. In support of the first possibility, c-Jun was previously shown to interact with PU.1 through residues 276 to 282 (3), which are adjacent to but distinct from

its DNA binding domain (251-276). It is therefore conceivable that TRE binding does not displace c-Jun from its association with PU.1 in the C2 complex.

Several specific complexes were observed in EMSAs using the IL1 $\beta$ -NFIL6 probe and TPA-induced TF-1 nuclear extracts (Fig. 3B, lane 1). Four of the complexes, C4 to C7 (Fig. 3B, lanes 1-8) were displaced by the CPS oligonucleotide (lane 4), but not an IL-1 $\beta$  oligonucleotide mutated in the NF-IL6 binding site (lane 3), which suggests the presence of a C/EBP family member(s). In agreement with this interpretation and with previous results (16), we found that the C5 and C6 complexes contained NF-IL6 since they were specifically supershifted with an anti-NF-IL6 antibody (Fig. 3B, lane 6) and not by antibodies directed against C/EBP  $\alpha$ ,  $\delta$  or  $\epsilon$  (Fig. 3B, lanes 9-11). Furthermore, despite the induction of C/EBP $\delta$  by TPA (Fig. 2B), we did not detect C/EBP $\delta$  binding to the IL-1 $\beta$ -NFIL6 probe (Fig. 3B, lane 10).

Finally, since AP-1 binding activity and IL-1 $\beta$ 131 promoter activity are both strongly induced by TPA (Fig. 2A), we looked for AP-1 binding sites in the IL-1 $\beta$ 131 promoter. At the sequence level, besides a putative half site located at -77 (Fig. 1B), no other obvious binding site could be found. We therefore addressed the question whether or not c-Jun could bind sequences of the proximal IL-1 $\beta$  promoter. First, we generated a set of overlapping probes spanning the entire IL-1 $\beta$ 131 promoter (Fig. 1A) and tested whether c-Jun could bind to any non-consensus AP-1 sites in gel shift assays. The presence of c-Jun, Jun D, C/EBP $\delta$  or NF-IL6 was verified through supershifting with their respective antibodies, as well as cross-competition with TRE or CPS consensus probes. We could not detect either AP-1 or C/EBP binding on any of these probes (data not shown), except for those found using the IL1 $\beta$ -PU.1 and the IL1 $\beta$ -NFIL6 probes as described in Fig. 3A and B. Then, a DNA fragment extending from -131 to +11 bp

was used as a probe in gel shift assays with *in vitro* translated PU.1 or c-Jun (Fig. 3A, lanes 13-18). PU.1 binding to the full length IL-1 $\beta$  probe produced a single complex (lane 16) which was specifically supershifted with an anti-PU.1 antibody (lane 18). In contrast, *in vitro* translated c-Jun which otherwise associated with a TRE probe (data not shown) failed to bind to the full length IL-1 $\beta$  probe (lane 15). Finally, an anti-c-Jun antibody which specifically supershifted binding to a TRE probe (Fig. 2B) failed to displace any of the complexes formed on the wild type IL1 $\beta$ -NFIL6 probe (Fig. 3B, lane 7). As a control, we created an AP-1 sequence in the context of the IL1 $\beta$ -NFIL6 probe (NF-IL6/AP1, Fig. 1) and performed gel shift assays with TPA-induced TF-1 nuclear extracts. The NFIL6/AP1 probe revealed the same band shift pattern as that observed with the wild type IL1 $\beta$ -NFIL6 probe. There was, however, one additional complex which was very strong and corresponded to c-Jun binding, i.e. the new complex migrated at the same level as the complex observed with the TRE probe and was supershifted by the anti-c-Jun antibody (Fig. 3B, lane 9-11). This new complex differed in size from the C4 complex formed on the wild type IL1 $\beta$ -NFIL6 probe. In summary, we could not detect c-Jun binding to the wild type IL-1 $\beta$ -NFIL6 probe, even in TPA-induced TF-1 nuclear extracts, while gel shift assays confirmed the presence of PU.1 and NF-IL6 binding sites as shown previously.

### **Synergistic activation of IL-1 $\beta$ 131 by PU.1, NF-IL6 and c-Jun: biologic specificity for c-Jun.**

The kinetics of c-Jun and NF-IL6 induction closely correlated with the biphasic induction of IL-1 $\beta$ 131 by TPA. Since PU.1 was not induced by TPA, we addressed the possibility whether NF-IL6 and c-Jun may be acting synergistically with PU.1 in

driving transcription from IL-1 $\beta$ 131 in both hemopoietic cells (Fig. 6) and non hemopoietic cells (Figs. 4 and 5).

The high levels of endogenous PU.1 and c-Jun in TF-1 cells preclude the possibility of directly testing the hypothesis that c-Jun may collaborate with PU.1 and NF-IL6 in driving IL-1 $\beta$  transcription in TF-1 cells. We therefore chose to use the teratocarcinoma cell line F9 which is devoid of PU.1 and AP-1 DNA binding activity, and has minimal C/EBP-like activity. NF-IL6 on its own induced a 3 fold increase in luciferase activity driven by IL-1 $\beta$ 131 (data not shown) and PU.1 on its own a 3 to 4 fold increase (Fig. 4A). In the presence of PU.1, NF-IL6 induced a dose-dependent synergistic increase in PU.1 transcriptional activity with a maximum of 200 fold induction of IL-1 $\beta$ 131 (Fig. 4A). Interestingly, c-Jun in this assay further increased the synergistic effect of NF-IL6 with PU.1, resulting in 800 fold induction of IL-1 $\beta$ 131-driven luciferase activity (Fig. 4A). As with NF-IL6, the effect of c-Jun was dose-dependant in the range of 1:1000 to 1:10 of c-Jun to IL-1 $\beta$ 131 (data not shown). c-Jun can form homodimers or heterodimers with c-Fos, we therefore addressed the question whether c-Fos would further enhance the transcriptional synergy of c-Jun with PU.1 and NF-IL6 (Fig. 4B). Our results indicate that the activity of c-Jun was not enhanced by c-Fos and was even slightly reduced (Fig. 4B) suggesting that heterodimerization with c-Fos was not required. Since TPA induces both c-Jun and JunD, we directly addressed the question whether members of the Jun family are interchangeable in this transcriptional synergy with PU.1. IL-1 $\beta$ 131 was therefore co-transfected with PU.1 and several concentrations of c-Jun, JunB or JunD (Fig. 4C, data shown for the optimal concentrations of the different Jun proteins). As above, PU.1 induced a 3-4 fold increase in IL-1 $\beta$  promoter activity. Co-transfection of c-Jun resulted in a 30-40 fold increase in transcriptional activity. In contrast, JunB and JunD did not

significantly affect PU.1 transcriptional activity (Fig. 4C). Together, our results indicate that PU.1 transcriptional activity is increased by c-Jun, through a mechanism which is c-Fos-independent. In addition, this property is specific to c-Jun and was not observed with either JunB or JunD.

**PU.1 transcriptional activity in the context of IL-1 $\beta$ 131 promoter sequence requires cooperation with an endogenous source of C/EBP.**

We next determined the sequences of IL-1 $\beta$ 131 that are required for transcriptional synergy between PU.1, NF-IL6 and c-Jun. We targeted sequences that were found to be important in gel shift assays using TPA-induced TF-1 nuclear extracts, i.e. the PU.1 binding site at -47 and the NF-IL6 binding site at -91 as illustrated in Fig. 3. Results shown in Fig. 5A indicate that both the NF-IL6 (-91) and the PU.1 (-47) binding sites are essential for this tripartite cooperativity between NF-IL6, PU.1 and c-Jun. Surprisingly, mutation of the NF-IL6 (-91) binding site also affected the bipartite cooperativity between PU.1 and c-Jun (Fig. 5A), and abrogated transactivation of IL-1 $\beta$  by PU.1 on its own (Fig. 5B), suggesting that C/EBP-like activities cooperate with PU.1 in this assay. This possibility was directly tested using a dominant negative mutant of the chicken NF-M, which bears more than 90% homology to the human NF-IL6 in its basic-leucine zipper domains and can therefore prevent C/EBP-like activities in mammalian cells (40) without affecting c-Jun function at concentrations used in the present study (data not shown). As illustrated in Fig. 5C, the dominant negative NF-M abrogated PU.1 transcriptional activity on IL- $\beta$ 131 in F9 cells even at the lowest concentration. Together, our results indicate that PU.1 is a weak transcription

factor that requires synergy with NF-IL6 or C/EBP like activities and/or c-Jun for transcription activation of the IL-1 $\beta$  promoter.

### **Role of PU.1, NF-IL6 and c-Jun in driving TPA-inducible response in hemopoietic cells.**

The significance of the tripartite synergy between PU.1, NF-IL6 and c-Jun in directing TPA induction of IL-1 $\beta$ 131 in hemopoietic cells was addressed as follows. First, we determined whether PU.1 and/or NF-IL6 anchoring to DNA was required through the use of the IL-1 $\beta$ 131 mutations defined in heterologous cells (Fig. 5A) and in gel shift assays (Fig. 3). In TF-1 cells, TPA induces a 14 fold increase in IL-1 $\beta$ 131 promoter activity (Fig. 2A and 6A). Mutation of either PU.1 or NF-IL6 binding site individually nearly abrogated the induction of IL-1 $\beta$ 131 by TPA (Fig. 6A). Interestingly, despite the presence of potential upstream PU.1 binding sites at -112 and -105 (29) these did not functionally substitute for the lack of PU.1 binding at -47. In agreement with previous report (16), we found that the only functional binding site for NF-IL6 on IL-1 $\beta$ 131 is at -91. Finally, mutation of both PU.1 and NF-IL6 binding sites as shown did not further disrupt TPA inducibility (Fig. 6A). Since the same mutations abolished PU.1 and NF-IL6 DNA binding, our results strongly suggest that both PU.1 and NF-IL6 anchoring to their respective binding sites is essential for the response of the IL-1 $\beta$ 131 promoter to TPA.

Second, because of the absence of AP-1 binding to IL-1 $\beta$ 131, the importance of c-Jun for TPA induction was, therefore, directly addressed in TF-1 cells expressing a c-Jun antisense construct using the murine stem cell virus (MSCV). In control cells expressing the vector alone, TPA induced a significant increase in IL-1 $\beta$  mRNA levels (Fig. 6B and C). In c-Jun antisense transfectants, there was a significant reduction in IL-1 $\beta$  mRNA at early time points (4 and 6 h) and a complete

abrogation of IL-1 $\beta$  mRNA levels after 18 and 48 hours of TPA (Fig. 6B and C). Since PU.1 and NF-IL6 DNA binding are required for TPA response and are not affected by the c-Jun antisense, the lack of IL-1 $\beta$  mRNA in c-Jun antisense transfectants suggests the possibility of synergistic interaction between PU.1, NF-IL6 and c-Jun in regulating IL-1 $\beta$  gene expression, both under steady state conditions and in response to TPA.

### **PU.1, c-Jun and NF-IL6 interact *in vivo*.**

We next performed mammalian two-hybrid assays (Fig. 7) in order to confirm that c-Jun interacts with PU.1 and NF-IL6 *in vivo*. The full length PU.1 cDNA was cloned in-frame with the yeast GAL4-DBD and transfected in F9 cells, together with a GAL4-dependent reporter construct and expression vectors for NF-IL6 and c-Jun-AD which contains the full length c-Jun cDNA cloned in-frame with the yeast GAL4-AD. A GAL4-DBD was used as a control in these experiments and no interaction was observed with either NF-IL6 or c-Jun-AD as expected. In this assay, PU.1 by itself did not affect reporter gene expression (Fig. 7B). As expected, c-Jun-AD and PU.1 interacted generating a twelve-fold increase of the luciferase reporter gene activation as compared to the PU.1-GAL4-DBD alone at the higher concentration (300 ng) of c-Jun-AD but not at the lower concentration (30 ng). Similarly, co-expression of wild type NF-IL6 with PU.1 GAL4-DBD significantly increased reporter gene expression, suggesting that PU.1 interacts with NF-IL6 in this assay. Strikingly, the addition of c-Jun-AD to PU.1-GAL4-DBD and NF-IL6 induced a twenty two fold activation of the reporter gene, even at a lower concentration of c-Jun-AD (30 ng) which was not sufficient to produce any activation when combined to PU.1-GAL4 DBD (Fig. 7B). These results confirm that



c-Jun potentializes the synergy between PU.1 and NF-IL6 and this co-activation by c-Jun is DNA-independent.

Interestingly, the same levels of induction of PU.1 transcriptional activity by NF-IL6 and c-Jun were observed on IL-1 $\beta$ 131 in the absence of NF-IL6 binding at -91 (Fig. 5A). As illustrated in Fig. 5A, c-Jun co-activation of PU.1 bound to IL-1 $\beta$ 131 mutated at the major NF-IL6 binding site at -91 produced a 10 fold induction of PU.1-dependent promoter activity, which was increased to 20-25 fold in the presence of NF-IL6, a situation which is mimicked by the mammalian two hybrid assay (Fig. 7B), resulting in comparable increases in transcriptional activity.

#### **The N terminal domain of PU.1 is required for the synergistic activation of IL-1 $\beta$ 131 with c-Jun.**

In order to define the domains of PU.1 that are required for its synergy with c-Jun, luciferase activities were normalized to the basal level observed with PU.1 alone, which was taken as 1 (Fig. 8A). Both the N terminal and the PEST domains of PU.1 were required for its synergy with c-Jun, whereas the cooperativity with NF-IL6 required the N terminal but not the PEST domain. As a consequence, the synergy between c-Jun, PU.1 and NF-IL6 required the integrity of both domains (Fig. 8A). In addition, we also observed that the N terminal domain of NF-IL6 is essential in this complex (data not shown).

#### **The DNA binding region of c-Jun is not essential for cooperativity with PU.1.**

We finally sought to determine the regions of c-Jun that are required for this cooperativity. Data shown in Fig. 8B indicated that co-transfection of c-Jun and

PU.1 with IL-1 $\beta$ 131 resulted in a 80 fold induction of luciferase activity at the optimal concentrations of c-Jun, as observed above. Complete deletion of the N terminal transactivation domain ( $\Delta$ TD) or of the leucine zipper domain ( $\Delta$ LZ) of c-Jun required for protein-protein interaction completely abrogated the cooperation between the three transcription factors (Fig. 8B). Deletion of c-Jun basic domain ( $\Delta$ DBD) that specifies DNA binding was less drastic and the tripartite cooperativity was consistently restored at a 3:1 ratio c-Jun ( $\Delta$ DBD) to IL-1 $\beta$ 131. c-Jun has previously been shown to interact with the ETS domain of PU.1 through a short domain extending from residues 276 to 282, which is entirely conserved in our  $\Delta$ DBD mutant (3). It is therefore possible that the relatively high levels of c-Jun ( $\Delta$ DBD) required in this assay is due to a weaker association with PU.1, most likely caused by a change in protein structure. Comparable results were observed when the different c-Jun deletion mutants were tested with PU.1 in the presence of NF-IL6 (data not shown). Together, our results indicate that the leucine zipper domain and the N terminal transactivation domain of c-Jun are required for its cooperativity with PU.1, whereas the DNA binding domain is not essential, which is in agreement with the absence of AP-1 sites within IL-1 $\beta$ 131.

Since c-Jun can interact with PU.1 both *in vitro* (3;4) and *in vivo* (Fig. 7) and enhances transcription in the absence of DNA binding, we conclude that c-Jun functions as a coactivator of the PU.1/NF-IL6 complex formed on IL-1 $\beta$ 131.

## DISCUSSION

Reconstitution of the proximal IL-1 $\beta$  promoter activity in a heterologous cell type lacking AP-1 function has allowed us to define the functional cooperation between a monocyte specific transcription factor PU.1, which has a weak transactivation function, and two stress-induced transcription factors, NF-IL6 and c-Jun.

### **PU.1 as a weak transcription factor.**

PU.1 is shown here and elsewhere (29) to bind defined sequences of the proximal IL-1 $\beta$  promoter with high affinity, yet transcription activation of the proximal promoter was only four to eight fold, independently of the cell type used for transfection, HeLa cells (29) or F9 cells (the present study). Intriguingly, the NF-IL6 binding site is required for transactivation of IL-1 $\beta$ 131 by PU.1 ((29) and the present study), suggesting that NF-IL6 cooperates with PU.1. In the present study, we provide direct evidence that an endogenous source of NF-IL6-like activity is required for transcriptional activation by PU.1. Conversely, elevating the levels of NF-IL6 is sufficient to increase PU.1 transcriptional activity by 50 fold. Since NF-IL6 associates with PU.1, our observations suggest that PU.1 is a weak transcription activator that requires association with other transcription factors in a multiprotein complex for efficient activation of gene expression. Consistent with this, PU.1 has been shown to associate with AML1 through a region of the PU.1

Ets domain (41) in a complex that involves C/EBP $\alpha$ , resulting in synergistic activation of the c-fms promoter (49).

### **NF-IL6, a transcription factor with concealed activation potential.**

Despite high affinity binding to the proximal IL-1 $\beta$  promoter (73), NF-IL6 is itself a weak transcription factor, perhaps even weaker than PU.1 in the context of IL-1 $\beta$ 131. It has been proposed that the activation of NF-IL6 (or C/EBP $\beta$ ) requires proper unfolding of the transactivation domain which is normally masked by self-association with regulatory regions of the protein (30;66). It is possible that such conformational change may be induced by phosphorylation, or by interaction with other transcription factors. For example, NF-IL6 has been shown to activate the chemokine MIP1 $\alpha$  promoter in synergy with c-Ets (18) or the hyaluronan binding protein TSG-6 promoter with c-Jun (27). Consistent with these observations, we report here that the effect of PU.1 and NF-IL6 on IL-1 $\beta$ 131 is more than additive, and is further amplified through co-delivery of c-Jun.

### **c-Jun as a coactivator of PU.1.**

The synergistic effect between PU.1 and c-Jun in the absence of DNA binding may be attributed to either an indirect effect due to the squelching of an inhibitor, or upregulation of NF-IL6 or, alternatively, a direct role for c-Jun as a coactivator. A strong synergy between PU.1, c-Jun and NF-IL6 rules out the possibility of a squelching effect, as the latter should result in a linear dose-effect relationship. Furthermore, an indirect effect of c-Jun on NF-IL6 transcription would not result in

a tripartite synergy following ectopic expression of PU.1, NF-IL6 and c-Jun. In contrast to the above, several lines of evidence support a role for c-Jun as a coactivator of PU.1. First, the observed cooperativity does not require the DNA binding domain of c-Jun. Second, it occurs on the proximal IL-1 $\beta$  promoter that lacks a canonical AP-1 binding site and does not associate with *in vitro* translated c-Jun. Third, the cooperativity is reproduced in a mammalian two-hybrid assay on another promoter that lacks AP-1 sites. Fourth, this cooperation requires that PU.1 is anchored to DNA either through a PU.1 site on the IL-1 $\beta$  promoter, or through a GAL4 binding sequence for the PU.1/GAL4 fusion protein. Finally, the requirement in NF-IL6, c-Jun and PU.1 for optimal activation of IL-1 $\beta$ 131 and/or IL-1 $\beta$  mRNA accumulation is observed in hemopoietic and non hemopoietic cells. Since c-Jun and PU.1 associate *in vitro* (3;39) and *in vivo* (shown here), and since c-Jun can directly interact with the TATA binding protein TBP and TFIIB (14), the requirement in both N terminal domains of c-Jun and of PU.1 suggests that c-Jun serves to bridge DNA bound-PU.1 to the transcription initiation complex and, therefore, functions as a coactivator of PU.1.

Interestingly, the first 87 amino acids of PU.1 are dispensable for stimulating the immunoglobulin  $\kappa$  3' enhancer activity in collaboration with PIP, c-Jun and c-Fos (51), although its requirement in the generation of monocytes (13;71) remains unresolved. This region is, however, essential for the cooperation with c-Jun in driving IL-1 $\beta$ 131 transcriptional activity. In a separate study, we also document the importance of the PU.1 transactivation domain in its synergy with c-Jun in driving transcription from the c-fms promoter (4). The nature of the cooperation between PU.1 and c-Jun is also different from its cooperation with NF-IL6 in that it requires the PEST domain of PU.1. A functional importance for the PEST domain has also been observed recently, since wild type PU.1 but not a mutant lacking the PEST

domain can rescue monocyte development in an *in vitro* differentiation system for PU.1<sup>-/-</sup> embryonic stem cells (13). Together, the observations suggest that distinct PU.1 domains are required for monocyte development under steady state conditions and B cell function, or during macrophage activation induced by pro-inflammatory signals. Even in activated macrophages, different PU.1 domains are involved depending on the nature of the protein present in the transcription complex. Thus, the modular nature of PU.1 permits a high adaptability in transcription regulation, an important property for cells that are involved in immune response.

Synergism between members of the ets family, PEA3, ets-1 or ets-2, and AP-1 family was initially shown to occur on the polyoma virus enhancer (64;65). AP-1 and Ets proteins have subsequently been found to interact physically in T cells without an assessment of transcriptional activity (3). In monocytes, this interaction is probably helped by binding to adjacent cognate DNA sequences, resulting in the synergistic activation of the promoter of tissue inhibitor of metalloproteinase (34), of the scavenger receptor (2;67) or of the macrosialin gene (33). Such cooperativity is essential for the development of the R7 photo-receptor in *Drosophila* (59). We now report a novel mechanism of cooperativity between PU.1 and c-Jun that requires the transactivation properties of c-Jun but does not involve direct DNA binding. The mechanism of transcription cooperativity observed here and elsewhere (4) is more reminiscent of the mechanism of transcription repression of Ets-1 by Maf-B, a bZIP protein (58). Thus, Maf-B has been shown to interact with Ets-1 and to repress Ets-1-dependent transcription of the transferrin receptor promoter that lacks Maf-B recognition element. Recently, a region of the PU.1 ets domain has been shown to interact with NF-IL6, c-Jun, GATA-1, AML1, and HSV IE protein (41). Furthermore, GATA-1 inhibits PU.1 function by blocking

c-Jun binding to this domain (possibly by a competitive mechanism) (72) and our data raises the possibility that c-Jun and NF-IL6 could synergize with PU.1 by interacting with this same domain in the Ets region.

