



HAL
open science

Analyse génétique et moléculaire de la spécificité temporelle et tissulaire d'expression du gène Fbp1 en réponse à l'hormone stéroïde ecdysone chez *D. melanogaster*.

Veronique Brodu

► To cite this version:

Veronique Brodu. Analyse génétique et moléculaire de la spécificité temporelle et tissulaire d'expression du gène Fbp1 en réponse à l'hormone stéroïde ecdysone chez *D. melanogaster*.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris 6 - Pierre et Marie Curie, 2000. Français. ⟨NNT : ⟩. ⟨tel-03031389⟩

HAL Id: tel-03031389

<https://hal.science/tel-03031389v1>

Submitted on 30 Nov 2020

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

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



HAL Authorization

THESE DE DOCTORAT de l'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité :
Physiologie des Invertébrés

présentée

par Véronique BRODU
pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS 6

Sujet de thèse :

**Analyse génétique et moléculaire de la spécificité temporelle et
tissulaire d'expression du gène *Fbp1* en réponse à l'hormone stéroïde
ecdysone
chez *D. melanogaster*.**

Soutenue le 11 Février 2000

Devant le jury composé de :

Monsieur Jean Deutsch, Professeur (Université Paris 6), Président

Monsieur Pierre Couble, Directeur de Recherche (CNRS), rapporteur

Monsieur Thierry Grange, Directeur de recherche (CNRS), rapporteur

Monsieur Michael Levine, Professeur, (Berkeley), examinateur

Monsieur Christophe Antoniewski, Chargé de recherche (CNRS), examinateur

Monsieur Jean-Antoine Lepsant, Directeur de recherche (CNRS), examinateur

Préambule	8
CHAPITRE 1	Error! Bookmark not defined.
LA DROSOPHILE : UN SYSTEME MODELE POUR ETUDIER LA REGULATION HORMONALE	Error!
Bookmark not defined.	
1. Contrôle du développement de la drosophile par des variations de la concentration en ecdysone	11
2. Problématique et système modèle	11
3. Physiologie des puffs et modèle d'Ashburner	14
3.1. Définition des puffs	15
3.2. Définition de différentes catégories de puffs.....	15
3.3. Modèle d'Ashburner.....	16
<i>a- Expériences</i>	16
<i>b- Modèle</i>	18
4. Caractéristiques générales des récepteurs nucléaires	18
4.1. Structure des récepteurs nucléaires.....	18
4.2. Structure des sites de fixation.....	20
4.3. Le domaine AF2.....	24
4.4. Les co-facteurs des récepteurs nucléaires.....	25
<i>a- Les co-activateurs</i>	25
<i>b- Les co-répresseurs</i>	26
<i>c- Echanges de co-facteurs en présence d'un ligand hormonal</i>	26
5. Caractérisation moléculaire du récepteur de l'ecdysone	28
5.1. Les protéines EcR.....	28
<i>a- Clonage du gène EcR</i>	28
<i>b- Les isoformes</i>	30
<i>c- Profils d'expression différentiels des isoformes</i>	30
5.2. La protéine USP.....	31
<i>a- Une seule isoforme USP</i>	31
<i>b- Profil d'expression de la protéine USP</i>	32
5.3. Les sites de fixation du récepteur hormonal.....	32
6. Caractérisation moléculaire du modèle d'Ashburner	33

6.1. Les gènes des puffs précoces.....	33
<i>a- Le gène E74.</i>	35
<i>b- Le gène E75</i>	38
<i>c- Le gène Broad-Complex.</i>	38
6.2 Validation du modèle d'Ashburner.....	38
6.3. Le gène <i>DHR78</i> : une position particulière dans le modèle d'Ashburner.....	39
7. La transition mid-pré pupale.....	42
7.1. Les gènes "précoces-tardifs"	42
<i>a- Le gène E78</i>	42
<i>b- Le gène DHR3</i>	42
7.2. \square FTZ-F1: facteur de compétence au stade pré pupal.....	43
7.3. Contrôle temporel de l'acquisition de la compétence : mécanismes de la transition mid-pré pupale.	46
8. Le modèle de coordination tissulaire et ses limites.....	47
8.1. Le modèle de coordination tissulaire.....	47
8.2. Extension du modèle d'Ashburner.....	47
8.3. Les limites du modèle de coordination tissulaire.	49
9. L'hétérodimérisation des protéines EcR/USP est-elle la seule solution pour répondre à l'ecdysone?.....	51
9.1. Etude d'un mutant <i>usp</i>	51
9.2. USP : un récepteur de l'hormone ecdysone uniquement ?.....	53
 CHAPITRE 2	55
 LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE LA FAMILLE GATA.....	55
 1. Portrait de famille des facteurs GATA.	56
1.1. Caractéristiques générales.	56
<i>a- Structure du domaine de liaison à l'ADN.</i>	56
<i>b- Séquence consensus de fixation.</i>	56
1.2. Les facteurs GATA des vertébrés.....	57
<i>a- Les facteurs GATA-1, 2 et 3.</i>	57
<i>b- Les facteurs GATA-4, 5 et 6</i>	59
1.3. Les facteurs GATA identifiés chez la drosophile.....	60
<i>a- Le facteur dGATAa/pannier.</i>	60
<i>b- Le facteur dGATAb/serpent.</i>	60
<i>c- Le facteur dGATAc/grain.</i>	61

2. Les facteurs GATA et leurs gènes cibles : un système très conservé.....	62
2.1. Le gène <i>Dmef2</i> et le développement du cœur.....	62
a- La formation du cœur chez la drosophile.....	62
b- Régulation de l'expression du gène <i>Dmef2</i>	64
1) L'enhancer cardiaque du gène <i>Dmef2</i>	64
2) Le facteur <i>Tinman</i> et ses homologues vertébrés.....	64
3) Les facteurs GATA.....	65
2.2. Le gène <i>Cecropin A</i> dans la réponse immunitaire chez la drosophile.....	67
a- La réponse immunitaire chez la drosophile.....	67
b- Régulation de l'expression du gène <i>Cecropin A</i> de drosophile.....	68
2.3. Expression de gènes dans le tissu adipeux : conservation de fonction et de régulation.....	71
a- Différenciation du corps gras larvaire.....	71
b- Exemples de gènes exprimés dans le tissu adipeux.....	72
1) Le gène <i>alcohol deshydrogenase</i>	72
1) Structure du gène de <i>D. melanogaster</i>	72
2) Comparaison avec <i>D. mulleri</i>	74
3) Le facteur dGATAb, un régulateur du gène <i>Adh</i>	74
4) Le facteur AEF-1.....	74
5) Le facteur DmC/EBP.....	75
6) Modèles d'utilisation alternative de promoteurs.....	76
2) Les gènes <i>Yp</i>	77
3) Le gène <i>Fat Body Protein 1</i>	78
2.4. Rôle central de dGATAb pour une expression dans le tissu adipeux.....	78
3. Modulation de la spécificité d'activation des facteurs GATA.....	80
3.1. Rôle des facteurs GATA dans la modification de la chromatine.....	80
a- Les facteurs GATA et les modifications de la position des nucléosomes.....	80
b- Activité de GATA modulée par l'acétylation.....	81
3.2. Modulation de l'activité des facteurs GATA : interaction avec d'autres partenaires.....	83
a- Modulation de l'activité de GATA-1 par des récepteurs stéroïdiens.....	83
b- Modulation de l'activité de GATA par des co-facteurs.....	84
1) FOG-1.....	84
2) FOG-2.....	84
3) U-shaped.....	86
CHAPITRE 3.....	87
LE GÈNE MODELE <i>Fbp1</i> ET LES OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE.....	87
1. Présentation générale.....	88

2. Les séquences régulatrices du gène <i>Fbp1</i>	89
3. Objectifs du travail de thèse.....	89
CHAPITRE 4	92
La réponse hormonale du gène <i>Fbp1</i> nécessite une double activation par le récepteur hormonal et le facteur dGATAb	92
1. Résultats antérieurs	93
2. Mises au point méthodologiques	94
1. Nouvelle méthode de préparation d'extraits nucléaires de tissu adipeux.....	94
2. Substitution des sites de fixation des facteurs régulateurs.....	96
3. La réponse hormonale du gène <i>Fbp1</i> nécessite une double activation par le récepteur hormonal et le facteur dGATAb	99
4. Résultats complémentaires	101
1. La formation <i>in vitro</i> des complexes a et b dépend d'une séquence spécifique.	101
2. Capacité d'homodimérisation du facteur dGATAb.....	104
2.1. Principe du test d'interaction <i>in vitro</i>	104
2.2. Mise en évidence de l'homodimérisation.....	104
2.3. Capacité d'hétérodimérisation avec le récepteur EcR/USP.	108
3. Conclusions et perspectives.	108
3.1. Particularité du site GBS1.....	108
3.2. Propriétés du facteur dGATAb <i>in vitro</i>	110
3.3. Interaction de dGATAb avec le récepteur hormonal et importance fonctionnelle.	110
3.4. Le facteur dGATAb et la spécificité tissulaire d'expression du gène <i>Fbp1</i>	111
a- Surexpression de dGATAb.....	111
b- Surexpression d'autres membres de la famille GATA.....	111
CHAPITRE 5	114
Le facteur dGATAb et la spécificité tissulaire d'expression de l'enhancer du gène <i>Fbp1</i> : une approche par mutagenèse <i>in vivo</i>	114

1. Introduction.....	115
2. Résultats.....	118
2.1. Contribution du site GBS1.....	118
a- <i>Le facteur GAL4 peut se substituer à dGATAb en GBS1.....</i>	118
b- <i>Redondance fonctionnelle des sites GBS.....</i>	120
2.2. Le facteur dGATAb module l'activation de l'enhancer par GAL4.	122
2.3. Mise en évidence de la répression.....	124
a- <i>Rôle du site de fixation du récepteur hormonal.....</i>	126
b- <i>Rôle de l'élément "amplificateur" (A).....</i>	126
2.4. Caractérisation du facteur répresseur.....	128
4.1. <i>Identification du site de fixation du facteur AEF-1.....</i>	128
4.2. <i>Le facteur AEF-1 se fixe sur la sonde A1.....</i>	132
4.3. <i>Effet de la mutation in vivo.....</i>	133
3. Discussion	135
3.1. Redondance fonctionnelle partielle entre les sites GBS pour une activation transcriptionnelle restreinte au tissu adipeux.....	135
3.2. Modulation de l'activité de GAL4.	136
a- <i>Modulation par dGATAb et AEF-1.....</i>	136
b- <i>Modulation par le récepteur hormonal.</i>	139
c- <i>Modulation par des facteurs interagissant avec le promoteur minimal.</i>	140
3.3. Modèle de régulation par dGATAb de l'activation de l'enhancer du gène <i>Fbp1</i> dans le tissu adipeux.	140
CHAPITRE 6	143
L'expression dynamique des isoformes du gène <i>Broad-complex</i> contrôle l'expression temporelle du gène <i>Fbp1</i>.....	143
1. Données préliminaires.....	144
1. Présentation générale des protéines à domaine BTB/POZ.....	144
1.1. <i>Caractéristiques des protéines à domaine BTB/POZ.....</i>	144
a- Les différentes catégories de protéines à domaine BTB/POZ.....	144
b- Fonction de dimérisation du domaine BTB/POZ.....	146
c- Fonction de répression transcriptionnelle du domaine BTB/POZ.....	146

1.2. Protéines nucléaires à domaine BTB/POZ et régulation de la structure de la chromatine.....	146
a- Membres des groupes Polycomb et Trithorax.....	146
b- Mise en place d'éléments "isolateurs".....	148
2. Le gène <i>Broad-Complex</i> de <i>D. melanogaster</i>	150
2.1. Les isoformes et les groupes de complémentation.....	150
2.2. Rôles des protéines BR-C au cours du développement.....	150
2.3. Mode d'action des protéines BR-C.....	152
3. Le gène <i>Fbp1</i> : gène cible des protéines BR-C.....	153
2. Article.....	155
CHAPITRE 7	157
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	157
1. Le contrôle temporel d'expression du gène <i>Fbp1</i> : le récepteur hormonal et le gène BR-C.	158
1.1. Rôle du récepteur de l'ecdysone dans la régulation temporelle d'expression du gène <i>Fbp1</i>	158
1.2. Le gène précoce <i>BR-C</i> et la régulation temporelle d'expression du gène <i>Fbp1</i>	161
1.3. Le gène <i>BR-C</i> et la spécificité tissulaire : discussion du modèle de coordination tissulaire.....	163
2. Le facteur dGATAb : un facteur clé pour une expression dans le tissu adipeux.....	163
2.1. La substitution de sites <i>in vivo</i> , une approche très informative.....	164
2.2. Mécanismes régulateurs de dGATAb et AEF-1.	165
2.3. Utilisation pour une expression conditionnelle.	166
Références bibliographiques.....	169

Préambule.

Au cours du développement des organismes supérieurs, la régulation hormonale est un moyen de coordonner l'expression d'un programme génétique spécifique au niveau d'un ou plusieurs tissus cibles. Un exemple de ce type de régulation est observé chez *Drosophila melanogaster* chez laquelle l'hormone stéroïde ecdysone joue un rôle central en coordonnant les différentes étapes de morphogenèse qui interviennent au cours des périodes larvaires et pupale. L'ecdysone induit l'expression d'une cascade génétique de régulateurs essentiels pour le déroulement des transformations morphogénétiques.

Un enjeu important est de déterminer comment l'expression des gènes induits par l'ecdysone, signal hormonal délivré dans tout l'organisme de manière ubiquitaire, est restreinte à un sous-ensemble de tissu.

Pour aborder cette problématique, nous étudions au laboratoire la régulation du gène *Fbp1*. Son expression est induite directement par l'ecdysone en fin de troisième stade larvaire et est restreinte au seul tissu adipeux. La régulation du gène *Fbp1* représente un modèle d'intégration d'informations tissulaire, spatiale et hormonale.

Mon objectif était, dans un premier temps, de caractériser l'influence du récepteur du signal hormonal dans la restriction tissulaire et temporelle d'expression du gène *Fbp1*. J'ai également cherché à caractériser d'autres facteurs de transcription permettant cette restriction d'expression. Nous avons ainsi mis en évidence que le promoteur du gène *Fbp1* est la cible du facteur dGATAb, un membre de la famille de transcription GATA.

L'introduction bibliographique de ce manuscrit est composée de deux parties. Dans la première partie, nous présenterons l'état des connaissances actuelles sur la caractérisation des gènes appartenant à la cascade régulatrice induite par l'ecdysone et essentielle à la morphogenèse. Nous présenterons les relations de régulation croisées qui existent entre les facteurs régulateurs. Nous essayerons ainsi de dégager la notion d'acquisition de compétence des gènes à répondre au signal hormonal.

La seconde partie portera sur les propriétés régulatrices des facteurs GATA identifiés chez la drosophile. Cette présentation permettra de faire un parallèle avec les modes de régulation des facteurs GATA identifiés chez les vertébrés. Elle montrera également comment le facteur dGATAb se retrouve être un facteur essentiel pour l'expression de différents gènes dans le tissu adipeux.

Dans un troisième chapitre, nous présenterons les caractéristiques du gène modèle *Fbp1*. Les chapitres suivants sont consacrés à l'exposé des résultats et à leur discussion.

Le problème central de la biologie du développement est de déterminer comment le programme génétique contrôle la formation harmonieuse d'un organisme entier. Un des aspects de cette problématique est de comprendre comment l'expression d'un gène est contrôlée, à un moment précis du développement, en réponse à différentes cascades de transduction de signaux. Les hormones, notamment, sont des signaux intervenant dans la régulation génique. Une question fondamentale est d'identifier comment ces signaux hormonaux, délivrés dans tout l'organisme, peuvent participer au contrôle précis d'un gène dans différents tissus.

Au cours de ces dernières années, l'existence de nombreux récepteurs hormonaux nucléaires a été révélée de la drosophile à l'homme. Les récepteurs hormonaux constituent une famille de protéines nucléaires dont les séquences sont fortement homologues. Malgré l'homologie de séquence, les récepteurs nucléaires jouent des rôles très différents en association avec des ligands hormonaux de nature variée. Certains récepteurs sont dits "orphelins" car leur ligand, s'il existe, n'est pas encore identifié.

Une des particularités de la drosophile est que la régulation hormonale de l'expression des gènes est dépendante d'une faible variété de signaux hormonaux. Les changements morphogénétiques au cours du développement sont attribuables aux variations de concentration de deux types d'hormones : les ecdystéroïdes et l'hormone juvénile. Ceci contraste fortement avec la régulation hormonale chez les vertébrés qui dépend d'une combinaison importante de signaux hormonaux.

La drosophile fournit un système modèle simple pour aborder sous des aspects aussi bien génétiques que moléculaires, dans un organisme entier en développement, le contrôle de la régulation hormonale. L'ensemble des données qu'il permet d'accumuler est utile pour appréhender le contrôle de la régulation hormonale chez les organismes supérieurs. En retour, la compréhension de la réponse hormonale chez la drosophile bénéficie largement de l'extension des connaissances concernant les récepteurs des vertébrés.

CHAPITRE 1

LA DROSOPHILE : UN SYSTEME MODELE POUR ETUDIER LA REGULATION HORMONALE.

1. Contrôle du développement de la drosophile par des variations de la concentration en ecdysone.

Parmi les ecdystéroïdes présents dans cet organisme, la 20-hydroxyecdysone apparaît comme la forme physiologiquement active de l'hormone stéroïde ecdysone (Figure 1). Par la suite, nous utiliserons le terme général ecdysone pour désigner la 20-hydroxyecdysone.

La mesure précise des variations de la concentration en ecdysone est rendue difficile à cause de l'asynchronisme de développement inhérent au sein d'une population et de la petite taille des larves de drosophile. La compilation de plusieurs études ainsi que les comparaisons des variations de concentration d'hormone entre différentes espèces d'insectes, comme *Manduca sexta*, ont permis d'estimer les variations de la concentration en ecdysone chez la drosophile (Richards, 1981).

Ces variations sont corrélées avec les transitions entre les différents stades de développement (Figure 2). Après le stade embryonnaire, la succession de trois stades larvaires est ponctuée par des pics d'ecdysone, qui contrôlent les mues entre ces stades (Figure 3). A la fin du troisième stade larvaire, une augmentation importante d'ecdysone conduit à la formation du puparium, marquant le début du stade prépupal et de la métamorphose. Le développement prépupal s'étend sur 12h, temps après lequel un nouveau pic d'ecdysone déclenche le développement qui aboutit quatre jours et demi plus tard à l'éclosion d'une mouche adulte. Pendant les premières heures de la métamorphose, les tissus larvaires sont détruits par histolyse. Ils sont remplacés par les tissus adultes qui se développent à partir de groupes de cellules imaginales progénitrices. Ainsi, la métamorphose aboutit à la complète transformation de forme et de fonction d'une larve vers un adulte reproducteur.

2. Problématique et système modèle

De façon très remarquable, l'ensemble des modifications morphologiques se succédant au cours du développement de la drosophile prend place en réponse à l'unique signal ecdysone. On retrouve ainsi chez la drosophile un des enjeux majeurs de la compréhension de la régulation hormonale en général.

20-Hydroxyecdysone

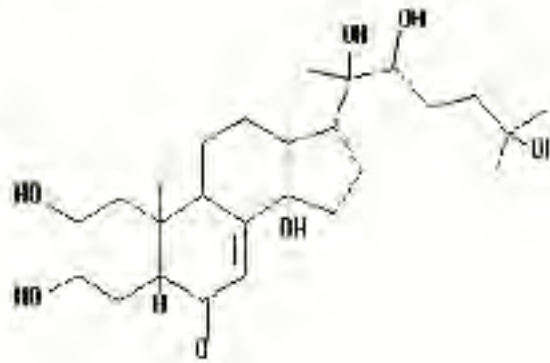


Figure 1 : Structure de la 20-hydroxyecdysone, forme physiologiquement active de l'hormone stéroïde ecdysone

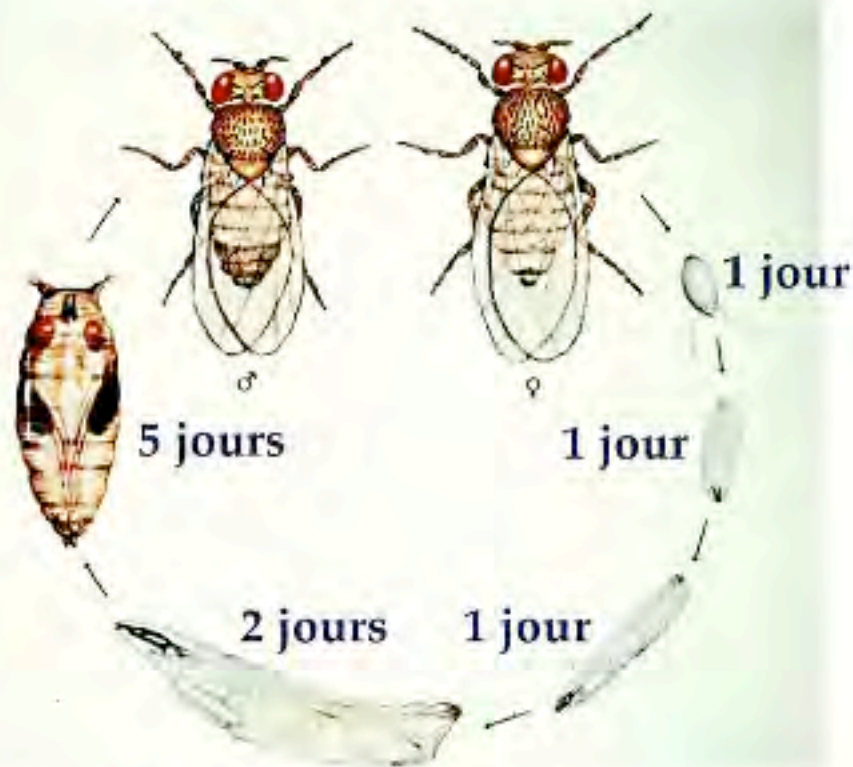


Figure 2 : Cycle de vie de la drosophile à 25°C.

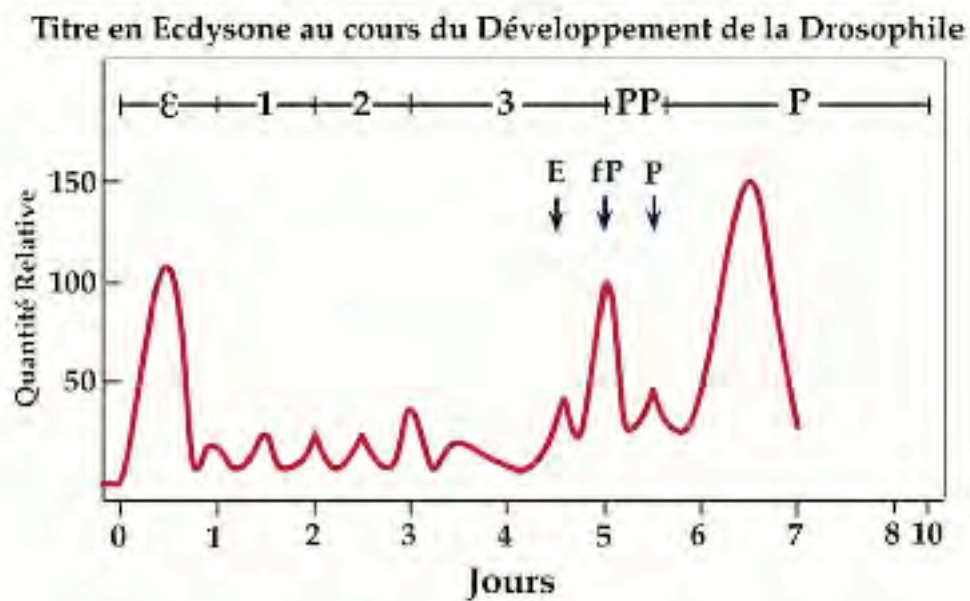


Figure 3 : Variations du titre en 20-hydroxyecdysone au cours du développement. ε désigne le stade embryonnaire, (1-3) les trois stades larvaires, E la phase d'errance, fP la formation du puparium, PP le stade pré-pupal et P le stade pupal. (d'après Richards, 1981)

La drosophile fournit un système modèle simple pour comprendre comment un signal hormonal unique et circulant de façon uniforme dans tous les tissus permet de contrôler à des moments précis et dans des tissus particuliers, des changements morphologiques tout au cours du développement. Dans cet organisme, les changements morphologiques sont orchestrés par un programme génétique contrôlé en partie par l'ecdysone. A l'occasion du déroulement de ce programme, certains gènes sont exprimés seulement dans certains tissus et/ou à des moments particuliers.

Les séquences de fixation des récepteurs nucléaires ou Hormone Response Element (HREs) sont généralement localisées dans la région promotrice des gènes cibles, à une distance et dans une orientation variables par rapport au site d'initiation de la transcription. Les HREs, placés en amont d'un promoteur hétérologue, sont capables d'activer, *in vitro*, la transcription, en réponse au signal hormonal. La fixation et/ou l'activité de la machinerie basale de transcription sont favorisées par la fixation sur le HRE du récepteur nucléaire associé à son ligand (Lucas and Granner, 1992). Une combinaison de paramètres, comprenant la séquence primaire des HREs, leur nombre, leur distance et leur position par rapport au site d'initiation de la transcription, influence l'activité transcriptionnelle des gènes cibles des récepteurs nucléaires. Cette activité transcriptionnelle est également dépendante de la fixation d'autres facteurs de transcription au niveau des séquences régulatrices pour permettre l'expression des gènes cibles *in vivo* (Lucas and Granner, 1992).

La compétence d'un gène à être induit par l'ecdysone, dans un tissu particulier, peut être liée au contrôle de l'expression du récepteur hormonal, à des co-facteurs modulant l'activité du récepteur ou encore à d'autres facteurs de transcription. L'acquisition de la compétence d'un tissu à répondre au signal hormonal peut également dépendre de la modulation de l'accessibilité des facteurs à leurs sites de fixation. La compréhension des mécanismes permettant d'acquérir cette compétence est fondamentale pour aborder la régulation hormonale de gènes particuliers.

La fin du troisième stade larvaire et de la prépupe sont deux périodes de développement qui connaissent deux augmentations de la concentration en ecdysone. Le programme génétique, induit par l'hormone, au cours de ces deux périodes, est le mieux caractérisé au niveau moléculaire. C'est pourquoi, nous nous restreindrons à ces deux périodes pour étudier les mécanismes de réponse hormonale.

3. Physiologie des puffs et modèle d'Ashburner.

3.1. Définition des puffs.

Dans certains tissus larvaires, la duplication du matériel génétique au cours de la mitose n'est pas suivie de division. Ce phénomène appelé endoréplication prend place notamment dans les cellules du tissu adipeux ou des glandes salivaires larvaires et conduit à la formation de chromosomes polytènes. Ces chromosomes présentent une structure en bandes, très reproductible d'un individu à l'autre.

L'observation des chromosomes polytènes au cours de la formation du puparium a mis en évidence un changement d'aspect de certaines bandes. On peut observer au niveau de ces bandes des renflements ou "puffs". Ces renflements traduisent une augmentation de l'activité de l'expression des gènes. L'observation de l'apparition des puffs fournit une séquence temporelle d'activation des gènes, visible directement au niveau du chromosome (Ashburner et al., 1974). Le moment d'apparition de ces puffs est reproductible. Leur présence ou leur absence permet de déterminer l'âge des larves avec une grande précision. Cependant, il est à noter que l'activité transcriptionnelle d'un gène n'est pas forcément corrélée à la formation d'un puff sur les chromosomes polytènes. De manière opposée, la formation de puffs n'est pas forcément corrélée à une activité transcriptionnelle (Richards, 1997).

3.2. Définition de différentes catégories de puffs.

L'ajout d'ecdysone à des glandes salivaires larvaires de chironome ou de drosophile, cultivées *in vitro*, conduit à l'apparition des puffs (Ashburner et al., 1974; Clever and Karlson, 1960). Un petit nombre de puffs apparaissent dans les quelques minutes qui suivent l'addition d'hormone et plus d'une centaine de puffs sont visibles dans les heures suivantes. La séquence d'apparition de ces puffs, corrélée à l'expression d'un gène au locus concerné, permet ainsi de faire un lien entre un événement physiologique, qui est la présence d'hormone, et un événement transcriptionnel. Cette expérience montre qu'il existe une séquence temporelle d'apparition des puffs en réponse à l'ecdysone. Cette séquence temporelle sous-tend une hiérarchie d'activation des gènes que nous détaillerons par la suite.

L'apparition des différentes catégories de puffs dépend de la concentration en hormone. Au milieu du troisième stade larvaire, environ 15 puffs d'"inter-mue" sont

présents quand les chromosomes des glandes salivaires ont subi suffisamment de cycles d'endoréplication et deviennent assez larges pour être analysés (Figure 4). Ces puffs régressent quand la concentration en ecdysone augmente et au moins 6 puffs dits "précoces" apparaissent. Ces puffs précoces sont induits directement par l'ecdysone et sont actifs de façon transitoire. En effet, à leur tour, ils régressent après quelques heures et sont suivis de l'apparition de plus d'une centaine de puffs dits "tardifs". Ces puffs tardifs régressent ensuite au cours du développement prépupal. Peu de puffs en milieu de stade prépupal sont visibles quand la concentration en ecdysone chute après la formation du puparium. Ensuite, un deuxième pic d'ecdysone au milieu de cette phase réinduit une nouvelle séquence d'apparition des puffs précoces et tardifs (Figure 4). Au cours de cette deuxième séquence, la plupart des puffs réinduits séquentiellement sont les mêmes que ceux induits à la fin du troisième stade larvaire. Cependant, il existe certains puffs tardifs qui ne sont induits qu'en fin de troisième stade larvaire et d'autres qui ne sont induits qu'au cours du pic prépupal.

3.3. Modèle d'Ashburner.

a- Expériences.

M. Ashburner *et al.* ont caractérisé la séquence d'apparition et la nature des puffs en cultivant, *in vitro*, des glandes salivaires en présence ou en absence d'ecdysone, en présence ou en absence de cycloheximide, inhibiteur de la synthèse protéique.