Interestingly, c-Jun has also been shown to associate with MyoD, a key regulator of myogenesis (5), or with the glucocorticoid receptor (54;68) in the absence of DNA binding. In both cases, however, direct interaction with c-Jun results in functional antagonism. In contrast, we provide evidence here for a strong synergistic transcription activation of IL-1 $\beta$  promoter by PU.1 and c-Jun, in which both transactivation domains play a critical role. Since PU.1 also associates with NF-IL6 *in vitro* (42) and *in vivo* ((42) and the present study), the observations reported here are consistent with the view that myeloid specific gene expression is governed not only by myeloid specific transcription factors but can also be modulated by ubiquitous and stress-induced transcription factors, resulting in an important amplification of transcriptional activity in myeloid cells in response to stress.

### **Implications for macrophage activation and inflammatory reaction.**

Resident macrophages found in different tissues and body cavities derive from peripheral monocytes that have migrated through the endothelium of blood vessels. This terminal differentiation step is accompanied by the transcription of a set of genes that are characteristic of tissue macrophages. In addition, the local context as well as cell-cell interactions can influence the expression of specific genes. As a result of traumatic injury or infection, macrophages are activated by bacterial cell surface components, antigen-antibody complexes, lymphokines, all of which induce IL-1 $\beta$  synthesis (reviewed by Dinarello (12)). In cultured monocytes

or cell lines, the stimuli that induce IL-1 $\beta$  are mimicked by TPA. Both c-Jun (11) and NF-IL6 (35) have been implicated in the mammalian stress-response. Our observations, therefore, suggest that pathological conditions that upregulate c-Jun and NF-IL6 can directly promote IL-1 $\beta$  transcription in macrophages through synergistic interaction with constitutively expressed PU.1. In rheumatoid arthritis or other inflammatory conditions, the inflammatory reaction is exacerbated as a consequence of increased IL-1 $\beta$  synthesis.

As with other hemopoietic cells, the survival of macrophages is modulated by external growth factors such as the macrophage colony stimulating factor (M-CSF) which specifically activates macrophages through binding to the M-CSF receptor or c-Fms (53). Interestingly, c-Jun is implicated in the synergistic activation of the c-fms promoter with PU.1, through a mechanism which is also independent of DNA binding (4), suggesting that other PU.1 targets may be subject to the same regulation identified here. Outcome in transcription activation may depend on the context of the promoter and the nature of the other transcription factors that are recruited into the complex, since c-Jun induced only a 7 fold increase in PU.1-dependent transcription from the c-fms promoter, whereas the magnitude of the response on the IL-1 $\beta$  promoter reported here was 40 fold over PU.1 alone and was further increased to 200 fold in the presence of NF-IL6. Together, our observations suggest that c-Jun, NF-IL6 and PU.1 establish a combinatorial code for macrophage activation in response to stress.

*Acknowledgements:* The authors wish to thank Dr Marc Therrien for critical reading of the manuscript, Dr Gerhard Behre for his help in establishing the gel shift assay and Brigitte Laforest for her technical assistance.



This work was funded by the Medical Research Council of Canada, the National Cancer Institute of Canada, with funds from the National Cancer Society and the National Institute of Health (grant CA41456). M.N. is a Senior Scientist of the Medical Research Council of Canada and T.H. a Senior Scientist of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## REFERENCES

1. **Angel, P., M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R.J. Imbra, H.J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich, and M. Karin.** 1987. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**:729-739.
2. **Angel, P. and M. Karin.** 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* **1072**:129-157.
3. **Bassuk, A.G. and J.M. Leiden.** 1995. A direct physical association between ETS and AP-1 transcription factors in normal human T cells. *Immunity* **3**:223-237.
4. **Behre, G., A.J. Whitmarsh, M. Coglán, T. Hoang, C.L. Carpenter, D.-E. Zhang, R.J. Davis, and D.G. Tenen.** 1999. c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor. *J. Biol. Chem.* **274**:4939-4946.
5. **Bengal, E., L. Ransone, R. Scharfmann, V.J. Dwarki, S.J. Tapscott, H. Weintraub, and I.M. Verma.** 1992. Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association. *Cell* **68**:507-519.
6. **Bergelson, S., U. Klingmuller, M. Socolovsky, J.G. Hsiao, and H.F. Lodish.** 1998. Tyrosine residues within the intracellular domain of the erythropoietin receptor mediate activation of AP-1 transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**:2396-2401.
7. **Buras, J.A., B.G. Monks, and M.J. Fenton.** 1994. The NF-beta A-binding element, not an overlapping NF-IL-6- binding element, is required for maximal IL-1 beta gene expression. *J. Immunol.* **152**:4444-4454.
8. **Cao, Z., R.M. Umek, and S.L. McKnight.** 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* **5**:1538-1552.
9. **Chan, J.Y., M. Kwong, R. Lu, J. Chang, B. Wang, T.S. Yen, and Y.W. Kan.** 1998. Targeted disruption of the ubiquitous CNC-bZIP transcription factor, Nrf-1, results in anemia and embryonic lethality in mice. *EMBO J.* **17**:1779-1787.

10. **Claret, F.X., M. Hibi, S. Dhut, T. Toda, and M. Karin.** 1996. A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature* **383**:453-457.
11. **Devary, Y., R.A. Gottlieb, L.F. Lau, and M. Karin.** 1991. Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol. Cell. Biol.* **11**:2804-2811.
12. **Dinareello, C.A.** 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**:2095-2147.
13. **Fisher, R.C., M.C. Olson, J.M. Pongubala, J.M. Perkel, M.L. Atchison, E.W. Scott, and M.C. Simon.** 1998. Normal myeloid development requires both the glutamine-rich transactivation domain and the PEST region of transcription factor PU.1 but not the potent acidic transactivation domain. *Mol. Cell. Biol.* **18**:4347-4357.
14. **Franklin, C.C., A.V. McCulloch, and A.S. Kraft.** 1995. In vitro association between the Jun protein family and the general transcription factors, TBP and TFIIB. *Biochem. J.* **305**:967-974.
15. **Friedman, A.D., W.H. Landschulz, and S.L. McKnight.** 1989. CCAAT/enhancer binding protein activates the promoter of the serum albumin gene in cultured hepatoma cells. *Genes Dev.* **3**:1314-1322.
16. **Godambe, S.A., D.D. Chaplin, T. Takova, and C.J. Bellone.** 1994. An NFIL-6 sequence near the transcriptional initiation site is necessary for the lipopolysaccharide induction of murine interleukin-1 beta. *DNA Cell Biol.* **13**:561-569.
17. **Godambe, S.A., D.D. Chaplin, T. Takova, L.M. Read, and C.J. Bellone.** 1995. A novel cis-acting element required for lipopolysaccharide- induced transcription of the murine interleukin-1 beta gene. *Mol. Cell. Biol.* **15**:112-119.
18. **Grove, M. and M. Plumb.** 1993. C/EBP, NF-kappa B, and c-Ets family members and transcriptional regulation of the cell-specific and inducible macrophage inflammatory protein 1 alpha immediate-early gene. *Mol. Cell. Biol.* **13**:5276-5289.
19. **Hawley, R.G., A.Z. Fong, M. Lu, and T.S. Hawley.** 1994. The Hox-11 homeobox-containing gene of human leukemia immortalizes murine hematopoietic precursors. *Oncogene* **9**:1-12.

20. **Hickstein, D.D., D.M. Baker, K.A. Gollahon, and A.L. Back.** 1992. Identification of the promoter of the myelomonocytic leukocyte integrin CD11b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**:2105-2109.
21. **Hiscott, J., J. Marois, J. Garoufalidis, M. D'Addario, A. Roulston, I. Kwan, N. Pepin, J. Lacoste, H. Nguyen, G. Bensi, and et al.** 1993. Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol. Cell. Biol.* **13**:6231-6240.
22. **Hoang, T., E. Paradis, G. Brady, F. Billia, K. Nakahara, N.N. Iscove, and I.R. Kirsch.** 1996. Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood* **87**:102-111.
23. **Hohaus, S., M.S. Petrovick, M.T. Voso, Z. Sun, D.E. Zhang, and D.G. Tenen.** 1995. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol. Cell. Biol.* **15**:5830-5845.
24. **Hunninghake, G.W., B.G. Monks, L.J. Geist, M.M. Monick, M.A. Monroy, M.F. Stinski, A.C. Webb, J.M. Dayer, P.E. Auron, and M.J. Fenton.** 1992. The functional importance of a cap site-proximal region of the human prointerleukin 1 beta gene is defined by viral protein trans-activation. *Mol. Cell. Biol.* **12**:3439-3448.
25. **Iwamoto, G.K., M.M. Monick, B.D. Clark, P.E. Auron, M.F. Stinski, and G.W. Hunninghake.** 1990. Modulation of interleukin 1 beta gene expression by the immediate early genes of human cytomegalovirus. *J. Clin. Invest.* **85**:1853-1857.
26. **Kitamura, T., T. Tange, T. Terasawa, S. Chiba, T. Kuwaki, K. Miyagawa, Y.F. Piao, K. Miyazono, A. Urabe, and F. Takaku.** 1989. Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J. Cell. Physiol.* **140**:323-334.
27. **Klampfer, L., T.H. Lee, W. Hsu, J. Vilcek, and S. Chen-Kiang.** 1994. NF-IL6 and AP-1 cooperatively modulate the activation of the TSG-6 gene by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Mol. Cell. Biol.* **14**:6561-6569.
28. **Klemsz, M.J., S.R. McKercher, A. Celada, C. Van Beveren, and R.A. Maki.** 1990. The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* **61**:113-124.

29. **Kominato, Y., D. Galson, W.R. Waterman, A.C. Webb, and P.E. Auron.** 1995. Monocyte expression of the human interleukin 1 beta gene (IL1B) is dependent on promoter sequences which bind the hematopoietic transcription factor Spi-1/PU.1. *Mol. Cell. Biol.* **15**:59-68.
30. **Kowenz-Leutz, E., G. Twamley, S. Ansieau, and A. Leutz.** 1994. Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: activation through derepression. *Genes Dev.* **8**:2781-2791.
31. **Koyama, Y., Y. Tanaka, K. Saito, M. Abe, K. Nakatsuka, I. Morimoto, P.E. Auron, and S. Eto.** 1996. Cross-linking of intercellular adhesion molecule 1 (CD54) induces AP-1 activation and IL-1beta transcription. *J. Immunol.* **157**:5097-5103.
32. **Krosi, G., G. He, M. Lefrancois, F. Charron, P.H. Roméo, P. Jolicoeur, I.R. Kirsch, M. Nemer, and T. Hoang.** 1998. Transcription factor SCL is required for c-kit expression and the rescue of hemopoietic cells from apoptosis by steel factor. *J. Exp. Med.* **188**:439-450.
33. **Li, A.C., F.R. Guidez, J.G. Collier, and C.K. Glass.** 1998. The macrosialin promoter directs high levels of transcriptional activity in macrophages dependent on combinatorial interactions between PU.1 and c-Jun. *J. Biol. Chem.* **273**:5389-5399.
34. **Logan, S.K., M.J. Garabedian, C.E. Campbell, and Z. Werb.** 1996. Synergistic transcriptional activation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter via functional interaction of AP-1 and Ets-1 transcription factors. *J. Biol. Chem.* **271**:774-782.
35. **Matsusaka, T., K. Fujikawa, Y. Nishio, N. Mukaida, K. Matsushima, T. Kishimoto, and S. Akira.** 1993. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **90**:10193-10197.
36. **McBride, K. and M. Nemer.** 1998. The C-terminal domain of c-fos is required for activation of an AP-1 site specific for jun-fos heterodimers. *Mol. Cell. Biol.* **18**:5073-5081.
37. **McKercher, S.R., B.E. Torbett, K.L. Anderson, G.W. Henkel, D.J. Vestal, H. Baribault, M. Klemsz, A.J. Feeney, G.E. Wu, C.J. Paige, and R.A. Maki.** 1996. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* **15** :5647-5658.
38. **Moreau, A., W.V. Yotov, F.H. Glorieux, and R. St-Arnaud.** 1998. Bone-specific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide-

associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription. *Mol. Cell. Biol.* **18**:1312-1321.

39. **Moulton, K.S., K. Semple, H. Wu, and C.K. Glass.** 1994. Cell-specific expression of the macrophage scavenger receptor gene is dependent on PU.1 and a composite AP-1/ets motif. *Mol. Cell. Biol.* **14**:4408-4418.
40. **Muller, C., E. Kowenz-Leutz, S. Grieser-Ade, T. Graf, and A. Leutz.** 1995. NF-M (chicken C/EBP beta) induces eosinophilic differentiation and apoptosis in a hematopoietic progenitor cell line. *EMBO J.* **14**:6127-6135.
41. **Wara-Aswapati, N., Y. Koyama, G. Behre, S. Tetradis, J. Tsukada, Y.T. Ro, D.G. Tenen, and P.E. Auron.** 1998. The wTH wing: an interaction motif mediating protein-tethered transactivation via association with a variety of transcription factors. *Blood* **92**: (Abstract).
42. **Nagulapalli, S., J.M. Pongubala, and M.L. Atchison.** 1995. Multiple proteins physically interact with PU.1. Transcriptional synergy with NF-IL6 beta (C/EBP delta, CRP3). *J. Immunol.* **155**:4330-4338.
43. **Natsuka, S., S. Akira, Y. Nishio, S. Hashimoto, T. Sugita, H. Isshiki, and T. Kishimoto.** 1992. Macrophage differentiation-specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6. *Blood* **79**:460-466.
44. **Nerlov, C. and T. Graf.** 1998. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.* **12**:2403-2412.
45. **Ness, S.A. and J.D. Engel.** 1994. Vintage reds and whites: combinatorial transcription factor utilization in hematopoietic differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**:718-724.
46. **Pahl, H.L., R.J. Scheibe, D.E. Zhang, H.M. Chen, D.L. Galson, R.A. Maki, and D.G. Tenen.** 1993. The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *J. Biol. Chem.* **268**:5014-5020.
47. **Paul, R., S. Schuetze, S.L. Kozak, C.A. Kozak, and D. Kabat.** 1991. The Sfp1-1 proviral integration site of Friend erythroleukemia encodes the ets-related transcription factor Pu.1. *J. Virol.* **65**:464-467.
48. **Pear, W.S., G.P. Nolan, M.L. Scott, and D. Baltimore.** 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**:8392-8396.
49. **Petrovick, M.S., S.W. Hiebert, A.D. Friedman, C.J. Hetherington, D.G. Tenen, and D.E. Zhang.** 1998a. Multiple functional domains of AML1: PU.1

- and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol. Cell. Biol.* **18**:3915-3925.
50. **Petrovick, M.S., S.W. Hiebert, A.D. Friedman, C.J. Hetherington, D.G. Tenen, and D.E. Zhang.** 1998b. Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol. Cell. Biol.* **18**:3915-3925.
  51. **Pongubala, J.M. and M.L. Atchison .** 1997. PU.1 can participate in an active enhancer complex without its transcriptional activation domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:127-132.
  52. **Rosmarin, A.G., D. Caprio, R. Levy, and C. Simkevich.** 1995. CD18 (beta 2 leukocyte integrin) promoter requires PU.1 transcription factor for myeloid activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:801-805.
  53. **Sacca, R., E.R. Stanley, C.J. Sherr, and C.W. Rettenmier.** 1986. Specific binding of the mononuclear phagocyte colony-stimulating factor CSF-1 to the product of the v-fms oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**:3331-3335.
  54. **Schule, R., P. Rangarajan, S. Kliwer, L.J. Ransone, J. Bolado, N. Yang, I.M. Verma, and R.M. Evans.** 1990. Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* **62**:1217-1226.
  55. **Scott, E.W., M.C. Simon, J. Anastasi, and H. Singh.** 1994. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**:1573-1577.
  56. **Shirakawa, F., K. Saito, C.A. Bonagura, D.L. Galson, M.J. Fenton, A.C. Webb, and P.E. Auron.** 1993. The human prointerleukin 1 beta gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue- specific induction. *Mol. Cell. Biol.* **13**:1332-1344.
  57. **Shivdasani, R.A. and S.H. Orkin.** 1996. The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* **87**:4025-4039.
  58. **Sieweke, M.H., H. Tekotte, J. Frampton, and T. Graf.** 1996. MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell* **85**:49-60.
  59. **Treier, M., D. Bohmann, and M. Mlodzik.** 1995. JUN cooperates with the ETS domain protein pointed to induce photoreceptor R7 fate in the *Drosophila* eye. *Cell* **83**:753-760.

60. **Tsukada, J., K. Saito, W.R. Waterman, A.C. Webb, and P.E. Auron.** 1994. Transcription factors NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 beta gene. *Mol. Cell. Biol.* **14**:7285-7297.
61. **Tsukada, J., W.R. Waterman, Y. Koyama, A.C. Webb, and P.E. Auron.** 1996. A novel STAT-like factor mediates lipopolysaccharide, interleukin 1 (IL-1), and IL-6 signaling and recognizes a gamma interferon activation site-like element in the IL1B gene. *Mol. Cell. Biol.* **16**:2183-2194.
62. **Voso, M.T., T.C. Burn, G. Wulf, B. Lim, G. Leone, and D.G. Tenen.** 1994. Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**:7932-7936.
63. **Wall, L., N. Destroismaisons, N. Delvoeye, and L.G. Guy.** 1996. CAAT/enhancer-binding proteins are involved in beta-globin gene expression and are differentially expressed in murine erythroleukemia and K562 cells. *J. Biol. Chem.* **271**:16477-16484.
64. **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**:191-193.
65. **Wasylyk, C., J.L. Imler, J. Perez-Mutul, and B. Wasylyk.** 1987. The c-Ha-ras oncogene and a tumor promoter activate the polyoma virus enhancer. *Cell* **48**:525-534.
66. **Williams, S.C., M. Baer, A.J. Dillner, and P.F. Johnson.** 1995. CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *EMBO J.* **14**:3170-3183.
67. **Wu, H., K. Moulton, A. Horvai, S. Parik, and C.K. Glass.** 1994. Combinatorial interactions between AP-1 and ets domain proteins contribute to the developmental regulation of the macrophage scavenger receptor gene. *Mol. Cell. Biol.* **14**:2129-2139.
68. **Yang-Yen, H.F., J.C. Chambard, Y.L. Sun, T. Smeal, T.J. Schmidt, J. Drouin, and M. Karin.** 1990. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* **62**:1205-1215.
69. **Zhang, D.E., K. Fujioka, C.J. Hetherington, L.H. Shapiro, H.M. Chen, A.T. Look, and D.G. Tenen.** 1994. Identification of a region which directs



the monocytic activity of the colony-stimulating factor 1 (macrophage colony-stimulating factor) receptor promoter and binds PEBP2/CBF (AML1). *Mol. Cell. Biol.* **14**:8085-8095.

70. **Zhang, D.E., C.J. Hetherington, H.M. Chen, and D.G. Tenen.** 1994. The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* **14**:373-381.
71. **Zhang, L., H. Xiao, R.A. Schultz, and R.F. Shen.** 1997. Genomic organization, chromosomal localization, and expression of the murine thromboxane synthase gene. *Genomics* **45**:519-528.
72. **Zhang, P., G. Behre, A. Iwama, J. Pan, N. Wara-aswapati, H.S. Radomska, S. Narravula, B.U. Müller, P.E. Auron, Z.J. Sun, and D.G. Tenen.** 1998. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Blood* **92**:194a.
73. **Zhang, Y. and W.N. Rom.** 1993. Regulation of the interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene by mycobacterial components and lipopolysaccharide is mediated by two nuclear factor-IL6 motifs. *Mol. Cell. Biol.* **13**:3831-3837.

## LEGENDS

FIG. 1. Diagram of the proximal IL-1 $\beta$  promoter and probes used for EMSA

(A) Diagram of the proximal IL-1 $\beta$  promoter. The following probes were used in EMSAs to map the entire IL-1 $\beta$ 131 promoter: hplIL1,-131-91: 5'-AGC TTC CAC CAA TAC TCT TTT CCC CTT TCC TTT AAC TTG AT-3'; hplIL1,-77-51: 5'-ATT CAA CAG AGA AAT TTC TCA GCC TCC-3'; hplIL1,-36-8: 5'-A AAG CTA TAA AAA CAG CGA GGG AGA AAC T-3'; hplIL1, -16+11: 5'-GG AGA AAC TGG CAG ATA CCA AAC CTC T-3' as well as the IL1 $\beta$ -PU.1 and IL1 $\beta$ -NFIL6 probes as underlined and described in B (B) Probes used in gel shift assays: IL1 $\beta$ -PU.1, sequences extending from -59 to -30 of the IL-1 $\beta$  gene; IL1 $\beta$ -NFIL6, -99 to -69; c-fms (70); carbamoyl phosphate synthetase (CPS) (63); collagenase TPA response element (TRE) (1). A near consensus AP-1 half site is shown in bold on the IL1 $\beta$ -NFIL6; the AP-1 mutation (NF-IL6/AP1) creates a consensus TGANTCA AP-1 binding site.

FIG. 2. Coordinate induction of IL-1 $\beta$  promoter activity and AP-1 and C/EBP DNA binding activities by TPA.

(A) IL-1 $\beta$  promoter activity in hemopoietic cells in response to TPA. The IL-1 $\beta$  131 luciferase reporter construct was delivered to exponentially growing hemopoietic TF-1 cells as detailed in Materials and Methods. Cells were induced with TPA (1 nM) immediately after gene delivery and harvested at the indicated times to determine luciferase activity, shown here as the ratio of enzyme activity

observed in TPA treated cells versus that observed in control cells which were maintained in standard culture medium. Transfection efficiency was normalized by co-transfection of CMV- $\beta$ gal, and Relative Light Units (RLU) were normalized on the basis of  $\beta$ -galactosidase activity determined on an aliquot of the same cell extract. Data shown are the average  $\pm$  SD of triplicate determinations and are typical of two independent experiments. (B) c-Jun, NF-IL6 and PU.1 DNA binding in hemopoietic cells. In parallel, nuclear extracts from TF-1 cells induced with TPA were prepared at the indicated times. EMSA as shown were performed with double stranded end-labelled TRE (1), CPS (63) and IL1 $\beta$ -PU.1 (29) probes (50 000 cpm) and 5  $\mu$ g of nuclear extracts. Cold double stranded competitor oligonucleotides were added at 200 fold molar excess over probe. Antibodies against Jun family members, C/EBP family members and PU.1 were added (1 $\mu$ l) as indicated (+) (lanes 10-13). Arrows on the left point to the complexes that were specifically supershifted by the antibodies. Arrows on the right point to the supershifted complexes (SS). The supershifts were performed after 12 hours of TPA treatment for c-Jun and PU.1, and after 24 hours for NF-IL6. For PU.1, the supershifted complex exhibits a large difference in migration as compared to the shifted complex (lane 10) and is shown in Fig. 3A.

FIG. 3. PU.1 preferentially binds to the IL1 $\beta$ -PU.1 probe while NF-IL6 preferentially binds to the IL1 $\beta$ -NFIL6 probe.

(A) Nuclear extracts (5  $\mu$ g) from TPA-induced TF-1 cells were incubated with double stranded end-labelled oligonucleotide probes (50 000 cpm), covering the PU.1 binding site (-47) of IL-1 $\beta$ 131 as shown in Fig. 1. The following competitors were added at a 200 fold molar excess over the concentration of labeled probe: self (lane 2), the IL1 $\beta$ -PU.1 oligonucleotide mutated at the PU.1 binding site at -47 (mPU.1, Fig. 1) (lane 3) (29), c-fms PU.1 binding site (lane 4) (69), TRE (lane 5)

(1) and CPS (lane 7) (63), containing the AP-1 and C/EBP consensus sequences, respectively. Note that the C1-C3 complexes as shown are displaced by self competition but not by mPU.1 oligonucleotides or by the TRE. The C1 complex is displaced by the CPS oligonucleotide while both C2 and C3 complexes are competed by the c-fms PU.1 binding site. Four of the faster migrating complexes formed on the IL1 $\beta$ -PU.1 probe were also specifically self-competed (Fig. 3A, lane 2). These complexes were not present in all EMSAs and may, therefore, represent PU.1 degradation products, as observed elsewhere (70). Antibodies to PU.1 [(+) 1  $\mu$ l and (++) 2  $\mu$ l] (lanes 9 and 10), to NF-IL6 (lane 11) and to c-Jun (lane 12) were added as indicated. Right arrows labelled SS point to the anti-PU.1-supershifted complex. The arrow labelled with an \* on the right of lane 12 points to the C2 complex that was disrupted by the anti-c-Jun antibody (1  $\mu$ l). The full length IL-1 $\beta$ 131 probe was incubated with 2  $\mu$ l of reticulocyte lysate containing *in vitro* translated c-Jun (lane 15) or *in vitro* translated PU.1 (lanes 16-18). 2  $\mu$ l of unprogrammed reticulocyte lysate (und.) or *in vitro* translated luciferase (luc) were used as controls (lanes 13 and 14 respectively). (B) The IL1 $\beta$ -NFIL6 probe (lanes 1-12) was incubated with 5  $\mu$ g of TPA-induced (24 hours) TF-1 nuclear extracts (5 $\mu$ g). Competitors were added at a 200 fold molar excess: self (lane 2), the IL1 $\beta$ -NFIL6 oligonucleotide mutated in the NF-IL6 binding site at -91 (mNFIL6, Fig. 1) (lane 3) and CPS (lane 4). Antibodies were added at 1  $\mu$ l where indicated (lanes 5-11). Arrows to the left of lane 1 point to four complexes that were specifically displaced by competition with the self (lane 2) and the CPS oligonucleotide (lane 4), two of which (C5 and C6) were also specifically supershifted (right arrows) with anti-NF-IL6 (1  $\mu$ l) (lane 6) but not anti-PU.1 (lane 5) or antibodies directed against other C/EBP family members (lanes 9-11). TF-1 nuclear extracts were also incubated with an NF-IL6/AP-1 probe (lane 13-15), which contains a consensus

AP-1 site (Fig. 1A), and with a TRE probe (lanes 16 and 17). Arrows on the left of lane 12 point to the same four complexes (C4 to C7) identified earlier (lane 1). The extra arrow, labelled c-Jun, points to a complex that appears only on the NFIL6/AP-1 and the TRE probes (lanes 13, 16 and 17), is self-competed (lane 14) and supershifted with an anti-c-Jun antibody (lane 15).

FIG. 4. NF-IL6 and c-Jun but not other Jun proteins cooperate with PU.1 in driving IL-1 $\beta$ 131 transcriptional activity.

(A) NF-IL6 induced a dose-dependent increase in PU.1 transcriptional activity in synergy with c-Jun. IL-1 $\beta$ 131 (1  $\mu$ g), PU.1 (1:1) and NF-IL6 at the indicated molar ratio with or without c-Jun (0.01) were transfected into F9 cells using calcium phosphate precipitation. Normalization was performed as in Fig. 2A. Data shown are the average of triplicate determinations, calculated as fold induction over that of IL-1 $\beta$ 131 alone and are typical of at least three independent experiments. (B) Where indicated, c-Jun and c-Fos were co-transfected at a ratio of 0.01 (with regards to IL-1 $\beta$ 131) in F9 cells together with PU.1 (1:1) or PU.1 and NF-IL6 (0.01:1). (C) JunB, JunD or c-Jun expression vectors were co-delivered with PU.1 and IL-1 $\beta$ 131 at a ratio of 1:1 (PU.1) or 0.3:1 (Jun) of activator to reporter construct. In Panels B and C, luciferase activities are expressed as fold induction over those observed with IL-1 $\beta$  alone, which were typically 50-60 Relative Light Units (RLU). Data shown are the average  $\pm$  SD of duplicate determinations and were typical of at least two independent experiments.

FIG. 5. PU.1 binding to DNA is necessary but not sufficient to drive transcription from IL-1 $\beta$ 131 promoter sequence: role of NF-IL6.

(A) Both NF-IL6 and PU.1 binding sites are essential for the synergistic transactivation of IL-1 $\beta$ 131 by PU.1, c-Jun and NF-IL6. The different transcription factors were co-delivered into F9 cells with IL-1 $\beta$ 131 at the following molar ratios (relative to IL-1 $\beta$ 131): 1 (PU.1), 0.01 (NF-IL6) and 0.01 (c-Jun). Cells were harvested at 40 hours post transfection and luciferase activity calculated as fold induction over IL-1 $\beta$ 131 transfected alone. (B) The same NF-IL6 and PU.1 binding sites are also essential for PU.1 transactivation of IL-1 $\beta$ 131. PU.1 was transfected into F9 cells together with IL-1 $\beta$ 131 in a ratio of 1:1. (C) PU.1 transcriptional activity in F9 cells requires a C/EBP-like activity. IL-1 $\beta$ 131 (1  $\mu$ g) was co-transfected with PU.1 at a 1:1 molar ratio through calcium phosphate precipitation. The dominant negative NF-M ( $\Delta$ 224) was co-delivered at molar ratios of 0.3 (+) or 1 (++). Assay conditions are as described in Panel A.

FIG. 6. PU.1, NF-IL6 and c-Jun are required for IL-1 $\beta$  transcription in hemopoietic cells.

(A) PU.1 and NF-IL6 binding drives IL-1 $\beta$  promoter activity induced by TPA in TF-1 cells. IL-1 $\beta$  promoter activity induced by TPA requires the integrity of the PU.1 and NF-IL6 binding sites at positions -47 and -91, respectively. Wild type or mutated IL-1 $\beta$  luciferase constructs (12  $\mu$ g) as depicted were delivered to exponentially growing TF-1 cells ( $1.5 \times 10^7$ ) as in Fig. 2A. The mutations abrogated PU.1 binding (Fig. 3A) or NF-IL6 binding (Fig. 3B), respectively, in EMSAs. Luciferase activity was determined 24 hours following TPA induction and was normalized for  $\beta$ -galactosidase activity. Results are shown as the ratio of

enzyme activity in TPA-induced cells over that of control cells maintained in the absence of TPA. (B) c-Jun is required for TPA-induction of IL-1 $\beta$  mRNA in TF-1 cells. Control cells (MSCV) and c-Jun antisense transfectants (AS c-Jun) were induced with TPA (1 nM). At the indicated times, cells were harvested for RNA extraction. For Northern blot analysis, 10  $\mu$ g of total mRNA were loaded per lane. The blots were sequentially hybridized to IL-1 $\beta$  cDNA or GAPDH (data not shown), and exposed to a PhosphorImager screen for quantitation. (C) Results are shown as the ratio of IL-1 $\beta$  levels over that of GAPDH.

FIG. 7. PU.1, c-Jun and NF-IL6 interact *in vivo* in a mammalian two-hybrid system

(A) Schematic representation of the transcriptional complex formed on the 5XUAS-tk-luc reporter construct. (B) The reporter construct (5XUAS-tk-luc) was transfected (1  $\mu$ g) into F9 cells using calcium phosphate precipitation. Where indicated, PU.1-GAL4 DBD was co-delivered at 300 ng (+) with or without c-Jun-GAL4 AD at 30 ng (+) or 300 ng (++) and wild type NF-IL6 at 300 ng. Luciferase activities are reported as fold induction calculated over that of 5XUAS transfected alone. Data shown are the average  $\pm$  SD of duplicate determinations and were typical of at least two independent experiments.

FIG. 8. Structure/function analysis of PU.1 and c-Jun. (A) The N terminal domain of PU.1 is required for co-activation by c-Jun. F9 cells were co-transfected with IL-1 $\beta$ 131 and PU.1 (or the deletants) at a 1:1 ratio. Where indicated, NF-IL6 and/or c-Jun were added at a 0.01:1 ratio. Assay conditions are as described in Fig. 5. Data shown are the average of triplicate determinations and are typical of at least two independent experiments. (B) The cooperation between PU.1 and c-

Jun requires the leucine zipper and the transactivation domain but not the DNA binding domain of c-Jun. F9 cells were co-transfected with IL-1 $\beta$ 131 and PU.1 at a 1:1 ratio. Where indicated, NF-IL6 was added at a 0.01:1 ratio. The ratio of wild type c-Jun or of the different c-Jun deletion mutants are shown relative to IL-1 $\beta$ 131. Luciferase activity was determined as in Fig. 5. Note that wild type c-Jun induces a dose-dependent synergistic transactivation of IL-1 $\beta$ 131 with PU.1, while the different c-Jun deletion mutants are inactive, except for the mutant lacking its DNA binding domain ( $\Delta$ DBD). Data shown are the average of triplicate determinations and are typical of at least two independent experiments.



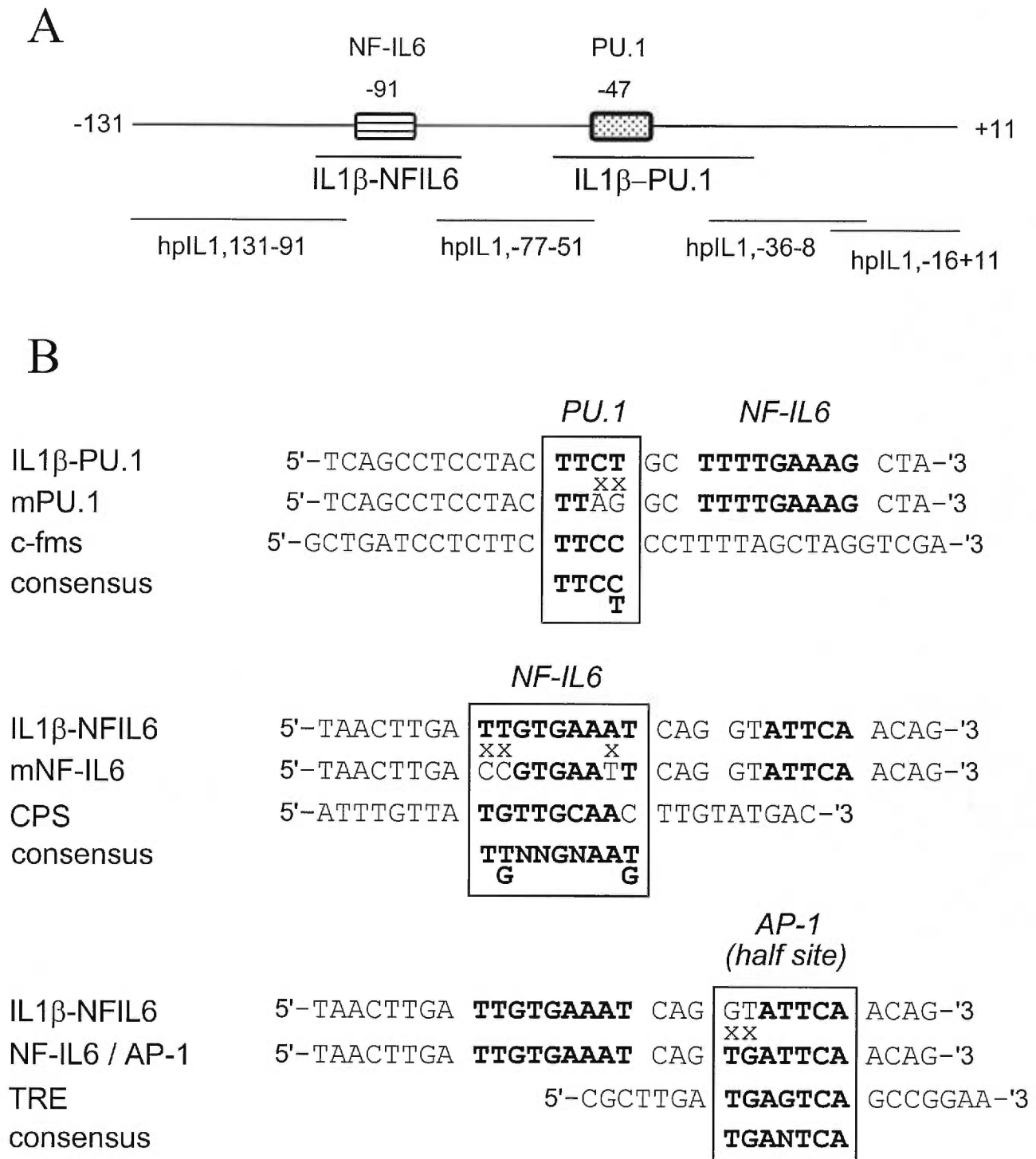


FIGURE 1

A

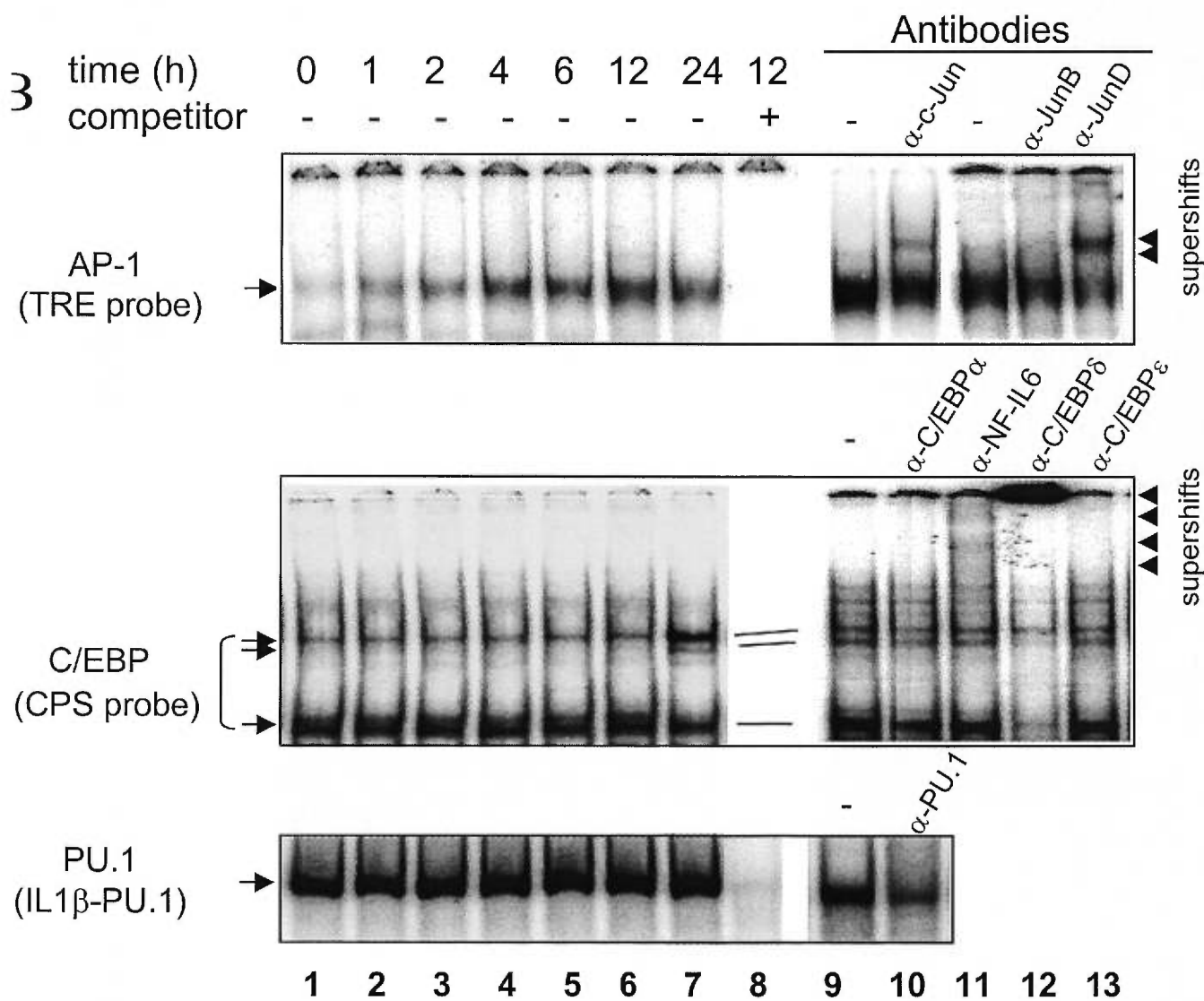
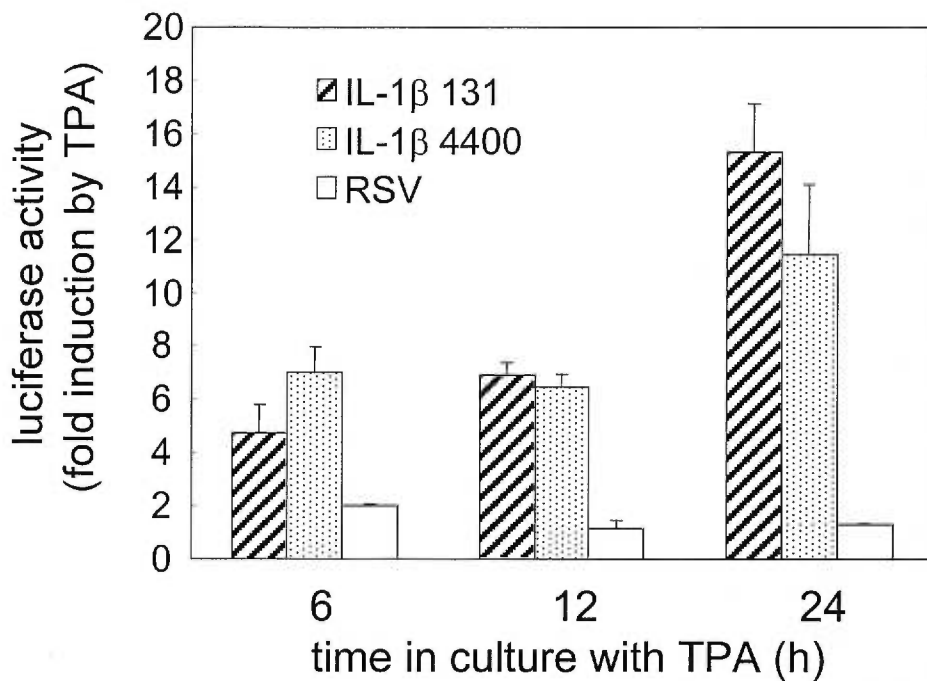