En absence d'ecdysone, les puffs d'inter-mue régressent moins vite et l'apparition des puffs précoces n'est pas observée (Ashburner *et al.*, 1974). En revanche, l'ajout d'hormone conduit à l'apparition des puffs précoces en quelques minutes. Leur taille est directement proportionnelle à la concentration d'hormone présente dans le milieu de culture.

Après l'ajout d'hormone, quelques heures sont nécessaires pour observer l'induction des puffs tardifs. Leur taille est indépendante de la concentration en hormone.

En présence de cycloheximide, les puffs précoces apparaissent normalement mais ne régressent pas. De plus, cet inhibiteur de la synthèse protéique empêche l'apparition des puffs tardifs.

Enfin, si l'ecdysone n'est présente que pendant 2 heures, et est ensuite retirée du milieu de culture, les puffs précoces régressent et les puffs tardifs sont induits prématurément.

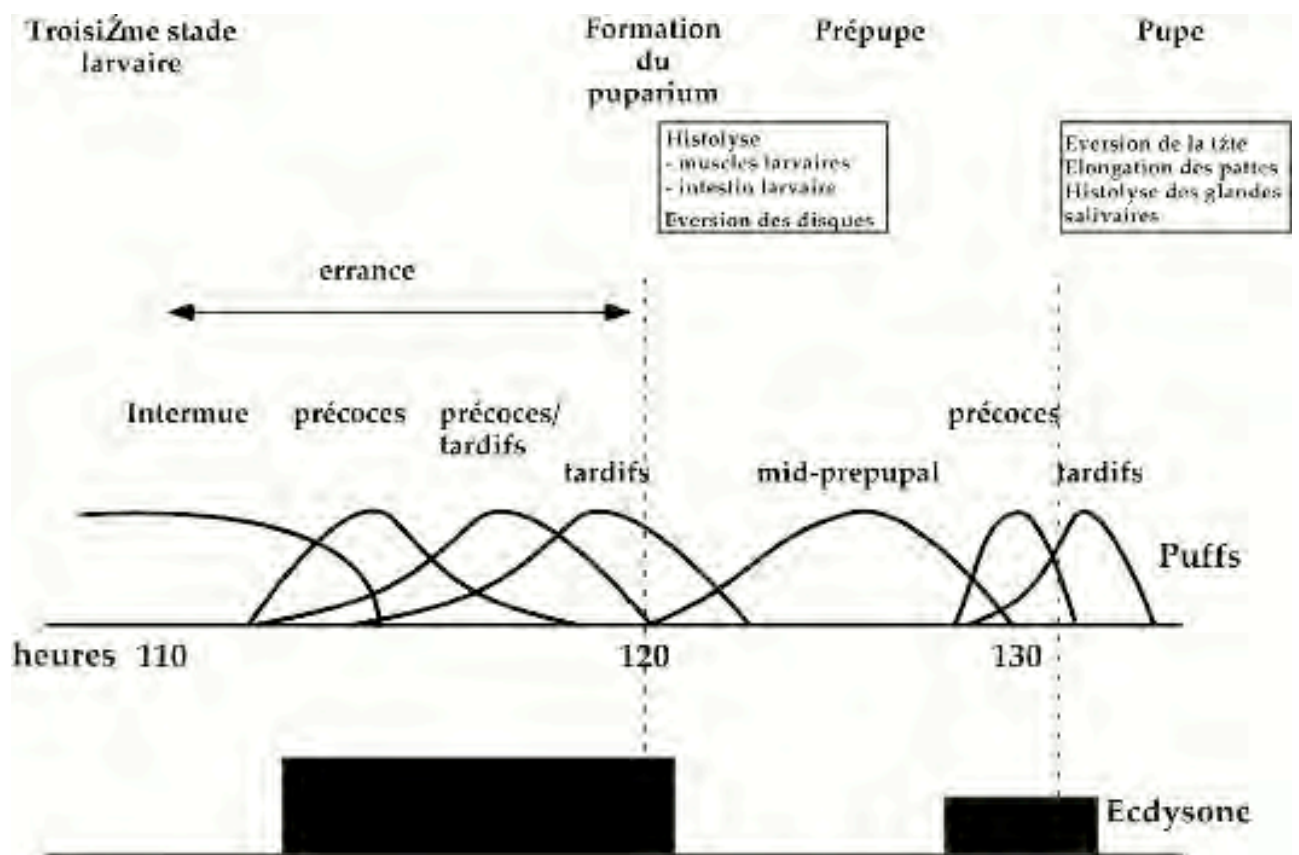


Figure 4 : Profil d'apparition des puffs d'intermue, précoces, précoces-tardifs, tardifs et mid-prépupaux en fonction des variations de la concentration en 20-hydroxyecdysone

Les temps sont indiqués en nombre d'heures après la ponte. Le temps 120h marque la fin du troisième stade larvaire et la formation du puparium. La période prépupale se déroule entre 120 et 130 heures. A 130h, la pupa est formée. Les principales transformations morphologiques accompagnant ces différentes phases de développement sont indiquées dans les rectangles.

Les augmentations de la concentration en 20-hydroxyecdysone sont symbolisées par des rectangles noirs.

b- Modèle.

L'ensemble de ces résultats a conduit M. Ashburner et ses collaborateurs à proposer un modèle de cascade génétique agissant en réponse à l'ecdysone au moment de la formation du puparium (Figure 5) (Ashburner et al., 1974). Selon ce modèle, un complexe récepteur-hormone activerait un nombre restreint de gènes régulateurs situés au niveau des puffs précoces. Les produits de ces gènes régulateurs auraient deux effets : l'activation d'une centaine de gènes situés au niveau de puffs tardifs et la répression de leur propre activité. Ainsi la durée d'expression des gènes des puffs précoces serait contrôlée par une boucle d'auto-régulation des produits de ces puffs.

Ce modèle illustre bien la notion de cascade génétique où la progression temporelle du développement en fin de troisième stade larvaire dépend de l'expression ordonnée de gènes. Au cours de cette décennie, la caractérisation moléculaire du récepteur de l'ecdysone et des gènes précoces (*E74*, *E75* et *Broad-Complex*) a permis de valider les prédictions du modèle d'Ashburner. Avant d'entrer dans le détail des caractéristiques moléculaires de ces différents gènes, il est utile de faire une brève présentation des récepteurs nucléaires.

4. Caractéristiques générales des récepteurs nucléaires.

Les récepteurs nucléaires, présents chez les vertébrés, les arthropodes et les nématodes, contrôlent l'expression de nombreux gènes impliqués dans des fonctions biologiques variées telles que la croissance, la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, la mort cellulaire programmée.

Les gènes des récepteurs nucléaires codent des protéines appartenant à une même superfamille. Ces protéines sont des récepteurs de divers ligands hydrophobes comme les hormones stéroïdiennes, thyroïdiennes, la vitamine D et les rétinoïdes. Au plan fonctionnel, tous ces récepteurs se comportent comme des facteurs de transcription qui régulent l'expression de leurs gènes cibles par l'intermédiaire de leur fixation, généralement sous forme de dimères, à des séquences d'ADN spécifiques, ou éléments de réponse, situés le plus souvent dans la région promotrice amont de ces gènes cibles.

4.1. Structure des récepteurs nucléaires.

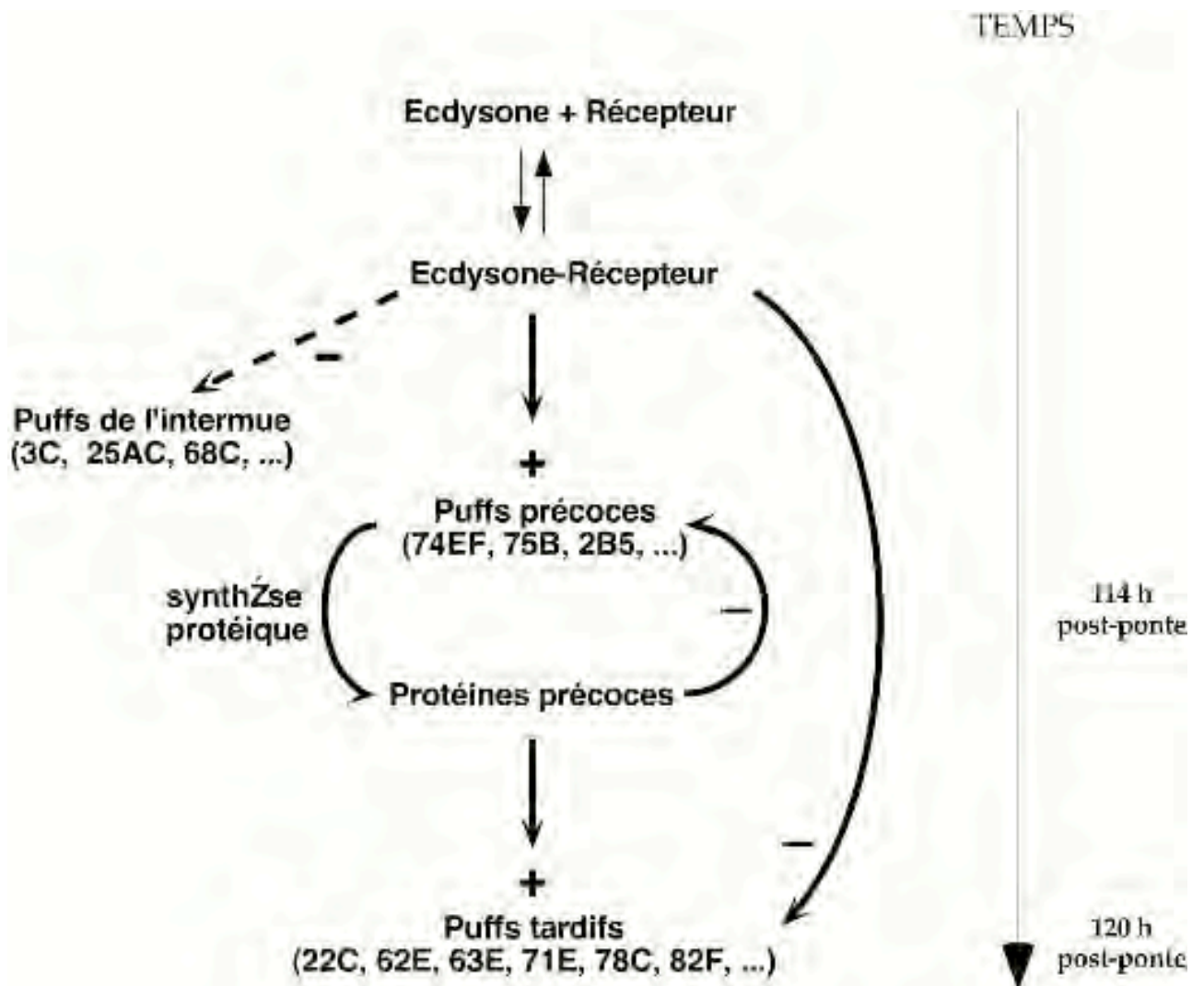


Figure 5 : Modèle d'Ashburner

Les traits pointillés ne figurent pas dans le modèle initial. Le récepteur de l'ecdysone agit pour réprimer les puffs d'intermue. (Ashburner *et al.*, 1974)

Les récepteurs nucléaires sont composés de plusieurs domaines fonctionnels conservés (Figure 6). Les mécanismes d'action similaires et l'homologie des séquences protéiques suggèrent que ces facteurs ont évolué à partir d'un ancêtre commun (Laudet et al., 1992). Par ailleurs, différents gènes ont été isolés sur la base d'homologie avec la séquence des récepteurs nucléaires. Les ligands, le rôle et les cibles biologiques des produits de ces gènes sont encore inconnus. Ces récepteurs appartiennent à la catégorie des récepteurs orphelins.

Les domaines fonctionnels, conservés dans la famille des récepteurs nucléaires, correspondent à un domaine de dimérisation, de fixation à l'ADN (DNA Binding Domain ou DBD) et de fixation du ligand (Ligand Binding Domain ou LBD) (Figure 6). Deux fonctions transactivatrices autonomes sont responsables de l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires : une fonction d'activation AF-1 constitutivement active dans la région A/B et une fonction AF-2 dépendante de la présence du ligand et comprise dans le LBD. Nous reviendrons par la suite plus en détail sur la caractérisation et le rôle du domaine AF-2. Les domaines de fixation à l'ADN et de fixation du ligand sont fonctionnellement indépendants et interchangeables entre les différents récepteurs (Green and Chambon, 1987; Green et al., 1988; Umesono and Evans, 1989).

4.2. Structure des sites de fixation.

La comparaison des HREs a permis d'établir des séquences consensus pour la fixation d'un récepteur hormonal donné. Les HREs sont constitués de deux demi-sites hexamériques organisés en répétition directe (DR), en palindrome (PAL) ou en palindrome inversé (IP).

Les HREs du récepteur des glucocorticoïdes (GRE), de la progestérone (PRE), des androgènes (ARE), et des minéralocorticoïdes (MRE) sont constitués d'une répétition inverse de l'hexanucléotide AGAACA, séparées par 3 paires de bases (Figure 7) (Evans, 1988).

L'HRE du récepteur des œstrogènes (ERE) est constitué d'une répétition inverse de la séquence AGGTCA, séparée par 3 paires de bases (Figure 7) (Evans, 1988). La différence entre un GRE et un ERE repose sur la variation de deux bases au sein du motif hexamérique. Il existe un domaine de reconnaissance au sein des récepteurs nucléaires, la boîte P, pour discriminer entre les séquences des HREs (Umesono and Evans, 1989).

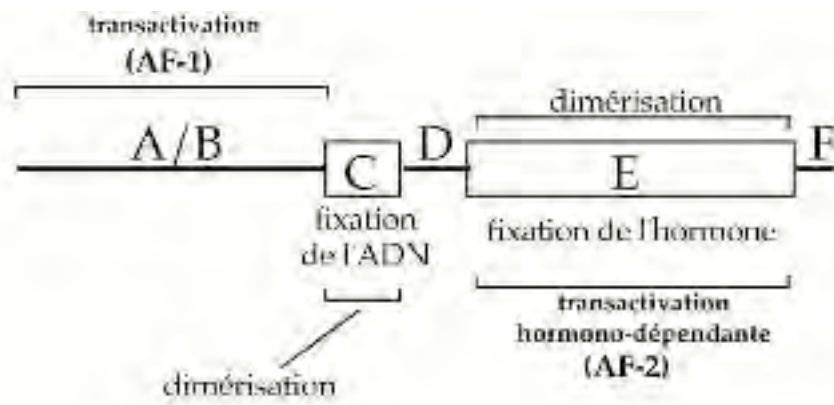


Figure 6 : Schéma de la structure des différents domaines fonctionnels d'un récepteur nucléaire

Le HRE du récepteur de l'hormone thyroïdienne (TRE) est constitué d'une répétition inverse de la séquence AGGTCA. La séquence d'un TRE est la même que celle d'un ERE mais aucun nucléotide séparateur ne vient ici s'insérer entre les deux demi-sites hexamériques (Figure 7). L'espacement est entre ces deux demi-sites est donc un deuxième paramètre qui détermine la spécificité hormonale d'un HRE (Figure 7) (Kurokawa et al., 1993).

Les récepteurs de l'hormone thyroïdienne T3 (T3R), de l'acide rétinoïque (RAR, RXR) et de la vitamine D3 (VDR) se fixent à des séquences répétées directes (DR) de type AGGTCA, en formant des hétérodimères avec le récepteur RXR. La fixation de ces hétérodimères respecte, en général, la règle des 3-4-5 selon laquelle l'hétérodimère TR/RXR se fixe sur un DR3, l'hétérodimère VDR/RXR sur un DR4 et l'hétérodimère RAR/RXR sur un DR5 (Figure 7) (Umesono and Evans, 1989).

Les sites de fixation asymétriques de type DRs suggèrent que les hétérodimères s'y fixent de façon asymétrique. En effet, il est établi dans le cas de DR3, DR4 et DR5, que RXR occupe le demi-site en 5' et le partenaire TR, VDR ou RAR, le demi-site en 3' (Umesono and Evans, 1989). Au niveau d'un DR1, RXR peut se fixer à la fois comme un homodimère ou comme un hétérodimère avec RAR (Figure 7). Dans le cas d'un hétérodimère, la polarité de RXR/RAR fixé est inversée. Cette inversion de polarité conduit, de façon intéressante, à un changement de conformation du LDB. L'hétérodimère RXR/RAR n'est plus sensible à l'acide *trans*-rétinoïque comme l'était l'hétérodimère RXR/RAR fixé sur un DR5. Dans le cas d'un homodimère, RXR/RXR a pour ligand l'acide 9-*cis* rétinoïque, un stéréoisomère de l'acide *trans*-rétinoïque (Heyman et al., 1992). ((Mangelsdorf and Evans, 1995) et références citées). La fixation d'un récepteur nucléaire sur un site de fixation, d'espacement variable, est un moyen de répondre à des signaux hormonaux différents.

L'existence de différents HREs en amont des gènes permet de fixer un récepteur hormonal particulier. Cette fixation conduit à un élément de spécificité de la réponse hormonale.

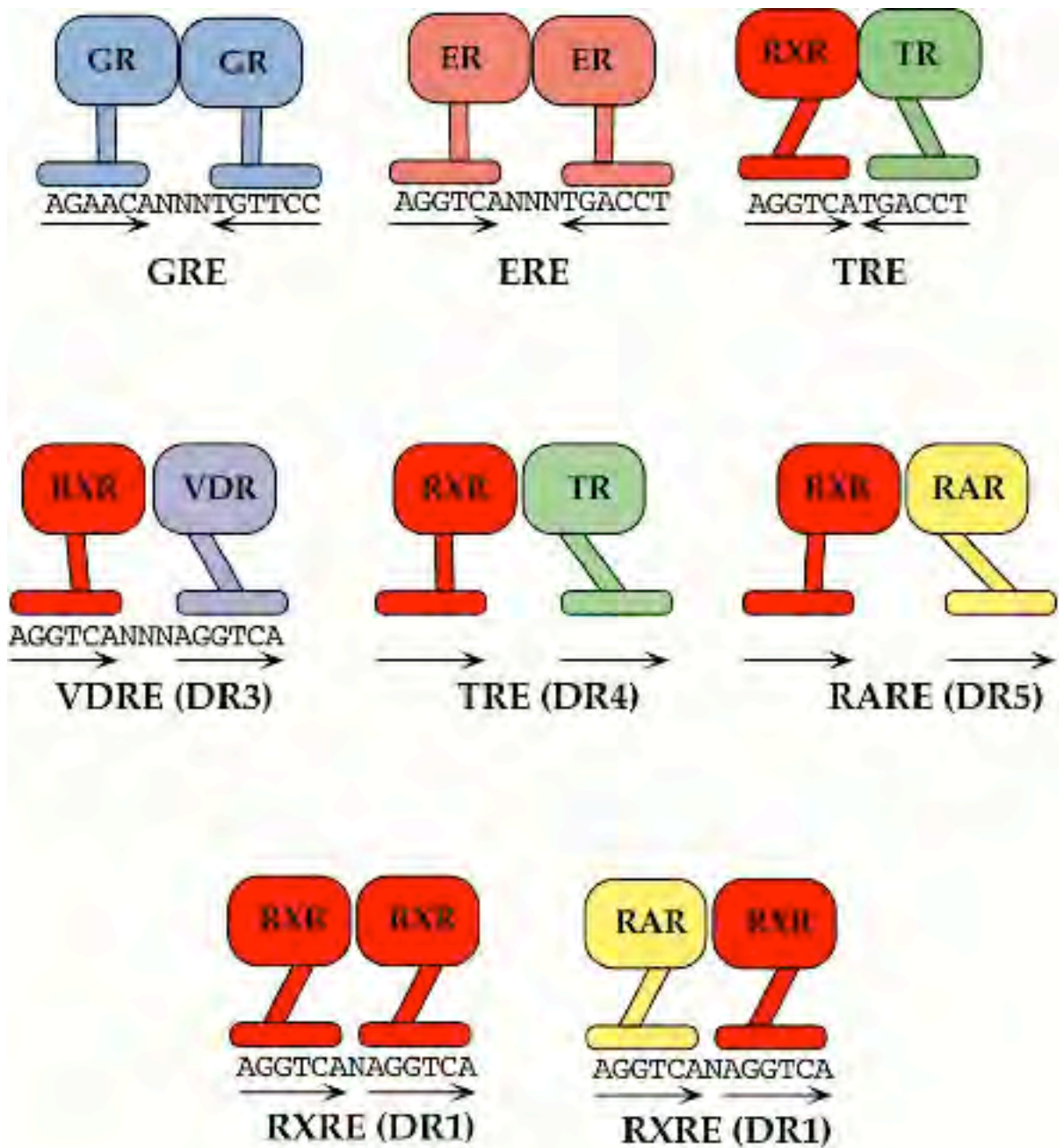


Figure 7: Schéma récapitulatif de la structure des éléments de réponse hormonal (HRE)

Abbréviations:

GRE : Glucocorticoïdes Response Element

ERE : Estrogènes Response Element

TRE : Thyroïde Response Element

VDRE : Vitamine D3 Response Element

RARE/RXRE : Retinoïc Acid Response Element

DR : Direct Repeat

4.3. Le domaine AF2.

Le domaine de liaison du ligand (LBD) d'un récepteur nucléaire détermine les propriétés de fixation du ligand à un récepteur donné. Ce domaine est impliqué dans la dimérisation et contient une fonction de transactivation dépendante de la fixation du ligand. Une analyse mutationnelle, initialement conduite sur le récepteur de l'œstrogène (ER), a permis de délimiter ce domaine de transactivation, noté AF-2 (activation fonction 2) situé dans la partie carboxy-terminale du LBD (Danielian et al., 1992). Par la suite, ce domaine AF-2 a été retrouvé très conservé parmi les récepteurs hormonaux (Barettono et al., 1994; Durand et al., 1994; Tone et al., 1994). En revanche, l'activité de l'autre domaine de transactivation AF-1, domaine non conservé et situé dans la partie amino-terminale (domaine A/B) des récepteurs, n'est pas contrôlée par le ligand. L'activation transcriptionnelle est donc constitutive pour AF-1 et induite par la fixation du ligand pour AF-2.

Les structures cristallines de la partie carboxy-terminale de plusieurs récepteurs nucléaires ont été résolues récemment (Moras and Gronemeyer, 1998). Ces analyses cristallographiques ont révélé que les différents LBD ont des structures très similaires, présentant en moyenne 12 hélices de type α très conservées. Un feuillet β est conservé entre les hélices 5 et 6. Une telle organisation permet au LBD de former une poche hydrophobe dans laquelle se loge le ligand.

La comparaison des structures cristallines en présence ou non du ligand a montré que celui-ci induisait des changements de conformation du récepteur. Cette réorganisation de la structure du récepteur en présence du ligand permet l'exposition de surfaces variables pour des interactions avec différents facteurs. La différence de structure la plus importante entre un récepteur associé à son ligand ou un récepteur libre repose sur la position de l'hélice 12 contenue dans le domaine AF-2. La fixation du ligand induit un changement de position de cette hélice qui se referme vers la poche hydrophobe en contact du ligand.

La connaissance de la structure cristalline du domaine de liaison du ligand a également permis de caractériser comment le ligand interagit avec les différentes hélices α au sein de la poche hydrophobe. Cette connaissance est utile pour mettre au point des molécules antagonistes de l'action d'un ligand naturel. Elle permet aussi de rechercher des ligands encore inconnus pour des récepteurs hormonaux orphelins.

4.4. Les co-facteurs des récepteurs nucléaires.

L'activation des certains récepteurs est inhibée par l'activation simultanée de récepteurs de la même famille. Ce phénomène suggérait un phénomène de séquestration d'éventuels effecteurs nucléaires. L'existence de nombreux co-facteurs intervenant dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires a été mise en évidence au cours de ces dernières années.

a- Les co-activateurs.

La famille de protéines p160, interagissant avec le domaine AF-2 des récepteurs nucléaires a été la première famille de co-activateurs identifiée. Les co-activateurs p160 sont représentés par les trois protéines SRC-1/NCoA, TIF2/GRIP1/NCoA-2 et p/CIP/ACTR. Ils agissent en augmentant l'activité transcriptionnelle de nombreux récepteurs nucléaires en présence du ligand approprié (Xu *et al.*, et références citées).

Les facteurs p300 et CBP représentent le deuxième type de co-activateur. Ces facteurs interagissent directement avec le domaine AF-2 des récepteurs nucléaires, de façon dépendante du ligand. Ils interagissent également avec les co-activateurs de la famille p160 (Xu *et al.*, 1999).

La protéine P/CAF est le troisième type de co-activateur. Cette protéine interagit avec les récepteurs nucléaires et avec les protéines p300/CBP.

L'activation hormonale des récepteurs nécessite un complexe de co-activateurs qui établissent des interactions multiples et croisées (Voir Xu *et al.* pour une revue récente et Figure 8).

Les protéines p160, CBP/p300 et p/CAF sont des enzymes capables d'acétyler les histones. Ceci suggère que la propriété de transactivation du complexe co-activateur est liée à la capacité de remodelage de la structure chromatinienne provoquée par l'acétylation au niveau des gènes cibles. Ce lien reste à être démontré *in vivo* (Xu *et al.*, 1999).

On peut se demander pourquoi plusieurs activités acétylases sont requises dans le complexe co-activateur. Une explication est que plusieurs activités acétylases distinctes pourraient être requises pour l'acétylation de protéines autres que les histones, comme le facteur GATA-1 ou la protéine p53 (Blobel *et al.*, 1995; Boyes *et al.*, 1998; Janknecht and Hunter, 1996).

La découverte de ces nouvelles familles de protéines soulève la question de spécificité de l'activation transcriptionnelle en réponse à un signal hormonal. Les co-

activateurs sont-ils utilisés de façon différentielle entre les récepteurs nucléaires et participent-ils ainsi à la spécificité de la réponse hormonale ?

b- Les co-répresseurs.

La protéine NCoR (nuclear receptor co-repressor) est un premier type de co-répresseur des récepteurs nucléaires identifié (Kurokawa et al., 1995). La protéine NCoR peut exercer son activité répressive quand elle est fusionnée directement à un domaine de liaison à l'ADN, en absence de récepteur. Cette répression est autonome en absence du ligand (Chen and Evans, 1995).

La protéine SMRT est un deuxième type de co-répresseur interagissant, comme NCoR, avec un grand nombre de récepteurs nucléaires (Jackson et al., 1997; Lavinsky et al., 1998; Shibata et al., 1997; Smith et al., 1997). Il est à noter que la partie carboxy-terminale de NCoR présente une identité de 43% avec celle de SMRT. Bien que NCoR et SMRT aient des similitudes de structure, ils n'ont cependant pas des fonctions exactement redondantes (Lavinsky et al., 1998).

Chez la drosophile, un co-répresseur du récepteur de l'ecdysone a été caractérisé très récemment (Tsai et al., 1999). Cet homologue noté SMRTER est une très grande protéine qui de façon surprenante ne présente qu'une faible homologie avec les co-répresseurs NCoR et SMRT. Pour autant, le facteur SMRTER est capable de jouer le même rôle fonctionnel. De façon intéressante, le facteur SMRTER n'interagit directement qu'avec la protéine EcR au sein de l'hétérodimère EcR/USP et l'ajout de l'hormone détruit cette interaction. Cependant, quand la protéine USP est remplacée par son homologue mammifère RXR, le facteur SMRTER n'est plus capable d'interagir avec la protéine EcR. Ce résultat indique que le facteur SMRTER, présentant une faible homologie avec les facteurs vertébrés, interagit spécifiquement avec l'hétérodimère EcR/USP.

Les co-répresseurs NCoR/SMRT font partie d'un large complexe dans lequel ils interagissent avec une histone déacétylase (Figure 8) (Alland et al., 1997; Nagy et al., 1997). Ceci suggère que l'activité des co-répresseurs des récepteurs nucléaires est également reliée fonctionnellement au remodelage de la structure chromatinienne.

c- Echanges de co-facteurs en présence d'un ligand hormonal.

La caractérisation des co-répresseurs et des co-activateurs des récepteurs nucléaires permet de proposer le modèle suivant (Figure 8) (Torchia et al., 1998).