FIGURE 2

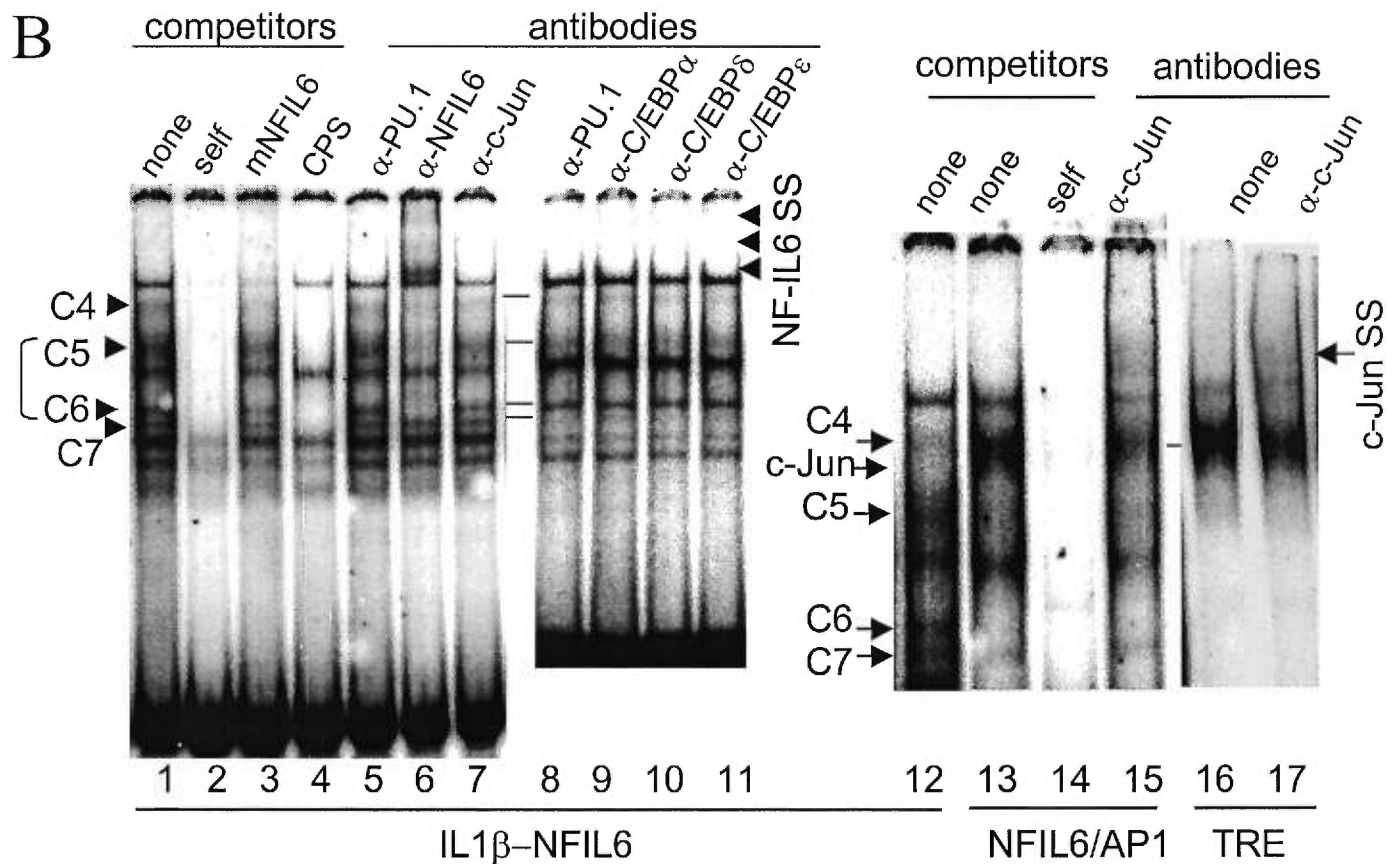
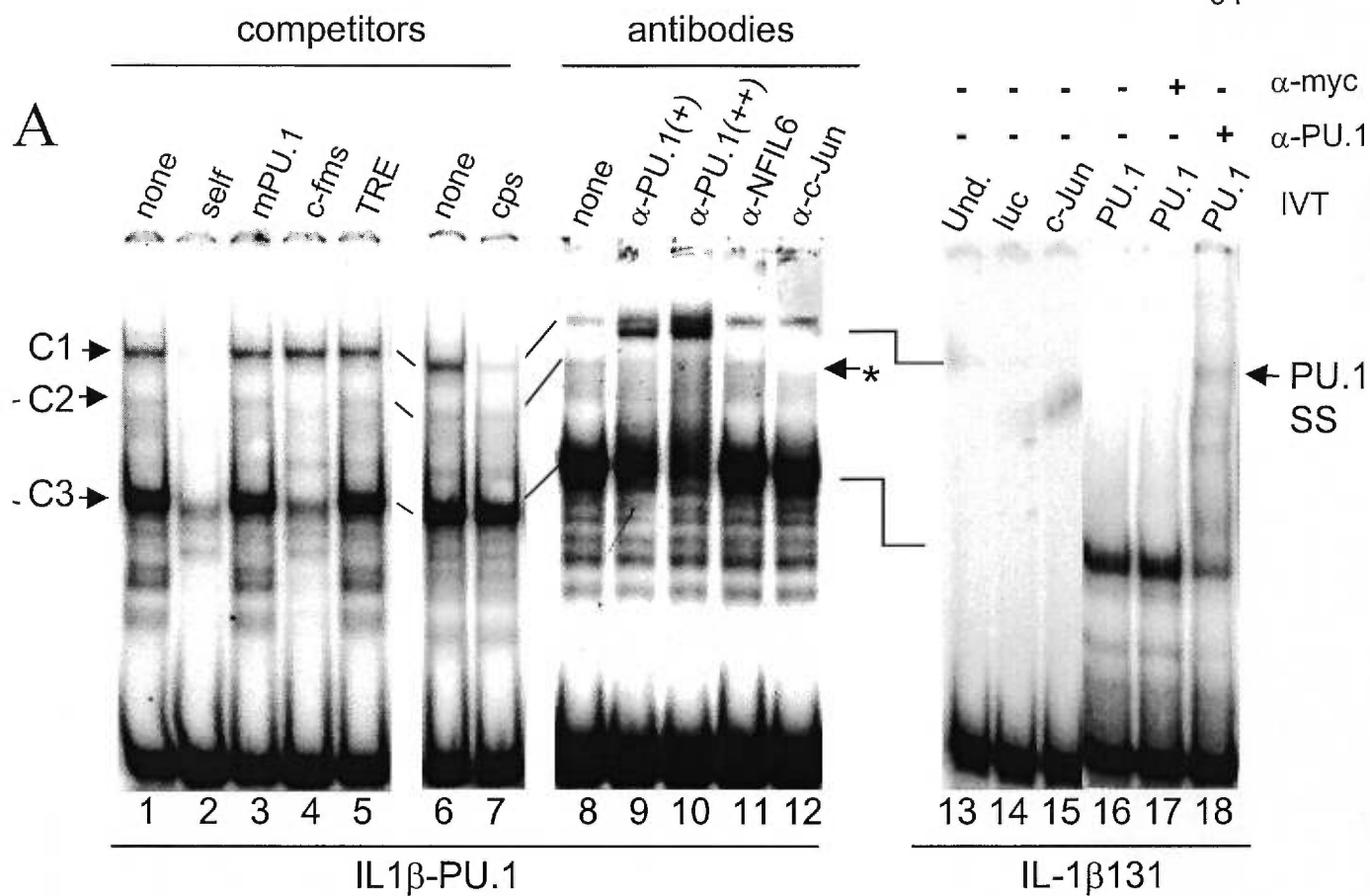
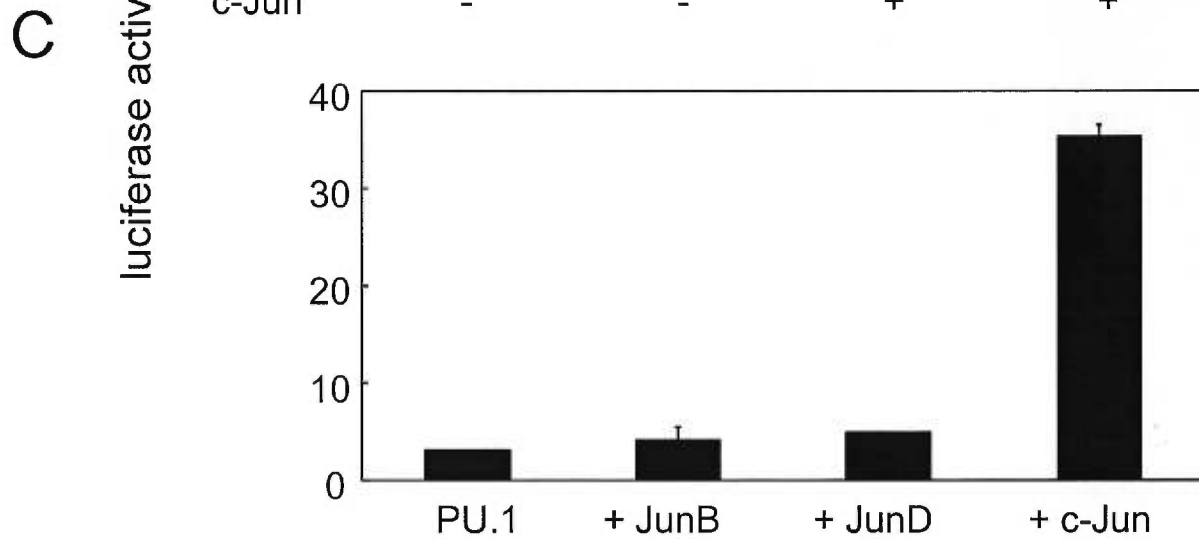
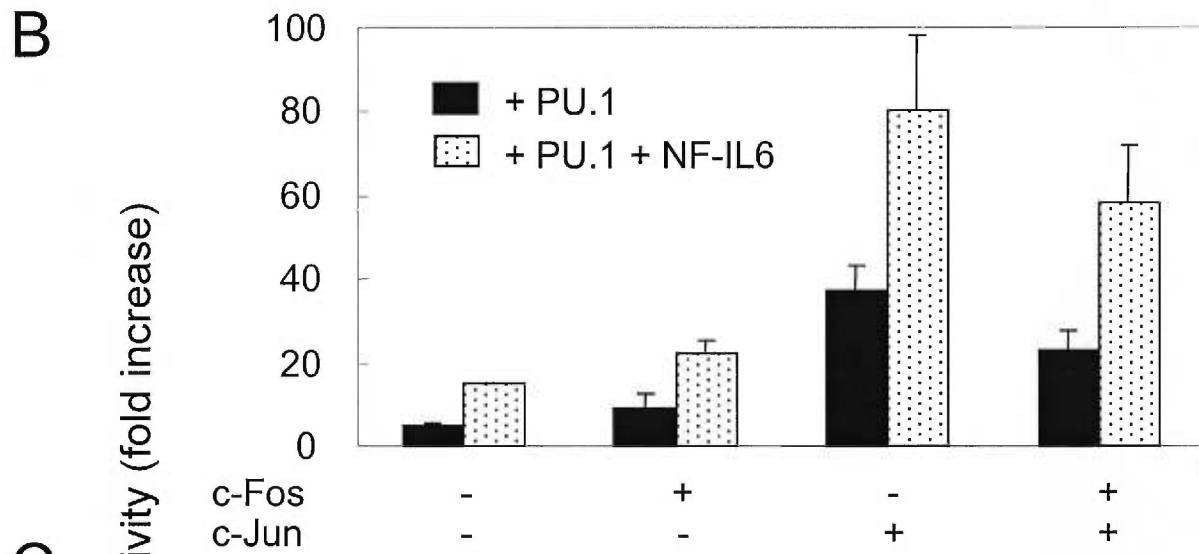
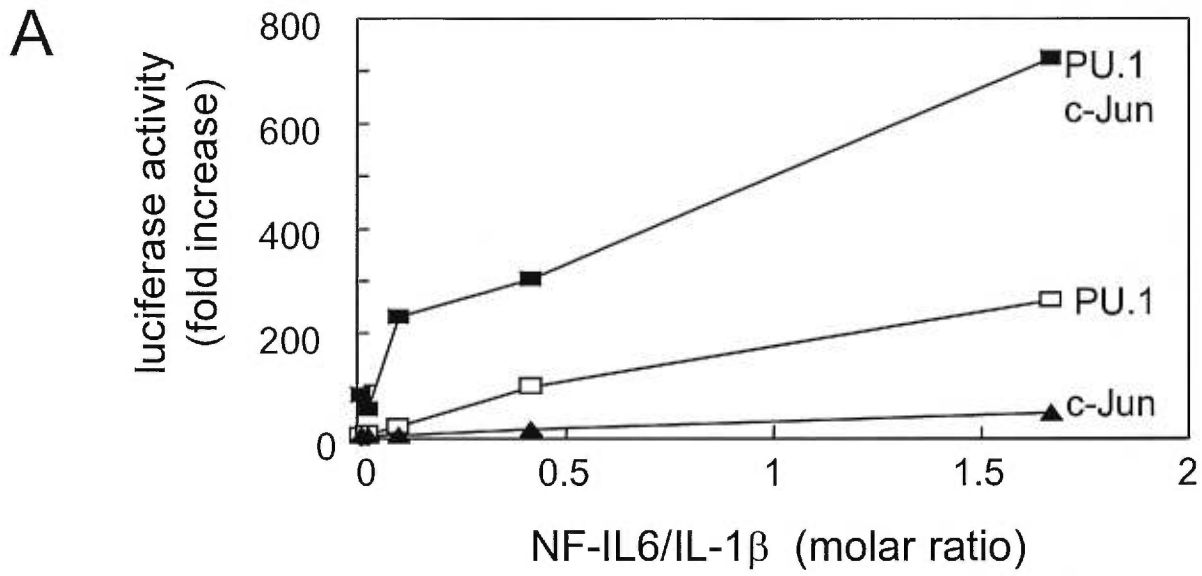
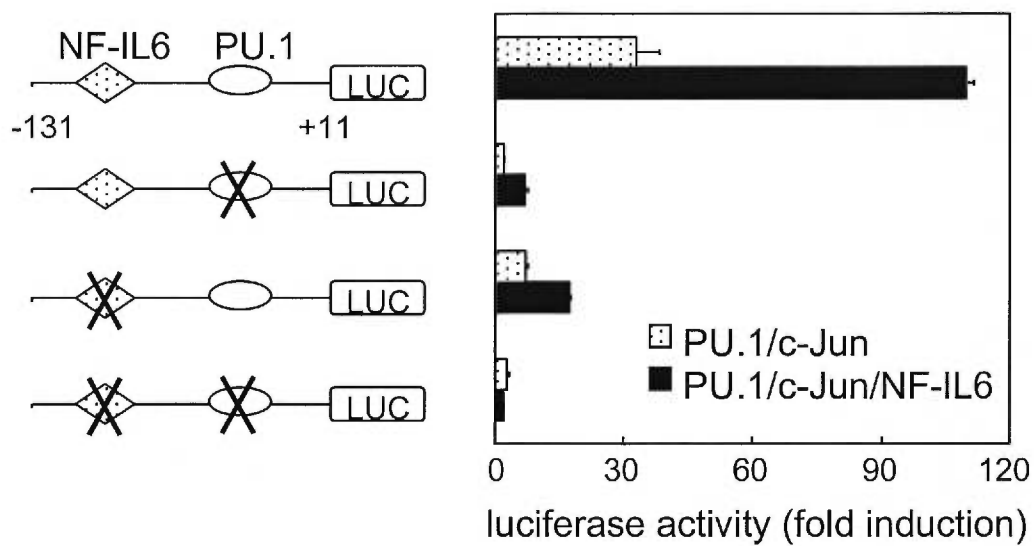


FIGURE 3

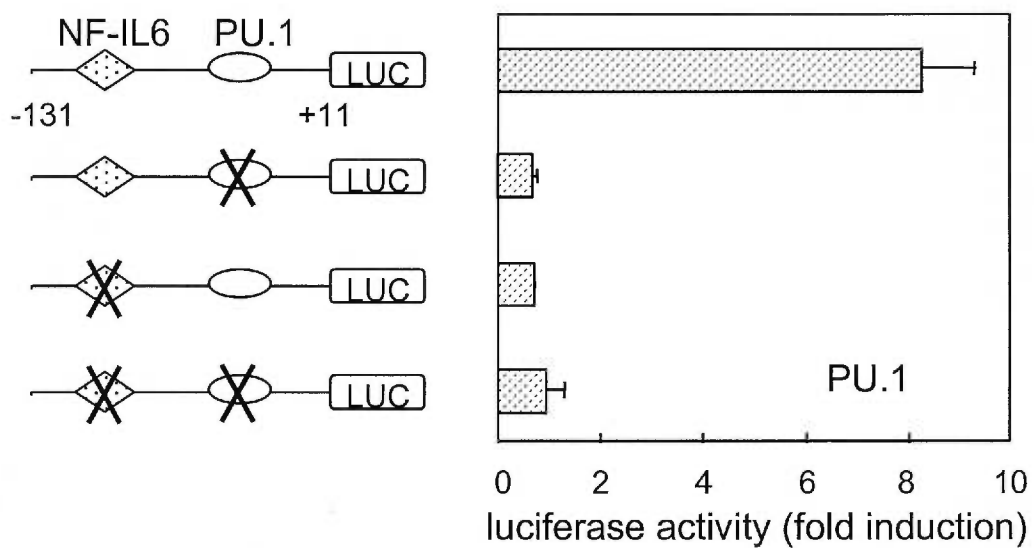


**FIGURE 4**

A



B



C

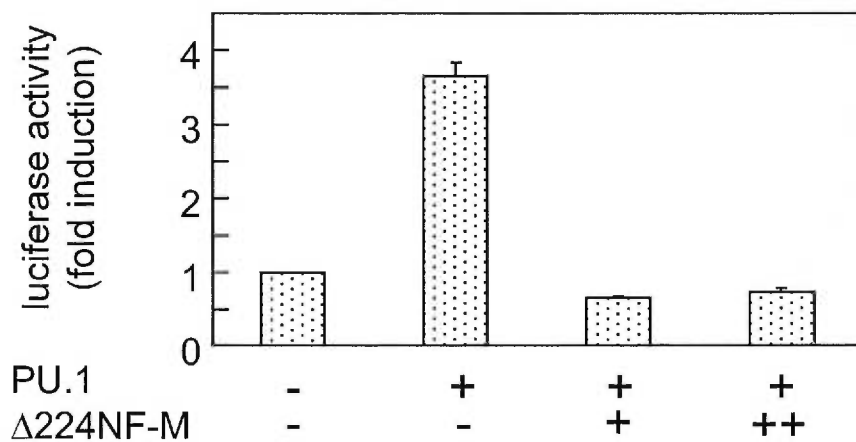


FIGURE 5

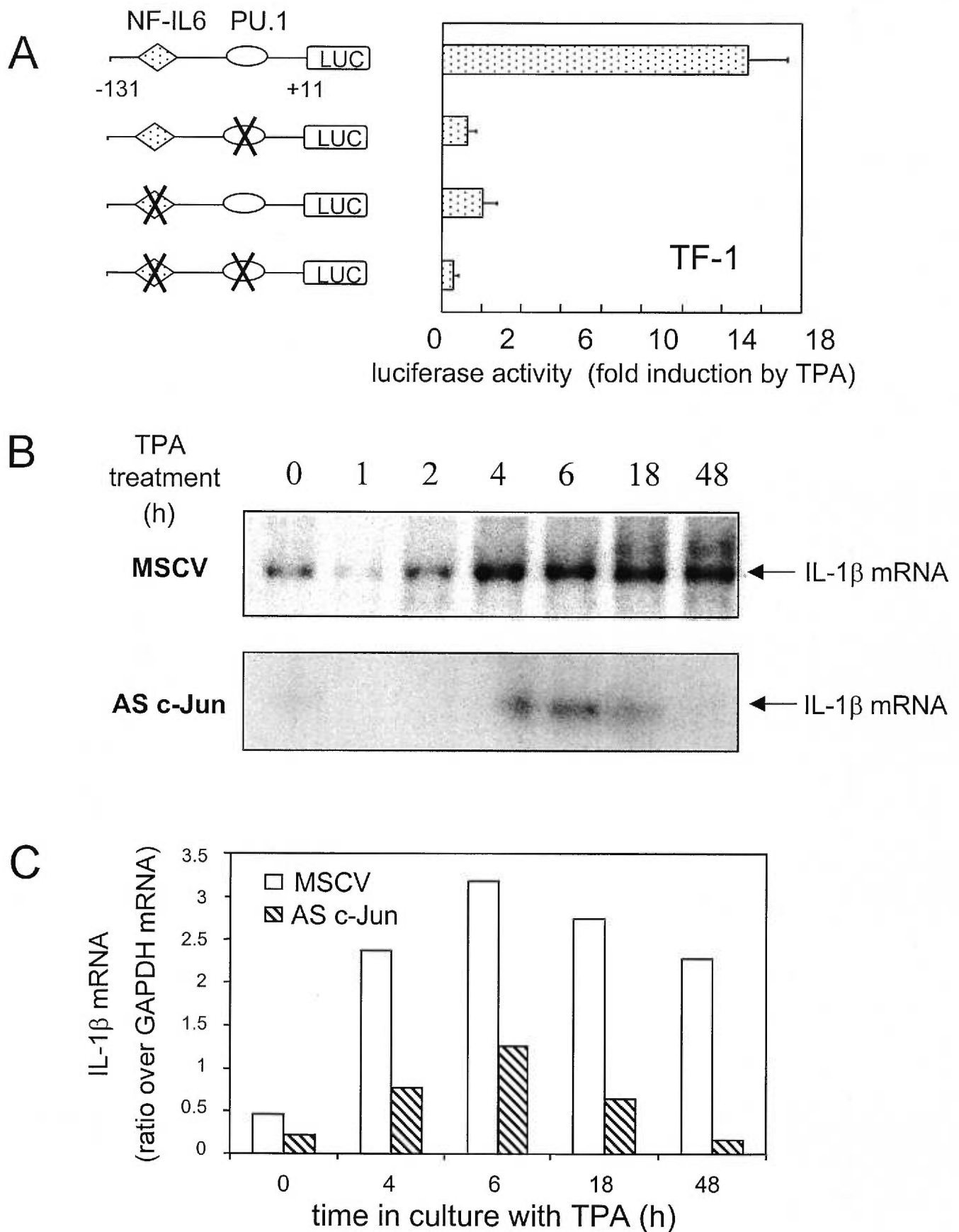
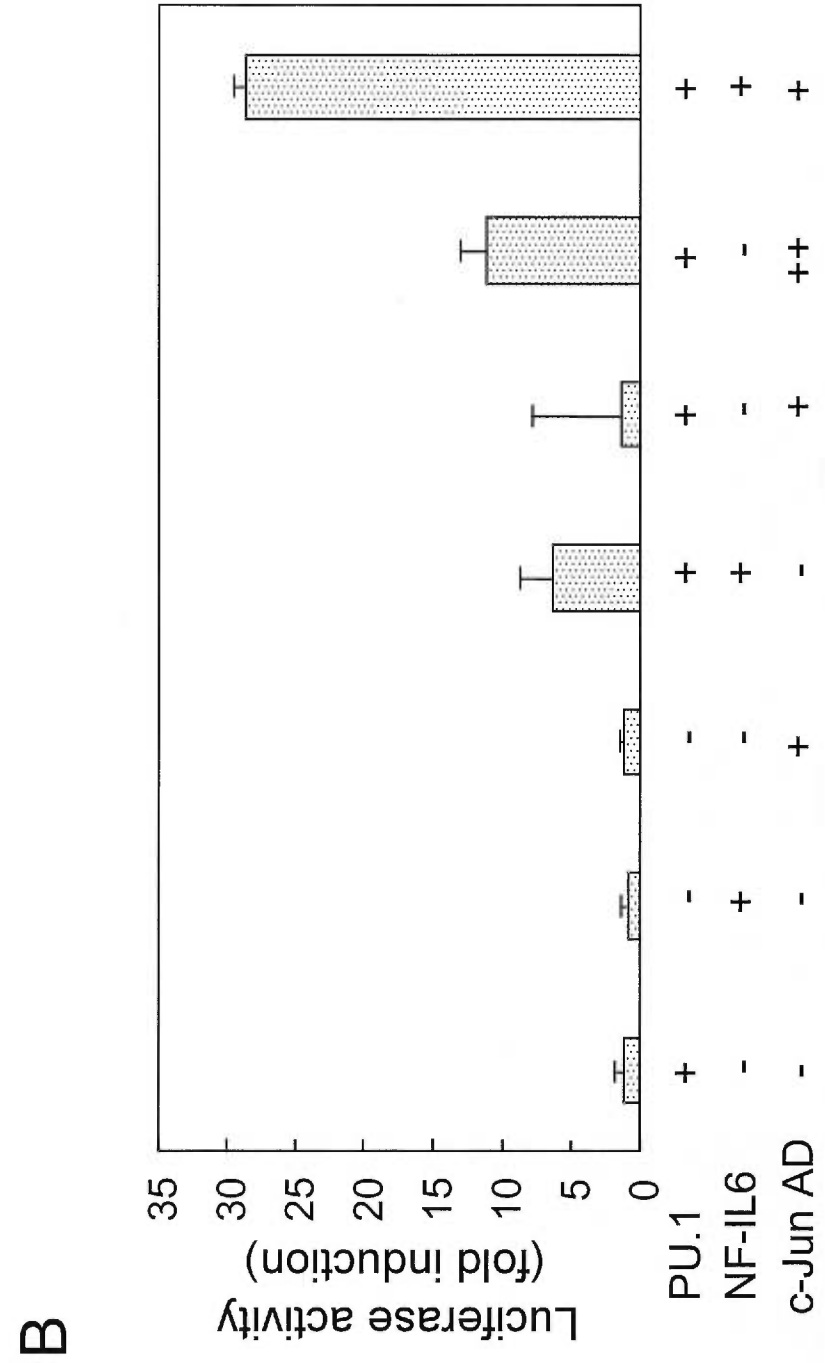
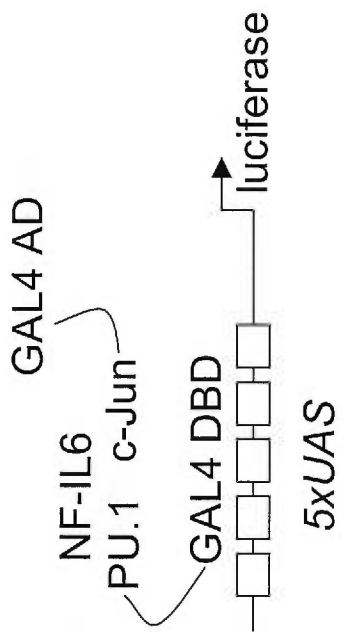


FIGURE 6



**FIGURE 7**

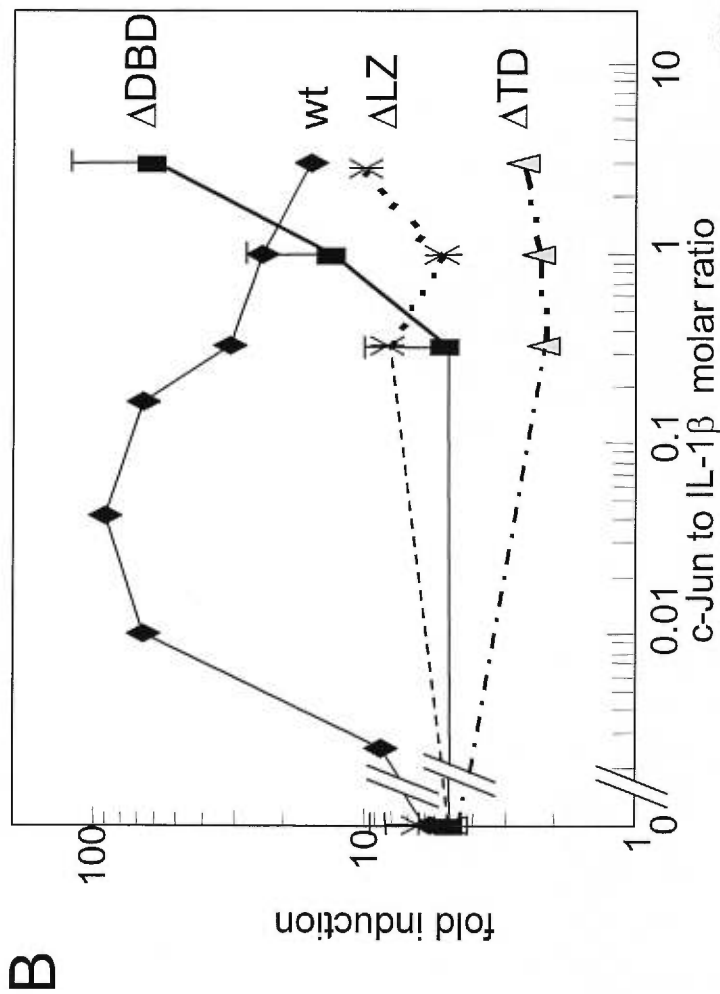
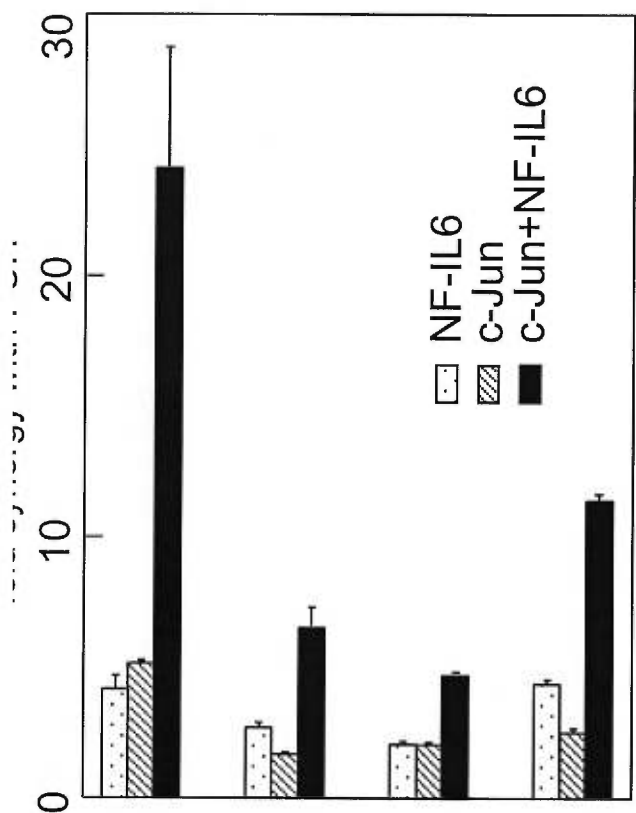


FIGURE 8



## CHAPITRE 3

### **DISCUSSION ET CONCLUSION**

La transcription des gènes est hautement régulée dans le but de conduire à une expression tissulaire et temporelle restreinte des protéines qui est adaptée à leurs fonctions dans l'organisme. Dans certaines situations, l'environnement cellulaire peut aussi exercer une influence sur la transcription de certains gènes pour en induire ou en réprimer la transcription. Il n'y a pas si longtemps, l'étude d'un promoteur donné consistait à déterminer les facteurs de transcription qui s'y liaient. L'action de ces facteurs était considérée comme directe et indépendante des autres facteurs de transcription. On considérait alors que l'addition des effets de chaque facteur de transcription seul, déterminait s'il devait y avoir transcription et avec quelle intensité le promoteur devait être activé. La réalité est en fait tout autre puisqu'il est maintenant connu que la liaison d'un facteur de transcription sur l'ADN n'est pas seulement déterminée par la séquence des paires de base avec lesquelles il interagit mais aussi par les facteurs de transcription environnants. Le réseau de protéines liées sur un promoteur provoque aussi la formation d'interfaces protéiques qui peuvent être reconnus par d'autres facteurs de transcription ADN-indépendants aussi appelés des coactivateurs. La caractérisation de complexes transcriptionnels de plus en plus imposants sur plusieurs promoteurs différents rend l'analyse concise des promoteurs de plus en plus complexe et délicate. Il devient donc important d'utiliser de courtes régions promotrices pour bien caractériser de petits complexes transcriptionnels constitués de deux ou trois joueurs. La caractérisation de ces petits complexes permet ensuite de bien évaluer leur impact au sein d'un groupe de facteurs plus complet, rencontré dans le contexte d'un promoteur entier.

Dans un tel optique, nous avons étudié la régulation transcriptionnelle du promoteur proximal de l'interleukine-1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) et démontré la présence à sa surface d'un complexe transcriptionnel fonctionnel composé des facteurs de transcription PU.1, NF-IL6 et c-Jun. PU.1 a une expression tissulaire restreinte aux monocytes/macrophages et aux lymphocytes B, alors que c-Jun est un facteur de transcription ubiquiste et inductible. Ensemble, ces facteurs de transcription

conduisent à une induction transcriptionnelle histo-spécifique de l'IL1 $\beta$  qui est même augmentée par NF-IL6, un autre facteur de transcription inductible dont l'expression hématopoïétique est aussi restreinte aux monocytes/macrophages.

Il s'agit ici de la première étude décrivant une situation dans laquelle c-Jun est capable d'activer la transcription d'un gène en agissant comme coactivateur. Nos résultats impliquent que c-Jun est un facteur clé dans l'induction de l'IL1 $\beta$  en situation d'inflammation locale et pourrait même être impliqué dans le développement de la leucémie myéloïde aiguë (LMA), une maladie à laquelle est souvent associée une accumulation d'IL1 $\beta$ .

## **1 PU.1, NF-IL6, c-Jun et l'activation transcriptionnelle de l'interleukine1 $\beta$ .**

L'utilisation de la lignée cellulaire F9 comme système hétérologue nous a permis de confirmer que c-Jun est incapable d'activer le promoteur proximal de l'IL1 $\beta$  à lui seul puisqu'il n'existe aucun site de liaison pour celui-ci dans cette région promotrice. Nous avons ensuite pu montrer, à la figure 4, qu'en présence de PU.1 et NF-IL6, des facteurs de transcription exprimés chez les macrophages, c-Jun devenait capable d'activer le promoteur de 4 à 10 fois (en comparaison avec NF-IL6 et PU.1). Par mutagenèse dirigée, nous avons aussi démontré que l'intégrité des sites NF-IL6 (-90) et PU.1 (-49) sur le promoteur IL1 $\beta$  était primordiale pour l'effet optimal de c-Jun (figure 4) ou pour l'induction à la TPA (figure 3). Il est déjà connu que ces trois facteurs de transcription sont capables d'interagir en combinaisons de deux *in vitro* (Hsu *et al.*, 1994; Bassuk et Leiden, 1995). Nous émettons donc l'hypothèse que les facteurs de transcription PU.1 et NF-IL6, en se liant au promoteur proximal de l'IL1 $\beta$ , permettent de former un site d'ancrage pour c-Jun qui vient alors interagir avec eux et agir comme coactivateur.

L'utilisation de protéines tronquées lors d'expériences de transactivation nous permet d'affirmer que les domaines de transactivation de PU.1 et c-Jun sont

requis pour l'activation maximale de la transcription (figures 7 et 8), une situation qui n'est pas sans rappeler «l'*enhanceosome*» qui a été caractérisé sur l'enhancer de l'interféron- $\beta$  (Merika *et al.*, 1998). Dans ce cas, les domaines de transactivation de tous les facteurs de transcription se liant sur le promoteur sont essentiels au recrutement de CBP, un coactivateur de la transcription. De façon intéressante, c-Jun est l'une des protéines composant «l'*enhanceosome*». Il est donc possible qu'il puisse recruter des coactivateurs comme CBP sur le promoteur proximal de l'IL1 $\beta$ . Il est à noter qu'à la différence de «l'*enhanceosome*» de l'interféron- $\beta$ , qui n'est composé que de facteurs de transcription inductibles; le complexe à trois que nous observons sur l'IL1 $\beta$  comprend le facteur de transcription PU.1 qui a une expression histo-spécifique. Puisque c-Jun doit absolument interagir avec PU.1 pour transactiver le promoteur IL1 $\beta$  proximal, il devient alors un inducteur histo-spécifique de sa transcription.

PU.1 est exprimé en grande quantité chez les macrophages. Il est reconnu à ce jour comme étant le facteur de transcription déterminant pour l'établissement de la lignée myéloïde. Il intervient dans la transcription d'une majorité de gènes spécifiquement exprimés chez les monocytes tels que la chaîne  $\alpha$  du récepteur du GM-CSF (Hohaus *et al.*, 1995), les récepteurs du M-CSF et du G-CSF (Zhang *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1996), le récepteur Mac-1 (Pahl *et al.*, 1993; Rosmarin *et al.*, 1995) ainsi que l'IL1 $\beta$  (Kominato *et al.*, 1995). Cependant, à lui seul, il est incapable de conduire à une forte activation de ses gènes cibles, se contentant d'activer leur transcription d'un ordre d'environ cinq fois. Nous croyons donc que PU.1 est un déterminant de la transcription plutôt qu'un activateur et que d'autres facteurs de transcription viennent collaborer avec lui pour activer ses gènes cibles. Nous considérons PU.1 comme l'interrupteur qui détermine si un gène peut être activé chez les monocytes/macrophages, une fonction qui est remplie par d'autres facteurs de transcription: des inducteurs transcriptionnels comme NF-IL6 et c-Jun.

Le rôle de NF-IL6 dans notre complexe est aussi très important puisque ce facteur est à la fois inductible par des conditions externes à la cellule et exprimé de façon spécifique dans l'hématopoïèse au niveau des macrophages. Il apporte donc à lui seul la notion d'induction histo-spécifique. Cependant, nous savons qu'à lui seul il n'est pas suffisant pour activer drastiquement le promoteur IL1 $\beta$  ni pour bien diriger sa transcription chez les macrophages. En effet, en transfection chez les cellules F9, son action transactivatrice est amplifiée par PU.1 (figure 4) ce qui pourrait être simplement dû à une stabilisation mutuelle de leur liaison au promoteur. Dans la même expérience, NF-IL6 est incapable de montrer une synergie appréciable avec c-Jun. Selon nous, sur le promoteur proximal IL1 $\beta$ , NF-IL6 joue un rôle de mécanisme de sûreté. C'est à dire qu'il apporte une induction histo-spécifique qui est à la fois dépendante de PU.1 et c-Jun, et nécessaire à PU.1 et c-Jun. Son rôle pourrait être de prévenir une transactivation non-souhaitable de l'IL1 $\beta$  lors d'une augmentation cellulaire de c-Jun provoquée par autre chose qu'un signal pro-inflammatoire. Dans une telle condition, il ne se formerait qu'un complexe instable composé de PU.1 et c-Jun qui ne pourrait activer le promoteur et serait vite décomposé pour favoriser l'action de c-Jun ailleurs dans la cellule, au niveau d'autres promoteurs.

L'utilisation du promoteur proximal de l'IL1 $\beta$  nous a permis de caractériser un complexe transcriptionnel tripartite composé de PU.1, NF-IL6 et c-Jun. Il serait maintenant intéressant de mesurer l'impact transcriptionnel de ce complexe sur le promoteur entier de l'IL1 $\beta$  qui s'étend des positions -4400 à +300. Dans un tel contexte, il faudrait d'abord déterminer si l'activité promotrice est toujours augmentée par c-Jun et dépendante des sites PU.1 et NF-IL6 proximaux. Nos expériences de transactivation nous ont démontré que le domaine de liaison à l'ADN de c-Jun n'est pas absolument requis à sa coopération fonctionnelle avec PU.1 et NF-IL6 (figure 7) et, par conséquent, que la liaison à l'ADN de c-Jun sur le promoteur proximal n'est pas absolument nécessaire. Cependant, ces résultats n'excluent pas la possibilité que c-Jun puisse coopérer avec PU.1 et NF-IL6

lorsqu'il est lié ailleurs sur le promoteur IL1 $\beta$ , par exemple au niveau de l'enhancer où il existe des sites consensus de liaison pour c-Jun qui sont encore mal caractérisés. c-Jun pourrait lier l'ADN à l'intérieur de l'enhancer de l'IL1 $\beta$  et, par un mécanisme de repliement de l'ADN, venir interagir avec la partie proximale du promoteur par le biais d'interactions physiques avec NF-IL6 et PU.1. Un tel mécanisme permettrait de former un nouvel interface protéique qui inclurait les autres facteurs de transcription se liant à l'enhancer et pourrait amener des coactivateurs du type de CBP.

## 2 Régulation possible d'autres gènes monocytaires.

Plusieurs gènes spécifiques à la lignée monocyttaire possèdent dans leur promoteur des combinaisons de sites PU.1 avec des sites AP-1, C/EBP ou NF-IL6. Par exemple, il est déjà connu que le promoteur du récepteur au G-CSF est activé par C/EBP $\alpha$  et PU.1 (Smith *et al.*, 1996) alors que celui du récepteur *scavenger* est activé par PU.1 et c-Jun (Moulton *et al.*, 1994). Nous pouvons donc envisager la possibilité que la coopération transcriptionnelle que nous avons caractérisée sur le promoteur de l'IL1 $\beta$  puisse être recréée, en tout ou en partie, sur d'autres promoteurs monocytaires. Au niveau des gènes impliqués dans le développement de la lignée, on peut s'attendre à ce que les composants du complexe soient différents puisque NF-IL6 n'est exprimé qu'en fin de maturation des monocytes. Cependant, C/EBP $\alpha$ , un autre membre de la famille de NF-IL6, est exprimé plus tôt durant le développement monocyttaire (Scott *et al.*, 1992; Natsuka *et al.*, 1992) et pourrait remplir la même fonction que NF-IL6 dans un éventuel complexe avec PU.1 et c-Jun. De plus, certains de nos travaux en cours indiquent que c-Jun pourrait agir comme coactivateur de PU.1 sur le promoteur de c-fms et ce sans le besoin d'un membre de la famille C/EBP (Behre *et al.*, travaux en cours). Ces observations, malgré que la plupart ne soient encore que circonstanciées, laissent planer un doute quant à la possibilité qu'un complexe

impliquant PU.1, c-Jun et un membre de la famille C/EBP soit utilisé pour la transactivation de plusieurs gènes spécifiques aux monocytes.

### 3 Régulation des mécanismes d'inflammation locale.

L'IL1 $\beta$  est une cytokine pro-inflammatoire qui est activée au niveau transcriptionnel par des stimuli externes tels que des constituants viraux ou bactériens ou encore des cytokines telles que l'IL6, l'IL8 ou l'IL1 $\beta$  elle-même (revue par Dinarello, 1996). Ces stimuli peuvent aussi être remplacés expérimentalement par un ester de phorbol, le TPA. Tel que montré à la figure 1, l'induction transcriptionnelle de l'IL1 $\beta$  est précédée par une induction des facteurs de transcription c-Jun et NF-IL6. Notre hypothèse est donc que chez des monocytes circulants, qui expriment déjà des niveaux appréciables de PU.1, un signal pro-inflammatoire déclenche une production intracellulaire de c-Jun et NF-IL6. Par la suite, NF-IL6 vient se lier au promoteur proximal de l'IL1 $\beta$  en position -90 à proximité de PU.1 qui est déjà présent sur son site en position -49. c-Jun vient ensuite former un pont entre ceux-ci pour former un complexe stable et activer fortement et rapidement la transcription du gène. Nous avons donc caractérisé un complexe à trois facteurs de transcription qui est directement impliqué dans l'intégration de signaux pro-inflammatoires. Cependant, la découverte d'un tel complexe soulève aussi plusieurs questions quant à la façon d'en réguler la fonction. En effet, il est important pour l'organisme que la situation inflammatoire ne soit pas maintenue indéfiniment. La synthèse exagérée d'IL1 $\beta$  est d'ailleurs à la base de l'arthrite rhumatoïde (Gowen *et al.*, 1983).

Lors du développement d'une réaction inflammatoire, il y aura élévation de la température corporelle ce qui déclenchera la synthèse de protéines du choc thermique (HSF). De plus, la synthèse de l'IL1 $\beta$  déclenche aussi directement la synthèse des HSFs (Freshney *et al.*, 1994). Puisqu'il existe un site fonctionnel reconnu par les HSFs sur le promoteur proximal de l'IL1 $\beta$  (Cahill *et al.*, 1996) situé

exactement entre les sites de liaison pour NF-IL6 et PU.1 (à la position -67), il serait intéressant de déterminer si la liaison d'un HSF sur ce site peut empêcher la formation du complexe à trois avec c-Jun. Dans l'affirmative, nous serions en présence d'un mécanisme moléculaire simple pouvant expliquer l'arrêt de l'induction transcriptionnelle de l'IL1 $\beta$ .

La présence de c-Jun au niveau du promoteur proximal de l'IL1 $\beta$  et son interaction avec PU.1 permet de coupler la notion de transcription histo-spécifique à celle de transcription inductible. On peut donc envisager la possibilité qu'un signal pro-inflammatoire qui serait diffusé localement au site d'inflammation et induirait la production de c-Jun par les cellules avoisinantes, ne pourrait provoquer la synthèse massive d'IL1 $\beta$  que par les macrophages car seuls ceux-ci possèdent déjà des niveaux élevés de PU.1.

#### **4 Modulation du complexe transcriptionnel.**

Une coopération à trois facteurs de transcription permet une régulation transcriptionnelle plus sensible puisqu'elle requiert d'abord la présence des trois protéines mais aussi parce que chacune d'elles peut être modulée séparément. Les résultats que nous avons obtenus montrent déjà que la présence de c-Fos peut amoindrir l'induction transcriptionnelle de l'IL-1 $\beta$  (figure 5), possiblement par la séquestration de c-Jun par c-Fos. Puisque c-Jun possède des sites de phosphorylation connus (sérines 69 et 79), il serait maintenant intéressant d'examiner si la phosphorylation de c-Jun a un impact sur le complexe à trois et, dans un tel cas, s'il est néfaste à celui-ci ou s'il permet une induction encore plus puissante du promoteur proximal IL1 $\beta$ . Il est toujours possible qu'une modification de la structure de c-Jun imposée par sa phosphorylation puisse affecter son interaction avec PU.1 et NF-IL6, ou même avec des cofacteurs phospho-dépendants. L'utilisation en transfection d'un mutant de c-Jun, dont les sérines 69



et 79 sont remplacées par des alanines, nous permettrait de répondre à cette question.