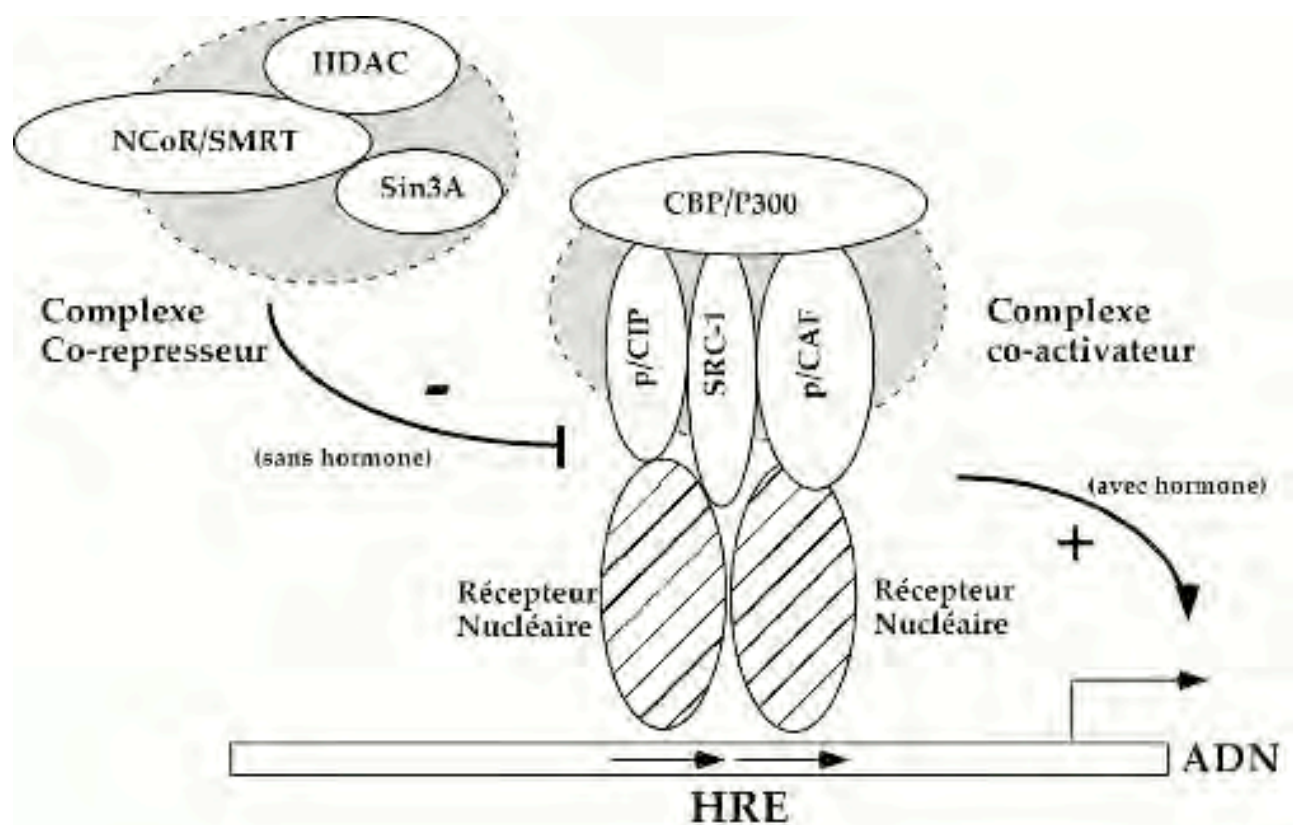


Figure 8 : Modèle du mode d'action des récepteurs nucléaires chez les vertébrés. Les récepteurs nucléaires (ovale hachuré), non associés à leur ligand, se fixent à l'ADN au niveau de leur HRE (ici représenté sous forme de répétition directe). Ils recrutent les co-répresseurs NCoR/SMRT et un complexe comprenant Sin3A et l'histone déacétylase HDAC. L'ensemble conduit à la répression transcriptionnelle. La fixation du ligand hormonal au récepteur permet l'échange du complexe répresseur par un complexe activateur. Ce dernier est constitué des co-activateurs SRC-1, p/CIP, p/CAF, CBP/p300, co-activateurs présentant une activité histone-acétylase. L'ensemble conduit à l'activation transcriptionnelle.

Les récepteurs hormonaux, non associés à leur ligand, se fixent à l'ADN, recrutent le complexe formé des facteurs SMRT/NCoR/déacétylases, qui permet la déacétylation des histones et résulte en une répression transcriptionnelle. La liaison du ligand au récepteur a pour effet de remplacer le complexe co-répresseur par le complexe co-activateur constitué de facteurs présentant des activités histones acétylases. Ces co-activateurs acétylent les histones et l'acétylation conduit à une "ouverture" de la chromatine et à une augmentation de la transcription. Ce modèle permet d'établir ainsi un lien entre déacétylation/acétylation et répression/activation transcriptionnelle en réponse à un signal hormonal.

5. Caractérisation moléculaire du récepteur de l'ecdysone.

Chez la drosophile, parmi les différents récepteurs nucléaires caractérisés, le récepteur de l'ecdysone est, jusqu'à ce jour, le seul dont on connaisse le ligand. La fonction de certains autres récepteurs nucléaires semble être requise au cours de l'embryogenèse et à différentes périodes au cours du développement (Thummel, 1996).

Le récepteur de l'hormone ecdysone est constitué d'un hétérodimère entre les protéines EcR et USP (Figure 9).

5.1. Les protéines EcR

a- Clonage du gène EcR.

La technique de marche sur le chromosome a été appliquée dans l'équipe de D. Hogness au clonage des gènes des puffs précoces (Segraves and Hogness, 1990). Le sens de la marche et sa validation au niveau des puffs précoces étaient contrôlés par hybridation sur les chromosomes polytènes. Les clones correspondant à un locus d'un puff précoce servaient ensuite pour hybrider des banques d'ADN complémentaires. Le gène *E75*, au locus *E75B*, a ainsi été le premier gène précoce identifié (Segraves and Hogness, 1990). Il présente la structure caractéristique des récepteurs hormonaux nucléaires. Le ligand hormonal de *E75* est inconnu.

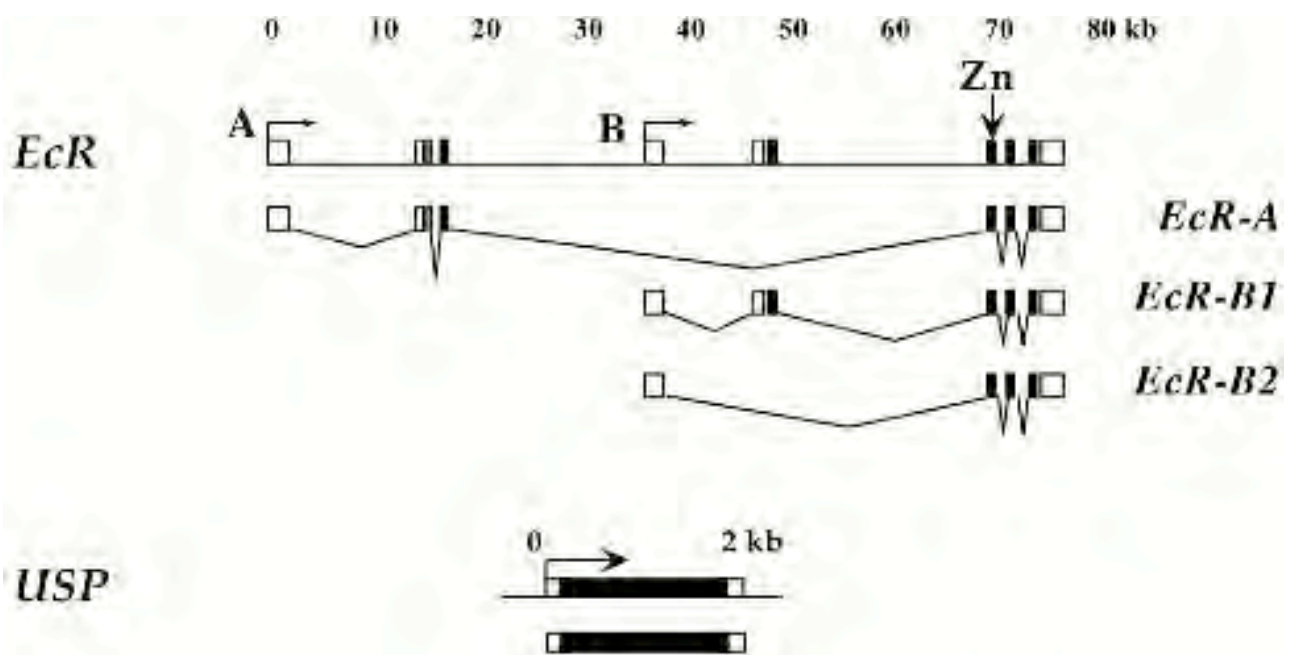


Figure 9 : Structures moléculaires des gènes *EcR* et *USP*.

Les rectangles représentent les exons. Leurs parties codantes sont représentées en noir et leurs parties non-codantes en blanc. L'exon fléché par Zn contient le domaine à doigts à zinc de fixation à l'ADN, caractéristique des récepteurs nucléaires. Il est commun aux trois isoformes.

Pour le gène *EcR*, le promoteur A dirige l'expression de l'isoforme A, le promoteur B dirige celle des isoformes B.

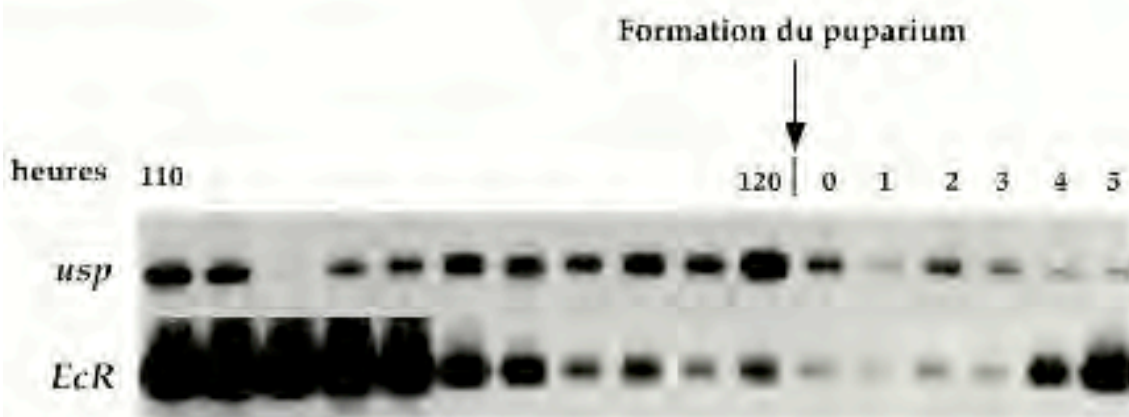


Figure 10 : Profils d'expression des gènes *EcR* et *USP* en fin de troisième stade larvaire et début de développement pré-pupal.

Les temps sont indiqués en nombre d'heures après la ponte jusqu'à la formation du puparium. Le gène *USP* est exprimé à un niveau relativement constant. En revanche, le gène *EcR* est induit par l'augmentation de la concentration en ecdysone. Il est exprimé à un maximum entre 110 et 115h pour diminuer jusqu'en fin de troisième stade larvaire. Au moment de la formation du puparium, il n'est pratiquement plus détectable et il est réinduit par le deuxième pic d'ecdysone qui prend place en fin de développement pré-pupal (d'après Andres et al., 1993).

Le gène *EcR* a par la suite été cloné par homologie avec le récepteur orphelin E75 (Koelle et al., 1991). Il a été caractérisé comme récepteur fonctionnel de l'ecdysone sur la base de différents critères.

La transfection de l'isoforme *EcR-B1* du gène *EcR* dans des cellules Schneider de drosophile en culture permet d'augmenter l'expression d'un transgène indicateur seulement en présence d'ecdysone. Ce transgène est constitué d'un gène indicateur *lacZ* placé sous contrôle de plusieurs répétitions d'un élément de réponse à l'ecdysone (*EcRE*), caractérisé dans le promoteur du gène *hsp27* (Koelle et al., 1991).

La protéine *EcR-B1* est également capable de fixer l'iodoponastérone, un analogue radioactif de l'ecdysone (Koelle et al., 1991).

A l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine *EcR*, utilisé dans des expériences de retardement sur gel ou d'immunoprécipitation, la même équipe a montré que la protéine *EcR* se fixe directement sur un *EcRE* (Koelle et al., 1991).

Ces résultats montrent que le gène *EcR* est un composant essentiel du récepteur de l'ecdysone. Cependant, dans un système hétérologue, l'*EcR* n'est pas suffisant à lui seul pour conférer une réponse hormonale. Par exemple, dans la lignée cellulaire COS de souris, l'expression de *EcR* ne permet pas d'observer l'augmentation de la transcription du transgène indicateur *hsp27-lacZ* (Koelle et al., 1992). Ces résultats suggèrent la nécessité d'un partenaire spécifique de *EcR* pour observer une réponse à l'ecdysone. Ce partenaire est présent dans les cellules Schneider de drosophile et non dans les cellules COS de souris.

b- Les isoformes

Le gène *EcR* code trois isoformes notées *EcR-A*, *EcR-B1* et *EcR-B2* (Figure 9) (Talbot et al., 1993). Ces trois protéines ont une structure caractéristique de récepteurs hormonaux nucléaires. Elles diffèrent dans leur partie amino-terminale mais présentent des domaines de liaison à l'ADN (DBD) et du ligand (LBD) identiques.

c- Profils d'expression différentiels des isoformes.

La transcription du gène *EcR* est induite directement par l'ecdysone ce qui conduit à l'établissement d'une boucle d'auto-régulation permettant d'augmenter le niveau de la protéine *EcR* en réponse à son ligand. L'expression du gène *EcR* suit ainsi les variations de la concentration en ecdysone (Figure 10) (Koelle et al., 1991).

L'utilisation d'anticorps spécifiques de chaque isoforme a permis de révéler leur profil d'expression au cours du développement et dans les différents tissus (Talbot et al., 1993). L'isoforme *EcR-A* est la forme prépondérante retrouvée au cours des toutes

premières heures de l'embryogenèse et correspond probablement à une expression d'origine maternelle. Au cours de l'embryogenèse, les deux isoformes EcR-A et EcR-B1 sont co-exprimées, avec un pic d'expression à la fin de cette période de développement. A la fin du troisième stade larvaire et pendant la formation du puparium, les deux isoformes EcR-A et EcR-B1 sont très fortement exprimées mais dans des tissus différents.

L'isoforme EcR-B1 est préférentiellement exprimée dans les tissus larvaires dont le destin est d'être histolysé au cours de la métamorphose. En revanche, l'isoforme EcR-A est exprimée dans les disques imaginaux qui donneront les futurs tissus adultes. On n'observe jamais, dans un tissu donné, de co-expression des isoformes EcR-A et EcR-B1. Ces différences d'expression des isoformes avaient conduit à l'hypothèse que leur utilisation différentielle pouvait en partie expliquer comment les gènes induits par l'ecdysone ne s'expriment que dans un sous-ensemble de tissus. Cette hypothèse est contredite par les résultats de P. Maroy. En effet, P. Maroy observe que la létalité, survenant en fin de troisième stade larvaire, induite par une mutation aboutissant à l'élimination de l'isoforme EcR-B1, peut être sauvée par la surexpression, dans tous les tissus, de n'importe quelle isoforme de EcR (Maroy et al., 1999). Ce résultat très impressionnant indique que n'importe quelle isoforme peut se substituer à une autre pour permettre le bon déroulement de la cascade d'événements morphogénétiques régulés par l'ecdysone. L'expression des gènes répondant à l'ecdysone semble pouvoir être induite par n'importe quelle isoforme pourvue qu'elle soit présente dans le tissu.

5.2. La protéine USP.

a- Une seule isoforme USP

Le gène *ultraspiracle (usp)* a été cloné par trois laboratoires indépendants en utilisant différentes approches. Il a été isolé dans le groupe de F. Kafatos comme un facteur de transcription requis pour l'expression correcte d'un gène de chorion s15 (Shea et al., 1990). Il a été également isolé par les groupes de R. Evans et L. Gilbert en recherchant des homologues des récepteurs stéroïdes de vertébrés (Henrich et al., 1990; Oro et al., 1990). Le gène *usp* code un seul transcrit (Figure 9).

Les trois isoformes de la protéine EcR acquièrent la capacité de se fixer à l'ADN uniquement lorsqu'elles forment un hétérodimère avec la protéine codée par le gène *usp* (Koelle et al., 1992; Thomas et al., 1993; Yao et al., 1992). Cette protéine appartient à la

superfamille des récepteurs nucléaires. De plus, seule la co-transfection des deux protéines EcR et USP dans des cellules COS permet d'observer une induction de l'expression du transgène indicateur *hsp27-lacZ* en réponse à l'ecdysone. Cette induction n'est pas observée quand seulement l'un des deux partenaires est transfecté dans ces cellules.

Des marquages avec des anticorps dirigés contre la protéine USP, sur des chromosomes polytènes de glandes salivaires, ont montré que tous les sites occupés par la protéine EcR correspondent également à des sites occupés par la protéine USP (Talbot et al., 1993; Yao et al., 1992).

La protéine USP est l'homologue structural des récepteurs RXR de vertébrés. Elle ne permet pourtant pas la fixation des rétinoïdes (Heyman et al., 1992; Mangelsdorf and Evans, 1995). Cependant, la protéine USP se révèle être l'homologue fonctionnel du récepteur RXR (Yao et al., 1993). Dans des expériences de transfection de cellules COS, USP est en effet capable de former des hétérodimères avec les récepteurs nucléaires VDR, TR, PPAR, et RAR qui sont des partenaires vertébrés de RXR. Il est aussi capable d'activer la transcription en réponse aux ligands de ces récepteurs de vertébrés.

b- Profil d'expression de la protéine USP

La protéine USP est exprimée à un niveau relativement constant tout au cours du développement. Son expression n'est donc pas régulée par les variations de la concentration en ecdysone (Figure 10). Sa fonction est requise au cours de l'ovogenèse et tout au long du développement. L'absence de la fonction USP entraîne une réduction de fertilité ainsi que des défauts dans la synthèse de la cuticule au cours de l'embryogenèse et au moment des mues entre les différents stades larvaires (Hall and Thummel, 1998).

5.3. Les sites de fixation du récepteur hormonal.

L'hétérodimère EcR/USP peut exister en solution en absence d'ecdysone, mais la présence de ce ligand augmente et stabilise sa formation (Yao et al., 1993). La forme qui se lie de façon prépondérante à l'ADN est la forme EcR/USP. Les deux premières cibles naturelles du récepteur de l'ecdysone ont été décrites dans les promoteurs des gènes *hsp 27* et *Eip28/29* (Yao et al., 1992).

Par la suite, l'identification de sites de fixation du récepteur hormonal (EcRE) a été étendue à d'autres gènes régulés par l'ecdysone. De l'étude de l'ensemble de ces sites de

fixation, il ressort que la nature d'un EcRE est assez variable. L'hétérodimère EcR/USP est capable de se fixer sur des séquences AGGTCA en répétitions directes et séparées par un nombre variable de bases allant de 0 à 11, comme les hétérodimères du RXR vertébrés (Antoniewski et al., 1996; Horner et al., 1995) ou sur une structure pseudo-palindromique de type AGGTCA•TGACCT avec un espacement de 1 paire de bases (Antoniewski et al., 1996).

La grande variété de sites de fixation de l'hétérodimère EcR/USP est à mettre en opposition avec la situation rencontrée pour la fixation des récepteurs hormonaux de vertébrés. Chez ces derniers, l'orientation et l'espacement entre les répétitions permettent la fixation de récepteurs hormonaux différents pour des hormones différentes (Mangelsdorf and Evans, 1995).

6. Caractérisation moléculaire du modèle d'Ashburner.

6.1. Les gènes des puffs précoces.

Les puffs précoces, induits précocement et directement par l'ecdysone, sont au nombre de six (Figure 11). Les gènes *EcR*, *E74*, *E75* et *Broad-Complex (BR-C)*, correspondant respectivement aux puffs précoces 74EF, 75B et 2B5, ont été caractérisés moléculairement par la technique de marche sur le chromosome (Figure 12) (Bayer et al., 1996; Burtis et al., 1990; DiBello et al., 1991; Segraves and Hogness, 1990). Une caractéristique commune aux gènes des puffs précoces est la grande taille de leur locus, s'étendant sur plusieurs dizaines de kilobases. La régulation de ces gènes précoces est complexe, l'utilisation alternative de promoteurs différents conduit à la synthèse de plusieurs transcrits. Des études génétiques ont révélé que des mutants de perte de fonction pour chacun de ces gènes conduisaient à une létalité embryonnaire ou pupale ((Richards, 1997) et références citées). Ce résultat indique que ces gènes participent à des étapes génétiques essentielles tout au cours du développement (Andres and Thummel, 1992).

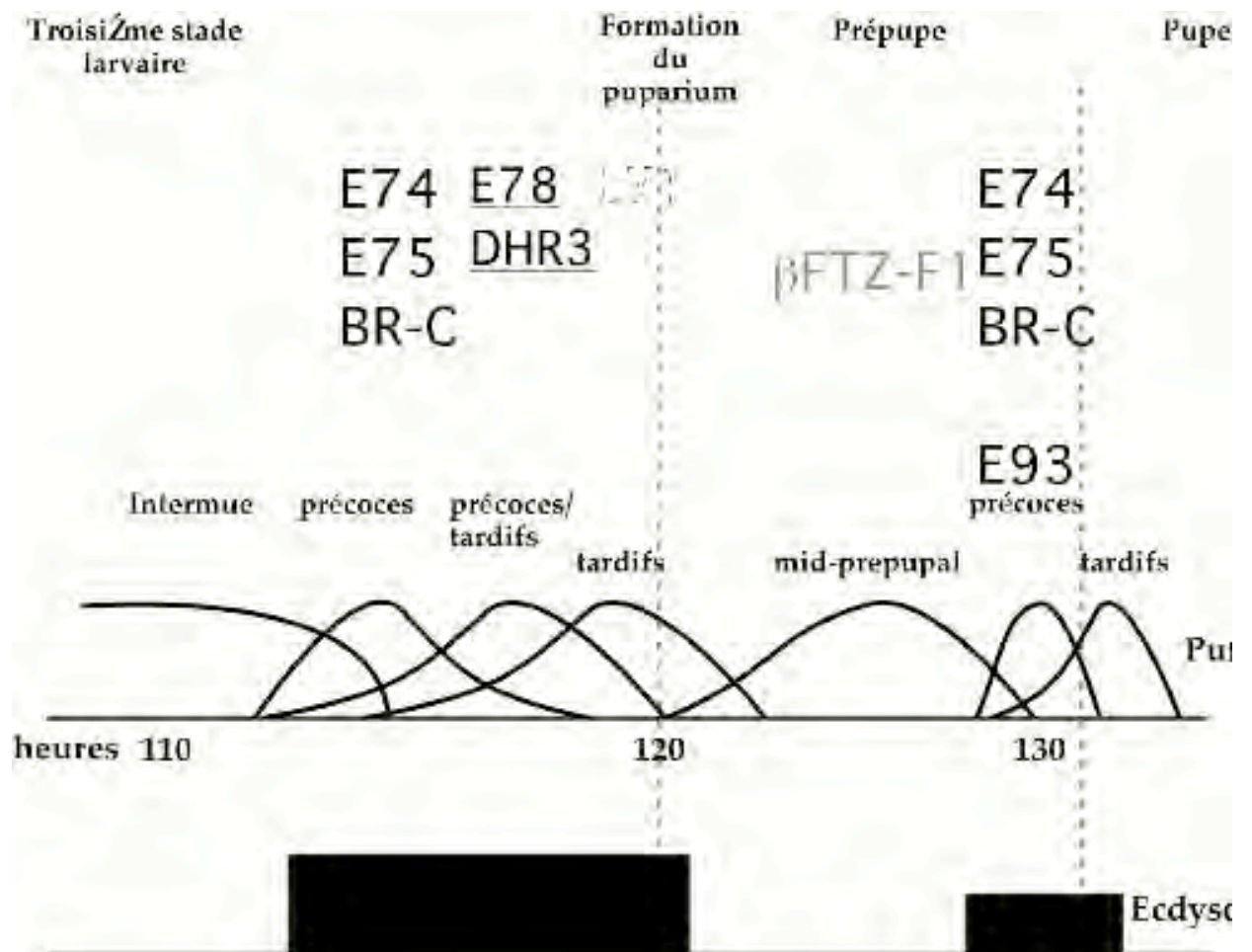


Figure 11 : Gènes clonés correspondant aux différentes classes de puffs.

Se reporter à la légende de la figure 4.

Les gènes des puffs précoces sont écrits en **gras**, des puffs précoces/tardifs en **gras souligné**, des puffs tardifs en *italique*, et de la transition mid-pré-pupale en *gris*.

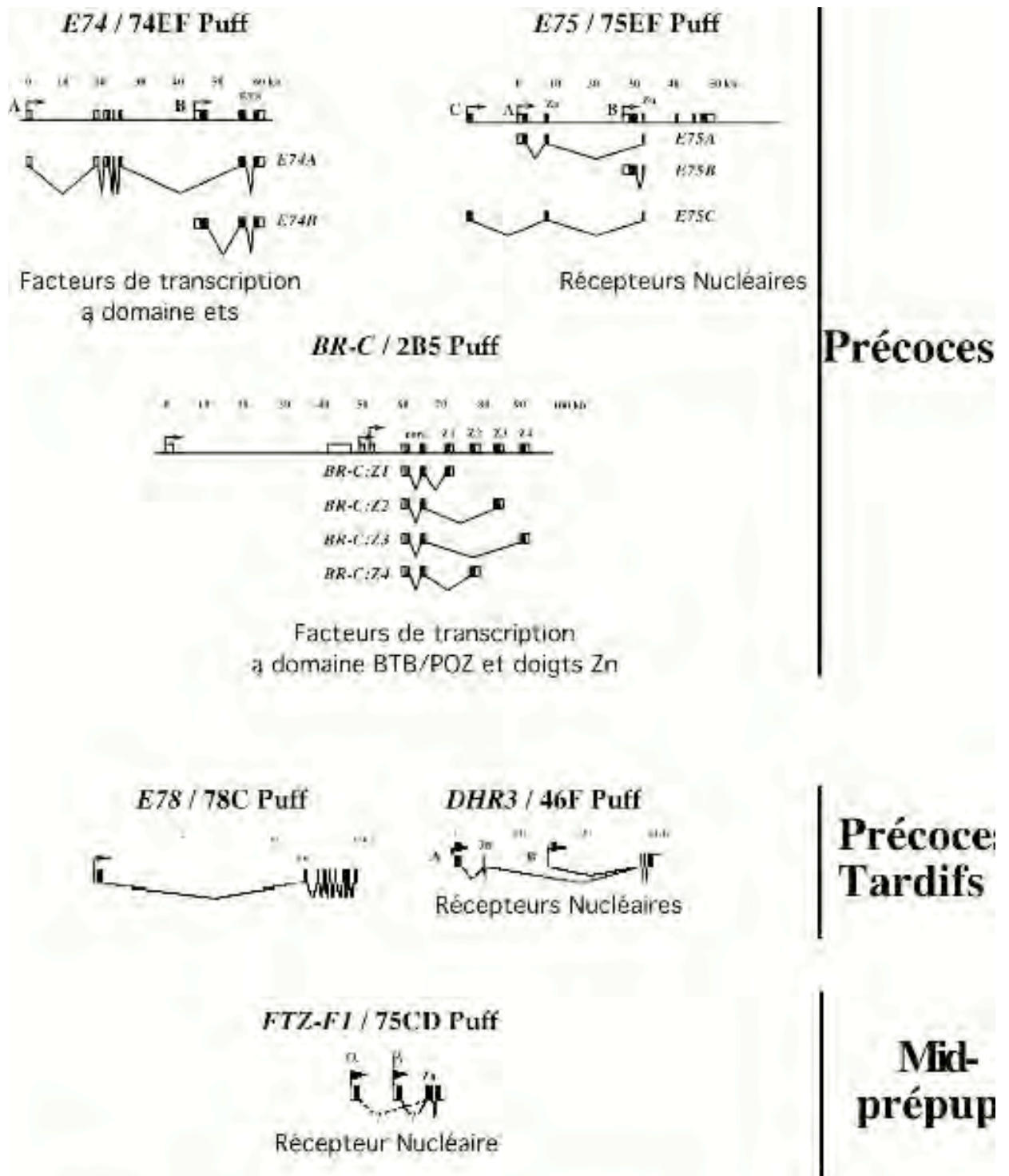


Figure 12 : Structure moléculaire des gènes des puffs précoces, précoces/tardifs et de mid-prépupe.

Pour chacun des gènes, les rectangles représentent les exons, en blanc non codants et en noir codants. Chaque nom de gène est indiqué avec la localisation du puff qui lui est associé. La nature des produits de ces gènes est indiquée. Zn désigne un domaine à deux doigts à zinc. La protéine E75C ne possède qu'un seul doigt à zinc. (d'après Huet *et al.*, 1995)

a- Le gène *E74*.

Le gène *E74* code deux transcrits *E74A* et *E74B*, synthétisés à partir de deux promoteurs distincts (Figure 12). Les protéines qui en résultent diffèrent dans leur partie amino-terminale mais présentent un domaine commun dans la partie carboxy-terminale. Ce domaine comporte un motif de liaison à l'ADN retrouvé dans les oncoprotéines de la famille *ets* (Burtis et al., 1990).

Le profil développemental d'expression de *E74A* montre qu'il est exprimé au cours de l'embryogenèse et au cours du troisième stade larvaire en réponse à l'augmentation de la concentration en ecdysone (Figure 13). Le profil d'expression de *E74B* est similaire à celui de *E74A* à la différence qu'il est induit plus précocement que *E74A* en fin de troisième stade larvaire.

La différence temporelle d'expression de ces 2 transcrits peut être expliquée en partie par le temps nécessaire (~ 1 heure) pour transcrire *E74A* dont l'ARN non épissé s'étend sur plus de 60 kb. En revanche la transcription de *E74B* ne nécessite que 15-30 minutes (Karim and Thummel, 1991). Par ailleurs, l'étude de l'expression du gène *E74* sur des glandes salivaires cultivées *in vitro* a révélé que *E74B* est induit à une concentration en ecdysone dix fois plus faible que *E74A*. Cette observation peut aussi expliquer pourquoi *E74B* est exprimée en premier dans des larves de fin de troisième stade (Karim and Thummel, 1991).

En analysant de façon plus détaillée l'effet des concentrations d'ecdysone, les auteurs ont montré qu'à une concentration d'hormone permettant une activité transcriptionnelle maximale, *E74B* est exprimé pendant 2 heures et qu'ensuite son expression diminue. Cette diminution est dépendante de la synthèse protéique. A une concentration d'ecdysone plus faible, *E74B* est toujours exprimée, mais son expression n'est pas réprimée au bout de 2 heures. Ce résultat suggère que la répression de l'expression de *E74B* nécessite un facteur induit à une concentration d'hormone élevée. Un candidat évident est la protéine *E74A*. Cependant le statut de répresseur de *E74A* n'est pas encore clairement établi car une mutation affectant seulement le transcrit *E74A* ne modifie pas le profil d'expression de *E74B* (Karim and Thummel, 1991).

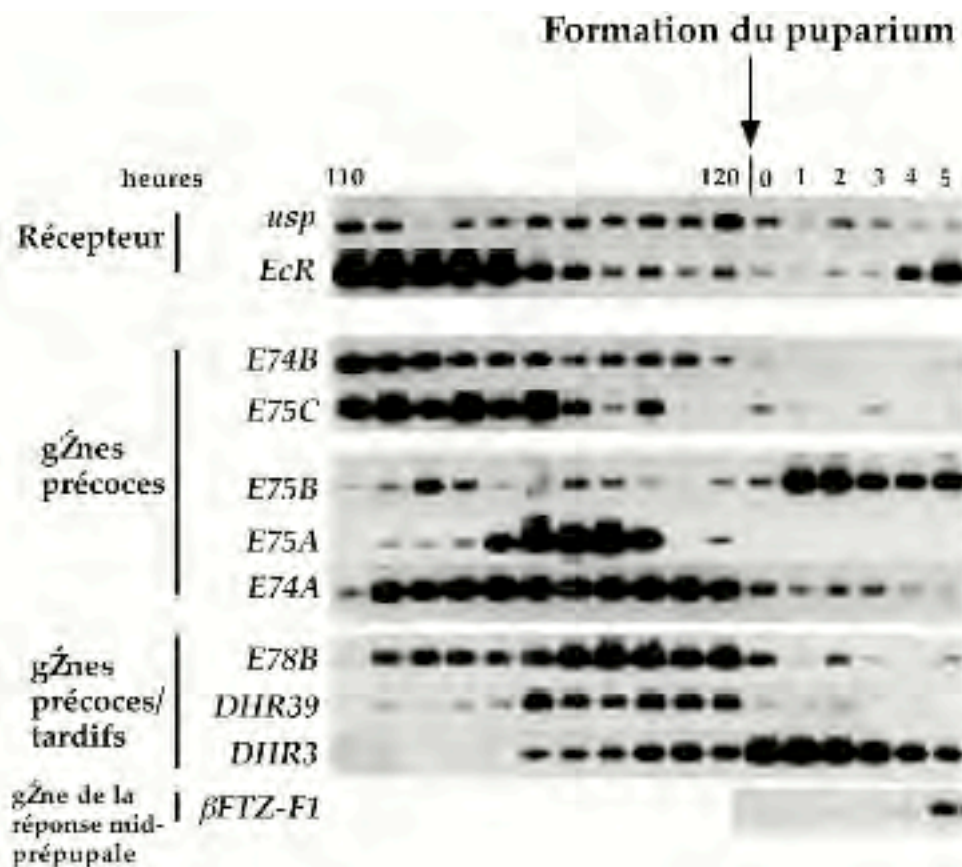


Figure 13 : La réponse transcriptionnelle à l'ecdysone

Profils d'expression des gènes codant le récepteur de l'ecdysone, des gènes des puifs précoces, précoces/tardifs et de la réponse midpré pupale.

Avant la formation du puparium, les temps sont indiqués en nombre d'heures après la ponte. L'expression des gènes précoces prend place au milieu du troisième stade larvaire et diminue avant la formation du puparium. Ils sont réinduits en fin de développement pré-pupal quand la concentration en ecdysone et en protéine EcR ont augmenté de nouveau. Les gènes précoces/tardifs sont exprimés en fin de vie larvaire et début de développement pré-pupal. Le gène *βFTZ-F1* n'est exprimé qu'au cours du développement pré-pupal. (d'après Andres *et al.*, 1993).

b- Le gène *E75*.

Le gène *E75* code trois transcrits notés *E75A*, *E75B* et *E75C* (Figure 12) (Segraves and Hogness, 1990). Les protéines *E75A* et *E75C* sont des récepteurs orphelins qui possèdent une partie amino-terminale distincte associée à des domaines communs de liaison à l'ADN et de liaison du ligand. La protéine *E75B* ne présente qu'un seul doigt à zinc dans le domaine de liaison à l'ADN. Il est donc vraisemblable que ce domaine n'est pas fonctionnel (Segraves and Hogness, 1990).

L'addition d'ecdysone induit rapidement l'expression des transcrits *E75*, dans des glandes salivaires cultivées *in vitro*. Leur expression augmente pendant les deux heures qui suivent l'addition de l'hormone et diminue par la suite. Cette diminution est dépendante de la présence d'hormone et nécessite une activité de synthèse protéique (Segraves and Hogness, 1990). Le profil d'expression de l'isoforme *E75C* est similaire à celui de *E74B* (Figure 13). Cette expression débute au milieu du troisième stade larvaire pour disparaître totalement avant la formation du puparium. L'expression de *E75A* est maximale quand l'expression de *E75C* est diminuée. Quant à l'expression de *E75B*, elle est plus tardive, n'étant maximale après la formation du puparium.

c- Le gène *Broad-Complex*.

Le gène *BR-C* code plus d'une dizaine de transcrits. Quatre protéines distinctes sont traduites à partir de ces transcrits. Elles sont notées *Z1*, *Z2*, *Z3* et *Z4* (Figure 12). Elles présentent une partie amino-terminale commune ou "core" et un motif différent à doigt à zinc de type C2H2 dans la partie carboxy-terminale (Bayer et al., 1997; DiBello et al., 1991). La région "core" comprend un domaine BTB/POZ (*Broad-Complex*, *tramtrak*, *bric-a-brac*/*Poxiviruses* and zinc finger). Ce domaine, retrouvé de façon conservée de la drosophile à l'homme, est impliqué dans des interactions protéine/protéine homo ou hétéro-typiques (Bardwell and Treisman, 1994).

6. 2 Validation du modèle d'Ashburner.

La caractérisation moléculaire de ces trois gènes précoces *E74*, *E75*, *BR-C* a permis de générer des anticorps spécifiques contre leurs produits. L'utilisation de ces anticorps a montré que les protéines codées par ces trois gènes précoces se lient au niveau de chromosomes polytènes des glandes salivaires à la fois au niveau des puffs précoces et des

puffs tardifs. Ces caractéristiques sont en accord avec le modèle d'action proposé par M. Ashburner selon lequel ces protéines sont à la fois des régulateurs de leur propre synthèse et de la synthèse des puffs tardifs.

En accord avec le modèle d'Ashburner, la transcription des différentes isoformes de ces trois gènes précoces est induite directement par l'ecdysone. Elles sont exprimées dans tous les tissus mais de façon différentielle selon les tissus. Nous avons indiqué que les isoformes codées par les gènes *BR-C*, *EcR* et *E74B* sont exprimées dès le milieu du troisième stade larvaire quand la concentration en ecdysone est faible. L'augmentation de la concentration hormonale en fin de troisième stade larvaire conduit à la répression de l'expression de *EcR* et *E74B* et à l'induction de *E74A* (Andres et al., 1993).

6.3. Le gène *DHR78* : une position particulière dans le modèle d'Ashburner.

Le gène *DHR78* a été cloné en recherchant de nouveaux membres de la famille des récepteurs orphelins exprimés au cours de la métamorphose (Fisk and Thummel, 1995). *DHR78* code un récepteur orphelin exprimé au cours des différents stades larvaires. Cependant, des niveaux plus importants sont observés pendant la deuxième moitié du troisième stade larvaire et dans la prépupe, quand la concentration en ecdysone a augmenté (Fisk and Thummel, 1995; Zelhof et al., 1995). En accord avec cette réponse hormonale observée *in vivo*, l'expression du gène *DHR78* est induite après l'ajout d'ecdysone dans le milieu de culture de tissus larvaires cultivés *in vitro* (Fisk and Thummel, 1995). Pourtant, au niveau des chromosomes polytènes, le locus du gène *DHR78* ne correspond pas à la formation d'un puff précoce.

Par ailleurs, le récepteur hormonal orphelin *DHR78* est capable de se fixer comme un homodimère à l'ADN au niveau de sites de fixation de l'hétérodimère *EcR/USP*. Ceci suggère que *DHR78* pourrait interférer avec l'action du récepteur de l'ecdysone (Fisk and Thummel, 1995; Zelhof et al., 1995). Une telle hypothèse est étayée par des expériences de transfection en culture de cellules. La transfection de *DHR78* inhibe la réponse transcriptionnelle induite par l'hétérodimère *EcR/USP* associé à son ligand (Zelhof et al., 1995).

L'expression de *DHR78* a déjà pris place au milieu du troisième stade larvaire quand le gène *EcR* est encore peu exprimé. Ceci suggère qu'il n'est pas exprimé sous contrôle du récepteur hormonal *EcR*. Il serait exprimé par un signal hormonal différent de l'ecdysone. De plus la surexpression de *DHR78* dans un contexte sauvage ne conduit pas à des défauts observables, contrairement à ce qui est observé pour la surexpression d'autres récepteurs

orphelins. Ce résultat suggère que l'activité de *DHR78* est régulée soit par des modifications post-traductionnelles soit par interaction avec un co-facteur (Fisk and Thummel, 1998).

L'obtention de mutants nuls spécifiques du gène *DHR78* a montré que ce gène était requis pour la formation du puparium. Les larves mutantes présentent un défaut dans la formation des trachées, une taille réduite et un asynchronisme de développement. Ces phénotypes apparaissent à partir du milieu du troisième stade larvaire, à un moment où l'on observe normalement une augmentation de la transcription de *DHR78* (Fisk and Thummel, 1998).

L'expression des gènes précoces est très affectée dans des larves mutantes pour *DHR78*. L'induction des gènes *EcR*, *E74B* et *BR-C* est très diminuée et le gène *E74A* n'est pas exprimé. L'expression de différents gènes effecteurs de la métamorphose, comme le gène du *Fbp1*, est affectée dans un tel mutant. L'expression du gène *Fbp1* est modulée par le gène *BR-C* (Lepesant et al., 1986). Dans ce contexte, l'absence d'expression du gène *Fbp1* pourrait être une conséquence de la diminution d'expression des gènes précoces *EcR* et *BR-C*.

L'absence de produit du gène *DHR78* a pour effet de bloquer toute la cascade génétique décrite dans le modèle d'Ashburner. Le gène *DHR78* pourrait être un des gènes les plus en amont de la cascade d'Ashburner (Figure 14). Il pourrait agir comme facteur de compétence permettant l'expression des gènes précoces au cours du développement larvaire, au moment du premier pic d'ecdysone (Fisk and Thummel, 1998).

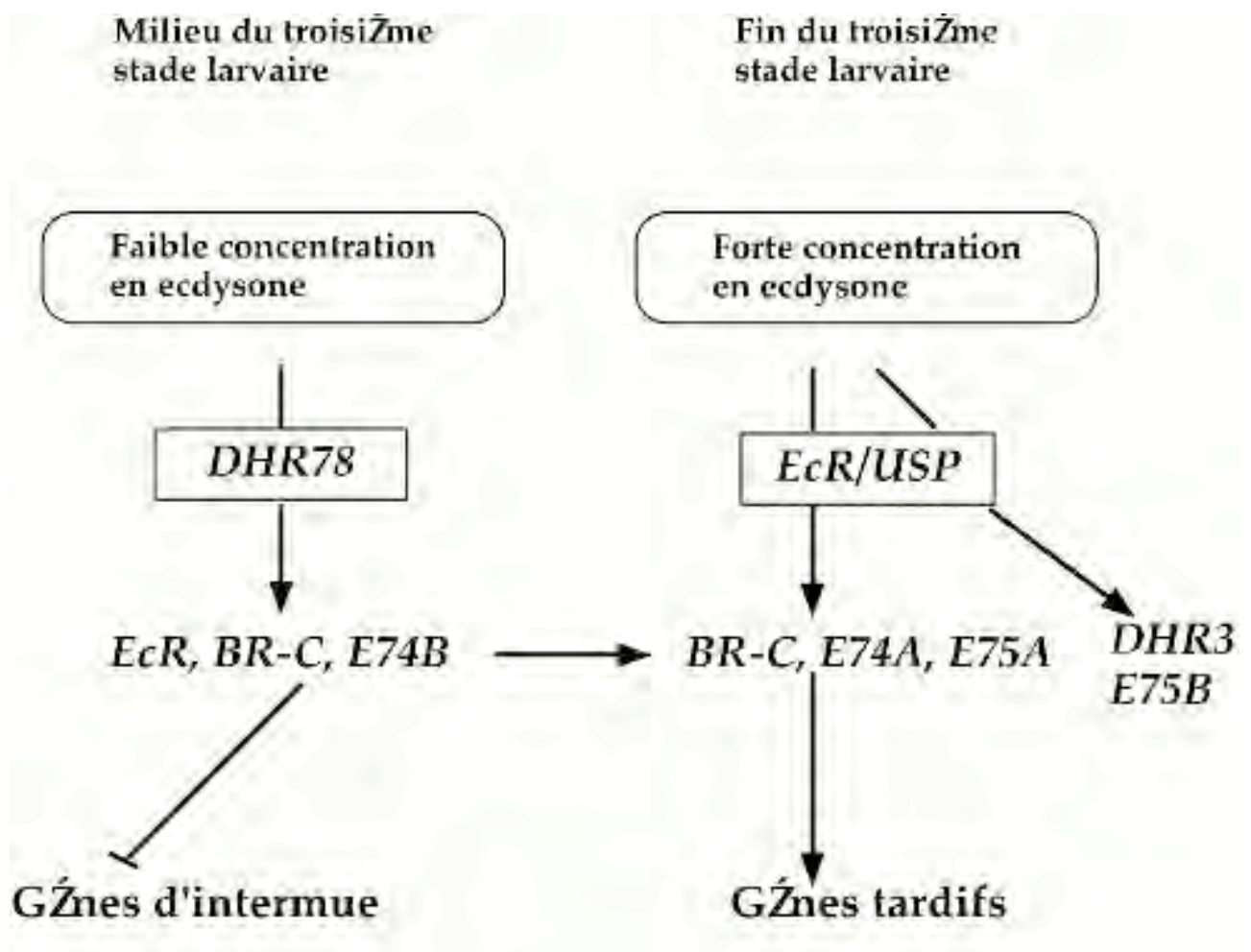


Figure 14 : Le gène *DHR78*, facteur de compétence pour l'expression des gènes précoces au milieu du troisième stade larvaire.

Le gène *DHR78* est induit au milieu du troisième stade larvaire avant l'expression de certaines isoformes des gènes précoces *EcR*, *BR-C*, *E74*. Il pourrait agir comme un facteur de compétence pour l'expression de ces isoformes qui répriment l'expression des gènes d'intermue.

En fin de troisième stade larvaire, le récepteur hormonal *EcR/USP* est requis pour l'expression d'autres isoformes des gènes précoces, isoformes requises pour l'expression des gènes tardifs. (d'après Fisk et Thummel, 1998).

7. La transition mid-pré pupale.

7.1. Les gènes "précoces-tardifs".

Les gènes *E78*¹ et *DHR3* sont classés dans la catégorie des gènes précoces ayant une période d'induction retardée et une expression qui perdure jusqu'à la formation du puparium (Figure 11). Ces gènes précoces à expression plus tardive sont induits directement par l'ecdysone, à forte concentration, même en présence de cycloheximide. Cependant, la présence de l'inhibiteur de synthèse protéique conduit à une induction plus faible. Ce résultat indique que des facteurs supplémentaires participent à leur activation maximale. La nécessité de ces facteurs supplémentaires pourrait expliquer l'expression plus tardive de ces gènes.

a- Le gène *E78*

Le gène *E78* code deux isoformes *E78A* et *E78B* appartenant toutes les deux à la superfamille des récepteurs nucléaires, sans ligand connu (Figure 12) (Stone and Thummel, 1993). L'isoforme *E78B* diffère de l'isoforme *E78A* par l'absence de domaine de liaison à l'ADN. L'expression de l'isoforme *E78B* connaît deux périodes distinctes : l'une au tout début de la formation du puparium, et l'autre 48 h plus tard dans la pupa (Figure 13). L'isoforme *E78A* n'est exprimée que pendant un bref intervalle autour de 35h après la formation du puparium. Elle présente une forte similarité avec le récepteur orphelin de vertébrés Rev-Erb. Cependant, malgré cette similarité, *E78A* ne se fixe pas sur un élément de réponse de Rev-Erb (Horner et al., 1995). Des études supplémentaires seraient nécessaires pour déterminer si *E78A* a besoin d'un partenaire pour se fixer sur cet élément de réponse ou s'il se fixe sur un autre élément de séquence éloignée.

b- Le gène *DHR3*

¹ Les gènes *DHR78* et *E78*, induits par l'ecdysone et appartenant à la superfamille des récepteurs orphelins, sont bien deux gènes distincts. Le gène *DHR78* correspond au locus 78D4 et le gène *E78* au niveau du puff 78C.

Le gène *DHR3* correspond également un locus complexe, comme tous les gènes précoces (Figure 12). Ce locus code au moins trois transcrits de taille différente exprimés après la formation du puparium (Figure 13) (Koelle et al., 1992). Jusqu'à présent, une seule isoforme a été décrite, qui présente une forte similarité avec le récepteur orphelin ROR α (retinoid related orphan receptor α) (Giguere et al., 1994). De la même manière que ROR α , la protéine DHR3 est capable de se fixer comme un monomère sur son élément de réponse (Horner et al., 1995). Au cours du troisième stade larvaire, la surexpression ectopique de DHR3 avant la formation du puparium conduit à la répression des gènes *EcR*, *E74A*, *E75A* et *E78B*, et à l'induction prématurée du gène *FTZ-F1*. Ce résultat suggère que le gène DHR3 intervient normalement au cours du développement prépupal pour réprimer l'expression des gènes précoces et pour activer l'expression du gène *FTZ-F1* (Lam et al., 1997).

7.2. *FTZ-F1*: facteur de compétence au stade prépupal.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction de ce chapitre, le pic d'ecdysone de la phase prépupale induit à nouveau une séquence d'apparition des transcrits des gènes précoces et tardifs (Figure 11). Ce deuxième pic d'ecdysone induit également une catégorie spécifique de puffs précoces qui ne sont induits qu'au moment de la réponse prépupale à l'hormone. Ainsi, le gène précoce *E93*, contenu dans le puff 93F, n'est induit que par le pic d'ecdysone prépupal, et cela uniquement dans les glandes salivaires (Figure 15) (Baehrecke and Thummel, 1995; Richards, 1976).

G. Richards a montré que la réinduction des gènes précoces *E74*, *E75* et *BR-C* ne peut pas être obtenue dans des glandes salivaires disséquées en fin de troisième stade larvaire et maintenues à forte concentration d'ecdysone. Cette réinduction nécessite en fait une période de faible concentration en hormone accompagnée d'une activité de synthèse protéique (Richards, 1976). Une explication simple de ces résultats est qu'un ou plusieurs facteurs permettent aux tissus d'acquérir la compétence pour la réexpression des gènes précoces dans la pupa, en réponse au pic d'ecdysone prépupal. L'expression de ces facteurs de compétence prendrait place pendant le début du stade prépupal et ne pourrait intervenir qu'à basse concentration en hormone (Richards, 1976).

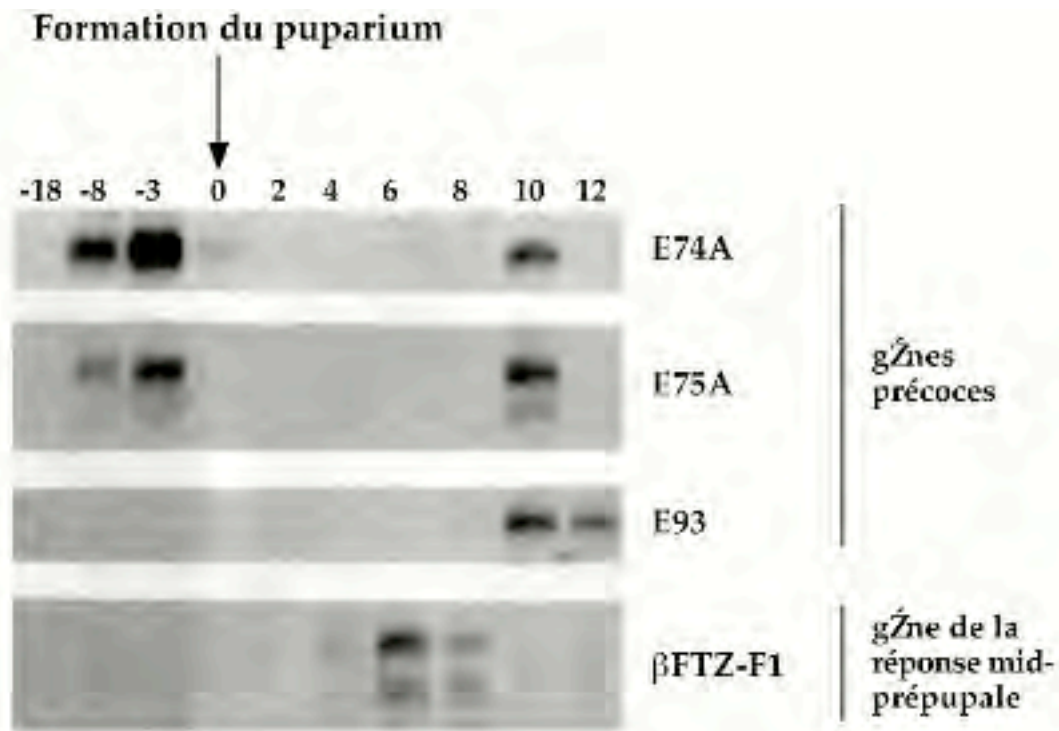


Figure 15 : Induction de l'expression des gènes précoces en réponse au pic larvaire et mid-pré pupal d'ecdysone.

Les temps sont indiqués en heures par rapport à la formation du puparium. L'induction des gènes précoces en réponse à l'augmentation de la concentration en ecdysone à la fin du troisième stade larvaire et au milieu de la phase pré pupale est montrée pour les isoformes E74A et E75A des gènes précoces E74 et E75. Le gène précoce E93 est un gène spécifique du développement pré pupal (d'après Woodard *et al.*, 1994).

Le gène *FTZ-F1* code deux protéines, \square *FTZ-F1* et \square *FTZ-F1*, différant dans la partie amino-terminale mais présentant un domaine carboxy-terminal commun (Figure 12). Cette région carboxy-terminale contient un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison du ligand caractéristiques des récepteurs nucléaires (Lavorgna et al., 1993; Lavorgna et al., 1991). L'expression et la fonction de \square *FTZ-F1* ne sont observées qu'au cours des étapes précoces de l'embryogenèse (Guichet et al., 1997). En revanche, \square *FTZ-F1* est exprimée en fin d'embryogenèse et au milieu du stade prépupal juste après l'expression de *E78B* et *DHR3* (Figure 13) (Lavorgna et al., 1993). Ces observations suggèrent que \square *FTZ-F1* serait un bon candidat au rôle de facteur de compétence pour la réinduction des gènes précoces au cours du développement prépupal.

A l'appui de cette hypothèse, des expériences réalisées sur des glandes salivaires en culture ont montré que la transcription du gène \square *FTZ-F1* est réprimée par l'ecdysone (Woodard et al., 1994).

De plus, l'utilisation d'un anticorps spécifique de \square *FTZ-F1* a révélé que ce facteur est fixé au niveau de nombreux puffs, induits par l'ecdysone, sur les chromosomes polytènes des glandes salivaires de stade prépupal. Les puffs précoces 74EF, 75B et 93F sont les puffs les plus fortement marqués au cours de cette détection (Lavorgna et al., 1993).

Enfin, dans des glandes salivaires de prépupe, cultivées *in vitro*, surexprimant \square *FTZ-F1*, on observe une induction de l'expression des gènes précoces *BR-C*, *E74A*, *E75A*. La surexpression de \square *FTZ-F1* permet également d'observer l'expression prématurée du gène *E93*, gène précoce spécifique de la réponse prépupe. Ce résultat indique que l'expression de \square *FTZ-F1* est suffisante pour permettre la réponse prépupe à l'ecdysone (Woodard et al., 1994).

L'ensemble de ces trois études montre que le facteur \square *FTZ-F1* présente la caractéristique définie par G. Richards (Richards, 1976) et agit comme un facteur de compétence au cours du développement prépupal.

Cette fonction est confirmée par l'observation de mutants du gène \square *FTZ-F1*. Dans une prépupe mutante, l'expression des gènes précoces est très faible, à l'exception de celle de *E75B* qui est normale. Les expressions de *DHR3* et de *EcR* ne sont pas modifiées (Broadus et al., 1999).

Deux mécanismes peuvent être proposés à partir de ces observations pour expliquer le rôle de facteur de compétence de \square *FTZ-F1*.

Le facteur \square *FTZ-F1* pourrait agir comme un facteur relevant la répression de l'expression des gènes précoces observée au moment de la formation du puparium. Cette

répression est en partie exercée par les facteurs DHR3 et E75B (Lam et al., 1997; White et al., 1997). Cependant, $\square FTZ-F1$ ne régule pas directement l'expression de ces deux gènes car celle-ci n'est pas modifiée dans un mutant $\square FTZ-F1$ (Broadus et al., 1999). La relève de l'inhibition exercée par DHR3 et E75B sous l'action $\square FTZ-F1$ devrait donc s'exercer à un niveau post-traductionnel.

Alternativement, $\square FTZ-F1$ pourrait conférer une compétence à répondre à l'ecdysone en augmentant l'activité du récepteur EcR/USP. Ceci pourrait expliquer pourquoi les gènes E74 et E75 sont exprimés à des niveaux comparables en fin de troisième stade larvaire et dans la prépupe alors que la concentration en ecdysone est trois fois plus faible dans la prépupe (Karim and Thummel, 1992). Cependant $\square FTZ-F1$ n'apparaît pas augmenter l'activité du récepteur par l'augmentation de la quantité de transcrite *EcR*. En effet, le niveau de transcrite d'*EcR* est normal dans un mutant $\square FTZ-F1$ (Broadus et al., 1999). Le facteur $\square FTZ-F1$ pourrait exercer son action par des interactions avec l'hétérodimère EcR/USP.

7.3. Contrôle temporel de l'acquisition de la compétence : mécanismes de la transition mid-prépupe.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la surexpression de DHR3 conduit à l'expression prématurée du facteur de compétence $\square FTZ-F1$. La régulation de l'expression du gène $\square FTZ-F1$ est en fait sous un double contrôle antagoniste de DHR3 et de E75B. En effet, la surexpression simultanée de DHR3 et E75B, récepteur orphelin pour lequel l'absence du domaine à doigt à zinc empêche la fixation à l'ADN, ne permet pas d'observer l'induction prématurée de $\square FTZ-F1$ observée lors d'une simple surexpression de DHR3. Ceci suggère que E75B empêche l'induction du gène $\square FTZ-F1$ par le facteur DHR3. L'équipe de D. Hogness a montré que cette inhibition résulte de la formation d'un complexe E75B-DHR3 sur le promoteur du gène $\square FTZ-F1$. Elle fournit un mécanisme de régulation temporelle de l'expression de $\square FTZ-F1$ par lequel l'induction de ce gène est dépendante de la disparition de E75B (Figure 16) (White et al., 1997).

L'équipe de D. Hogness a également montré que DHR3 peut interagir directement avec EcR, par le domaine de liaison du ligand. Dans des cellules en culture, DHR3 peut inhiber l'induction d'un gène indicateur sous contrôle de multimères d'éléments de réponse à l'ecdysone. Cette répression est encore visible en utilisant des formes délétées

de DHR3 ne possédant plus le domaine de liaison à l'ADN. Ceci suggère que le domaine de liaison du ligand est suffisant à lui seul pour assurer la fonction répressive (White et al., 1997). Sur la base de ces résultats, K. White et ses collaborateurs proposent que le facteur DHR3 pourrait fonctionner comme un répresseur de l'expression des gènes précoces en formant un dimère avec la protéine EcR et en bloquant ainsi la réponse hormonale (Figure 16).

8. Le modèle de coordination tissulaire et ses limites.

8.1. Le modèle de coordination tissulaire

Le modèle de régulation en cascade, suivant les changements dynamiques de la concentration en ecdysone, proposé par M. Ashburner et collaborateurs, montre les relations de régulation croisées qui existent entre les facteurs de transcription codés par les gènes précoces. L'existence de ces relations croisées fournit un mécanisme de compétence pour la réponse des gènes tardifs au signal hormonal. Les gènes *DHR3* et *FTZ-F1* apparaissent comme des régulateurs temporels déterminant la transition entre les réponses larvaires et prépupales à l'ecdysone. Le mode d'action de ces récepteurs orphelins permet de proposer un mécanisme par lequel un signal hormonal unique peut contrôler l'expression temporelle spécifique d'une série de gènes. La drosophile fournit ainsi un système génétique de choix pour comprendre la fonction des récepteurs nucléaires dits orphelins au cours du développement. Ces récepteurs sont peut-être orphelins de ligand mais sûrement pas de fonction.

8.2. Extension du modèle d'Ashburner.

La description de la cascade génétique mise en œuvre pour la régulation des gènes secondaires est limitée aux glandes salivaires larvaires. En effet, l'étude des chromosomes polytènes des glandes salivaires a été un outil puissant pour identifier les régulateurs clés de cette cascade, et leur définition cytogénétique a permis leur caractérisation. Dans ce sens, la hiérarchie d'apparition des puffs dans les glandes salivaires a donné des éléments importants pour décrire des fonctions générales de régulation de gènes précoces induits

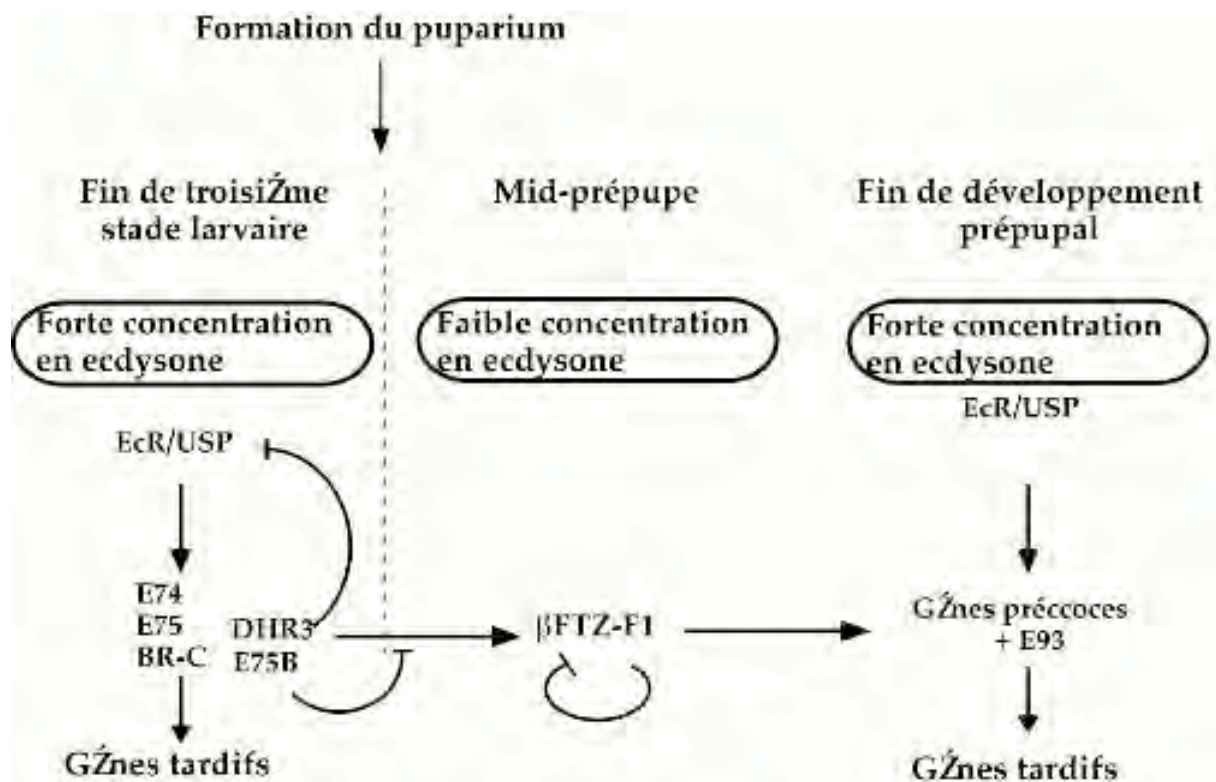


Figure 16 : Cascade génétique de régulation des gènes induits par l'ecdysone au cours de la métamorphose.