NF-IL6 n'est pas le seul membre de la famille des C/EBPs à être exprimé durant le développement monocyttaire. Quatre autres membres de la famille sont aussi exprimés soit CHOP, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\delta$  et C/EBP $\epsilon$ . C/EBP $\alpha$  est exprimé plus tôt que NF-IL6 et son expression s'éteint vers la fin de la maturation des monocytes. Il ne devrait donc pas être un régulateur de la transcription de l'IL1 $\beta$ . Par contre, C/EBP $\delta$  (NF-IL6 $\beta$ ) a un patron d'expression quasi identique à celui de NF-IL6 (Kinoshita *et al.*, 1992). De plus, un hétérodimère NF-IL6+C/EBP $\delta$  constitue un meilleur transactivateur qu'un homodimère NF-IL6 pour transactiver le promoteur de l'interleukine-6 (Kinoshita *et al.*, 1992). Il serait donc intéressant de vérifier l'effet de C/EBP $\delta$  sur le complexe PU.1/c-Jun/NF-IL6 de l'IL1 $\beta$ . C/EBP $\epsilon$ , le dernier-né de la famille, est aussi exprimé chez des lignées cellulaires myéloïdes (Chumakov *et al.*, 1997) et pourrait être un régulateur du complexe. Cependant, à ce jour très peu de choses sont connues à son sujet et il est plutôt difficile d'élaborer des hypothèses sur l'effet qu'il pourrait exercer. Il reste enfin la possibilité que CHOP (Ron et Habener, 1992), qui ne peut lier l'ADN, vienne séquestrer NF-IL6 ou que la forme tronquée de NF-IL6, qui n'a pas de domaine de transactivation (voir introduction section 5.2.4), vienne compétitionner pour le site de liaison et empêcher la formation d'un complexe actif. Il serait donc intéressant de vérifier si l'expression de ces autres C/EBPs peut abaisser la transactivation de l'IL1 $\beta$ 132 exercée par le complexe PU.1/NF-IL6/c-Jun.

Enfin, en ce qui a trait à PU.1, il lie l'ADN sous forme de monomère ce qui exclut la possibilité qu'il puisse être régulé par un partenaire direct. Cependant, nos résultats apportent une nouvelle dimension à l'analyse structure/fonction de PU.1. En effet, nous avons démontré, en employant différentes formes tronquées de PU.1, que la portion amino-terminale était essentielle à sa coopération avec c-Jun pour induire la transcription de IL-1 $\beta$ 132 (figure 8). Pourtant, cette portion de

PU.1 n'est pas essentielle au développement normal des monocytes puisque la forme tronquée de PU.1 peut rétablir le développement de cette lignée chez des cellules souches embryonnaires PU.1<sup>-/-</sup> (Fisher *et al.*, 1998). Cette même forme tronquée est aussi suffisante à la stimulation de l'enhancer de l'immunoglobuline  $\kappa$  3' en collaboration avec Pip, c-Jun et c-Fos (Pongubala *et al.*, 1997). Ces observations suggèrent que différents domaines de PU.1 soient impliqués dans le fonctionnement des lymphocytes B, la maturation des monocytes et l'inflammation. De plus, même chez les macrophages activés, il semble que les différents domaines de PU.1 aient des fonctions distinctes. En effet, nous avons démontré que le domaine PEST de PU.1 était nécessaire à sa coopération optimale avec c-Jun alors qu'il n'était pas indispensable à sa coopération avec NF-IL6 (figure 8). En résumé, il semble que la structure modulaire de PU.1 lui confère une grande capacité d'adaptation, lui permettant d'avoir des rôles biologiques diversifiés chez les lymphocytes B, dans la maturation des monocytes et dans l'inflammation.

## **5 Implication dans le développement de la leucémie myéloïde aiguë.**

En plus de son implication dans l'implantation d'une réaction inflammatoire, l'IL1 $\beta$  pourrait bien être impliqué dans des processus leucémiques. En effet, la cascade de l'IL1 $\beta$  permet la prolifération des blastes de la LMA (Griffin *et al.*, 1987; Sakai *et al.*, 1987; Hoang *et al.*, 1988; Oster *et al.*, 1989; Cozzolino *et al.*, 1989; van der Schoot *et al.*, 1989; Bradbury *et al.*, 1989; Rodriguez-Cimadevilla *et al.*, 1990; Beauchemin *et al.*, 1991; Estrov *et al.*, 1992) en plus de favoriser leur survie en retardant l'apoptose (Rodriguez *et al.*, 1996). Il est à noter que certaines conditions de stress telles que l'irradiation aux rayons ultraviolets ou gammas peuvent conduire à la fois à une induction cellulaire de c-Jun (Engelberg *et al.*, 1994) ainsi qu'à l'induction des protéases apoptotiques du type ICE (revue par

Martin et Green, 1995). Pour cette raison, nous proposons un mécanisme selon lequel, en conditions de stress, l'induction de c-Jun chez les cellules exprimant PU.1 provoquerait une importante synthèse d'IL1 $\beta$  résultant en un signal prolifératif opposé au signal pro-apoptotique généré par les protéases ICE. Ce signal prolifératif conduirait ensuite à l'accumulation des cellules plutôt qu'à leur mort par apoptose. Au niveau moléculaire, cette hypothèse est bien appuyée par des observations faites avec la protéine virale Tax. Cette protéine est encodée par le virus HTLV-1 qui peut conduire à des maladies inflammatoires. Le mécanisme d'action de la protéine Tax est d'induire la transcription de l'IL1 $\beta$  en stabilisant à la fois la liaison de NF-IL6 et de PU.1 sur le promoteur proximal (Tsukada *et al.*, 1997). On peut imaginer le même type de mécanisme dans la LMA où c-Jun agirait d'une façon similaire à Tax pour venir former le complexe à trois dont il a été question tout au long de ce travail et conduire à une transcription accrue de l'IL1 $\beta$ .

## **6 Conclusion.**

Nous avons caractérisé sur le promoteur proximal de l'IL1 $\beta$  un complexe transcriptionnel composé de trois facteurs de transcription qui sont PU.1, NF-IL6 et c-Jun. Dans ce complexe, PU.1 est le déterminant d'histo-spécificité, alors que NF-IL6 et c-Jun sont deux facteurs qui sont induits en conditions d'inflammation juste avant que ne soit transcrit l'ARNm de l'IL1 $\beta$ . Un tel complexe permet ici de coupler l'induction transcriptionnelle du gène à son expression histo-spécifique. De plus, nos travaux identifient pour la première fois c-Jun comme étant un coactivateur de la transcription.

Il devient de plus en plus évident que la régulation transcriptionnelle des gènes se fait par l'agencement précis de groupes de facteurs de transcription sur leur promoteur. Ceci permet d'obtenir une régulation serrée de l'expression génique. Nos travaux permettent d'abord une meilleure compréhension des

mécanismes régissant l'induction transcriptionnelle rapide de l'IL1 $\beta$  en condition de stress, mais soulèvent aussi d'importantes questions quant à la manière de réguler un tel complexe. En effet, la présence des facteurs de transcription NF-IL6 et c-Jun dans le complexe à trois permet d'envisager une régulation très précise du complexe qui est souhaitable et nécessaire dans le cas de la synthèse de l'IL1 $\beta$ . L'étude des mécanismes de régulation de ce complexe promet alors d'être des plus intéressante.

L'identification de c-Jun comme coactivateur transcriptionnel s'inscrit dans la nouvelle ligne de pensée selon laquelle les facteurs AP-1 (c-Jun et c-Fos) peuvent exercer des fonctions transcriptionnelles séparément autant qu'en combinaison l'un avec l'autre. D'ailleurs, ces deux façons d'agir impliquent nécessairement une régulation croisée des mécanismes d'action de c-Jun et c-Fos. Il sera maintenant intéressant de voir si c-Jun pourra aussi transactiver d'autres gènes en tant que coactivateur, et ce à l'intérieur comme à l'extérieur de l'hématopoïèse.

## **BIBLIOGRAPHIE**

Agulnick, A.D., Taira, M., Breen, J.J., Tanaka, T., Dawid, I.B., and Westphal, H. (1996). Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature* 384, 270-272.

Akira, S., Isshiki, H., Nakajima, T., Kinoshita, S., Nishio, Y., Natsuka, S., and Kishimoto, T. (1992). Regulation of expression of the interleukin 6 gene: structure and function of the transcription factor NF-IL6. [Review]. *Ciba. Found. Symp.* 167, 47-62; discussion 62-7.

Akira, S., Isshiki, H., Sugita, T., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., Nakajima, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1990). A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.* 9, 1897-1906.

Akira, S. and Kishimoto, T. (1992). IL-6 and NF-IL6 in acute-phase response and viral infection. [Review] [95 refs]. *Immunol. Rev.* 127, 25-50.

Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Jr., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N., and DePinho, R.A. (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression [see comments]. *Nature* 387, 49-55.

Andrews, N.C., Erdjument-Bromage, H., Davidson, M.B., Tempst, P., and Orkin, S.H. (1993). Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* 362, 722-728.

Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P., and Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49, 729-739.

Angel, P. and Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. [Review]. *Biochim. Biophys. Acta.* 1072, 129-157.

Bassuk, A.G. and Leiden, J.M. (1995). A direct physical association between ETS and AP-1 transcription factors in normal human T cells. *Immunity* 3, 223-237.

Beauchemin, V., Villeneuve, L., Rodriguez-Cimadevilla, J.C., Rajotte, D., Kenney, J.S., Clark, S.C., and Hoang, T. (1991). Interleukin-6 production by the blast cells of acute myeloblastic leukemia: regulation by endogenous interleukin-1 and biological implications. *J. Cell. Physiol.* 148, 353-361.

Begley, C.G., Aplan, P.D., Davey, M.P., Nakahara, K., Tchorz, K., Kurtzberg, J., Hershfield, M.S., Haynes, B.F., Cohen, D.I., Waldmann, T.A., and et al (1989).

Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2031-2035.

Begley, C.G., Aplan, P.D., Denning, S.M., Haynes, B.F., Waldmann, T.A., and Kirsch, I.R. (1989). The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10128-10132.

Behre, G., Whitmarsh A.J., Coglean M., Hoang T., Carpenter C.L., Zhang D.-E., Davis R.J., and Tenen D.G. (1999) c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor. *J. Biol. Chem.* 274:4939-4946.

Bengal, E., Ransone, L., Scharfmann, R., Dwarki, V.J., Tapscott, S.J., Weintraub, H., and Verma, I.M. (1992). Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association. *Cell* 68, 507-519.

Bensi, G., Mora, M., Raugei, G., Buonamassa, D.T., Rossini, M., and Melli, M. (1990). An inducible enhancer controls the expression of the human interleukin 1 beta gene. *Cell. Growth. Diff.* 1, 491-497.

Bergelson, S., Klingmuller U., Socolovsky M., Hsiao J.G., and Lodish H.F. (1998) Tyrosine residues within the intracellular domain of the erythropoietin receptor mediate activation of AP-1 transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273:2396-2401.

Beuscher, H.U., Gunther, C., and Rollinghoff, M. (1990). IL-1 beta is secreted by activated murine macrophages as biologically inactive precursor. *J. Immunol.* 144, 2179-2183.

Bjorklund, S. and Kim, Y.J. (1996). Mediator of transcriptional regulation [see comments]. [Review] [25 refs]. *Trends Biochem. Sci.* 21, 335-337.

Bohmann, D., Bos, T.J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P.K., and Tjian, R. (1987). Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. [Review]. *Science* 238, 1386-1392.

Bomalaski, J.S., Steiner, M.R., Simon, P.L., and Clark, M.A. (1992). IL-1 increases phospholipase A2 activity, expression of phospholipase A2-activating protein, and release of linoleic acid from the murine T helper cell line EL-4. *J. Immunol.* 148, 155-160.

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

Bradbury, D., Bowen, G., Kozlowski, R., Reilly, I., and Russell, N. (1990). Endogenous interleukin-1 can regulate the autonomous growth of the blast cells of acute myeloblastic leukemia by inducing autocrine secretion of GM-CSF. *Leukemia* 4, 44-47.

Brass, A.L., Kehrl, E., Eisenbeis, C.F., Storb, U., and Singh, H. (1996). Pip, a lymphoid-restricted IRF, contains a regulatory domain that is important for autoinhibition and ternary complex formation with the Ets factor PU.1. *Genes Dev.* 10(18), 2335-2347.

Briegel, K., Lim, K.C., Plank, C., Beug, H., Engel, J.D., and Zenke, M. (1993). Ectopic expression of a conditional GATA-2/estrogen receptor chimera arrests erythroid differentiation in a hormone-dependent manner. *Genes Dev.* 7, 1097-1109.

Brown, K.E., Guest, S.S., Smale, S.T., Hahn, K., Merckenschlager, M., and Fisher, A.G. (1997). Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell* 91, 845-854.

Buras, J.A., Monks, B.G., and Fenton, M.J. (1994). The NF-beta A-binding element, not an overlapping NF-IL-6-binding element, is required for maximal IL-1 beta gene expression. *J. Immunol.* 152, 4444-4454.

Buras, J.A., Reenstra, W.R., and Fenton, M.J. (1995). NF beta A, a factor required for maximal interleukin-1 beta gene expression is identical to the ets family member PU.1. Evidence for structural alteration following LPS activation [published erratum appears in *Mol Immunol* 1995 Oct;32(14-15):1175]. *Mol. Immunol.* 32(8), 541-554.

Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P.A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 56, 549-561.

Burk, O., Mink, S., Ringwald, M., and Klempnauer, K.H. (1993). Synergistic activation of the chicken mim-1 gene by v-myb and C/EBP transcription factors. *EMBO J.* 12, 2027-2038.

Cahill, C.M., Waterman, W.R., Xie, Y., Auron, P.E., and Calderwood, S.K. (1996). Transcriptional repression of the prointerleukin 1beta gene by heat shock factor 1. *J. Biol. Chem.* 271, 24874-24879.

Cao, Z., Umek R.M., and McKnight S.L. (1991) Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* 5:1538-1552.



Carter, D.B., Deibel, M.R., Jr., Dunn, C.J., Tomich, C.S., Laborde, A.L., Slightom, J.L., Berger, A.E., Bienkowski, M.J., Sun, F.F., McEwan, R.N., and et al (1990). Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein [see comments]. *Nature* 344, 633-638.

Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T., Cannizzaro, L.A., and et al (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256, 97-100.

Chan, J.Y., Kwong M., Lu R., Chang J., Wang B., Yen T.S., and Kan Y.W. (1998). Targeted disruption of the ubiquitous CNC-bZIP transcription factor, Nrf-1, results in anemia and embryonic lethality in mice. *EMBO J.* 17:1779-1787.

Chang, C.P., Shen, W.F., Rozenfeld, S., Lawrence, H.J., Largman, C., and Cleary, M.L. (1995). Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes Dev.* 9, 663-674.

Chen, H., Ray-Gallet, D., Zhang, P., Hetherington, C.J., Gonzalez, D.A., Zhang, D.E., Moreau-Gachelin, F., and Tenen, D.G. (1995). PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene* 11, 1549-1560.

Chen, P.L., Riley, D.J., Chen-Kiang, S., and Lee, W.H. (1996). Retinoblastoma protein directly interacts with and activates the transcription factor NF-IL6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 465-469.

Chiu, R., Boyle, W.J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T., and Karin, M. (1988). The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54, 541-552.

Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R., and Goodman, R.H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365, 855-859.

Chumakov, A.M., Grillier, I., Chumakova, E., Chih, D., Slater, J., and Koeffler, H.P. (1997). Cloning of the novel human myeloid-cell-specific C/EBP-epsilon transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1375-1386.

Claret, F.X., Hibi, M., Dhut, S., Toda, T., and Karin, M. (1996). A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature* 383, 453-457.

Clore, G.M., Bax, A., Omichinski, J.G., and Gronenborn, A.M. (1994). Localization of bound water in the solution structure of a complex of the erythroid transcription factor GATA-1 with DNA. *Structure* 2, 89-94.

Cohen, D.R. and Curran, T. (1988). *fra-1*: a serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a *fos*-related antigen. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2063-2069.

Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarutti, N., Sironi, M., Giri, J.G., Dower, S.K., Sims, J.E., and Mantovani, A. (1993). Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261, 472-475.

Combates, N.J., Kwon, P.O., Rzepka, R.W., and Cohen, D. (1997). Involvement of the transcription factor NF-IL6 in phorbol ester induction of P-glycoprotein in U937 cells. *Cell Growth Diff.* 8, 213-219.

Corral, J., Lavenir, I., Impey, H., Warren, A.J., Forster, A., Larson, T.A., Bell, S., McKenzie, A.N., King, G., and Rabbitts, T.H. (1996). An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell* 85, 853-861.

Cozzolino, F., Rubartelli, A., Aldinucci, D., Sitia, R., Torcia, M., Shaw, A., and Di Guglielmo, R. (1989). Interleukin 1 as an autocrine growth factor for acute myeloid leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2369-2373.

Cumano, A., Dieterlen-Lievre, F., and Godin, I. (1996). Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86, 907-916.

Dantonel, J.C., Murthy, K.G., Manley, J.L., and Tora, L. (1997). Transcription factor TFIIID recruits factor CPSF for formation of 3' end of mRNA. *Nature* 389, 399-402.

Darnell, J.E., Jr. (1982). Variety in the level of gene control in eucaryotic cells. *Nature* 297, 365-371.

Dear, T.N., Colledge, W.H., Carlton, M.B., Lavenir, I., Larson, T., Smith, A.J., Warren, A.J., Evans, M.J., Sofroniew, M.V., and Rabbitts, T.H. (1995). The *Hox11* gene is essential for cell survival during spleen development. *Development* 121, 2909-2915.

Deng, T. and Karin, M. (1993). JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev.* 7, 479-490.

de Revel, T., Mabondzo, A., Gras, G., Delord, B., Roques, P., Boussin, F., Neveux, Y., Bahuau, M., Fleury, H.J., and Dormont, D. (1993). In vitro infection of human macrophages with human T-cell leukemia virus type 1. *Blood* 81, 1598-1606.

Descombes, P. and Schibler, U. (1991). A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* 67, 569-579.

Devary, Y., Gottlieb, R.A., Lau, L.F., and Karin, M. (1991). Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2804-2811.

Dinarello, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. [Review]. *Blood* 87, 2095-2147.

Dinarello, C.A., Ikejima, T., Warner, S.J., Orencole, S.F., Lonnemann, G., Cannon, J.G., and Libby, P. (1987). Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J. Immunol.* 139, 1902-1910.

Doyle, G.A.R., Pierce R.A., Parks W.C. (1997). Transcriptional induction of collagenase-1 in differentiated monocyte-like (U937) cells is regulated by AP-1 and an upstream C/EBP-beta site. *J. Biol. Chem.* 272, 11840-11849.

Dripps, D.J., Verderber, E., Ng, R.K., Thompson, R.C., and Eisenberg, S.P. (1991). Interleukin-1 receptor antagonist binds to the type II interleukin-1 receptor on B cells and neutrophils. *J. Biol. Chem.* 266, 20311-20315.

Dubois, C.M., Ruscetti, F.W., Palaszynski, E.W., Falk, L.A., Oppenheim, J.J., and Keller, J.R. (1990). Transforming growth factor beta is a potent inhibitor of interleukin 1 (IL-1) receptor expression: proposed mechanism of inhibition of IL-1 action. *J. Exp. Med.* 172, 737-744.

Dynlacht, B.D., Hoey, T., and Tjian, R. (1991). Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* 66, 563-576.

Eisenbeis, C.F., Singh, H., and Storb, U. (1993). PU.1 is a component of a multiprotein complex which binds an essential site in the murine immunoglobulin lambda 2-4 enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 13(10), 6452-6461.

Eisenbeis, C.F., Singh, H., and Storb, U. (1995). Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. *Genes Dev.* 9(11), 1377-1387.

Eisenberg, S.P., Evans, R.J., Arend, W.P., Verderber, E., Brewer, M.T., Hannum, C.H., and Thompson, R.C. (1990). Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* 343, 341-346.

Engelberg, D., Klein, C., Martinetto, H., Struhl, K., and Karin, M. (1994). The UV response involving the Ras signaling pathway and AP-1 transcription factors is conserved between yeast and mammals. *Cell* 77, 381-390.

Estrov, Z., Kurzrock, R., Estey, E., Wetzler, M., Ferrajoli, A., Harris, D., Blake, M., Gutterman, J.U., and Talpaz, M. (1992). Inhibition of acute myelogenous leukemia blast proliferation by interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist and soluble IL-1 receptors. *Blood* 79, 1938-1945.

Feaver, W.J., Gileadi, O., Li, Y., and Kornberg, R.D. (1991). CTD kinase associated with yeast RNA polymerase II initiation factor b. *Cell* 67, 1223-1230.

Fisher, R.C., Olson, M.C., Pongubala, J.M., Perkel, J.M., Atchison, M.L., Scott, E.W., and Simon, M.C. (1998). Normal myeloid development requires both the glutamine-rich transactivation domain and the PEST region of transcription factor PU.1 but not the potent acidic transactivation domain. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4347-4357.

Fisher, R.J., Mavrothalassitis, G., Kondoh, A., and Papas, T.S. (1991). High-affinity DNA-protein interactions of the cellular ETS1 protein: the determination of the ETS binding motif. *Oncogene* 6, 2249-2254.

Franklin, C.C., McCulloch A.V., and Kraft A.S. (1995). In vitro association between the Jun protein family and the general transcription factors, TBP and TFIIB. *Biochem. J.* 305:967-974.

Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., and Saklatvala, J. (1994). Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 78, 1039-1049.

Friedman, A.D., Landschulz W.H., and McKnight S.L. 1989. CCAAT/enhancer binding protein activates the promoter of the serum albumin gene in cultured hepatoma cells. *Genes Dev.* 3:1314-1322.

Fryer, C.J. and Archer, T.K. (1998). Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature* 393, 88-91.

Gabrielsen, O.S., Sentenac, A., and Fromageot, P. (1991). Specific DNA binding by c-Myb: evidence for a double helix-turn-helix-related motif. *Science* 253, 1140-1143.

Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J.H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79, 143-156.

Ghoda, L., Sidney, D., Macrae, M., and Coffino, P. (1992). Structural elements of ornithine decarboxylase required for intracellular degradation and polyamine-dependent regulation. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2178-2185.

Godambe, S.A., Chaplin D.D., Takova T., and Bellone C.J. (1994). An NFIL-6 sequence near the transcriptional initiation site is necessary for the lipopolysaccharide induction of murine interleukin-1 beta. *DNA Cell Biol.* 13:561-569.

Godambe, S.A., Chaplin, D.D., Takova, T., Read, L.M., and Bellone, C.J. (1995). A novel cis-acting element required for lipopolysaccharide-induced transcription of the murine interleukin-1 beta gene. *Mol. Cell. Biol.* 15, 112-119.