A forte concentration en ecdysone, le récepteur hormonal (EcR/USP) induit directement l'expression des gènes précoces *E74*, *E75*, *BR-C* et *E93*. Ce dernier n'est induit qu'en fin de développement prépuval. Le récepteur EcR/USP induit également l'expression du gène précoce/tardif *DHR3*. Les produits des gènes précoces et précoces/tardifs régulent leur propre transcription et activent l'expression des gènes tardifs. Ils régulent également l'expression du gène *βFTZ-F1* au milieu du développement prépuval, quand la concentration en ecdysone est faible. Le produit du gène *βFTZ-F1* régule sa propre transcription. Il agit comme un facteur de compétence permettant la réinduction des gènes précoces en fin de développement prépuval, quand la concentration en ecdysone augmente. Au cours de cette période, les produits de gènes précoces activent de nouveau l'expression de gènes tardifs (d'après Lam *et al.*, 1997).

par l'ecdysone. Il est ainsi maintenant clairement établi que l'ensemble des gènes précoces ou tardifs ne sont pas exprimés que dans ce tissu.

Le modèle de coordination tissulaire propose une extension du modèle d'Ashburner à tous les autres tissus larvaires et imaginaux (Thummel et al., 1990). Il repose sur l'observation que le moment et l'intensité de l'expression de chacun des gènes précoces peuvent varier d'un tissu à l'autre (Huet et al., 1993; Huet et al., 1995; Karim and Thummel, 1991). Ainsi chaque tissu renferme à un moment donné une combinatoire particulière et caractéristique d'expression de ces gènes précoces. Cette combinatoire particulière serait à l'origine de l'expression tissulaire spécifique des gènes tardifs, effecteurs de la métamorphose. De cette manière, ce modèle de coordination tissulaire de l'expression des gènes précoces propose d'apporter des éléments de réponse au problème général de la régulation hormonale : comment l'expression d'un gène, régulé par l'ecdysone, est restreinte à un seul ou un sous-ensemble de tissus alors que l'hormone est présente partout.

Le modèle de coordination tissulaire peut être également étendu à d'autres stades de développement. Par exemple, la maturation de la chambre ovarienne au cours de l'ovogenèse est contrôlée par l'ecdysone. Elle dépend de l'expression des gènes précoces *E74*, *E75* et *BR-C* (Buszczak et al., 1999).

De manière remarquable, cette cascade génétique est également conservée chez d'autres insectes ((Henrich and Brown, 1995) et références citées). D'une part, les homologues du gène *EcR* ont été identifiés dans d'autres espèces incluant *Chironomus tentans*, *Bombyx mori*, *Manduca sexta* et *Aedes aegypti* (Henrich and Brown, 1995). Les homologues du gène *usp* ont été identifiés à la fois chez *C. tentans*, *B. mori* et *A. aegypti*. Dans ces trois espèces, et contrairement à la drosophile, plusieurs isoformes du gène *usp* ont été identifiées (Henrich and Brown, 1995).

Par ailleurs, des homologues de certains gènes précoces ont été caractérisés. Par exemple, les gènes *MHR3* de *Manduca* et *GHR3* de *Galleria* sont les homologues du gène *DHR3* de drosophile. Ils occupent la même position dans la cascade de régulation car ils portent les caractéristiques de gènes précoces/tardifs (Henrich and Brown, 1995). L'homologue du gène précoce *E75* a été identifié chez le chironome, chez *Manduca*, chez *Galleria* et enfin chez le moustique *A. aegypti* (Henrich and Brown, 1995). Chez le dernier, comme chez la drosophile, il joue un rôle dans le contrôle de la progression de l'ovogenèse (Pierceall et al., 1999).

8.3. Les limites du modèle de coordination tissulaire.

Le modèle de coordination tissulaire attend encore d'être validé au niveau moléculaire. Une difficulté majeure est qu'à l'heure actuelle, seuls les gènes des puffs tardifs 71E (Restifo and Guild, 1986; Stone and Thummel, 1993), L82 (Stowers et al., 1999) et L63 (Stowers *et al.*, soumis pour publication) ont été caractérisés au niveau moléculaire. Cependant, deux points clés de ce modèle restent hypothétiques. Il reste à démontrer d'une part une interaction moléculaire directe entre les promoteurs des gènes tardifs et les produits des gènes précoces et d'autre part que la spécificité tissulaire d'expression des gènes tardifs dépend de cette interaction.

Par ailleurs, de nombreux gènes régulés par l'ecdysone codent des produits qui ne sont pas des facteurs de transcription mais sont plus vraisemblablement des gènes effecteurs de la métamorphose. Ils sont exprimés spécifiquement dans un petit nombre de tissus. On peut citer comme exemples les gènes des protéines cuticulaires de l'épiderme (Aplan et al., 1990; Kimbrell et al., 1989), de la dopa-décarboxylase (Clark et al., 1986), des gènes *Eip28/29* et *Eip40* (Cherbas et al., 1991), les gènes *IMP* (Natzle, 1993), le gène de la β -tubuline (Bruhat et al., 1993; Tourmente et al., 1993), les gènes des petites protéines des choc thermique *hsp 22, 23, 26, 27* (Ireland and Berger, 1982; Morganelli et al., 1985) et enfin les gènes *Lsp1*, *Lsp2* et *Fbp1* (Deutsch et al., 1989; Lepesant et al., 1982). Ces gènes effecteurs ne présentent pas les caractéristiques de gènes tardifs. Ils sont induits directement par l'ecdysone et ne correspondent pas à des puffs visibles sur les chromosomes des glandes salivaires. De plus, il n'existe pas de preuves directes d'interactions entre le promoteurs de ces gènes et le produit des gènes précoces. Ces gènes effecteurs ne sont donc pas intégrés dans le modèle d'Ashburner et à fortiori pas dans le modèle de coordination tissulaire.

Le modèle de coordination tissulaire ne peut expliquer à lui seul comment un gène régulé par l'ecdysone s'exprime dans un tissu particulier. Il faut donc faire appel à d'autres facteurs de transcription pour expliquer la restriction tissulaire d'expression des gènes cibles du signal hormonal ubiquitaire.

L'identification des gènes effecteurs tardifs reste un enjeu important pour comprendre les mécanismes qui interviennent au cours de la métamorphose pour permettre la transformation d'une larve en un adulte reproducteur. Comme nous venons de le détailler, autant les puffs précoces et les gènes régulateurs associés sont bien caractérisés, autant les gènes effecteurs correspondant aux puffs tardifs le sont très peu. De ce point de vue, l'utilisation de puces à ADN sur lesquelles ont été fixés les ADN complémentaires larvaires collectés à différents temps au moment de la formation du

puparium, sera un outil très efficace pour identifier des gènes effecteurs induits par l'augmentation de la concentration hormonale (White *et al.*, communication personnelle, sous presse dans Science).

9. L'hétérodimérisation des protéines EcR/USP est-elle la seule solution pour répondre à l'ecdysone?

Nous venons de décrire l'identification chez la drosophile de nombreux récepteurs nucléaires exprimés au cours de la métamorphose. A l'exception de USP, leur expression est induite par l'ecdysone .

Les récepteurs nucléaires des vertébrés sont capables de former un nombre important de combinaisons d'hétérodimères et ainsi d'avoir des propriétés différentes dans la régulation hormonale tout au cours du développement. On peut se demander si les protéines EcR et USP forment obligatoirement des hétérodimères entre eux ou si elles sont capables de s'associer à d'autres récepteurs nucléaires pour commander l'expression particulière de gènes cibles à une concentration donnée en ecdysone. Cette combinaison particulière pour l'expression d'un gène pourrait être également spécifique d'un tissu donné et pourrait ainsi être à l'origine du contrôle tissulaire de l'expression d'un gène en réponse à signal hormonal (Thummel, 1996).

9.1. Etude d'un mutant *usp*

Des embryons peuvent être sauvés de la létalité embryonnaire associée à une mutation du gène *usp* par la surexpression de la protéine USP à cette période de développement (Hall and Thummel, 1998). Les individus survivent alors jusqu'au troisième stade larvaire mais n'entament pas la métamorphose. Ces individus n'expriment pas les transcrits des gènes précoces *E74A*, *E75B* et *BR-C* en réponse au pic d'ecdysone de troisième stade larvaire. Cependant, de manière inattendue, au milieu de ce stade larvaire, les expressions de *EcR*, *E74B* et de certains transcrits *BR-C* ne sont pas affectées dans un tel mutant.

Il existe au moins quatre explications pour ce résultat surprenant.

La première est qu'il persiste, après la surexpression dans l'embryon, un très faible niveau, non détectable, de protéine USP au cours du troisième stade larvaire. Ce faible

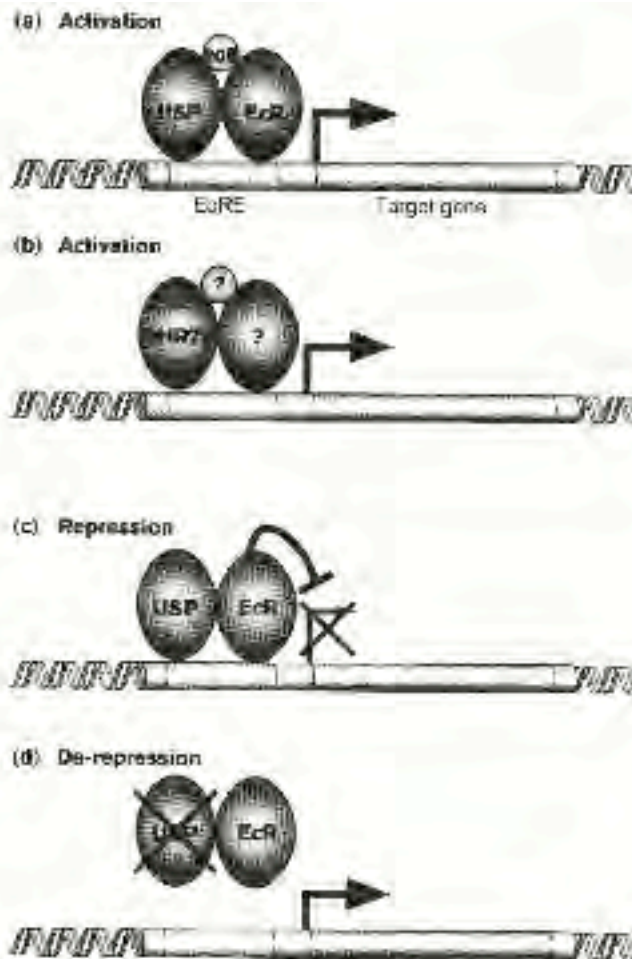


Figure 17 : Régulation de l'expression des gènes par les récepteurs de l'ecdysone

(a) La fixation de la 20-hydroxyecdysone (20E) à l'hétérodimère EcR/USP permet la fixation de ce complexe à l'EcRE (Ecdysone Response Element).

(b) DHR78 peut se fixer au niveau des mêmes EcRE et sa capacité d'induire l'expression des gènes, au milieu du troisième stade larvaire, nécessiterait un autre ligand non identifié ou un autre récepteur nucléaire.

(c) De manière similaire au récepteur de l'hormone thyroïdienne, l'hétérodimère EcR/USP, ne fixant pas la 20E, pourrait réprimer la transcription.

(d) La perte d'un des composants du récepteur hormonal pourrait ainsi conduire à l'activation transcriptionnelle des gènes cibles en relevant la répression exercée par le récepteur hormonal non associé à son ligand. (d'après Buszczak et Segaves, 1998).

niveau est cependant suffisant pour induire la réponse hormonale au milieu du troisième stade larvaire, quand la concentration en ecdysone est basse.

La deuxième explication possible est qu'il existe une composante non hormonale à l'expression des gènes les plus précoces.

Une explication alternative est, qu'à la manière du récepteur à l'hormone thyroïdienne, le récepteur de l'ecdysone peut aussi agir comme un répresseur de l'expression de gènes cibles. Ainsi l'absence de récepteur hormonal peut provoquer une dérégulation de l'expression des gènes (Figure 17).

Enfin, la réponse à l'ecdysone pendant le milieu du troisième stade larvaire impliquerait un récepteur ne contenant pas la protéine USP. La question est dès lors de savoir si un tel récepteur existe. Celui-ci pourrait être constitué d'un homodimère d'EcR, d'un hétérodimère entre la protéine EcR et un autre partenaire ou encore il pourrait être un tout autre récepteur hormonal non encore identifié. Il est à noter que dans ce contexte, plusieurs études indépendantes, notamment celle concernant DHR78 et présentée dans le paragraphe 6.3. de ce chapitre, ont suggéré que les récepteurs orphelins peuvent moduler la réponse au signal hormonal (Figure 17). Ces récepteurs orphelins pourraient entrer en compétition avec le récepteur EcR/USP au niveau de leur fixation à l'ADN ou entrer en compétition avec EcR ou USP pour former des hétérodimères (Broadus et al., 1999; Fisk and Thummel, 1998).

9.2. USP : un récepteur de l'hormone ecdysone uniquement ?

Nous pouvons également nous poser la question de savoir si USP peut avoir, en dehors de son association avec son partenaire EcR, une autre fonction de récepteur pour un autre ligand hormonal.

Sur la base de sa ressemblance structurale avec d'autres ligands de récepteurs nucléaires, en particulier avec l'acide rétinoïque, il est très probable que l'hormone juvénile (JH) agit par une interaction avec un récepteur hormonal nucléaire. L'hormone juvénile est une petite molécule hydrophobe responsable de la modulation de la réponse aux ecdystéroïdes et ayant des fonctions au cours du développement et de la reproduction. Un des effets les mieux caractérisés de la JH est de moduler la production de cuticule en réponse au signal ecdysone. Ainsi, une cuticule larvaire est formée en présence de JH, et une cuticule pupale en son absence.

La formation d'une cuticule larvaire supplémentaire est observée au moment de la formation du puparium dans des mutants *usp*. Ce résultat est similaire à celui obtenu après l'addition de JH. Il suggère que le gène *usp* pourrait participer à la régulation par la JH (Hall and Thummel, 1998).

De récents résultats ont indiqué que l'hormone JH peut se fixer à la protéine USP et stimuler sa dimérisation aussi bien *in vitro* que dans la levure. Ces résultats suggèrent que la protéine USP pourrait être un composant du récepteur de la JH (Jones and Sharp, 1997).

La possibilité que USP puisse agir comme le récepteur de la JH conduit à envisager l'hypothèse que la JH module l'activité de l'hétérodimère EcR/USP dans la réponse à l'ecdysone. Il reste à déterminer si la JH agit via une interaction avec le récepteur EcR/USP lui-même, ou un homodimère de USP, ou bien un hétérodimère contenant USP et un autre récepteur nucléaire.

CHAPITRE 2

LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE LA FAMILLE GATA

1. Portrait de famille des facteurs GATA.

1.1. Caractéristiques générales.

Les facteurs de transcription de la famille GATA sont des protéines nucléaires régulatrices qui contrôlent et coordonnent l'expression de nombreux gènes. Le domaine de fixation à l'ADN dans ces facteurs GATA est retrouvé très conservé au cours de l'évolution.

a- Structure du domaine de liaison à l'ADN.

La caractéristique commune aux facteurs de la famille GATA est la présence d'un domaine à doigts à zinc. Ce domaine comporte en général deux doigts à zinc de type Cys-X2-Cys-X17-Cys-X2-Cys. Cette structure en doigt à zinc représente l'élément conservé à travers l'évolution alors que les séquences en acides aminés situées de part et d'autre sont très divergentes. Il est également à noter l'existence d'une forte homologie entre le doigt amino-terminal (N-f) et carboxy-terminal (C-f) au sein d'un même facteur GATA.

b- Séquence consensus de fixation.

Les facteurs GATA, identifiées chez la levure, le champignon, le nématode et la drosophile se fixent à une séquence consensus de type (A/T)GATA(A/G) sous forme monomérique ou homodimérique. Crossley et ses collaborateurs ont montré que le facteur GATA-1 humain est capable de former des homodimères en solution, sans fixation à un site cible, mais également des hétérodimères avec les facteurs GATA-2 et GATA-3 humains (Crossley et al., 1995). La fixation de ces hétérodimères ne semble pas être accompagnée de changement de la spécificité de reconnaissance du site cible par rapport aux homodimères.

Ces homo ou hétérodimères sont tous capables de se fixer sur un site consensus. Les auteurs montrent dans cette étude que le doigt C-f assure la double fonction de fixation à l'ADN et d'interface de dimérisation. Le doigt N-f aurait une fonction de stabilisation de liaisons ADN/protéine ou protéine/protéine.

1.2. Les facteurs GATA des vertébrés.

Six facteurs GATA ont été caractérisés chez les vertébrés (Table 1). Ils peuvent être classés en deux sous-familles selon leur profil d'expression spécifique. Les facteurs GATA-1, 2 et 3 sont exprimés essentiellement dans les lignées hématopoïétiques (Fujiwara et al., 1996; Pandolfi et al., 1995; Ting et al., 1996; Tsai et al., 1994). Les facteurs GATA-4, 5, 6 sont exprimés majoritairement dans le cœur, le poumon, l'intestin ainsi que dans le cerveau (Table1) (Arceci et al., 1993; Laverriere et al., 1994; Soudais et al., 1995; Tamura et al., 1993).

a- Les facteurs GATA-1, 2 et 3.

Le facteur GATA-1 a été le premier facteur GATA caractérisé chez les mammifères, comme régulateur de l'expression des gènes de globine. Des sites cibles pour ce facteur sont retrouvés dans les promoteurs de tous les gènes érythroïdes analysés (Orkin, 1995). Il est exprimé dans les érythroblastes matures mais aussi dans les mégacaryocytes, les mastocytes, les éosinophiles et dans les progéniteurs multipotents de moelle osseuse. Le facteur GATA-1 est également exprimé dans les cellules de Sertoli (Table 1).

Le facteur GATA-2 est exprimé au stade précoce des cellules souches de la lignée hématopoïétique mais aussi dans les cellules endothéliales.

Le facteur GATA-3 est lui exprimé dans les lymphocytes T à tous les stades de développement. On le retrouve également dans d'autres tissus embryonnaires non hématopoïétiques comme les glandes surrénales, le placenta. Les facteurs GATA-2 et GATA-3 sont les seuls facteurs GATA exprimés dans le cerveau au cours du développement.

La capacité des facteurs GATA de se fixer au niveau d'un même site cible et leur co-expression dans plusieurs sous-lignées hématopoïétiques conduit à se demander si un même gène peut être régulé par plusieurs facteurs GATA.

Pour aborder ces questions, une première approche a consisté à muter sélectivement chez la souris les gènes codant ces facteurs GATA. Elle a permis de générer des animaux mutants pour les gènes GATA-1, 2 ou 3 et d'étudier les anomalies de développement induites par ces mutations (Table 1) (Orkin, 1995). Chez les mutants GATA-1, le développement de la lignée érythroïde est arrêté au stade proérythroblaste (Pevny et al., 1995). En revanche, on n'observe pas de défaut de maturation dans les autres lignées cellulaires comme la lignée mégacaryocytaire dans laquelle GATA-1 est aussi exprimé. Ce

résultat suggère que le facteur GATA-1 n'est essentiel que dans les lignées érythroïdes.

FACTEURS	PROFIL D'EXPRESSION	DEFAUT EN CAS D'INACTIVATION
GATA-1	Cellules érythroïdes Mégacaryocytes Mastocytes Cellules de Sertoli	Lignée érythroïde
GATA-2	Cellules progénitrices de la lignée érythroïde, mégacaryocytaire Cellules endothéliales Cerveau embryonnaire	Cellules progénitrices de la lignée érythroïde
GATA-3	Lymphocytes T Foie Foetal Glandes surrénales Placenta Système nerveux central et périphérique	Développement hématopoïétique. Hémorragie, Lésions nerveuses
GATA-4	Coeur, Cerveau Endothélium intestinal	Différenciation du muscle cardiaque
GATA-5	Coeur, Poumons, Intestin	Pas de défaut
GATA-6	Coeur, Poumons, Intestin	Différenciation de l'endoderme viscéral et bronchique

Table 1 : Profils d'expression des facteurs GATA de vertébrés et profils d'expression en cas d'inactivation.

Dans la lignée mégacaryocytaire, ce facteur n'est soit pas essentiel, soit il existe la possibilité d'un remplacement fonctionnel par un autre facteur GATA (Pevny et al., 1995). L'inactivation du gène GATA-2 conduit à l'absence complète de cellules hématopoïétiques. Ceci confirme l'importance de l'expression du facteur GATA-2 dans les cellules souches et son rôle majeur dans les étapes précoces de l'hématopoïèse (Tsai et al., 1994). Chez les mutants GATA-3, le tableau phénotypique est dominé par un faible nombre de cellules hématopoïétiques, une absence de plaquettes, de nombreuses anomalies morphologiques notamment au niveau des systèmes nerveux central et périphérique (Pandolfi et al., 1995).

A l'issue de ces études, il semble difficile de détailler le rôle spécifique de chacun des facteurs GATA-1, 2, 3 dans la différenciation des cellules érythroïdes. Il apparaît également difficile de discriminer entre l'existence d'une spécificité propre ou d'une redondance fonctionnelle entre les différents facteurs GATA. En effet, le facteur GATA-1 est requis spécifiquement pour la différenciation érythroïde, mais il est remplaçable par d'autres facteurs pour la différenciation mégacaryocytaire. De plus, le rôle spécifique d'un facteur GATA peut varier au cours du développement. Ainsi, au cours de la différenciation des cellules érythroïdes, le facteur GATA-2 peut se substituer au facteur GATA-1 pendant les étapes des cellules progénitrices, mais il ne peut plus le faire au stade proérythroblastes (Pevny et al., 1995).

b- Les facteurs GATA-4, 5 et 6

Les facteurs GATA-4 à 6 forment la deuxième sous-famille des facteurs GATA (Table 1). Ces facteurs présentent entre eux une forte homologie dans le domaine à doigts à zinc mais aussi une homologie importante en dehors de ce domaine. L'existence de cette homologie étendue reste particulière à ces 3 facteurs GATA. Les facteurs GATA-4, 5, 6 ont des domaines d'expression restreints au cœur et à l'intestin. Chez la souris, l'extinction du gène GATA-4 conduit à l'absence de formation du cœur ce qui confirme son implication dans la cardiogenèse (Kuo et al., 1997; Molkenin et al., 1997). De façon intéressante, dans ce contexte, on observe une augmentation de la transcription de GATA-6, ce qui suggère que les facteurs GATA pourraient réguler mutuellement leur expression. L'inactivation du gène GATA-6 conduit à une létalité très précoce due à des défauts dans la différenciation de l'endoderme et dans le développement des annexes embryonnaires (Koutsourakis et al., 1999; Morrissey et al., 1998). En revanche, l'inactivation du gène GATA-5 est viable suggérant une redondance fonctionnelle avec d'autres gènes GATA (Molkenin et al., 1997).

1.3. Les facteurs GATA identifiés chez la drosophile.

Chez la drosophile, trois membres de la famille GATA ont été caractérisés. Comme chez les vertébrés, l'appartenance à cette famille repose sur la conservation de la structure du domaine à doigt à zinc caractéristique. En dehors de ce domaine, les séquences sont très divergentes. Les profils d'expression et les fonctions de ces trois facteurs sont également très différents.

a- Le facteur dGATAa/pannier.

Le facteur dGATAa, codé par le gène *pannier*, possède un domaine à deux doigts à zinc similaire à celui du facteur GATA-1 de vertébrés. Au cours du développement embryonnaire, dGATAa est fortement exprimé dans l'épiderme dorsal suggérant un rôle dans la détermination de l'identité dorsale (Winick et al., 1993).

Des mutations dans le domaine à doigt à zinc de dGATAa conduisent à la surexpression des gènes proneuraux *achaete* et *scute (acs)* et au développement de précurseurs neuronaux supplémentaires (Ramain et al., 1993). Ce résultat suggère un rôle dans la différenciation du système nerveux périphérique. Le facteur dGATAa décrit comme un régulateur négatif des gènes *acs* se fixe directement sur un site cible dans leur promoteur (Garcia-Garcia et al., 1999).

La régulation négative des gènes *acs* dépend d'une interaction de dGATAa avec un co-répresseur codé par le gène *U-shaped (Ush)* (Cubadda et al., 1997; Haenlin et al., 1997). Nous détaillerons par la suite la structure à doigts à zinc de ce co-répresseur, caractéristique des co-facteurs des protéines GATA (paragraphe 3.2.b.). Le doigt amino-terminal de dGATAa est impliqué dans l'interaction avec *Ush*. Cette interaction a pour effet d'inhiber l'activité transcriptionnelle médiée par dGATAa. Ainsi, dans le territoire où dGATAa et *Ush* sont co-exprimés, le gène *acs* n'est pas exprimé. Dans le territoire d'exclusion d'expression de *Ush*, dGATAa active l'expression de *acs*. Cette régulation négative de l'activité de dGATAa par *Ush* permet une régionalisation de l'expression du gène *acs* et ainsi une régionalisation de la position des précurseurs proneuraux dans la partie dorsale (Garcia-Garcia et al., 1999).

b- Le facteur dGATAb/serpent.

Le facteur dGATAb, codé par le gène *serpent (srp)*, a été identifié d'abord comme un facteur strictement requis pour le développement de l'intestin et de l'amnioséreuse (Reuter, 1994). Ce facteur est également essentiel pour la différenciation des hémocytes, cellules qui correspondraient aux cellules sanguines chez l'homme et qui sont également impliquées dans les processus de défense immunitaire chez la drosophile (Rehorn et al., 1996; Sam et al., 1996). De plus, ce facteur est requis pour la différenciation du corps gras embryonnaire dont il constitue le marqueur le plus précoce (Sam et al., 1996). Deux études récentes montrent, qu'au cours de la gastrulation, l'expression de dGATAb conduit à la différenciation du mésoderme en corps gras alors que son absence d'expression conduit à la différenciation du mésoderme en gonades (Moore et al., 1998; Riechmann et al., 1998).

Le facteur dGATAb présente la particularité de ne posséder qu'un seul doigt à zinc contre deux pour les facteurs GATA de vertébrés. Cet unique doigt à zinc de dGATAb pourrait correspondre au doigt à zinc du facteur GATA ancestral. Il aurait été dupliqué pour former les facteurs GATA de vertébrés possédant un domaine à deux doigts à zinc homologues l'un avec l'autre (Rehorn et al., 1996).

Il apparaît que le facteur dGATAb est requis pour l'hématopoïèse comme le sont les facteurs GATA-1, 2 et 3 chez les vertébrés. Il est également impliqué dans la formation de l'intestin comme les facteurs GATA-4, 5 et 6. Le facteur dGATAb pourrait ainsi être considéré comme le gène orthologue de l'ensemble des facteurs GATA de vertébrés. Il regrouperait toutes les fonctions qui ont été distribuées parmi les six facteurs GATA de vertébrés (Rehorn et al., 1996). Il est cependant à noter que l'hématopoïèse est considérablement simplifiée chez les insectes.

c- Le facteur dGATAc/grain.

La forte conservation de séquence du domaine à doigt à zinc parmi les facteurs de la famille GATA a permis d'isoler le facteur dGATAc (Lin et al., 1995). Au cours de l'embryogenèse, le transcrit dGATAc est détecté dans de nombreux tissus comme l'intestin, le système nerveux central et les spiracles postérieurs.

Très récemment, l'étude de la fonction du facteur dGATAc a été complétée par la génération d'anticorps spécifiques qui ont permis d'en préciser sa localisation nucléaire. Le facteur dGATAc est exprimé dans la tête, le système nerveux central, les spiracles postérieurs et l'intestin (Brown et Castelli-Gair, résultats non publiés). Ces résultats sont en accord avec la localisation du transcrit détecté dans l'étude précédente (Lin et al., 1995).

Par ailleurs, à la suite d'un crible génétique, un mutant du gène *grain*, gène codant pour le facteur dGATAc, a été isolé. Dans ce mutant, la protéine dGATAc est absente. Cette absence conduit à une létalité embryonnaire traduisant le rôle essentiel de ce facteur au cours du développement précoce. Cette létalité est associée à un défaut dans le développement de la tête et dans la formation des appendices respiratoires (Brown et Castelli-Gair, résultats non publiés).

2. Les facteurs GATA et leurs gènes cibles : un système très conservé.

Les facteurs GATA, en association avec d'autres facteurs régulateurs, se trouvent impliqués dans la régulation de plusieurs processus fondamentaux conservés au cours de l'évolution depuis la drosophile jusqu'à l'homme.

Nous examinerons la conservation des mécanismes moléculaires mis en jeu pour le développement cardiaque. Ensuite nous aborderons le contrôle exercé par le facteur dGATAb au cours de la réponse immunitaire. Enfin, nous étudierons les mécanismes de régulation par le facteur dGATAb de gènes exprimés dans le tissu adipeux de la drosophile, tissu analogue fonctionnellement au foie des mammifères. Chacun de ces exemples sera abordé à travers l'expression de gènes particuliers.

2. 1. Le gène *Dmef2* et le développement du cœur

Malgré des différences morphologiques évidentes existant entre le cœur de la drosophile et des vertébrés, il apparaît de façon remarquable que de nombreux mécanismes moléculaires orchestrant le développement harmonieux de cet organe sont conservés entre les insectes et les mammifères.

a- La formation du cœur chez la drosophile

Les cellules précurseurs du cœur sont formées de façon bilatérale dans la partie dorsale du mésoderme thoracique. Ces cellules précurseurs fusionnent ensuite dans la partie dorsale centrale de l'embryon pour former une structure tubulaire. Cette structure

contractile permet la circulation de l'hémolymphe dans tout le corps de la larve. Ce cœur est constitué de deux types cellulaires majeurs : les cellules musculaires contractiles également appelées cellules cardiaques, et les cellules péricardiales flanquant les cellules cardiaques. Les cellules péricardiales n'expriment pas de marqueurs musculaires.

Le cœur des vertébrés est constitué de plusieurs cavités, regroupant un grand nombre de cellules spécialisées, l'ensemble étant connecté à un système circulatoire complexe. Malgré ces différences morphologiques importantes, il existe des similarités de développement : chez les vertébrés, comme chez les invertébrés, le cœur est assemblé à partir de cellules précurseurs déterminées de chaque côté de l'axe antéro-postérieur et qui se rejoignent au cours de la gastrulation (Bodmer and Venkatesh, 1998).

b- Régulation de l'expression du gène *Dmef2*

1) L'enhancer cardiaque du gène *Dmef2*

Quatre gènes *MEF2* (*myocytes enhancer factor-2*) ont été caractérisés chez les vertébrés. Il n'existe qu'un seul gène homologue *Dmef2* chez la drosophile. Comme chez les vertébrés, ce gène est exprimé dans les cellules myogéniques cardiaques, somatiques et viscérales (Olson et al., 1995). Dans un mutant pour le gène *Dmef2*, les cellules souches des cellules myogéniques existent, mais leur différenciation n'a pas lieu. Ce phénotype de la mutation indique que ce gène contrôle les étapes tardives du développement du muscle cardiaque et non sa détermination (Bour et al., 1995; Lilly et al., 1995). Le facteur de différenciation D-MEF2 active la transcription de différents gènes codant des protéines de structure impliquées dans l'activité contractile du cœur (Bour et al., 1995; Lilly et al., 1995; Ranganayakulu et al., 1995).

L'étude du promoteur du gène *Dmef2* a été réalisée pour appréhender le rôle du gène *Dmef2* dans les lignages musculaires et la participation d'autres facteurs de transcription dans ce processus. Elle a permis la caractérisation de deux enhanceurs. L'un est requis pour l'activation spécifique de *Dmef2* dans les précurseurs des cellules cardiaques. L'autre est requis pour son expression dans les précurseurs des cellules musculaires (Cripps et al., 1998; Gajewski et al., 1997).

2) Le facteur *Tinman* et ses homologues vertébrés.

L'étude de l'enhancer requis pour l'expression du gène *Dmef2* dans les cellules cardiaques a montré qu'il était la cible directe du facteur *Tinman* (Gajewski et al., 1997). Le facteur *Tinman* se fixe sur cet enhancer au niveau de deux sites distincts, tous deux essentiels pour l'activité de l'enhancer de *Dmef2*. De plus, son expression ectopique conduit à une expression ectopique de *Dmef2* en dehors des cellules cardiaques (Gajewski et al., 1997).

Le facteur *Tinman* est un facteur de transcription possédant un homéodomaine. Au début du développement embryonnaire, il est exprimé uniformément dans le mésoderme présomptif. Après la gastrulation, son expression est restreinte à la partie dorsale du mésoderme, partie qui donnera lieu à la formation du cœur et des cellules musculaires. Ensuite, *Tinman* est exprimé transitoirement dans le mésoderme viscéral et de façon stable dans le cœur en formation comprenant les cellules cardiaques et péricardiales. Une mutation du gène *Tinman* conduit à l'absence de formation du cœur et des autres dérivés

mésodermiques (Bodmer and Venkatesh, 1998). La surexpression de *Tinman* ne conduit pas à la formation ectopique de tissu cardiaque. Ce résultat suggère que la capacité activatrice de *Tinman* pourrait nécessiter la présence de co-facteurs (Gajewski et al., 1997; Yin and Frasch, 1998).

L'importance du facteur *Tinman* dans la différenciation du cœur de la drosophile a conduit plusieurs équipes à chercher des homologues vertébrés. Le premier homologue identifié chez la souris est le gène *Nkx2-5* (Lints et al., 1993). Une mutation de ce gène permet la formation du tube cardiaque, mais le développement s'arrête rapidement et l'on n'observe pas d'expression des marqueurs myogéniques. De façon très intéressante, l'expression du gène *Nkx2-5* dans des embryons de drosophile mutants pour le gène *Tinman*, conduit à un sauvetage partiel de la formation du cœur. Le gène *Nkx2-5* est capable de se substituer fonctionnellement au gène *Tinman* (Bodmer and Venkatesh, 1998).

Par la suite, en plus du gène *Nkx2-5*, d'autres homologues du gène *Tinman* ont été identifiés dans de nombreuses espèces. Les facteurs appartenant à cette famille Nkx sont très conservés et présentent tous des homéodomains. Ils sont tous exprimés au cours du développement cardiaque (Newman and Krieg, 1998; Tanaka et al., 1998).

3) Les facteurs GATA

L'enhancer impliqué dans l'expression du gène *Dmef2* dans les cellules cardiaques contient un site de fixation pour les facteurs de transcription de la famille GATA. L'intégrité de ce site est requise pour l'activité de cet enhancer (Gajewski et al., 1998). En effet, la mutation de ce site de fixation abolit l'expression de *Dmef2* dans les cellules cardiaques, mais conduit à une expression ectopique dans les cellules péricardiales. La mutation du site GATA conduit ainsi à un changement de spécificité de l'enhancer. Parmi les 3 facteurs GATA identifiés chez la drosophile, le facteur dGATAa est le seul facteur exprimé dans le mésoderme cardiaque où sont déterminés les précurseurs cardiaques (Winick et al., 1993). Cette observation conduit à se demander quel est le rôle du facteur dGATAa dans la régulation de l'enhancer cardiaque du gène *Dmef2*.

Dans un contexte mutant pour le gène dGATAa, aucune protéine DMEF2 n'est détectée et le nombre de cellules péricardiales est augmenté (Gajewski et al., 1999). Ces résultats sont en accord avec l'effet de la mutation du site de fixation GATA dans l'enhancer. Le facteur dGATAa agirait comme un sélecteur engageant les cellules précurseurs vers une différenciation en cellules cardiaques. Ce résultat est confirmé par la surexpression du facteur dGATAa dans le mésoderme. Dans ce contexte, on observe une

augmentation du nombre de cellules cardiaques et une diminution du nombre de cellules péricardiales. La surexpression de dGATAa n'affecte pas la prolifération de ces deux types de cellules mais conduit à un changement d'identité d'un type cellulaire pour un autre (Gajewski et al., 1999).

Chez les vertébrés, les facteurs GATA-4, 5 et 6 sont notamment exprimés dans le cœur en formation. De plus, des sites de fixation pour les facteurs GATA ont été caractérisés dans plusieurs promoteurs de gènes exprimés dans le muscle cardiaque. L'inhibition de l'expression de GATA-4, par transfection d'ARN anti-sens, bloque la différenciation en myocytes cardiaques de cellules embryonnaires pluripotentes en culture (Grepin et al., 1995).

Les facteurs GATA fonctionnent souvent en combinaison avec le facteur *Nkx2-5* pour la régulation de gènes exprimés dans le muscle cardiaque. Le gène *ANP* (*atrial natriuretic peptide*) est la cible directe des gènes *Nkx2-5* et GATA-4. Ces facteurs agissent de manière synergique sur l'activité du promoteur de ce gène. Cette synergie nécessite l'interaction directe de GATA-4 avec la partie carboxy-terminale de *Nkx2-5*. Une synergie optimale de l'action de ces facteurs est observée quand ils sont fixés directement sur leurs sites cibles respectifs. Une synergie plus faible est observée sur un promoteur hétérologue contenant seulement des multimères de sites *Nkx*. Cette synergie faible suggère que le facteur *Nkx2-5* est capable de recruter le facteur GATA-4 au sein d'un même complexe transcriptionnel sans que ce dernier ne se fixe directement à l'ADN (Durocher and Nemer, 1998).

L'enhancer cardiaque du gène *Dmef2* est régulé par le facteur *Tinman* dont le facteur *Nkx2-5* est l'homologue vertébré. De plus, cet enhancer est activé par le facteur dGATAa dont le domaine à doigt à zinc possède 85% d'identité avec le domaine à doigts à zinc de facteurs dGATA-4. La conservation de ces facteurs a conduit l'équipe de R. Schulz à tester la capacité de GATA-4 pour l'activation de l'enhancer de *Dmef2*. Le facteur GATA-4 a donc été introduit par transgénèse chez la drosophile. Dans un contexte mutant pour le facteur dGATAa, l'expression de GATA-4 dans le mésoderme active l'expression du gène *Dmef2* dans les cellules cardiaques. Ce résultat indique que le facteur GATA-4 peut se substituer fonctionnellement au facteur dGATAa pour l'expression du gène *Dmef2* dans les cellules cardiaques. Des expériences complémentaires ont indiqué que les facteurs GATA-1 et dGATAB ne sont eux pas capables de remplacer fonctionnellement le facteur dGATAa (Gajewski et al., 1999).

Chez la souris, la combinaison des facteurs GATA-4 et *Nkx2-5* aboutit à l'expression du gène *ANP* dans les cellules cardiaques. Chez la drosophile, l'expression conjointe de facteurs dGATAa et *Tinman*, permet l'expression du gène *Dmef2* également dans les cellules cardiaques. Les facteurs de transcription de drosophile peuvent être remplacés fonctionnellement par leurs homologues vertébrés. L'expression génique dans les cellules cardiaques semble ainsi mettre en jeu un mécanisme conservé où les facteurs GATA-4 et dGATAa apparaissent comme des facteurs essentiels.

2.2. Le gène *Cecropin A* dans la réponse immunitaire chez la drosophile.

a- La réponse immunitaire chez la drosophile.

Les insectes sont particulièrement résistants aux infections microbiennes et fongiques. Face à ces infections, ils développent un large et rapide éventail de défense en synthétisant des peptides anti-microbiens comme les attacines, les cécropines, les défensines et les diptéricines. Le système de défense immunitaire mis en œuvre partage des caractéristiques fondamentales avec le système de réponse immunitaire innée des vertébrés. La réponse immunitaire acquise reste le propre des vertébrés. L'étude de la réponse immunitaire chez la drosophile constitue un modèle génétique pour aborder les mécanismes de la réponse innée (Hoffmann et al., 1999).

Chez les insectes, la majorité des peptides anti-microbiens sont synthétisés dans le corps gras. Une minorité d'entre eux peut aussi être produite, selon les espèces, au niveau de l'intestin, des glandes salivaires ou encore du tractus génital mâle ou femelle (Hoffmann et al., 1996).

L'expression des gènes codant ces peptides anti-microbiens est régulée au niveau de l'initiation de la transcription. Plusieurs éléments cis-régulateurs sont retrouvés conservés entre les différents promoteurs de ces gènes. L'élément le plus conservé est l'élément $\square B$, retrouvé dans le promoteur de tous les gènes induits au cours de la réponse immunitaire qui ont été clonés à ce jour (Figure 18). Chez les mammifères, l'élément $\square B$ permet la fixation des facteurs de transcription de la famille Rel comme le facteur NF- $\square B$ (Lenardo and Baltimore, 1989; Stancovski and Baltimore, 1997). Chez la drosophile, les facteurs *Dorsal*, *dorsal-related immunity factor (Dif)*, et *Relish* constituant la famille Rel interagissent avec l'élément $\square B$ (Dushay et al., 1996; Hoffmann et al., 1999; Ip et al., 1993; Steward, 1987).

Les facteurs de la famille Rel de type NF- κ B sont présents sous forme inactive dans le cytoplasme (Figure 18). Cette forme inactive résulte de l'association avec un co-facteur : le facteur I- κ B chez les vertébrés ou son homologue *cactus* chez la drosophile. La réception du ligand Spatzle au niveau du récepteur transmembranaire Toll active une cascade génétique conservée entre les différents groupes phylogénétiques. Cette activation aboutit à la dissociation du complexe I- κ B/NF- κ B de vertébrés ou *cactus*/Rel chez la drosophile. Il en résulte la translocation du facteur de la famille Rel dans le noyau où il peut activer l'expression de gènes de défense immunitaire. La fonction du facteur I- κ B/*cactus* est ainsi de séquestrer le facteur Rel dans le cytoplasme en absence de toute infection. Quand une infection est perçue au niveau du récepteur Toll, l'expression des gènes de défense est induite par translocation rapide de l'activateur Rel dans le noyau (Figure 18).

b- Régulation de l'expression du gène Cecropin A de drosophile.

Les cécropines sont des peptides présents dans de nombreux insectes et qui sont sécrétés rapidement après une infection bactérienne. Chez la drosophile, les gènes *Cec A1*, *A2*, *B* et *C* codant pour des cécropines ont été clonés et s'expriment essentiellement dans le tissu adipeux après infection (Figure 19). Ces quatre gènes possèdent dans leurs promoteurs des éléments κ B et des séquences correspondant au site consensus de fixation du facteur GATA. La présence de ces deux motifs κ B et GATA est une caractéristique générale commune à l'ensemble des gènes induits au cours de la réponse immunitaire chez les insectes comme chez les vertébrés. Le nombre et l'orientation de ces éléments sont variables d'un promoteur à l'autre (Figure 19) (Kadalayil et al., 1997).

Plus particulièrement, dans le promoteur du gène *CecA1*, le site κ B permet la fixation de la protéine Dif (Petersen et al., 1995). Ce site est essentiel pour l'expression de *CecA1* (Kadalayil et al., 1997). Par ailleurs, le promoteur *CecA1* possède un site de fixation GATA (Kadalayil et al., 1997). Ce site est essentiel pour l'expression du gène *CecA1* dans le corps gras larvaire. En revanche ce site n'est pas essentiel pour l'expression de *CecA1* dans le corps gras adulte (Petersen et al., 1999). Ce site GATA permet la fixation du facteur dGATAb en association avec des partenaires non encore identifiés.

L'étude menée par Petersen *et al.* a été la première montrant directement l'implication de dGATAb dans la régulation du gène *CecA1*. dGATAb est le seul facteur GATA exprimé dans le tissu adipeux. Cette exclusivité d'expression suggère qu'il est un

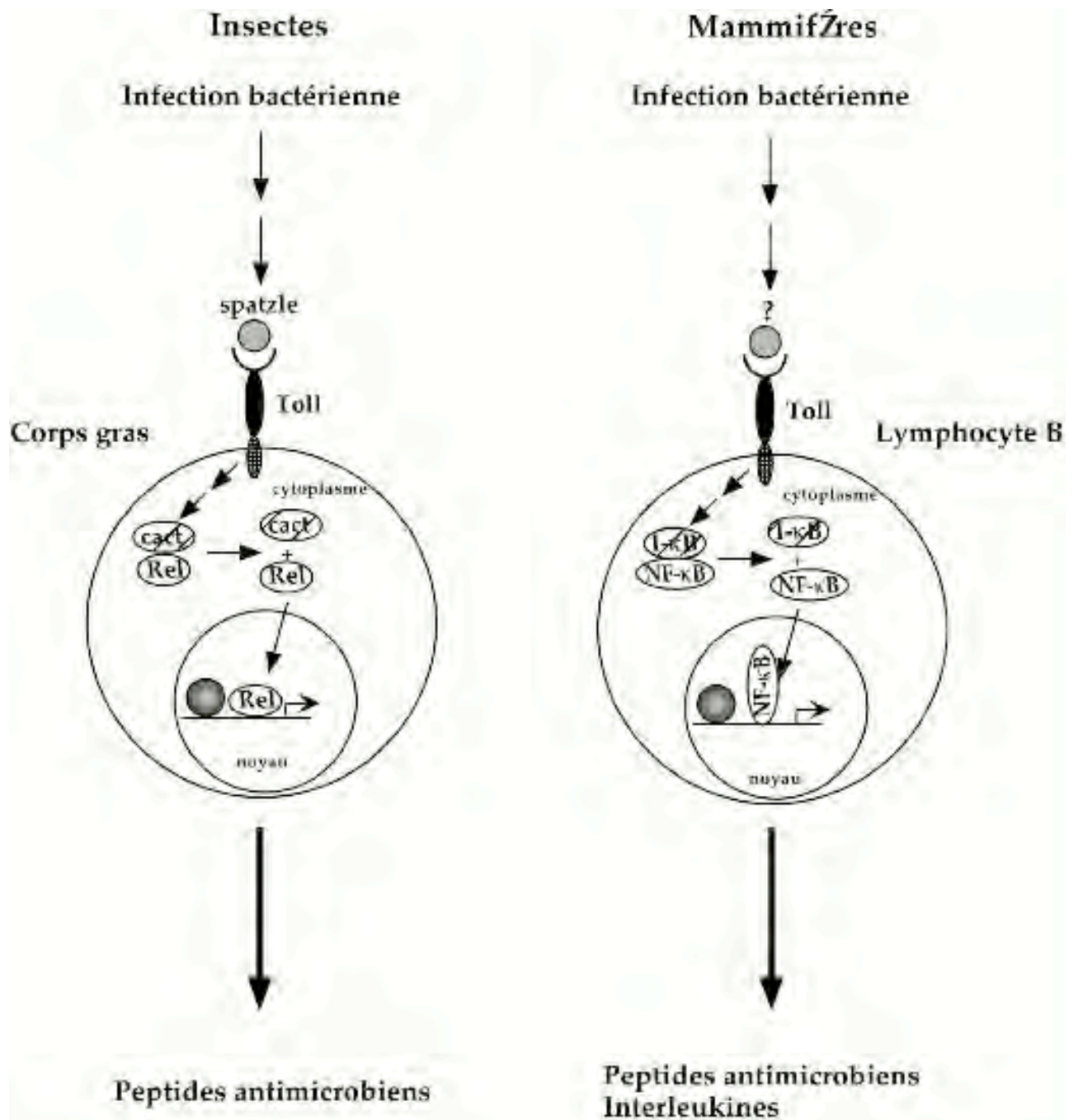


Figure 18 : Cascade génétique de réponse à une infection bactérienne conservée entre les insectes et les vertébrés.
 Le cercle grisé représente un facteur de la famille GATA (d'après Hoffmann *et al.*, 1996 et Medzhitov *et al.*, 1997)

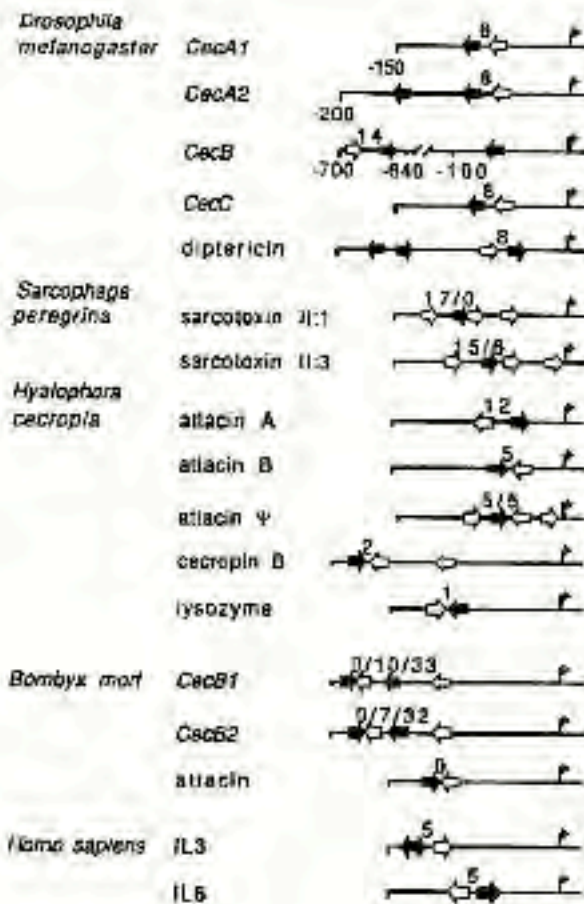


Figure 19 : Sites de fixation GATA et κB dans les régions promotrices des gènes de défense immunitaire chez les insectes et les mammifères.

Les flèches blanches représentent les sites de fixation κB et les noires les sites GATA. L'orientation des flèches indique l'orientation des sites de fixation. Les chiffres indiquent la distance (en nucléotides) séparant les sites de fixation. Les régions régulatrices sont désignées à l'échelle et le site de démarrage de la transcription est désigné par une fine flèche. (d'après Kadalayil et al., 1997).

régulateur central de l'ensemble de gènes de défense immunitaire exprimés dans ce tissu et qui possèdent des sites de fixation GATA dans leur promoteur. Des études supplémentaires devront montrer le rôle régulateur de dGATAb pour l'expression des autres gènes de défense immunitaire.

2.3. Expression de gènes dans le tissu adipeux : conservation de fonction et de régulation.

L'expression du facteur dGATAb prend place très précocement dès le début de l'embryogenèse dans les cellules précurseurs du tissu adipeux. Cette expression est maintenue au cours du développement larvaire. Le facteur dGATAb est important pour la différenciation du tissu adipeux et pour le maintien de cette identité.

L'étude de certains gènes régulés par le facteur dGATAb a permis de mettre en évidence son rôle régulateur important dans le tissu adipeux. Cette étude a montré de fortes similarités entre les facteurs régulateurs impliqués dans la spécificité tissulaire d'expression dans le corps gras de drosophile et dans le foie de l'homme, son analogue fonctionnel.

a- Différenciation du corps gras larvaire.

Le corps gras larvaire est une structure relativement simple, constituée d'une monocouche cellulaire située de façon symétrique de chaque côté de l'axe antéro-postérieur de l'animal. Les groupes de cellules précurseurs sont répartis le long de cet axe en réponse à une cascade génétique complexe (Reuter, 1994; Riechmann et al., 1998). L'établissement de cette cascade aboutit à l'expression du facteur dGATAb dans ces cellules. L'expression de dGATAb engage la différenciation des cellules précurseurs vers une identité de tissu adipeux alors que l'absence d'expression conduit à l'acquisition d'une identité de gonade. Le facteur dGATAb constitue ainsi le marqueur le plus précoce du tissu adipeux embryonnaire (Riechmann et al., 1998).

Les cellules du corps gras se divisent au cours de l'embryogenèse. Pendant les stades larvaires, on observe une augmentation de la taille et du degré de ploïdie des cellules mais plus aucune division. L'augmentation de la taille des cellules est d'autant plus visible au cours de troisième stade larvaire. En effet, les cellules accumulent de nombreuses réserves énergétiques en vue de la métamorphose (Bate, 1993).

b- Exemples de gènes exprimés dans le tissu adipeux.

1) Le gène *alcohol deshydrogenase*.

1) Structure du gène de *D. melanogaster*.

Chez *D. melanogaster*, le gène *alcohol deshydrogenase* (*Adh*) code une enzyme de détoxification des alcools ingérés par la drosophile. L'expression du gène *Adh* prend place dans 3 tissus : le corps gras, l'intestin et les tubules de Malpighi.

La transcription du gène *Adh* est initiée à partir de deux promoteurs indépendants distants de 700 pb (Figure 20). Le promoteur distal est actif pendant la fin de vie larvaire et adulte alors que le promoteur proximal est actif au cours du développement embryonnaire et larvaire. Ces deux promoteurs sont activés par des séquences enhancers distinctes, caractérisées par une approche de découpage de promoteur (Posakony et al., 1985). Une séquence de régulation, le *Adh* adult enhancer, ou AAE, active le promoteur distal dans le corps gras (Figure 20). Le *Adh* larval enhancer, ou ALE, active le promoteur proximal dans le corps gras. L'utilisation alternative du promoteur proximal puis distal, pour l'expression d'*Adh* au cours du temps, met en jeu l'utilisation alternative des deux enhancers ALE et AAE respectivement.

Le AAE est actif en fin de troisième stade larvaire alors que le ALE est actif à tous les stades de développement. La persistance de l'activité de ALE, alors que le promoteur proximal n'est actif que jusqu'à la fin du troisième stade larvaire, suggère l'existence d'un mécanisme de répression du promoteur proximal dans les mouches adultes. En effet, chez les adultes, la transcription du gène *Adh* n'est observée qu'à partir du promoteur distal (Corbin and Maniatis, 1990; Corbin and Maniatis, 1989).

Cette organisation particulière de la transcription du gène *Adh* chez *D. melanogaster* met en jeu également des interactions spécifiques entre les séquences promotrices et les séquences enhancers. Nous reviendrons plus en détail sur les données concernant ces interactions et l'utilisation alternative des promoteurs.

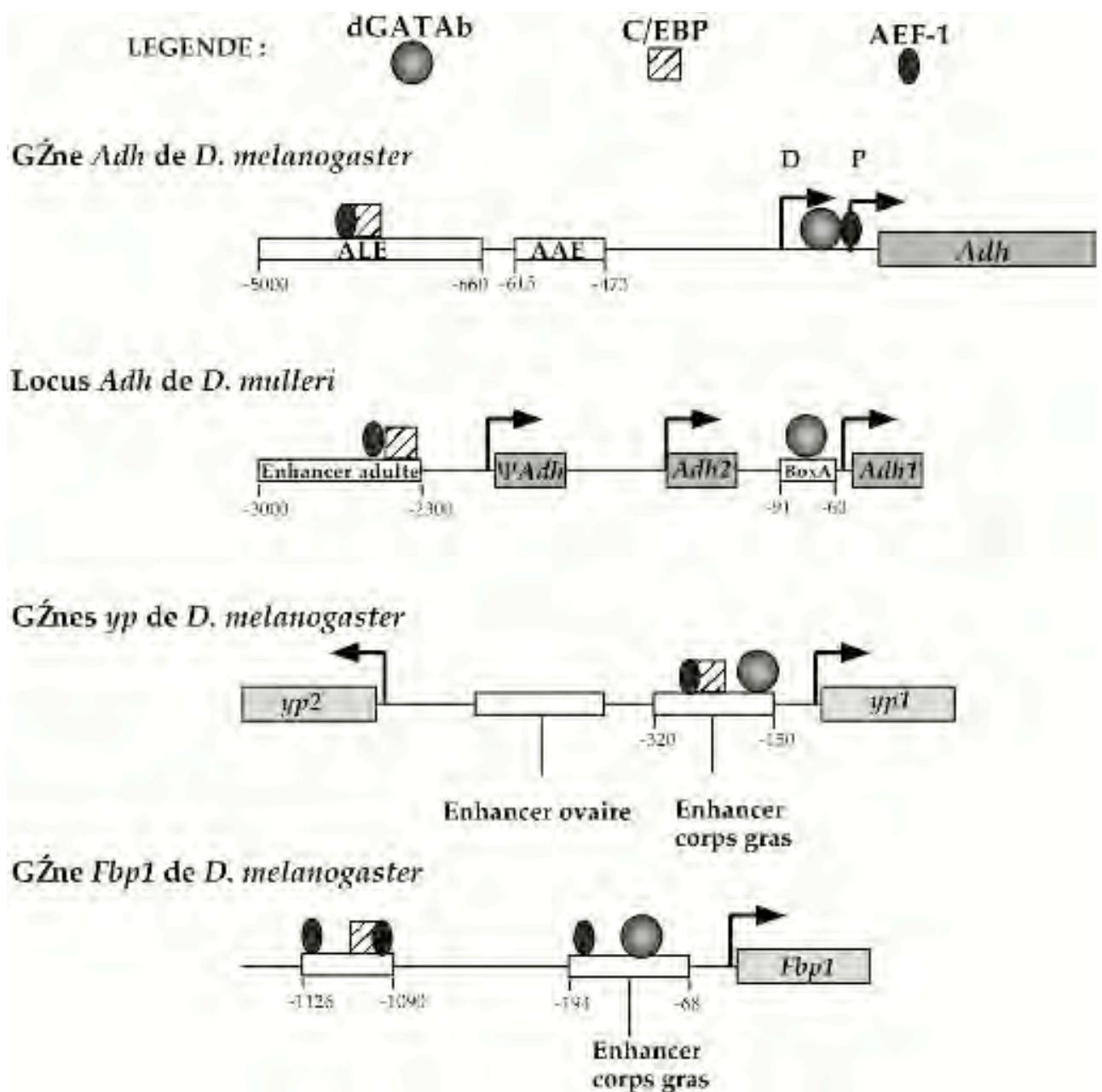


Figure 20 : Fixation des facteurs dGATAB, C/EBP, AEF-1 sur les éléments régulateurs spécifiques de l'expression dans le tissu adipeux. Les séquences codantes des différents gènes sont représentées par des rectangles grisés et les éléments régulateurs par des rectangles blancs. Les lignes représentent les promoteurs et les régions intergéniques. Les flèches indiquent les sites d'initiation et le sens de la transcription. Le AAE (Adh Adult Enhancer) active le promoteur distal D du gène *Adh* de *D. melanogaster*. Le ALE (Adh Larval Enhancer) active le promoteur proximal P du gène *Adh* de *D. melanogaster*. Le facteur dGATAB est représenté par un cercle, C/EBP pour un carré et AEF-1 par un ovale. Un seul des 3 sites de fixation pour dGATAB est représenté au niveau de l'enhancer corps gras du gène *Fbp1* de *D. melanogaster*.