Goebel, M.K. (1990). The PU.1 transcription factor is the product of the putative oncogene Spi-1 [comment]. *Cell* 61, 1165-1166.

Gould, A. (1997). Functions of mammalian Polycomb group and trithorax group related genes. [Review] [61 refs]. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 7, 488-494.

Gowen, M., Wood, D.D., Ihrie, E.J., McGuire, M.K., and Russell, R.G. (1983). An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature* 306, 378-380.

Gray, J.G., Chandra, G., Clay, W.C., Stinnett, S.W., Haneline, S.A., Lorenz, J.J., Patel, I.R., Wisely, G.B., Furdon, P.J., Taylor, J.D., and et al (1993). A CRE/ATF-like site in the upstream regulatory sequence of the human interleukin 1 beta gene is necessary for induction in U937 and THP-1 monocytic cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6678-6689.

Grepin, C., Robitaille, L., Antakly, T., and Nemer, M. (1995). Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4095-4102.

Grove, M. and Plumb M. (1993). C/EBP, NF-kappa B, and c-Ets family members and transcriptional regulation of the cell-specific and inducible macrophage inflammatory protein 1 alpha immediate-early gene. *Mol. Cell. Biol.* 13:5276-5289.

Griffin, J.D., Rambaldi, A., Vellenga, E., Young, D.C., Ostapovicz, D., and Cannistra, S.A. (1987). Secretion of interleukin-1 by acute myeloblastic leukemia cells in vitro induces endothelial cells to secrete colony stimulating factors. *Blood* 70, 1218-1221.

Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. [Review] [75 refs]. *Nature* 389, 349-352.

Gu, Y., Wu, J., Faucheu, C., Lalanne, J.L., Diu, A., Livingston, D.J., and Su, M.S. (1995). Interleukin-1 beta converting enzyme requires oligomerization for activity of processed forms in vivo. *EMBO J.* 14, 1923-1931.

Hagemeier, C., Bannister, A.J., Cook, A., and Kouzarides, T. (1993). The activation domain of transcription factor PU.1 binds the retinoblastoma (RB) protein and the transcription factor TFIID in vitro: RB shows sequence similarity to TFIID and TFIIB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1580-1584.

Hagmeyer, B.M., Konig, H., Herr, I., Offringa, R., Zantema, A., van der Eb, A., Herrlich, P., and Angel, P. (1993). Adenovirus E1A negatively and positively modulates transcription of AP-1 dependent genes by dimer-specific regulation of the DNA binding and transactivation activities of Jun. *EMBO J.* 12, 3559-3572.

Hai, T. and Curran, T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3720-3724.

Hannum, C.H., Wilcox, C.J., Arend, W.P., Joslin, F.G., Dripps, D.J., Heimdal, P.L., Armes, L.G., Sommer, A., Eisenberg, S.P., and Thompson, R.C. (1990). Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 343, 336-340.

Hardy, S., Kong, Y., and Konieczny, S.F. (1993). Fibroblast growth factor inhibits MRF4 activity independently of the phosphorylation status of a conserved threonine residue within the DNA-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5943-5956.

Hargrove, J.L., Scoble, H.A., Mathews, W.R., Baumstark, B.R., and Biemann, K. (1989). The structure of tyrosine aminotransferase. Evidence for domains involved in catalysis and enzyme turnover. *J. Biol. Chem.* 264, 45-53.

Hauser, C., Saurat, J.H., Schmitt, A., Jaunin, F., and Dayer, J.M. (1986). Interleukin 1 is present in normal human epidermis. *J. Immunol.* *136*, 3317-3323.

Hawley, R.G., Fong A.Z., Lu M., and Hawley T.S. (1994). The Hox-11 homeobox-containing gene of human leukemia immortalizes murine hematopoietic precursors. *Oncogene* *9*:1-12.

Helgason, C.D., Sauvageau, G., Lawrence, H.J., Largman, C., and Humphries, R.K. (1996). Overexpression of HOXB4 enhances the hematopoietic potential of embryonic stem cells differentiated in vitro. *Blood* *87*, 2740-2749.

Hess, J.L., Yu, B.D., Li, B., Hanson, R., and Korsmeyer, S.J. (1997). Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood* *90*, 1799-1806.

Heydemann, A., Juang, G., Hennessy, K., Parmacek, M.S., and Simon, M.C. (1996). The myeloid-cell-specific c-fes promoter is regulated by Sp1, PU.1, and a novel transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 1676-1686.

Hickstein, D.D., Baker, D.M., Gollahon, K.A., and Back, A.L. (1992). Identification of the promoter of the myelomonocytic leukocyte integrin CD11b. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 2105-2109.

Hirai, S.I., Ryseck, R.P., Mehta, F., Bravo, R., and Yaniv, M. (1989). Characterization of junD: a new member of the jun proto-oncogene family. *EMBO J.* *8*, 1433-1439.

Hiscott, J., Marois, J., Garoufalidis, J., D'Addario, M., Roulston, A., Kwan, I., Pepin, N., Lacoste, J., Nguyen, H., Bensi, G., and et al (1993). Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 6231-6240.

Hoang, T., Haman, A., Goncalves, O., Letendre, F., Mathieu, M., Wong, G.G., and Clark, S.C. (1988). Interleukin 1 enhances growth factor-dependent proliferation of the clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia and of normal human primitive hemopoietic precursors. *J. Exp. Med.* *168*, 463-474.

Hoang, T., Paradis, E., Brady, G., Billia, F., Nakahara, K., Iscove, N.N., and Kirsch, I.R. (1996). Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood* *87*, 102-111.

Hoeck, W. and Groner, B. (1990). Hormone-dependent phosphorylation of the glucocorticoid receptor occurs mainly in the amino-terminal transactivation domain. *J. Biol. Chem.* *265*, 5403-5408.



Hohaus, S., Petrovick, M.S., Voso, M.T., Sun, Z., Zhang, D.E., and Tenen, D.G. (1995). PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 5830-5845.

Horvai, A., Palinski, W., Wu, H., Moulton, K.S., Kalla, K., Glass, C.K. (1995). Scavenger receptor A gene regulatory elements target gene expression to macrophages and to foam cells of atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *92*, 5391-5395.

Hsu, W. and Chen-Kiang, S. (1993). Convergent regulation of NF-IL6 and Oct-1 synthesis by interleukin-6 and retinoic acid signaling in embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 2515-2523.

Hsu, W., Kerppola, T.K., Chen, P.L., Curran, T., and Chen-Kiang, S. (1994). Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 268-276.

Hunninghake, G.W., Monks, B.G., Geist, L.J., Monick, M.M., Monroy, M.A., Stinski, M.F., Webb, A.C., Dayer, J.M., Auron, P.E., and Fenton, M.J. (1992). The functional importance of a cap site-proximal region of the human prointerleukin 1 beta gene is defined by viral protein trans-activation. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 3439-3448.

Ihle, J.N. and Kerr, I.M. (1995). Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. [Review] [67 refs]. *Trends Genet.* *11*, 69-74.

Imhof, A., Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., Wolffe, A.P., and Ge, H. (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. [Review] [25 refs]. *Curr. Biol.* *7*, 689-692.

Issekutz, A.C. and Issekutz, T.B. (1992). The contribution of LFA-1 (CD11a/CD18) and MAC-1 (CD11b/CD18) to the in vivo migration of polymorphonuclear leucocytes to inflammatory reactions in the rat. *Immunology* *76*, 655-661.

Isshiki, H., Akira, S., Tanabe, O., Nakajima, T., Shimamoto, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1990). Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 2757-2764.

Iwamoto, G.K., Monick, M.M., Clark, B.D., Auron, P.E., Stinski, M.F., and Hunninghake, G.W. (1990). Modulation of interleukin 1 beta gene expression by the immediate early genes of human cytomegalovirus. *J. Clin. Invest.* *85*, 1853-1857.



Johnson, G.R. and Moore, M.A. (1975). Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. *Nature* 258, 726-728.

Kallianpur, A.R., Jordan, J.E., Brandt, S.J. (1994). The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood* 83, 1200-1208.

Kao, C.C., Lieberman, P.M., Schmidt, M.C., Zhou, Q., Pei, R., and Berk, A.J. (1990). Cloning of a transcriptionally active human TATA binding factor. *Science* 248, 1646-1650.

Karim, F.D., Urness, L.D., Thummel, C.S., Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Celada, A., van Beveren, C., Maki, R.A., Gunther, C.V., Nye, J.A., and et al (1990). The ETS-domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence [letter]. *Genes Dev.* 4, 1451-1453.

Kass, S.U., Pruss, D., and Wolffe, A.P. (1997). How does DNA methylation repress transcription?. [Review] [55 refs]. *Trends Genet.* 13, 444-449.

Kerppola, T.K. and Curran, T. (1993). Selective DNA bending by a variety of bZIP proteins. *Molr. Cell. Biol.* 13, 5479-5489.

Kinoshita, S., Akira, S., and Kishimoto, T. (1992). A member of the C/EBP family, NF-IL6 beta, forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1473-1476.

Kitamura, T., Sato, N., Arai, K., and Miyajima, A. (1991). Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors. *Cell* 66, 1165-1174.

Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y.F., Miyazono, K., Urabe, A., and Takaku, F. (1989). Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J. Cell. Physiol.* 140, 323-334.

Klampfer, L., Chen-Kiang, S., and Vilcek, J. (1995). Activation of the TSG-6 gene by NF-IL6 requires two adjacent NF-IL6 binding sites. *J. Biol. Chem.* 270, 3677-3682.

Klampfer, L., Lee, T.H., Hsu, W., Vilcek, J., and Chen-Kiang, S. (1994). NF-IL6 and AP-1 cooperatively modulate the activation of the TSG-6 gene by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6561-6569.

Klemsz, M.J. and Maki, R.A. (1996). Activation of transcription by PU.1 requires both acidic and glutamine domains. *Mol. Cell. Biol.* 16, 390-397.

Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Celada, A., van Beveren, C., and Maki, R.A. (1990). The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene [see comments]. *Cell* 61, 113-124.

Kobierski, L.A., Chu, H.M., Tan, Y., and Comb, M.J. (1991). cAMP-dependent regulation of proenkephalin by JunD and JunB: positive and negative effects of AP-1 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10222-10226.

Kodandapani, R., Pio, F., Ni, C.Z., Piccialli, G., Klemsz, M., McKercher, S., Maki, R.A., and Ely, K.R. (1996). A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS-domain-DNA complex. *Nature* 380, 456-460.

Kominato, Y., Galson, D., Waterman, W.R., Webb, A.C., and Auron, P.E. (1995). Monocyte expression of the human prointerleukin 1 beta gene (IL1B) is dependent on promoter sequences which bind the hematopoietic transcription factor Spi-1/PU.1. *Mol. Cell. Biol.* 15, 59-68.

Kowenz-Leutz, E., Twamley G., Ansieau S., and Leutz A. (1994). Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: activation through derepression. *Genes Dev.* 8:2781-2791.

Koyama, Y., Tanaka Y., Saito K., Abe M., Nakatsuka K., Morimoto I., Auron P.E., and Eto S. (1996). Cross-linking of intercellular adhesion molecule 1 (CD54) induces AP-1 activation and IL-1beta transcription. *J. Immunol.* 157:5097-5103.

Krosi, G., He, G., Lefrancois, M., Charron, F., Romeo, P.H., Jolicoeur, P., Kirsch, I.R., Nemer, M., and Hoang, T. (1998). Transcription factor SCL is required for c-kit expression and c-Kit function in hemopoietic cells. *J. Exp. Med.* 188, 439-450.

Kunz, D., Muhl, H., Walker, G., and Pfeilschifter, J. (1994). Two distinct signaling pathways trigger the expression of inducible nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5387-5391.

Laherty, C.D., Yang, W.M., Sun, J.M., Davie, J.R., Seto, E., and Eisenman, R.N. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 89, 349-356.

Landschulz, W.H., Johnson, P.F., and McKnight, S.L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759-1764.

Larson, R.C., Lavenir, I., Larson, T.A., Baer, R., Warren, A.J., Wadman, I., Nottage, K., and Rabbitts, T.H. (1996). Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 15, 1021-1027.

LeClair, K.P., Blonar, M.A., and Sharp, P.A. (1992). The p50 subunit of NF-kappa B associates with the NF-IL6 transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8145-8149.

Lee, D. and Lis, J.T. (1998). Transcriptional activation independent of TFIIH kinase and the RNA polymerase II mediator in vivo. *Nature* 393, 389-392.

Lee, W., Mitchell, P., and Tjian, R. (1987). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 49, 741-752.

Lee, Y.H., Williams, S.C., Baer, M., Sterneck, E., Gonzalez, F.J., and Johnson, P.F. (1997). The ability of C/EBP beta but not C/EBP alpha to synergize with an Sp1 protein is specified by the leucine zipper and activation domain. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2038-2047.

Lessard, J., Baban, S., and Sauvageau, G. (1998). Stage-specific expression of polycomb group genes in human bone marrow cells. *Blood* 91, 1216-1224.

Leuther, K.K., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (1996). Two-dimensional crystallography of TFIIIB- and IIE-RNA polymerase II complexes: implications for start site selection and initiation complex formation. *Cell* 85, 773-779.

Lewis, J.D., Meehan, R.R., Henzel, W.J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., and Bird, A. (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 69, 905-914.

Li, A.C., Guidez, F.R.B., Collier, J.G., and Glass, C.K. (1998). The macrosialin promoter directs high level of transcriptional activity in macrophages dependant on combinatorial interactions between PU.1 and c-Jun. *J. Biol. Chem.* 273, 5389-5399.

Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, S., Herzog, L., Johnston, C., McDowell, J., Paskind, M., Rodman, L., Salfeld, J., and et al (1995). Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* 80, 401-411.

Logan, S.K., Garabedian, M.J., Campbell, C.E., and Werb, Z. (1996). Synergistic transcriptional activation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter

via functional interaction of AP-1 and Ets-1 transcription factors. *J. Biol. Chem.* *271*, 774-782.

Lopez-Rodriguez, C. and Corbi, A.L. (1997). PU.1 negatively regulates the CD11c integrin gene promoter through recognition of the major transcriptional start site. *European J. Immunol.* *27*(8), 1843-1847.

Lord, K.A., Abdollahi, A., Hoffman-Liebermann, B., and Liebermann, D.A. (1993). Proto-oncogenes of the fos/jun family of transcription factors are positive regulators of myeloid differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 841-851.

Maki, Y., Bos, T.J., Davis, C., Starbuck, M., and Vogt, P.K. (1987). Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *84*, 2848-2852.

March, C.J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D.P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C.S., Kronheim, S.R., Grabstein, K., and et al (1985). Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* *315*, 641-647.

Marshall, H., Morrison, A., Studer, M., Popperl, H., and Krumlauf, R. (1996). Retinoids and Hox genes. [Review] [62 refs]. *FASEB J.* *10*, 969-978.

Martin, M.L., Lieberman, P.M., and Curran, T. (1996). Fos-Jun dimerization promotes interaction of the basic region with TFIIE-34 and TFIIF. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 2110-2118.

Martin, S.J. and Green, D.R. (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?. [Review] [30 refs]. *Cell* *82*, 349-352.

Matsui, M., Tokuhara, M., Konuma, Y., Nomura, N., and Ishizaki, R. (1990). Isolation of human fos-related genes and their expression during monocyte-macrophage differentiation. *Oncogene* *5*, 249-255.

Matsusaka, T., Fujikawa, K., Nishio, Y., Mukaida, N., Matsushima, K., Kishimoto, T., and Akira, S. (1993). Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *90*, 10193-10197.

McBride, K. and Nemer M. (1998). The C-terminal domain of c-fos is required for activation of an AP-1 site specific for jun-fos heterodimers. *Mol. Cell. Biol.* *18*:5073-5081.

McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G.E., Paige, C.J., and Maki, R.A.

(1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* *15*, 5647-5658.

Medvinsky, A. and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* *86*, 897-906.

Meehan, R.R., Lewis, J.D., McKay, S., Kleiner, E.L., and Bird, A.P. (1989). Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* *58*, 499-507.

Merika, M., Williams, A.J., Chen, G.Y., Collins, T., and Thanos, D. (1998). Recruitment of CBP/P300 by the IFN-beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Molecular Cell* *1*, 277-287.

Metz, R. and Ziff, E. (1991). cAMP stimulates the C/EBP-related transcription factor rNFIL-6 to trans-locate to the nucleus and induce c-fos transcription. *Genes Dev.* *5*, 1754-1766.

Mignotte, V., Eleouet, J.F., Raich, N., and Romeo, P.H. (1989). Cis- and trans-acting elements involved in the regulation of the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *86*, 6548-6552.

Miller, I.J. and Bieker, J.J. (1993). A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 2776-2786.

Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwig, E.A., and Yuan, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-*. *Cell* *75*, 653-660.

Molnar, A. and Georgopoulos, K. (1994). The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 8292-8303.

Moore, M.A.S. and Metcalf, D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br. J. Haematol.* *18*, 279-296.

Moreau, A., Yotov, W.V., Glorieux, F.H., and Starnaud, R. (1998). Bone-specific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 1312-1321.

Moreau-Gachelin, F., Tavitian, A., and Tambourin, P. (1988). Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* 331, 277-280.

Moreau-Gachelin, F., Ray, D., de Both, N.J., van der Feltz, M.J., Tambourin, P., and Tavitian, A. (1990). Spi-1 oncogene activation in Rauscher and Friend murine virus-induced acute erythroleukemias. *Leukemia* 4, 20-23.

Moulton, K.S., Semple, K., Wu, H., and Glass, C.K. (1994). Cell-specific expression of the macrophage scavenger receptor gene is dependent on PU.1 and a composite AP-1/ets motif. *Mol. Cell. Biol.* 14(7), 4408-4418.

Mucenski, M.L., McLain, K., Kier, A.B., Swerdlow, S.H., Schreiner, C.M., Miller, T.A., Pietryga, D.W., Scott, W.J., Jr., and Potter, S.S. (1991). A functional c-myc gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* 65, 677-689.

Muegge, K., Vila, M., Gusella, G.L., Musso, T., Herrlich, P., Stein, B., and Durum, S.K. (1993). Interleukin 1 induction of the c-jun promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7054-7058.

Muller, C., Kowenz-Leutz E., Grieser-Ade S., Graf T., and Leutz A. (1995). NF-M (chicken C/EBP beta) induces eosinophilic differentiation and apoptosis in a hematopoietic progenitor cell line. *EMBO J.* 14:6127-6135.

Nagulapalli, S., Pongubala, J.M., and Atchison, M.L. (1995). Multiple proteins physically interact with PU.1. Transcriptional synergy with NF-IL6 beta (C/EBP delta, CRP3). *J. Immunol.* 155, 4330-4338.

Nagy, L., Kao, H.Y., Chakravarti, D., Lin, R.J., Hassig, C.A., Ayer, D.E., Schreiber, S.L., and Evans, R.M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89, 373-380.

Nakabeppu, Y., Ryder, K., and Nathans, D. (1988). DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. *Cell* 55, 907-915.

Nakabeppu, Y. and Nathans, D. (1991). A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity. *Cell* 64, 751-759.

Nan, X., Campoy, F.J., and Bird, A. (1997). MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88, 471-481.

Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex [see comments]. *Nature* 393, 386-389.

Natsuka, S., Akira, S., Nishio, Y., Hashimoto, S., Sugita, T., Isshiki, H., and Kishimoto, T. (1992). Macrophage differentiation-specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6. *Blood* 79, 460-466.

Nead, M.A., Baglia, L.A., Antinore, M.J., Ludlow, J.W., and Mccance, D.J. (1998). Rb binds c-Jun and activates transcription. *EMBO J.* 17, 2342-2352.

Nelsen, B., Tian, G., Erman, B., Gregoire, J., Maki, R., Graves, B., and Sen, R. (1993). Regulation of lymphoid-specific immunoglobulin mu heavy chain gene enhancer by ETS-domain proteins. *Science* 261, 82-86.

Nerlov, C. and Graf T. (1998). PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.* 12:2403-2412.

Ness, S.A. and Engel, J.D. (1994). Vintage reds and whites: combinatorial transcription factor utilization in hematopoietic differentiation. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 4 718-724.

Neuteboom, S.T., Peltenburg, L.T., van Dijk, M.A., and Murre, C. (1995). The hexapeptide LFPWMR in Hoxb-8 is required for cooperative DNA binding with Pbx1 and Pbx2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9166-9170.

Ng, K.W., Ridgway, P., Cohen, D.R., and Tremethick, D.J. (1997). The binding of a Fos/Jun heterodimer can completely disrupt the structure of a nucleosome. *EMBO J.* 16, 2072-2085.

Nikolov, D.B., Chen, H., Halay, E.D., Usheva, A.A., Hisatake, K., Lee, D.K., Roeder, R.G., and Burley, S.K. (1995). Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature* 377, 119-128.

Nuez, B., Michalovich, D., Bygrave, A., Ploemacher, R., and Grosveld, F. (1995). Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature* 375, 316-318.

Oehler, T., Pintzas, A., Stumm, S., Darling, A., Gillespie, D., and Angel, P. (1993). Mutation of a phosphorylation site in the DNA-binding domain is required for redox-independent transactivation of AP1-dependent genes by v-Jun. *Oncogene* 8, 1141-1147.

Oelgeschlager, T., Tao, Y., Kang, Y.K., and Roeder, R.G. (1998) Transcription activation via enhanced preinitiation complex assembly in a human cell-free system lacking TAF(II)s. *Molecular Cell* 1, 925-931.



Ohkuma, Y. and Roeder, R.G. (1994). Regulation of TFIIH ATPase and kinase activities by TFIIIE during active initiation complex formation. *Nature* 368, 160-163.

Orkin, S.H. (1996). Development of the hematopoietic system. [Review] [44 refs]. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 6, 597-602.

Osada, H., Grutz, G., Axelson, H., Forster, A., and Rabbitts, T.H. (1995). Association of erythroid transcription factors: complexes involving the LIM protein RBTN2 and the zinc-finger protein GATA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9585-9589.

Osada, H., Grutz, G.G., Axelson, H., Forster, A., and Rabbitts, T.H. (1997). LIM-only protein Lmo2 forms a protein complex with erythroid transcription factor GATA-1. *Leukemia* 11, Suppl 3:307-12.