2) Comparaison avec *D. mulleri*

L'étude du gène *Adh* dans une autre espèce de drosophile, *D. mulleri*, a fourni des informations sur ces modes de régulations qui apparaissent très conservés au cours de l'évolution. Le locus *Adh* de *D. mulleri* comprend un pseudogène \square *Adh* et deux gènes *Adh1* et *Adh2* exprimés dans les mêmes tissus que le gène *Adh* de *D. melanogaster*. Le gène *Adh1* s'exprime au cours du troisième stade larvaire, selon le même profil d'expression que le gène *Adh* de *D. melanogaster* induit à partir du promoteur proximal. En revanche, le gène *Adh2* s'exprime chez l'adulte, selon le même profil d'expression que le gène *Adh* de *D. melanogaster* induit à partir du promoteur distal. Ces gènes peuvent s'exprimer dans *D. melanogaster* lorsqu'ils sont introduits dans son génome par transformation germinale. Ce résultat suggère que des facteurs communs sont impliqués dans la régulation de l'expression du gène *Adh* de ces deux espèces distinctes (Fischer and Maniatis, 1986).

3) Le facteur dGATAb, un régulateur du gène *Adh*

L'utilisation de sondes couvrant le promoteur proximal du gène *Adh* de *D. melanogaster* et le promoteur du gène *Adh1* de *D. mulleri* pour cribler une banque d'expression a permis de caractériser le facteur dGATAb (Figure 20) (Abel et al., 1993). Ce facteur, exprimé dans le corps gras larvaire, se fixe au niveau d'un site correspondant au site consensus pour les facteurs GATA. Dans des expériences de transfection de cellules, la présence du facteur dGATAb augmente la transcription d'un gène indicateur placé sous contrôle de six sites de fixation placés en tandem. De plus, une mutagenèse réalisée *in vivo* par transgenèse a montré qu'une délétion de la région comprenant le site de fixation de dGATAb abolit toute activité transcriptionnelle du gène *Adh* de *D. melanogaster* (Corbin and Maniatis, 1990; Fischer and Maniatis, 1988). L'ensemble de ces résultats indiquent que le facteur dGATAb agit comme un régulateur positif de l'expression *in vivo* du gène *Adh* dans le tissu adipeux.

4) Le facteur AEF-1

La caractérisation des facteurs protéiques interagissant avec l'enhancer adulte AAE du gène *Adh* a été réalisée grâce à la technique de retardement sur gel à partir d'extraits nucléaires d'ovaires ou de mouches adultes (Figure 20). La technique d'interférence à la méthylation a permis de déterminer précisément les sites de fixation de ces facteurs. Un facteur noté AEF-1 se fixe au niveau d'une séquence consensus du type CAAC(A/T)A

(Falb and Maniatis, 1992)((Ren and Maniatis, 1998). Le rôle de ce facteur a été testé *in vivo* en introduisant dans l'enhancer AAE fusionné au gène indicateur *lacZ* une mutation abolissant sa fixation. Les lignées transgéniques possédant cette version mutée de l'enhancer AAE s'expriment à un niveau 5 à 10 fois supérieur au niveau d'expression du transgène sauvage. L'expression spatiale et temporelle du gène indicateur *lacZ*, sous contrôle de l'enhancer sauvage ou muté, est identique. Ceci indique que la fonction répressive d'AEF-1 ne joue pas un rôle dans la spécificité temporelle ou tissulaire d'expression (Falb and Maniatis, 1992).

Le criblage d'une banque d'ADNc d'ovaires avec une sonde possédant des sites AEF-1 a permis d'isoler un clone codant une protéine à doigt à zinc. L'expression temporelle du facteur AEF-1 suit le profil de transcription du promoteur distal, c'est-à-dire une expression faible jusqu'au troisième stade larvaire et une expression s'accroissant jusqu'au stade adulte. Ce facteur est exprimé dans tous les tissus dont le corps gras au cours du troisième stade larvaire (Falb and Maniatis, 1992).

5) Le facteur DmC/EBP

Le facteur de transcription C/EBP de mammifère (CCAAT/Enhancer Binding Protein), isolée à partir de noyaux de foie de rat (Landschultz, 1988), est exprimée dans plusieurs tissus dont le tissu adipeux, l'intestin, les poumons et la peau (Birkenmeier et al., 1989). La protéine C/EBP de mammifères est capable de se fixer sur l'enhancer adulte AAE du gène *Adh* de *D. melanogaster* ainsi que sur le promoteur du gène *Adh2* adulte de *D. mulleri* (Figure 20) (Falb and Maniatis, 1992). Les sites de fixation de ce facteur sont chevauchants ou très proches des sites de reconnaissance de la protéine AEF-1. Des expériences d'empreintes à la DNase I réalisées à partir des deux protéines, ont permis de montrer que la protéine AEF-1 est capable de déplacer la fixation de la protéine C/EBP.

Dans des expériences de transfection de cellules, la présence de la protéine C/EBP active un gène indicateur placé sous contrôle de l'enhancer AAE. En revanche, la protéine AEF-1 réprime ce même gène indicateur. Cette diminution d'expression est également observée en transfectant les deux facteurs. Ceci confirme que la protéine AEF-1 exerce son activité répressive en empêchant la fixation du facteur activateur C/EBP (Falb and Maniatis, 1992). Nous détaillerons, au cours de chapitre 5, d'autres mécanismes possibles de répression. Ce type de fixation mutuellement exclusif a été observé également sur les séquences *cis*-régulatrices du gène *Adh2* humain, suggérant un mécanisme de régulation très conservé au cours de l'évolution (Falb and Maniatis, 1992).

En accord avec cette hypothèse, le facteur de drosophile DmC/EBP, codé par le gène *slow border cells*, a été isolé (Montell et al., 1992). DmC/EBP présente une forte homologie avec le facteur humain qui est uniquement restreinte au domaine de liaison à l'ADN. La protéine DmC/EBP, produite *in vitro*, est capable de se fixer au niveau de site cible dans l'enhancer AAE du gène *Adh*.

De façon très remarquable, les facteurs GATA, C/EBP et AEF-1 sont requis pour l'expression du gène *Adh* humain dans le foie. Cette conservation des mécanismes de régulation permet d'établir un parallèle de fonction entre le tissu adipeux des diptères et le foie des vertébrés.

6) Modèles d'utilisation alternative de promoteurs

V. Corbin et T. Maniatis ont proposé un premier modèle pour expliquer l'alternance des promoteurs, en se basant sur l'analyse des effets de réarrangements et de délétions au niveau des séquences régulatrices du gène *Adh* de *D. melanogaster*. Selon ce modèle, l'activité du promoteur proximal est réprimée par un mécanisme d'interférence transcriptionnelle exercée par le promoteur distal quand celui-ci devient actif (Corbin and Maniatis, 1989).

Plus récemment, S. Hansen et R. Tjian ont proposé un autre modèle selon lequel les caractéristiques de la machinerie basale de transcription varieraient au cours du développement. En raison de ces variations, la transcription serait préférentiellement initiée à partir du promoteur proximal, pour se poursuivre ensuite à partir du promoteur distal (Hansen and Tjian, 1995).

Une étude très récente menée par B. Ren et T. Maniatis a permis de proposer un nouveau modèle mettant en jeu, cette fois, le facteur AEF-1, pour l'utilisation alternative des promoteurs d'*Adh* (Ren and Maniatis, 1998). Les auteurs montrent que le facteur AEF-1 est non seulement capable d'interagir avec l'enhancer AAE et d'empêcher ainsi la fixation du facteur activateur C/EBP mais encore de se fixer directement au niveau de la boîte TATA du promoteur proximal (Figure 20) (Ren and Maniatis, 1998). La fixation du facteur AEF-1 sur ce promoteur conduit alors à une diminution de son activité qui favorise l'utilisation du promoteur distal. La boîte TATA du promoteur distal ne possède pas de site de fixation pour AEF-1. Ren et Maniatis ont introduit un site AEF-1 au niveau de la boîte TATA du promoteur distal et une mutation de ce site dans la boîte TATA du promoteur proximal. Dans ces conditions, le promoteur proximal reste actif après la formation du puparium alors que le promoteur distal n'est jamais activé. Ces résultats

montrent le rôle direct du facteur répresseur AEF-1 dans l'utilisation alternative des promoteurs du gène *Adh*. Les auteurs proposent que la fixation du facteur AEF-1 au niveau du promoteur proximal pourrait déstabiliser les interactions avec la machinerie basale de transcription (Ren and Maniatis, 1998).

La régulation de l'expression du gène *Adh* de *D. melanogaster*, dans le tissu adipeux, résulte des interactions croisées des facteurs de transcriptions C/EBP, AEF-1 et dGATAb qui prennent place au niveau d'enhancers ou au niveau des promoteurs. Nous montrerons par la suite que ces réseaux d'interactions se retrouvent conservés pour l'expression d'autres gènes dans le tissu adipeux.

2) Les gènes *Yp*

Chez la drosophile, 3 gènes *yolk protein* (*Yp 1, 2, 3*) codent pour des protéines vitellines. Ces gènes sont exprimés dans l'ovaire et le corps gras des femelles adultes (Bownes and Hames, 1978). L'expression de ces gènes *Yp* dans les ovaires permet l'accumulation des protéines vitellines dans les embryons, où elles seraient impliquées dans le stockage des nutriments. Elles seraient capables de se complexer avec des lipides et des hormones stéroïdes permettant l'accumulation d'ecdystéroïdes dans l'embryon. Les gènes *Yp1* et *Yp2* sont transcrits de façon divergente et partagent une région régulatrice intergénique commune (Figure 20). Dans la région intergénique, un enhancer confère une expression restreinte au corps gras des femelles adultes (Garabedian et al., 1985; Garabedian et al., 1986; Shepherd et al., 1985). D'autres enhancers sont impliqués dans l'expression ovarienne (Logan et al., 1989).

De façon très remarquable, l'enhancer dirigeant une expression dans le tissu adipeux possède un site de fixation pour le facteur dGATAb. Il est aussi la cible des facteurs AEF-1 et C/EBP. Les sites de fixation de ces facteurs sont chevauchants, comme dans l'enhancer AAE du gène *Adh* (Figure 20) (Falb and Maniatis, 1992).

Des mécanismes de régulation similaires ont été décrits chez le moustique pour l'expression du gène *lysosomal aspartic protease* (*AaLAP*) (Dittmer and Raikhel, 1997). L'activité de dégradation due à l'expression de cette protéase lysosomale est particulièrement importante pour le remodelage du corps gras au cours de la transition larve-pupe et pour l'activité de vitellogenèse des femelles adultes. L'étude du promoteur de ce gène a révélé notamment la présence de sites de fixation pour les facteurs activateurs GATA, C/EBP et pour le facteur répresseur AEF-1. L'importance fonctionnelle de ces sites de fixation reste à déterminer.

3) Le gène *Fat Body Protein 1*

Le gène *Fat Body Protein 1 (Fbp1)* est exprimé exclusivement dans le tissu adipeux en fin de troisième stade larvaire en réponse à l'augmentation de la concentration en ecdystéroïdes. Nous ne détaillerons pas ici la fonction, la structure et les mécanismes de régulation de ce gène qui seront traités dans un chapitre indépendant (Chapitre 3) et qui font l'objet de ce travail de thèse. Cependant, ce travail ajouté à ceux précédemment réalisés au laboratoire, montre que, comme les gènes *Adh* et *Yp1*, le gène *Fbp1* est la cible directe des facteurs dGATAb et DmC/EBP (Figure 20) (Brodu et al., 1999; Lapie et al., 1993).

2.4. Rôle central de dGATAb pour une expression dans le tissu adipeux.

Le facteur dGATAb est requis pour la différenciation du tissu adipeux. Comme nous l'avons exposé, le facteur dGATAb est impliqué dans la régulation de différents gènes exprimés dans ce tissu.

D'une part, la régulation de l'expression des gènes de défense immunitaire repose sur l'activation conjointe des facteurs dGATAb et d'un membre de la famille Rel.

Par ailleurs, l'expression, dans le tissu adipeux, des protéines codées par les gènes *Adh*, *Yp* ou *Fbp1*, est dépendante du facteur dGATAb et des facteurs C/EBP et AEF-1. Le rôle de ces trois facteurs est conservé au cours de l'évolution.

Le facteur dGATAb semble donc jouer un rôle régulateur central pour l'expression de gènes dans ce tissu, en association avec différents partenaires.

De façon remarquable, les combinaisons protéiques impliquant le facteur dGATAb sont conservées au cours de l'évolution. Une combinaison GATA-Rel est impliquée dans l'expression des interleukines de vertébrés (Gottschalk et al., 1993). Une combinaison C/EBP-AEF-1 est impliquée dans l'expression du gène *Adh* humain dans le foie (Falb and Maniatis, 1992).

Les facteurs GATA-4 et HNF3 de mammifères, ou leurs homologues de drosophile dGATAb et *fork head*, sont essentiels pour la formation et la différenciation de l'intestin à partir de l'endoderme ((Zaret, 1999) et références citées). La technique de l'empreinte à la DNase I *in vivo* a permis de montrer qu'au niveau de la chromatine, les sites de fixation

pour ces deux facteurs sont occupés même quand leurs cibles sont silencieuses. La fixation de ces deux facteurs à l'ADN, avant même que les gènes ne soient exprimés, pourrait être un moyen de réduire le temps nécessaire à leur activation de ces gènes. Celle-ci ne dépendrait plus que du recrutement des autres régulateurs au niveau du promoteur. Cette fixation préalable permettrait également de synchroniser plus précisément l'activation des gènes.

De manière analogue, dans le tissu adipeux, le facteur dGATAb pourrait se fixer sans conduire à l'activation de l'expression de son gène cible. Il faciliterait, en combinaison avec d'autres partenaires, par exemple les facteurs Rel ou C/EBP/AEF-1, l'expression dans le tissu adipeux. Pour tester ce rôle de dGATAb, il serait intéressant de réaliser des expériences d'empreinte génomique *in vivo* sur les promoteurs des gènes exprimés dans le tissu adipeux. Cette expérience permettrait de tester si le facteur dGATAb est capable d'interagir avec la chromatine au niveau de son site de fixation à un moment où les gènes cibles ne sont pas exprimés. Une telle possibilité implique que le facteur dGATAb est capable d'interagir avec la chromatine sous forme compactée. Dans le paragraphe suivant, nous aborderons plus en détail l'influence de la fixation des facteurs GATA sur l'état de la chromatine.

3. Modulation de la spécificité d'activation des facteurs GATA.

3.1. Rôle des facteurs GATA dans la modification de la chromatine.

Des expériences de sensibilité à la DNase I réalisées sur les régions *cis*-régulatrices situées en amont du locus □ des gènes de globines des vertébrés ont permis d'identifier la région LCR (Locus Control Region). Cette région essentielle pour l'expression des gènes de globines est la cible des facteurs GATA-1 et EKLF (Erythroid Krüppel-like factor) (Orkin, 1990). Une hypothèse pour expliquer le rôle de cette région LCR serait qu'elle est impliquée dans la stabilisation d'une forme décondensée de la chromatine au niveau des gènes de globines, forme favorisant leur activation (Forrester et al., 1990; Li et al., 1999). Plusieurs études complémentaires réalisées à la fois *in vitro* et *in vivo* permettent de faire un lien entre les facteurs GATA-1 et EKLF et la modification de l'état de la chromatine.

a- Les facteurs GATA et les modifications de la position des nucléosomes.

L'équipe de G. Felsenfeld a montré que le facteur GATA-1 du poulet est capable de se fixer, *in vitro*, sur de l'ADN reconstitué en nucléosomes au niveau du locus LCR. Cette fixation provoque le déplacement des nucléosomes et ce, de manière réversible, car le retrait de GATA-1 induit à nouveau l'assemblage ADN/histones (Boyes et al., 1998). La signification physiologique de ce déplacement et son influence sur l'activité transcriptionnelle restent cependant à établir.

Ces résultats peuvent être corrélés avec ceux obtenus *in vivo* avec le facteur AreA, un facteur GATA du champignon *Aspergillus nidulans*. Les auteurs montrent, cette fois *in vivo*, que ce facteur GATA AreA conduit à la réorganisation du positionnement des nucléosomes (Muro-Pastor et al., 1999). La présence de AreA est nécessaire et suffisante pour que le repositionnement ait lieu *in vivo*. L'activation transcriptionnelle n'est pas requise pour ce repositionnement.

Ces deux études montrent que les facteurs de la famille GATA sont capables de se lier à leur site de fixation, même quand ce dernier est engagé dans une structure nucléosomale, sans conduire nécessairement à une activation transcriptionnelle. Cette

propriété des facteurs GATA renforce l'hypothèse de leur rôle comme facteurs de compétence.

Plusieurs autres facteurs de transcription comme le récepteur des glucocorticoïdes (Perlmann and Wrangle, 1988), de la progestérone (Pham et al., 1992), de l'hormone thyroïde (Wong et al., 1995) ou encore le facteur GAL4 de levure (Taylor et al., 1991) sont également capables de se fixer sur leurs sites cibles même si ceux-ci sont engagés dans une structure nucléosomale. Ces études suggèrent que la fixation de ces facteurs de transcription est une première étape conduisant à un changement de la structure de la chromatine. Il reste à montrer si le facteur GATA est à lui seul responsable de ce changement. Une hypothèse alternative serait que le changement de structure est lié à l'action de facteurs de remodelage de la chromatine, facteurs requis pour la fixation de GATA.

b- Activité de GATA modulée par l'acétylation.

Les protéines p300 et CBP (CREB Binding Protein) de vertébrés sont des enzymes nucléaires qui catalysent le transfert d'un groupement acétyle sur des résidus lysines de la partie amino-terminale des histones. La position de ces lysines est très conservée entre les différents groupes d'histones. Il existe deux modèles pour expliquer l'influence de l'acétylation des histones sur l'activité transcriptionnelle. Selon le premier modèle, la neutralisation par un groupement acétyle de la charge positive portée par la lysine diminuerait l'affinité de la fibre d'ADN chargée négativement pour l'octamère d'histones. Cette diminution d'affinité permet la décompaction de la fibre d'ADN autour de la structure nucléosomale. Il en résulte une augmentation de son accessibilité pour des facteurs de transcription. Dans le deuxième modèle, les groupements acétyles serviraient de signaux permettant l'interaction des histones avec d'autres protéines régulatrices.

Les histones acétyltransférases p300 et CBP sont deux protéines ayant des fonctions biologiques très similaires. CBP interagit avec la protéine CREB (cAMP response element binding protein) phosphorylée. Il se révèle interagir également avec beaucoup d'autres facteurs de transcription incluant le facteur p53 et de nombreux récepteurs hormonaux nucléaires (Bannister and Kouzarides, 1996; Janknecht and Hunter, 1996; Ogryzko et al., 1996). En plus de l'acétylation des histones, l'acétylation des facteurs de transcription pourrait également avoir une importance dans la régulation transcriptionnelle.

Des expériences d'immunoprécipitation, réalisées à partir d'un extrait cellulaire avec un anticorps reconnaissant spécifiquement les résidus lysines acétylés, a montré que le facteur GATA-1 est acétylé *in vivo*. Cet état d'acétylation est corrélé avec une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'un gène cible de GATA-1. La mutagenèse des résidus concernés par cette acétylation conduit à une diminution de l'activité transcriptionnelle conférée par GATA-1 (Boyes et al., 1998). Ces résultats suggèrent que l'acétylation module l'activité de GATA-1 en modifiant des interactions entre le facteur GATA-1 et son site cible soit au niveau de l'ADN soit en modifiant des interactions avec des partenaires.

Dans des expériences réalisées cette fois *in vitro*, les deux acétyltransférases CBP et p300 sont capable d'acétyler le facteur GATA-1, en interagissant avec le domaine à doigts à zinc de ce dernier (Blobel et al., 1998; Boyes et al., 1998). Il reste à montrer que l'acétylation du facteur GATA-1 mise en évidence *in vivo* résulte bien de l'action d'au moins une de ces deux acétyltransférases.

Le facteur GATA-1 fait donc partie des facteurs de transcription qui, en plus des histones, sont la cible des acétyltransférases. Au nombre de ces facteurs de transcription est présent le facteur EKLF (Zhang and Bieker, 1998). Ce facteur a été décrit précédemment comme un régulateur des gènes de globines en association avec des sites GATA. Il est intéressant de noter que ces deux régulateurs, au sein d'une même séquence promotrice, présentent une activité modulée par leur état d'acétylation.

3.2. Modulation de l'activité des facteurs GATA : interaction avec d'autres partenaires

a- Modulation de l'activité de GATA-1 par des récepteurs stéroïdiens.

Chez les vertébrés, l'hématopoïèse est hautement régulée et capable de nombreuses réponses adaptatives. Les hormones stéroïdes, incluant les œstrogènes et les glucocorticoïdes, font partie des facteurs pouvant moduler l'érythropoïèse. Il a été démontré chez les mammifères que l'administration de doses élevées d'œstrogènes conduit à une anémie. De la même manière, l'ajout de glucocorticoïdes sur des cellules en culture bloque le programme de différenciation érythropoïétique. Ce blocage s'observe notamment par la diminution de l'expression des gènes des globines ((Blobel et al., 1995; Chang et al., 1993) et références incluses).

L'équipe de W. Scher a montré que le facteur GATA-1 murin est capable d'interagir, *in vitro*, avec le récepteur des glucocorticoïdes (GR) (Chang et al., 1993). Cette interaction conduit à la diminution de l'activité transactivatrice de GATA-1, diminution renforcée en présence de l'hormone. Ces résultats permettent d'expliquer en partie l'effet des glucocorticoïdes sur la différenciation de la lignée érythropoïétique.

L'équipe de S.H. Orkin a montré que GATA-1 interagit aussi avec le récepteur humain des œstrogènes (ER) (Blobel et al., 1995). Cette interaction nécessite deux régions de GATA-1 situées dans la partie amino-terminale et dans le domaine à doigts à zinc. Des transfections de GATA-1 et de l'ER dans des cellules cultivées en présence ou non d'œstrogènes ont été réalisées. Les immunoprécipitations réalisées sur les extraits cellulaires résultants ont montré que les deux protéines GATA-1 et ER interagissent uniquement en présence du ligand hormonal. Les auteurs ont aussi étudié l'expression d'un gène indicateur placé sous contrôle d'un promoteur cible du facteur GATA-1. L'activation induite par GATA-1 est abolie en présence de ER et de son ligand. Ces expériences suggèrent que les œstrogènes exerceraient leurs effets sur l'érythropoïèse en modulant l'activité du facteur GATA-1 par des interactions protéine-protéine avec le récepteur hormonal associé à son ligand.

Les données de la modulation de l'activité de GATA-1 par les récepteurs stéroïdiens reposent sur des résultats obtenus sur des cellules en culture. Aucune étude complémentaire n'a été réalisée depuis pour confirmer ces interactions et leurs significations dans l'animal. De plus, des travaux récents montrent que les

glucocorticoïdes sont impliqués *in vivo*, en non plus sur des cellules en culture, dans la différenciation de la lignée hématopoïétique notamment (Bauer et al., 1999).

b- Modulation de l'activité de GATA par des co-facteurs.

1)FOG-1

En utilisant le système de double hybride chez la levure, l'équipe de S.H. Orkin a isolé une protéine FOG-1 (*friend of GATA*) qui interagit avec le facteur GATA-1 (Tsang et al., 1997). Les deux facteurs FOG-1 et GATA-1 agissent en synergie au cours de l'activation de la transcription et des différenciations érythroïde et mégacaryocytaire (Tsang et al., 1997). FOG-1 est une protéine à 9 doigts à zinc parmi lesquels 3 doigts auraient un rôle spécifique dans l'activité du complexe GATA-1/FOG (Figure 21) (Fox et al., 1999). FOG-1 se lie au doigt N-f de GATA-1 alors que le doigt C-f de GATA-1 fixe d'autres partenaires comme les facteurs Krüppel, EKLf ou Sp1 (Anderson et al., 1998). Le facteur FOG-1 est également capable d'interagir, *in vitro*, avec tous les facteurs GATA connus (Tsang et al., 1997).

2) FOG-2.

Le facteur FOG-2 a été identifié en exploitant les banques de données pour chercher des homologues de FOG-1 (Svensson et al., 1999; Tevosian et al., 1999). Il possède 8 doigts à zinc dont la structure globale est très semblable à celle de FOG mais dont la séquence primaire diverge (Figure 21). FOG-2 s'associe au doigt N-f du facteur GATA-4 dont il module l'activité transcriptionnelle. Dans les cardiomyocytes, le complexe GATA-4/FOG-2 est un répresseur de la transcription. Par ailleurs, l'expression forcée de FOG-2 permet de restaurer la maturation des érythroïdes dans des lignées cellulaires hématopoïétiques n'exprimant pas le facteur FOG-1. Dans ce cas, le facteur FOG-2 est capable de s'associer à GATA-1 (Tevosian et al., 1999). Les profils d'expression de FOG-1 et FOG-2 ne sont cependant pas superposables. On peut donc penser que leurs fonctions *in vivo* ne sont pas redondantes (Svensson et al., 1999).

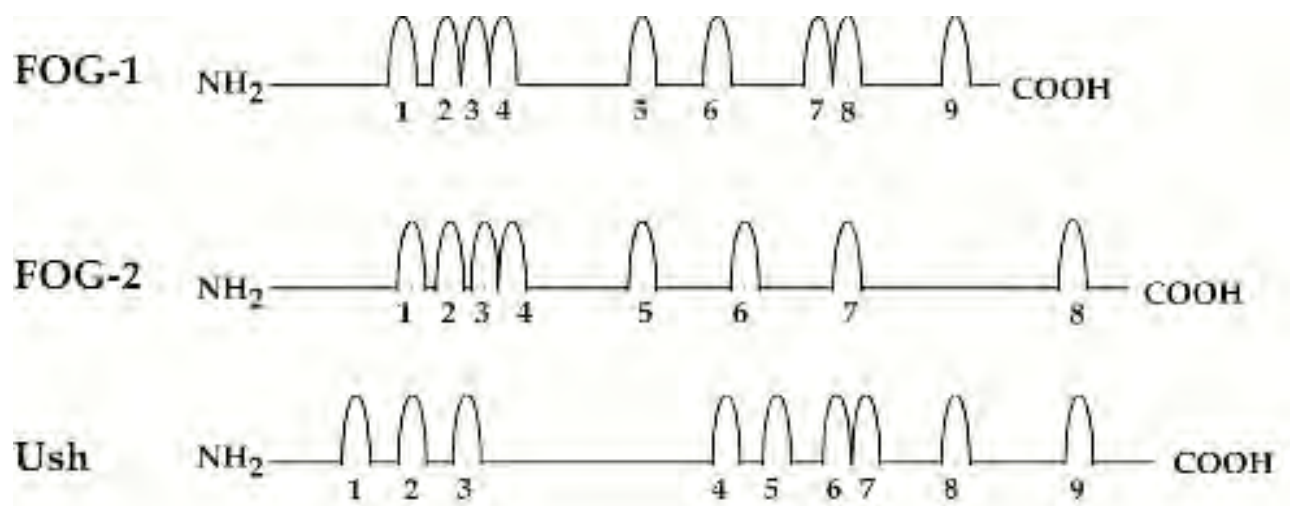


Figure 21 : Distribution schématique des doigts à zinc dans les co-facteurs FOG-1, FOG-2 et Ush
 Les doigts à zinc sont numérotés.

3) U-shaped.

L'activation de la transcription par des facteurs de type GATA qui se fixent par l'intermédiaire des doigts à zinc à la même séquence consensus est un mécanisme très conservé au cours de l'évolution. En témoigne chez la drosophile le rôle du facteur dGATAa possédant un domaine à doigt à zinc très homologue à celui du facteur GATA-1 (Figure 21). La régulation des gènes proneuraux *acs* dépend du facteur dGATAa et de son co-répresseur Ush. La protéine USH est une protéine à 9 doigts à zinc de structure semblable à FOG-1 (Cubadda et al., 1997; Haenlin et al., 1997). L'interaction de ces deux protéines implique le doigt N-f de dGATAa. Contrairement à ce qu'on observe pour l'interaction de FOG-1 avec GATA-1, l'interaction de Ush avec dGATAa ne conduit pas à une synergie d'activation mais elle permet d'exercer un contrôle négatif sur l'activité de dGATAa.

On peut donc penser qu'à la manière de dGATAa, GATA-1 et GATA-4, le facteur dGATAB pourrait interagir avec un facteur dont la structure globale pourrait être identique à FOG. Ce partenaire potentiel pourrait être Ush lui-même ou, dans la mesure où les profils d'expression de dGATAB et Ush ne sont pas superposables, un nouveau facteur. L'identité de ce facteur reste à établir. Dans ce contexte, Jana Lepesant a entamé un crible en utilisant le système double hybride chez la levure pour identifier des partenaires de dGATAB.

CHAPITRE 3

LE GÈNE MODELE *Fbp1* ET LES OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE

1. Présentation générale

Le gène *Fbp1* est étudié avec beaucoup d'attention depuis de nombreuses années au laboratoire. L'intérêt qui lui est porté a débuté quand Jana et Jean-Antoine Lepesant ont montré qu'à la fin du troisième stade larvaire, le corps gras synthétise spécifiquement un grand nombre de protéines dont les protéines Fat Body Protein 1 et 2 (FBP1 et 2), LSP1 (Larval Serum Protein1) et LSP2 (Lepesant et al., 1978). La synthèse de la protéine FBP1 est abolie dans une souche de drosophile déficiente pour le métabolisme des ecdystéroïdes. Cette caractéristique a permis d'isoler le gène *Fbp1* sur la base d'un criblage différentiel d'une banque d'ADN génomique avec des ARN de corps gras provenant d'une souche sauvage ou de cette souche déficiente *ecd1* (Lepesant et al., 1978; Lepesant et al., 1982).

La caractérisation du gène *Fbp1* a permis de montrer qu'il présente une structure simple (Maschat et al., 1990). Son promoteur dirige l'expression d'un unique ARN messager de 3.5kb comportant un petit intron de 59 pb dans la partie proximale. Cet ARN messager code une protéine membranaire synthétisée de façon très abondante à la fin du troisième stade larvaire. La protéine FBP1 membranaire serait responsable de la capture des protéines circulant dans l'hémolymphe, en vue d'un stockage dans le tissu adipeux. Ce stockage permet l'accumulation de réserves énergétiques au moment où la larve cesse de s'alimenter et engage le processus de métamorphose (Burmester et al., 1999).