Oster, W., Lindemann, A., Riedel, D., Cicco, N.A., Mertelsmann, R., and Herrmann, F. (1988). Monokines: stimulatory and inhibitory regulator molecules of myelopoiesis in vitro. *J. Biol. Regul. Homeo. Agents* 2, 134-138.

Pahl, H.L., Scheibe, R.J., Zhang, D.E., Chen, H.M., Galson, D.L., Maki, R.A., and Tenen, D.G. (1993). The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *J. Biol. Chem.* 268, 5014-5020.

Pandolfi, P.P., Roth, M.E., Karis, A., Leonard, M.W., Dzierzak, E., Grosveld, F.G., Engel, J.D., Lindenbaum, M.H. (1995). Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nature Genet.* 11, 40-44.

Paul, R., Schuetze, S., Kozak, S.L., Kozak, C.A., and Kabat, D. (1991). The Sfpi-1 proviral integration site of Friend erythroleukemia encodes the ets-related transcription factor Pu.1. *J. Virol.* 65, 464-467.

Pear, W.S., Nolan G.P., Scott M.L., and Baltimore D. (1993) Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:8392-8396.

Perkins, A.C. and Cory, S. (1993). Conditional immortalization of mouse myelomonocytic, megakaryocytic and mast cell progenitors by the Hox-2.4 homeobox gene. *EMBO J.* 12, 3835-3846.

Perkins, A.C., Sharpe, A.H., and Orkin, S.H. (1995). Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature* 375, 318-322.



Petrovick, M.S., Hiebert S.W., Friedman A.D., Hetherington C.J., Tenen D.G., and Zhang D.E. (1998) Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol. Cell. Biol.* 18:3915-3925.

Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., D'Agati, V., Orkin, S.H., and Costantini, F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349, 257-260.

Phelan, M.L., Rambaldi, I., and Featherstone, M.S. (1995). Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3989-3997.

Pio, F., Ni, C.Z., Mitchell, R.S., Knight, J., McKercher, S., Klemsz, M., Lombardo, A., Maki, R.A., and Ely, K.R. (1995). Co-crystallization of an ETS domain (PU.1) in complex with DNA. Engineering the length of both protein and oligonucleotide. *J. Biol. Chem.* 270, 24258-24263.

Pongubala, J.M. and Atchison, M.L. (1997). PU.1 can participate in an active enhancer complex without its transcriptional activation domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 127-132.

Pongubala, J.M., Nagulapalli, S., Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Maki, R.A., and Atchison, M.L. (1992). PU.1 recruits a second nuclear factor to a site important for immunoglobulin kappa 3' enhancer activity. *Mol. Cell. Biol.* 12, 368-378.

Pongubala, J.M., van Beveren, C., Nagulapalli, S., Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Maki, R.A., and Atchison, M.L. (1993). Effect of PU.1 phosphorylation on interaction with NF-EM5 and transcriptional activation. *Science* 259(5101), 1622-1625.

Rabbitts, T.H., Axelson, H., Forster, A., Grutz, G., Lavenir, I., Larson, R., Osada, H., Valge-Archer, V., Wadman, I., and Warren, A. (1997). Chromosomal translocations and leukaemia: a role for LMO2 in T cell acute leukaemia, in transcription and in erythropoiesis. *Leukemia* 11, Suppl 3:271-2.

Ray, D., Culine, S., Tavittain, A., and Moreau-Gachelin, F. (1990). The human homologue of the putative proto-oncogene Spi-1: characterization and expression in tumors [published erratum appears in *Oncogene* 1990 Oct;5(10):1611-2]. *Oncogene* 5, 663-668.

Relman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D.T., Saukkonen, K., and Wright, S.D. (1990). Recognition of a bacterial adhesion by an integrin:

macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* 61, 1375-1382.

Robb, L., Elwood, N.J., Elefanty, A.G., Kontgen, F., Li, R., Barnett, L.D., and Begley, C.G. (1996). The *scl* gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J.* 15, 4123-4129.

Robinson, G.W., Johnson, P.F., Hennighausen, L., and Sterneck, E. (1998). The C/EBP-beta transcription factor regulates epithelial cell proliferation and differentiation in the mammary gland. *Genes Dev.* 12, 1907-1916.

Rodriguez, C., Lacasse, C., and Hoang, T. (1996). Interleukin-1 beta suppresses apoptosis in CD34 positive bone marrow cells through activation of the type I IL-1 receptor. *J. Cell. Physiol.* 166, 387-396.

Rodriguez-Cimadevilla, J.C., Beauchemin, V., Villeneuve, L., Letendre, F., Shaw, A., and Hoang, T. (1990). Coordinate secretion of interleukin-1 beta and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by the blast cells of acute myeloblastic leukemia: role of interleukin-1 as an endogenous inducer. *Blood* 76, 1481-1489.

Roeder, R.G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. [Review] [65 refs]. *Trends Biochem. Sci.* 21, 327-335.

Roman, C., Platero, J.S., Shuman, J., and Calame, K. (1990). Ig/EBP-1: a ubiquitously expressed immunoglobulin enhancer binding protein that is similar to C/EBP and heterodimerizes with C/EBP. *Genes Dev.* 4, 1404-1415.

Ron, D. and Habener, J.F. (1992). CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* 6, 439-453.

Rosmarin, A.G., Caprio, D., Levy, R., and Simkevich, C. (1995). CD18 (beta 2 leukocyte integrin) promoter requires PU.1 transcription factor for myeloid activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(3), 801-805.

Russel, E.S. and Bernstein, S.E. (1966). Blood and blood formation. In *Biology of the Laboratory Mouse*, Second Edition. 351-372.

Ryder, K., Lau, L.F., and Nathans, D. (1988). A gene activated by growth factors is related to the oncogene *v-jun*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1487-1491.

Ryseck, R.P. and Bravo, R. (1991). c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* 6, 533-542.

Sacca, R., Stanley E.R., Sherr C.J., and Rettenmier C.W. (1986) Specific binding of the mononuclear phagocyte colony-stimulating factor CSF-1 to the product of the v-fms oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:3331-3335.

Sakai, K., Hattori, T., Matsuoka, M., Asou, N., Yamamoto, S., Sagawa, K., and Takatsuki, K. (1987). Autocrine stimulation of interleukin 1 beta in acute myelogenous leukemia cells. *J. Exp. Med.* 166, 1597-1602.

Salama, S.R., Hendricks, K.B., and Thorner, J. (1994). G1 cyclin degradation: the PEST motif of yeast Cln2 is necessary, but not sufficient, for rapid protein turnover. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7953-7966.

Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Eaves, C.J., Lawrence, H.J., Largman, C., Lansdorp, P.M., and Humphries, R.K. (1995). Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev.* 9, 1753-1765.

Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Hough, M.R., Hugo, P., Lawrence, H.J., Largman, C., and Humphries, R.K. (1997). Overexpression of HOXB3 in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. *Immunity.* 6, 13-22.

Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M., and Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nuc. Ac. Res.* 17, 6419

Schuetze, S., Stenberg, P.E., and Kabat, D. (1993). The Ets-related transcription factor PU.1 immortalizes erythroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 13(9), 5670-5678.

Schule, R., Rangarajan, P., Kliwer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I.M., and Evans, R.M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62, 1217-1226.

Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265(5178), 1573-1577.

Scott, L.M., Civin, C.I., Rorth, P., and Friedman, A.D. (1992). A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood* 80, 1725-1735.

Seagroves, T.N., Krnacik, S., Raught, B., Gay, J., Burgessbeusse, B., Darlington, G.J., and Rosen, J.M. (1998). C/EBP-beta, but not C/EBP-alpha, is essential for ductal morphogenesis, lobuloalveolar proliferation, and functional differentiation in the mouse mammary gland. *Genes Dev.* 12, 1917-1928.

Seeger, R. and Krebs, E.G. (1995). The MAPK signaling cascade. [Review]. *FASEB J.* 9, 726-735.

Serizawa, H., Makela, T.P., Conaway, J.W., Conaway, R.C., Weinberg, R.A., and Young, R.A. (1995). Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIIH. *Nature* 374, 280-282.

Seth, A., Ascione, R., Fisher, R.J., Mavrothalassitis, G.J., Bhat, N.K., and Papas, T.S. (1992). The ets gene family. [Review] [49 refs]. *Cell Growth Diff.* 3, 327-334.

Shiekhhattar, R., Mermelstein, F., Fisher, R.P., Drapkin, R., Dynlacht, B., Wessling, H.C., Morgan, D.O., and Reinberg, D. (1995). Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIIH. *Nature* 374, 283-287.

Shirakawa, F., Saito, K., Bonagura, C.A., Galson, D.L., Fenton, M.J., Webb, A.C., and Auron, P.E. (1993). The human prointerleukin 1 beta gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue-specific induction. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1332-1344.

Shivdasani, R.A., Mayer, E.L., and Orkin, S.H. (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncprotein tal-1/SCL. *Nature* 373, 432-434.

Shivdasani, R.A. and Orkin, S.H. (1995). Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8690-8694.

Shivdasani, R.A. and Orkin, S.H. (1996) The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* 87:4025-4039.

Shore, P. and Sharrocks, A.D. (1994). The transcription factors Elk-1 and serum response factor interact by direct protein-protein contacts mediated by a short region of Elk-1. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3283-3291.

Sieweke, M.H., Tekotte, H., Frampton, J., and Graf, T. (1996). MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell* 85, 49-60.

Silver, A., Boultonwood, J., Breckon, G., Masson, W., Adam, J., Shaw, A.R., and Cox, R. (1989). Interleukin-1 beta gene deregulation associated with chromosomal rearrangement: a candidate initiating event for murine radiation-myeloid leukemogenesis? *Mol. Carcino.* 2, 226-232.

Sims, J.E., Gayle, M.A., Slack, J.L., Alderson, M.R., Bird, T.A., Giri, J.G., Colotta, F., Re, F., Mantovani, A., Shanebeck, K., and et al (1993). Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6155-6159.

Sims, J.E., March, C.J., Cosman, D., Widmer, M.B., MacDonald, H.R., McMahan, C.J., Grubin, C.E., Wignall, J.M., Jackson, J.L., Call, S.M., and et al (1988). cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 241, 585-589.

Smith, L.T., Hohaus, S., Gonzalez, D.A., Dziennis, S.E., and Tenen, D.G. (1996). PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood* 88, 1234-1247.

Symons, J.A., Eastgate, J.A., and Duff, G.W. (1991). Purification and characterization of a novel soluble receptor for interleukin 1. *J. Exp. Med.* 174, 1251-1254.

Tanaka, T., Akira, S., Yoshida, K., Umemoto, M., Yoneda, Y., Shirafuji, N., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., and Kishimoto, T. (1995). Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell* 80, 353-361.

Tangirala, R.K., Murao, K., and Quehenberger, O. (1997). Regulation of expression of the human monocyte chemotactic protein-1 receptor (hCCR2) by cytokines. *J. Biol. Chem.* 272, 8050-8056.

Therrien, M. and Drouin, J. (1991). Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3492-3503.

Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., and et al (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774.

Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G., Hough, M.R., Dragowska, W., Lansdorp, P.M., Lawrence, H.J., Largman, C., and Humphries, R.K. (1997). Overexpression

of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol. Cell. Biol.* 17, 495-505.

Ting, C.N., Olson, M.C., Barton, K.P., Leiden, J.M. (1996). Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* 384, 474-478.

Tondravi, M.M., McKercher, S.R., Anderson, K., Erdmann, J.M., Quiroz, M., Maki, R., Teitelbaum, S.L. (1997). Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* 386, 81-84.

Treier, M., Bohmann, D., and Mlodzik, M. (1995). JUN cooperates with the ETS domain protein pointed to induce photoreceptor R7 fate in the *Drosophila* eye. *Cell* 83, 753-760.

Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. [Review] [95 refs]. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 205-215.

Tsai, F.Y., Keller, G., Kuo, F.C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F.W., and Orkin, S.H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221-226.

Tsai, S.F., Martin, D.I., Zon, L.I., D'Andrea, A.D., Wong, G.G., and Orkin, S.H. (1989). Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* 339, 446-451.

Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M.J., Crossley, M., and Orkin, S.H. (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* 90, 109-119.

Tsukada, J., Misago, M., Serino, Y., Ogawa, R., Murakami, S., Nakanishi, M., Tonai, S., Kominato, Y., Morimoto, I., Auron, P.E., and Eto, S. (1997). Human T-cell leukemia virus type I Tax transactivates the promoter of human prointerleukin-1beta gene through association with two transcription factors, nuclear factor-interleukin-6 and Spi-1. *Blood* 90, 3142-3153.

Tsukada, J., Saito, K., Waterman, W.R., Webb, A.C., and Auron, P.E. (1994). Transcription factors NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 beta gene. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7285-7297.

Tsukada, J., Waterman, W.R., Koyama, Y., Webb, A.C., and Auron, P.E. (1996). A novel STAT-like factor mediates lipopolysaccharide, interleukin 1 (IL-1), and IL-6 signaling and recognizes a gamma interferon activation site-like element in the IL1B gene. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2183-2194.

Turner, B.M. (1991). Histone acetylation and control of gene expression. [Review] [81 refs]. *J. Cell Sci.* 99, 13-20.

Vacher, J. and Tilghman, S.M. (1990). Dominant negative regulation of the mouse alpha-fetoprotein gene in adult liver. *Science* 250, 1732-1735.

Valge-Archer, V.E., Osada, H., Warren, A.J., Forster, A., Li, J., Baer, R., and Rabbitts, T.H. (1994). The LIM protein RBTN2 and the basic helix-loop-helix protein TAL1 are present in a complex in erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8617-8621.

van der Schoot, C.E., Jansen, P., Poorter, M., Wester, M.R., von dem Borne, A.E., Aarden, L.A., and van Oers, R.H. (1989). Interleukin-6 and interleukin-1 production in acute leukemia with monocytoid differentiation. *Blood* 74, 2081-2087.

Van Dyke, M.W., Roeder, R.G., and Sawadogo, M. (1988). Physical analysis of transcription preinitiation complex assembly on a class II gene promoter. *Science* 241, 1335-1338.

Visvader, J.E., Mao, X., Fujiwara, Y., Hahm, K., and Orkin, S.H. (1997). The LIM-domain binding protein Ldb1 and its partner LMO2 act as negative regulators of erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13707-13712.

Voronova, A.F. and Lee, F. (1994). The E2A and tal-1 helix-loop-helix proteins associate in vivo and are modulated by Id proteins during interleukin 6-induced myeloid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5952-5956.

Voso, M.T., Burn, T.C., Wulf, G., Lim, B., Leone, G., and Tenen, D.G. (1994). Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7932-7936.

Wadman, I.A., Osada, H., Grutz, G.G., Agulnick, A.D., Westphal, H., Forster, A., and Rabbitts, T.H. (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J.* 16, 3145-3157.

Walker, N.P., Talanian, R.V., Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., Ferez, C.R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M.C., Hammill, L.D., and et al (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer. *Cell* 78, 343-352.

Wall, L., Destroismaisons, N., Delvoye, N., and Guy, L.G. (1996). CAAT/enhancer-binding proteins are involved in beta-globin gene expression and are differentially



expressed in murine erythroleukemia and K562 cells. *J. Biol. Chem.* 271, 16477-16484.

Wang, N.D., Finegold, M.J., Bradley, A., Ou, C.N., Abdelsayed, S.V., Wilde, M.D., Taylor, L.R., Wilson, D.R., and Darlington, G.J. (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269, 1108-1112.

Wara-Aswapati, N., Koyama Y., Behre G., Tetradis S., Tsukada J., Ro Y.T., Tenen D.G., and Auron P.E.. (1998) The wHTH wing: an interaction motif mediating protein-tethered transactivation via association with a variety of transcription factors. *Blood* 92: (Abstract).

Warren, A.J., Colledge, W.H., Carlton, M.B., Evans, M.J., Smith, A.J., and Rabbitts, T.H. (1994). The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein *rbtn2* is essential for erythroid development. *Cell* 78, 45-57.

Wasylyk, B., Wasylyk C., Flores P., Begue A., Leprince D., and Stehelin D. (1990) The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* 346:191-193.

Watson, D.K., McWilliams, M.J., Lapis, P., Lautenberger, J.A., Schweinfest, C.W., and Papas, T.S. (1988). Mammalian *ets-1* and *ets-2* genes encode highly conserved proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7862-7866.

Webb, A.C., Collins, K.L., Auron, P.E., Eddy, R.L., Nakai, H., Byers, M.G., Haley, L.L., Henry, W.M., and Shows, T.B. (1986). Interleukin-1 gene (IL1) assigned to long arm of human chromosome 2. *Lymphokine Research.* 5, 77-85.

Wedel, A., Sulski, G., and Zieglerheitbrock, H.W.L. (1996). CCAAT/enhancer binding protein is involved in the expression of the tumour necrosis factor gene in human monocytes. *Cytokine* 8, 335-341.

Wegner, M., Cao, Z., and Rosenfeld, M.G. (1992). Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP beta. *Science* 256, 370-373.

Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. [Review] [80 refs]. *Cell* 81, 323-330.

Weintraub, H. (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. [Review]. *Cell* 75, 1241-1244.

Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T.K., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S., and et al (1991). The myoD



gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. [Review] [69 refs]. *Science* 251, 761-766.

Weiss, M.J., Keller, G., and Orkin, S.H. (1994). Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev.* 8, 1184-1197.

Weiss, M.J. and Orkin, S.H. (1995). Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9623-9627.

Westermarck, J., Seth, A., and Kahari, V.M. (1997). Differential regulation of interstitial collagenase (MMP-1) gene expression by ETS transcription factors. *Oncogene* 14, 2651-2660.

Williams, S.C., Baer M., Dillner A.J., and Johnson P.F. (1995) CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *EMBO J.* 14:3170-3183.

Wilson, K.P., Black, J.A., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., Murcko, M.A., Chambers, S.P., Aldape, R.A., Raybuck, S.A., and et al (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme [see comments]. *Nature* 370, 270-275.

Winandy, S., Wu, P., and Georgopoulos, K. (1995). A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell* 83, 289-299.

Wolffe, A.P. (1996). Histone deacetylase: a regulator of transcription [comment]. [Review] [16 refs]. *Science* 272, 371-372.

Wolffe, A.P. (1994). Gene regulation. Insulating chromatin. *Curr. Biol.* 4, 85-87.

Wu, G.D., Lai, E.J., Huang, N., and Wen, X. (1997). Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.* 272, 2396-2403.

Wu, H., Moulton K., Horvai A., Parik S., and Glass C.K. (1994) Combinatorial interactions between AP-1 and ets domain proteins contribute to the developmental regulation of the macrophage scavenger receptor gene. *Mol. Cell. Biol.* 14:2129-2139.

Yamagata, T., Nishida, J., Tanaka, S., Sakai, R., Mitani, K., Yoshida, M., Taniguchi, T., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1996). A novel interferon regulatory factor family transcription factor, ICSAT/Pip/LSIRF, that negatively regulates the activity of interferon-regulated genes. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 1283-1294.

Yang-Yen, H.F., Chambard, J.C., Sun, Y.L., Smeal, T., Schmidt, T.J., Drouin, J., and Karin, M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* *62*, 1205-1215.

Yu, B.D., Hess, J.L., Horning, S.E., Brown, G.A., and Korsmeyer, S.J. (1995). Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* *378*, 505-508.

Zabel, U. and Baeuerle, P.A. (1990). Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF-kappa B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* *61*, 255-265.

Zerial, M., Toschi, L., Ryseck, R.P., Schuermann, M., Muller, R., and Bravo, R. (1989). The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J.* *8*, 805-813.

Zhang, D.E., Fujioka K., Hetherington C.J., Shapiro L.H., Chen H.M., Look A.T., and Tenen D.G. (1994) Identification of a region which directs the monocytic activity of the colony-stimulating factor 1 (macrophage colony-stimulating factor) receptor promoter and binds PEBP2/CBF (AML1). *Mol. Cell. Biol.* *14*:8085-8095.

Zhang, D.E., Hetherington, C.J., Chen, H.M., and Tenen, D.G. (1994). The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 373-381.

Zhang, G. and Duff, G.W. (1998). Characterization of a second transcription initiation element (STIE) in the human interleukin-1 beta (IL-1beta) gene. *DNA Cell Biol.* *17*, 19-25.

Zhang, G., Zhang, L., and Duff, G.W. (1997). A negative regulatory region containing a glucocorticosteroid response element (nGRE) in the human interleukin-1beta gene. *DNA Cell Biol.* *16*, 145-152.

Zhang, L., Xiao H., Schultz R.A., and Shen R.F. (1997) Genomic organization, chromosomal localization, and expression of the murine thromboxane synthase gene. *Genomics* *45*:519-528.

Zhang, P., Behre G., Iwama A., Pan J., Wara-aswapati N., Radomska H.S., Narravula S., Müller B.U., Auron P.E., Sun Z.J., and Tenen D.G. (1998) Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Blood* 92:194a.

Zhang, Y., Broser, M., and Rom, W.N. (1994). Activation of the interleukin 6 gene by *Mycobacterium tuberculosis* or lipopolysaccharide is mediated by nuclear factors NF-IL6 and NF-kappa B [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Apr 11;92(8):3632]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2225-2229.

Zhang, Y. and Rom, W.N. (1993). Regulation of the interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene by mycobacterial components and lipopolysaccharide is mediated by two nuclear factor-IL6 motifs. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3831-3837.

Zheng, H., Fletcher, D., Kozak, W., Jiang, M., Hofmann, K.J., Conn, C.A., Soszynski, D., Grabiec, C., Trumbauer, M.E., Shaw, A., and et al (1995). Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 beta-deficient mice. *Immunity.* 3, 9-19.

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier ma directrice de recherche, Dre Trang Hoang, pour avoir su bien m'orienter dans mes travaux tout en me laissant la liberté nécessaire à ce que j'apprenne de mes propres erreurs et pour avoir su bien gérer mes quelques périodes d'entêtement ou de déprime.

Je tiens aussi à remercier mon ami André Haman, notre technicien en chef, qui a réussi l'exploit d'être mon voisin au laboratoire pendant ces quelques années tout en restant toujours de bonne humeur (surtout après une bonne cigarette).

Puis, toutes les personnes que j'ai cotoyées au laboratoire et avec qui j'ai eu beaucoup plus de bons moments, de bonnes discussions et de fous rires que de prises de bec.

Enfin, je voudrais remercier mes parents qui m'ont permis de faire toutes mes études, qui m'ont toujours appuyé et qui se sont toujours demandés quand ça allait finir!