Le transcrit du gène *Fbp1* est exprimé spécifiquement dans le tissu adipeux, ou corps gras, au cours de la deuxième moitié du troisième stade larvaire (Andres et al., 1993; Laval et al., 1993). Le profil d'expression coïncide avec l'augmentation de la concentration en ecdysone dans la larve de fin de troisième stade.

Non seulement la transcription du gène *Fbp1* est régulée à la fois à un niveau spatial et temporel, mais elle est aussi contrôlée directement par l'ecdysone. En effet, dans des larves *ecd1* mutantes pour le métabolisme des ecdystéroïdes, l'expression du gène *Fbp1* est abolie. Cependant elle peut être restaurée en incorporant de l'ecdysone dans la nourriture ou en cultivant des corps gras disséqués en présence de l'hormone (Lepesant et al., 1982; Sommé-Martin et al., 1990). Cette induction peut également être obtenue si les corps gras disséqués sont incubés en présence de cycloheximide, inhibiteur de la synthèse protéique (Nakanishi and Garen, 1983). L'ensemble de ces résultats indique que la transcription du gène *Fbp1* est sous contrôle direct de l'hormone ecdysone.

Le gène *Fbp1*, de structure simple, est donc exprimé dans un tissu particulier, le tissu adipeux, durant une courte période correspondant à la fin du troisième stade larvaire, en réponse à l'augmentation du titre en ecdysone. Toutes ces raisons font qu'il constitue un modèle de choix pour aborder les mécanismes mis en œuvre pour restreindre l'action d'une hormone à un seul tissu cible à un moment particulier du développement.

2. Les séquences régulatrices du gène *Fbp1*.

L'analyse des séquences régulatrices a été réalisée par transgénèse en étudiant leur capacité à diriger l'expression d'un gène indicateur. Elle a révélé qu'une séquence de 70 pb, localisée entre les positions -68 et -138 par rapport au site d'initiation de la transcription du gène *Fbp1*, est essentielle et suffisante à elle seule pour la spécificité tissulaire et temporelle et pour le contrôle hormonal de son expression (Deutsch et al., 1989; Laval et al., 1993). Par ailleurs, cette séquence, placée en amont du promoteur minimum hétérologue *hsp70*, est capable de diriger l'expression du gène indicateur *lacZ* dans le corps gras en fin de troisième stade larvaire. Cette expression reste sous le contrôle du signal hormonal. L'élément de 70 pb présente donc à la fois les propriétés d'un "enhancer" spécifique du corps gras de fin de troisième stade larvaire et d'un élément de réponse à l'ecdysone (Laval et al., 1993).

Cependant, le niveau d'expression conférée par cet enhancer n'est pas comparable au niveau d'expression endogène du gène *Fbp1* (Laval et al., 1993; Maschat et al., 1991). Des séquences réparties entre les positions -138 et -1386 jouent un rôle important sur le niveau d'expression, notamment un élément de 32 pb, situé entre les positions -162 et -194. Ce petit élément permet d'augmenter d'un facteur 5 à 10 le niveau d'expression obtenu avec l'enhancer seul (Lapie et al., 1993), sans modifier la spécificité temporelle ou tissulaire d'expression. Cet élément est défini comme un élément "amplificateur" du niveau d'expression.

3. Objectifs du travail de thèse.

L'expression hautement régulée du gène *Fbp1* est le résultat de l'action de facteurs de transcription agissant au niveau d'une séquence régulatrice de 70 pb. Cet enhancer

renferme toutes les informations essentielles pour l'expression tissulaire, temporelle et hormonale du gène. De plus, il est la cible directe du récepteur de l'ecdysone (Antoniewski et al., 1994).

L'objectif de mon projet de thèse a été de chercher à identifier et déterminer l'importance fonctionnelle du récepteur hormonal ainsi que celle des autres facteurs de transcription interagissant avec l'enhancer. Les résultats obtenus sont présentés dans les trois chapitres suivants.

Dans une première étape, une nouvelle méthode de préparation d'extraits nucléaires, mise au point au laboratoire, m'a permis de mettre en évidence que l'enhancer est la cible du facteur de transcription dGATAb, au niveau de trois sites de fixation.

J'ai ensuite cherché à préciser l'influence du récepteur du signal hormonal dans la restriction tissulaire et temporelle d'expression du gène *Fbp1*. Pour cela, j'ai développé une deuxième approche qui repose sur l'étude, par transgénèse, de l'effet de la substitution de sites de fixation de facteurs régulateurs à l'ADN. Cette approche m'a permis de montrer que le récepteur hormonal joue un rôle de régulateur temporel de l'activation de l'enhancer du gène *Fbp1* et qu'il ne semble pas avoir de rôle dans la restriction tissulaire de son activation.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de l'article "Dual requirement for the EcR/USP nuclear receptor and the dGATAb factor in an ecdysone response in *Drosophila melanogaster*" (Mol. Cell. Biol, Vol 19, No 8, p5732-5742, 1999). Une série de résultats complémentaires apportant des indications sur le mode de fixation du facteur dGATAb à son site cible dans l'enhancer, ainsi que sur les interactions que ce facteur peut établir avec le récepteur hormonal ont été obtenus. L'ensemble de ces résultats seront présentés et discutés dans le chapitre 4.

Dans le chapitre 5, seront décrits les résultats de l'approche de substitution de site *in vivo*, employée également pour chercher à préciser le rôle du facteur dGATAb dans la spécificité tissulaire d'activation de l'enhancer. Cette approche s'est révélée très informative car elle était la seule possible pour mettre en évidence la redondance fonctionnelle partielle qui existe entre deux des trois sites de fixation du facteur dGATAb identifiés dans l'enhancer. Elle nous a également permis de révéler le mécanisme complexe qui limite l'activation de l'enhancer de *Fbp1* au tissu adipeux. Cette activation est réprimée dans tous les tissus par le facteur répresseur AEF-1, et induite par le facteur dGATAb uniquement dans le tissu adipeux. Ceci nous a conduit à proposer un modèle de régulation selon lequel le facteur dGATAb occupe une position centrale.

Enfin, nous avons cherché à préciser l'intégration du gène *Fbp1* dans la cascade génétique décrite par Ashburner *et al.* Nous avons montré que l'activation de l'enhancer du gène *Fbp1* est régulée par une combinaison particulière d'isoformes codées par le gène *Broad-Complex*. Cette combinaison est impliquée dans la régulation temporelle de cette activation et non dans sa régulation tissulaire. Ces résultats sont rassemblés, dans le chapitre 6, sous forme d'un manuscrit à soumettre pour publication.

Les conclusions générales concernant l'ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit et les perspectives qu'ils ouvrent sont rassemblées dans le chapitre 7.

CHAPITRE 4

La réponse hormonale du gène *Fbp1* nécessite une double activation par le récepteur hormonal et le facteur dGATAb.

1. Résultats antérieurs.

Dans le but d'identifier les facteurs régulateurs se fixant à l'enhancer du gène *Fbp1*, des expériences de retardement sur gel très détaillées avaient été réalisées à partir d'un extrait nucléaire de corps gras de larves de troisième stade (Antoniewski et al., 1994). Elles avaient révélé que sept facteurs présents dans cet extrait interagissent avec l'enhancer et avaient permis de préciser la localisation de leurs sites de fixation respectifs (Antoniewski et al., 1994).

Le récepteur hormonal EcR/USP a été ensuite identifié parmi ces sept facteurs. Il a été montré que la mutation du site de fixation du récepteur hormonal EcRE (Ecdysone Response Element) abolit totalement la capacité de l'enhancer à diriger l'expression d'un gène indicateur *lacZ* dans le corps gras. L'intégrité de ce site est donc nécessaire pour l'activité de l'enhancer (Antoniewski et al., 1996).

De plus, C. Antoniewski *et al.* ont montré que la multimérisation de sites de fixation du récepteur hormonal ne suffit pas pour activer *in vivo* le promoteur minimal du gène *Fbp1* (Antoniewski et al., 1996). Le site de fixation du récepteur hormonal est donc insuffisant à lui seul pour conférer *in vivo* une réponse hormonale. Pour autant, dans le contexte de l'enhancer, ce site est strictement requis. Ces résultats indiquent que le récepteur hormonal EcR/USP est indispensable dans le fonctionnement de l'enhancer mais que d'autres facteurs que ce récepteur sont requis pour permettre la réponse hormonale.

La caractérisation de ces facteurs est donc une étape essentielle pour comprendre le fonctionnement de cet enhancer.

Je me suis attachée à contribuer à atteindre cet objectif en mettant en jeu deux approches expérimentales.

- La première, classique, a consisté à analyser des interactions protéines/ADN *in vitro* dans des expériences de retardement sur gel d'électrophorèse, mais en utilisant une méthode nouvelle pour la préparation des extraits nucléaires.

- La deuxième, plus originale, a reposé sur l'étude, par transgénèse, de l'effet de la substitution par un site UAS de fixation du facteur GAL4 des sites de fixation caractérisés par la première approche.

Je détaillerai ci-dessous ces deux approches.

2. Mises au point méthodologiques.

1. Nouvelle méthode de préparation d'extraits nucléaires de tissu adipeux.

Un extrait nucléaire de corps gras obtenu à partir de larves récoltées en masse à la fin du troisième stade larvaire avait été utilisé par Antoniewski *et al.* pour mettre en évidence la formation de sept complexes avec l'enhancer utilisé comme sonde radioactive (Figure 22 et (Antoniewski et al., 1994).

La méthode de préparation d'extraits en masse de corps gras à partir d'une quantité importante de larves est longue. Au cours du temps nécessaire pour séparer le corps gras des autres tissus, l'action de diverses protéases libérées par la rupture des cellules peut prendre place.

Pour minimiser cette action, Bruno Mugat au laboratoire, a mis au point une méthode permettant de miniaturiser et accélérer la préparation des extraits nucléaires. Cette préparation s'effectue sur des tissus préparés par dissection à partir d'un nombre de larves variant de 50 à 80. Ce faible nombre permet également de travailler sur des animaux dont le stade de développement est plus aisément contrôlé.

L'utilisation de ces "mini-extraits" nucléaires de tissu adipeux conduit à un profil de migration très différent des complexes formés avec l'extrait nucléaire "en masse" (Figure 22).

Les trois complexes 5, 6 et 7 précédemment décrits par Antoniewski *et al.* migrent plus rapidement que le complexe formé par le récepteur hormonal. Ces trois complexes sont absents du profil de migration obtenu à partir de "mini-extraits" (Figure 22). En revanche, on observe la formation de trois complexes nouveaux, nommés a, b et c, migrant plus lentement que le récepteur hormonal (Figure 22). J'ai vérifié que ces trois nouveaux complexes interagissent toujours avec l'enhancer, de façon indépendante, au niveau des mêmes sites de fixation des complexes 5, 6 et 7.

Ce résultat suggérait que la protéolyse des facteurs impliqués dans la formation des complexes a, b et c pouvait être à l'origine de la formation des complexes 5, 6 et 7.

J'ai dès lors travaillé exclusivement avec des extraits préparés selon cette nouvelle technique. Comme il est décrit dans l'article Brodu *et al.*, j'ai pu ainsi confirmer l'hypothèse

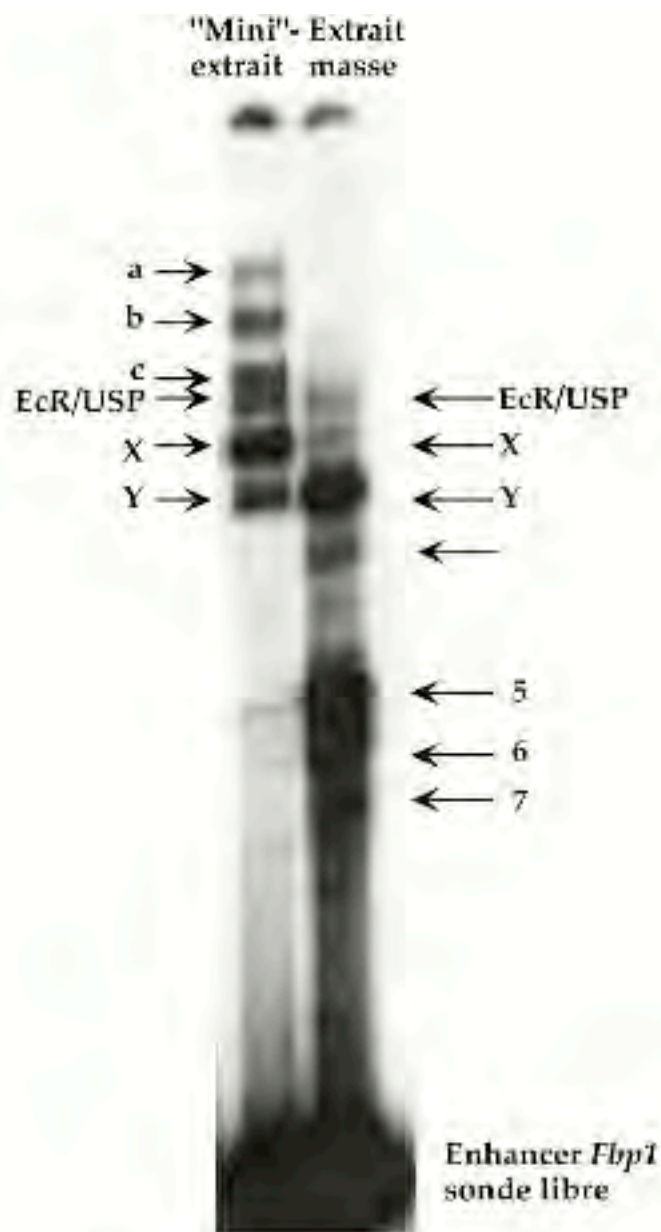


Figure 22 : Comparaison des profils de retardement obtenus avec l'enhancer de *Fbp1* comme sonde radioactive en présence de "mini"-extraits ou d'extraits de masse nucléaires de corps gras.

Les complexes obtenus sont indiqués par des flèches. Les complexes X et Y sont formés, à partir des deux types d'extraits, dans des proportions relatives différentes. Leur fixation nécessite la présence des sites GBS1 et GBS2. La nature des facteurs impliqués dans leur formation est pour le moment encore inconnue.

d'une protéolyse et caractériser les facteurs impliqués dans la formation des complexes a, b et c.

2. Substitution des sites de fixation des facteurs régulateurs

J'ai développé une approche permettant d'analyser, au niveau d'un élément cis-régulateur, comment l'action de facteurs de transcription peut être restreinte à un seul tissu.

La limitation tissulaire de l'activité d'un facteur de transcription peut être exercée au moins à trois niveaux différents.

A un premier niveau, l'activité d'un facteur peut être restreinte à un tissu particulier par la limitation de son expression à ce tissu.

Un deuxième niveau de régulation peut s'exercer par le biais d'une modulation tissulaire de l'activité du facteur exprimé de façon ubiquitaire. Cette modulation peut dépendre par exemple de modifications post-traductionnelles ou d'une association avec des co-facteurs dont l'expression est restreinte spatialement.

Un dernier niveau peut faire intervenir l'accessibilité, modulée selon les tissus, du facteur à sa cible génétique.

Dans le but de déterminer à quel niveau les facteurs EcR/USP et dGATAb pouvaient être modulés dans leur activité, j'ai étudié, par transgénèse, l'effet de la substitution de leurs sites de fixation par celui d'un transactivateur exprimé de façon ubiquitaire et dont la capacité transactivatrice est autonome.

J'ai choisi de tester l'effet de la substitution des sites de fixation de EcR/USP et dGATAb par un site UAS de fixation du facteur GAL4 exprimé de manière ubiquitaire. En effet, il est clairement établi que le transactivateur hétérologue GAL4 de levure est fonctionnel chez la drosophile dans tous les tissus et à tous les stades de développement (Brand and Perrimon, 1993).

Dans le cas où la substitution conduit à une expression nulle de la construction, cela indique que le facteur de transcription considéré ne peut pas être substitué par le facteur GAL4. Un tel cas de figure ne nous apporte pas d'informations sur sa modulation tissulaire d'activité.

En revanche si une expression ubiquitaire de la construction est observée, cela signifie qu'à la suite de la substitution, l'expression du promoteur est passée sous contrôle du facteur hétérologue GAL4. Dans ce cas, ceci suggère que le facteur de transcription

concerné par la substitution est le seul facteur essentiel impliqué dans la spécificité d'expression du transgène.

Dans le cas où l'expression est restreinte à un sous-ensemble des tissus larvaires, cela signifie qu'il existe, en dehors du site de fixation substitué, d'autres sites de fixation de facteurs limitant l'activité de GAL4.

En résumé, cette approche permet de mettre en évidence l'importance de sites de fixation autres que celui concerné par la substitution dans la modulation de l'activité transactivatrice de facteurs, comme GAL4. Elle permet également de contourner la stricte dépendance vis-à-vis d'un site essentiel et de tester le rôle des autres sites de fixation dans la restriction tissulaire.

Le préalable à cette approche de substitution de site de fixation était de s'assurer que le promoteur minimal du gène *Fbp1* n'est pas à lui seul la cible de facteurs capables de moduler l'expression du facteur GAL4.

Des délétions successives des séquences promotrices du gène *Fbp1* avaient permis de délimiter, entre les positions -68 et +80 par rapport au site de démarrage de la transcription, une séquence promotrice ne présentant pas d'activité transcriptionnelle autonome (Lapie et al., 1993). Placée en amont du gène indicateur *lacZ*, cette séquence promotrice ne permet de détecter aucune expression du gène indicateur (Laval et al., 1993).

Afin de déterminer si cette séquence peut correspondre à la définition d'un promoteur minimal, acceptant des séquences régulatrices sans moduler leur activité, j'ai ajouté cinq répétitions du site UAS en amont de cette séquence promotrice. Cette addition ne conduit à aucune expression du gène indicateur, en absence de facteur GAL4. Ceci confirme bien que cette séquence promotrice n'est douée d'aucune propriété intrinsèque d'activation transcriptionnelle. En revanche, en présence du facteur GAL4 exprimé de manière ubiquitaire, on observe une expression ubiquitaire de ce transgène, à l'exception d'une partie du système nerveux central et des gonades (Chapitre 5 et résultats non montrés). Cette expression prend place à tous les stades de développement depuis l'embryogenèse jusqu'à la formation du puparium. Ce résultat indique que cette séquence promotrice est activable par un facteur de transcription tel que le facteur GAL4 mais ne comporte pas de site de fixation d'autres facteurs pouvant interférer avec cette transactivation.

Nous pouvons conclure que la séquence promotrice (-68/+80) est silencieuse en absence de GAL4 et est activée de façon presque ubiquitaire en sa présence. Par la suite,

nous avons considéré cette séquence comme un promoteur minimal dans les différentes constructions.

En pratique, dans le contexte du promoteur du gène *Fbp1* placé en amont du gène indicateur *lacZ*, j'ai remplacé un site cible de fixation pour les facteurs de transcription EcR/USP et dGATAb par un site UAS de fixation du facteur GAL4 de levure. J'ai établi des lignées transgéniques pour chacune des versions modifiées de l'enhancer. Ces lignées transgéniques ont ensuite été croisées avec une lignée Da-GAL4 exprimant le facteur GAL4, de manière ubiquitaire et constante, sous contrôle du promoteur *daughterless* (Wodarz et al., 1995).

A l'issue de ces croisements, j'ai analysé l'expression du transgène modifié qualitativement par coloration histochimique et quantitativement par mesure de l'activité β -galactosidase.

3. La réponse hormonale du gène *Fbp1* nécessite une double activation par le récepteur hormonal et le facteur dGATAb.

L'examen des sites de fixation des complexes a, b, c dans la séquence de l'enhancer a révélé qu'ils pouvaient être des cibles pour des facteurs de la famille GATA. Chez la drosophile, comme nous l'avons mentionné au cours de l'introduction, trois facteurs GATA ont été caractérisés jusqu'à présent. Le facteur dGATAb, codé par le gène *serpent*, participe à la différenciation du corps gras et constitue le marqueur le plus précoce pour identifier les précurseurs de ce tissu dans l'embryon (Reuter, 1994) (Chapitre 2). Son expression conduit les cellules embryonnaires du mésoderme à adopter une destinée de tissu adipeux alors que l'absence d'expression de dGATAb permet le développement des gonades (Moore et al., 1998; Riechmann et al., 1998). Par ailleurs, l'équipe de T. Maniatis a montré que l'expression du gène *Alcohol dehydrogenase (Adh)*, exprimé dans le tissu adipeux larvaire, est régulée par le facteur dGATAb (Abel et al., 1993).

La juxtaposition de ces données nous a conduit à tester l'hypothèse que le facteur dGATAb pouvait également réguler l'activité de l'enhancer du gène *Fbp1* dans le corps gras en fin de troisième stade larvaire. L'utilisation des "mini-extraits" de corps gras larvaire, préparés selon la nouvelle méthode, nous a permis de montrer que le facteur de transcription dGATAb était impliqué dans la formation des trois complexes a, b, c et qu'il interagissait directement avec l'enhancer.

Dans une expérience de retardement sur gel, ces trois complexes sont reconnus spécifiquement par deux anticorps anti-dGATAb dirigés l'un contre les 16 derniers acides aminés et l'autre contre 7 acides aminés présents dans la partie centrale de ce facteur.

L'approche de substitution *in vivo* du site de fixation du récepteur hormonal par un site UAS apporte également la démonstration que le récepteur hormonal joue un rôle essentiel comme régulateur temporel.

L'ensemble de ces résultats est décrit dans l'article "Dual requirement for the EcR/USP nuclear receptor and the dGATAb factor in an ecdysone response in *Drosophila melanogaster*" (Brodu, V., Mugat, B., Roignant, J. Y., Lepesant, J. A., Antoniewski, C. Mol. Cell; Biol, Vol 19, No 8, p5732-5742, 1999). Il est complété par l'exposé de résultats complémentaires sur le mode de fixation des complexes contenant le facteur dGATAb à l'ADN et sur les interactions qu'il peut établir avec le récepteur hormonal.

Dual Requirement for the EcR/USP Nuclear Receptor and the dGATAb Factor in an Ecdysone Response in *Drosophila melanogaster*

VERONIQUE BRODU, BRUNO MUGAT, JEAN-YVES ROIGNANT, JEAN-ANTOINE LEPESANT, AND CHRISTOPHE ANTONIEWSKI*

Institut Jacques Monod, Laboratoire de Biologie du Développement, CNRS UMR 7592, Université Paris 7 Denis Diderot, Université Paris 6 P. et M. Curie, 75251 Paris Cedex 05, France

Received 21 April 1999; Returned for modification 6 May 1999; Accepted 20 May 1999

The EcR/USP nuclear receptor controls *Drosophila* metamorphosis by activating complex cascades of gene transcription in response to pulses of the steroid hormone ecdysone at the end of larval development. Ecdysone release provides a ubiquitous signal for the activation of the receptor, but a number of its target genes are induced in a tissue- and stage-specific manner. Little is known about the molecular mechanisms involved in this developmental modulation of the EcR/USP-mediated pathway. *Fbp1* is a good model of primary ecdysone response gene expressed in the fat body for addressing this question. We show here that the dGATAb factor binds to three target sites flanking an EcR/USP binding site in a 70-bp enhancer that controls the tissue and stage specificity of *Fbp1* transcription. We demonstrate that one of these sites and proper expression of dGATAb are required for specific activation of the enhancer in the fat body. In addition, we provide further evidence that EcR/USP plays an essential role as a hormonal timer. Our study provides a striking example of the integration of molecular pathways at the level of a tissue-specific hormone response unit.

Nuclear receptors for steroid and retinoid hormones are transcription factors that bind to gene promoters, recruit co-activators or corepressors, and modulate the activity of the transcription machinery. A wealth of information concerning these mechanisms has been provided by *in vitro* approaches or studies with cultured cell systems (19, 30). In whole organisms, gene responses to circulating hormones depend on both the target tissue and the developmental stage. Accordingly, nuclear receptor binding sites in natural promoters are often found included in composite assemblages of multiple binding sites for a variety of transcription factors (29). These so-called hormone response units are thought to integrate multiple regulatory pathways responsible for the tissue and time specificity of the transcriptional hormonal response. However, the mechanisms by which this integration occurs in animals are poorly understood.

Drosophila melanogaster provides a choice model for the study of a steroid hormone response in the context of a developing organism. At the end of the third larval instar, a major pulse of 20-hydroxyecdysone (hereafter referred to as ecdysone) triggers the larval-to-prepupal morphological transition and initiates metamorphosis (3). During this period, the ecdysone receptor, a heterodimer between the EcR and USP proteins, two members of the nuclear receptor superfamily (22, 46, 52), orchestrates complex waves of gene transcription in target tissues of ecdysone. The regulatory pathways controlling this genetic program at the temporal level have been examined in detail (see reference 47 for a review; see also references 13, 23, and 50 for recent advances). Despite these advances, how transcription of genes, in response to circulating ecdysone, is

restricted to a subset or a single target tissue remains an open question.

We used *Fbp1* as a model gene to address this question. *Fbp1*, which encodes a receptor mediating the uptake of hexameres from the hemolymph (12), is transcribed in response to ecdysone exclusively in the fat body during the second half of the third larval instar (2, 27). Germ line transformation analysis of its promoter has pinpointed a 70-bp enhancer (–69 to –158) sufficient to specify the spatially and temporally ecdysteroid-controlled pattern of *Fbp1* expression (24). The EcR/USP heterodimer binds to a pseudopalindromic site in the 70-bp *Fbp1* enhancer (4). Mutations of this site completely abolished the ability of the *Fbp1* enhancer to confer a fat body-specific ecdysteroid response onto a minimal promoter-*lacZ* reporter transgene, indicating that activation by the EcR/USP heterodimer is a strict requirement for the activity of the *Fbp1* enhancer (5). Germ line transformation experiments showed, however, that an EcR/USP binding site was unable by itself to confer an ecdysteroid response onto the same minimal-promoter-*lacZ* reporter gene, even when multimerized. This provided evidence that other transcription factors, targeted to sequences flanking the EcR/USP binding site in the *Fbp1* enhancer, must act *in vivo*, in addition to the ecdysone receptor, to mediate an ecdysteroid genetic response (5).

Analysis of the role of these sequences is complicated by the fact that their regulatory function cannot be revealed in the absence of activation by the liganded EcR/USP heterodimer. We show here that replacement of the EcR/USP binding site with an upstream activation sequence (UAS) site can circumvent this limitation. In the presence of the yeast activator Gal4, transcriptional activation of this modified *Fbp1* enhancer remains restricted to the third-instar fat body, providing direct confirmation that sequences flanking the EcR/USP binding site play an important role in this specific activation. We further show that dGATAb, the product of the *serpent* (*srp*) gene, binds in the close vicinity of the EcR/USP binding site

* Corresponding author. Mailing address: Institut Jacques Monod, Laboratoire de Biologie du Développement, CNRS UMR 7592, Université Paris 6 et Paris 7, 2 place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France. Phone: (33 1) 44 27 78 12, Fax: (33 1) 44 27 52 65, E-mail: antoniewski@ijm.jussieu.fr.

4. Résultats complémentaires

Les résultats rapportés dans l'article "Dual requirement for the EcR/USP nuclear receptor and the dGATAb factor in an ecdysone response in *Drosophila melanogaster*" démontrent que l'enhancer du gène *Fbp1* est *in vivo* la cible directe du facteur dGATAb et du récepteur de l'ecdysone.

De plus, ces résultats suggèrent très fortement que le récepteur de l'ecdysone n'intervient que comme un régulateur temporel de l'activation de l'enhancer de *Fbp1*, et qu'il n'est pas impliqué dans la régulation tissulaire de son expression.

Ils démontrent enfin que les séquences de l'enhancer adjacentes au site de fixation de ce récepteur sont essentielles pour diriger une expression dans le tissu adipeux.

Les trois sites de fixation du facteur dGATAb font partie de ces séquences essentielles, et tout particulièrement le site noté GBS1. En effet, seule la mutation du site GBS1 abolit totalement l'expression du transgène. Le site GBS1 permet, *in vitro*, la fixation du facteur dGATAb associé à des partenaires de nature inconnue. Cette association se traduit par la formation des complexes a et b. Avec une affinité plus faible, le site GBS3 permet également la formation de ces deux complexes a et b. En revanche, le site GBS2 ne semble impliqué que dans la fixation du facteur dGATAb. Celle-ci se traduit par la formation d'un complexe de migration noté c.

Ces observations m'ont conduit à chercher l'origine des propriétés distinctes des sites GBS1, GBS2 et GBS3.

Par ailleurs, j'ai cherché à caractériser des partenaires potentiels de dGATAb.

1. La formation *in vitro* des complexes a et b dépend d'une séquence spécifique.

Les facteurs GATA ont une affinité préférentielle pour les séquences du type (A/T)GATA(A/G). Cependant, Merika et al. (Merika and Orkin, 1993) ont montré que, *in vitro*, des séquences même très éloignées de la séquence consensus (par exemple la séquence G/GTTA/G) peuvent permettre la fixation des facteurs de la famille GATA.

Dans le cas de l'enhancer du gène *Fbp1*, nous avons caractérisé trois sites de fixation pour le facteur dGATAb. En utilisant l'oligonucléotide A, incluant le site GBS1, trois complexes a, b et c peuvent être mis en évidence par retardement sur gel (Figure 23, ligne

1). L'utilisation de l'oligonucléotide B, recouvrant le site GBS2, ne permet que la formation d'un complexe c (Figure 23, lignes 1 et 6).

Dans un premier temps, j'ai testé si la divergence de GBS1 et GBS2 au niveau de la séquence centrale GATA peut expliquer cette différence de comportement (Figure 23, B). Pour cela, j'ai utilisé un oligonucléotide At pour lequel la séquence 5'GATA3' de GBS1 est changée pour la séquence 5'GATT3', qui correspond au motif central GBS2. Les trois complexes a, b, c sont formés avec l'oligonucléotide modifié (Figure 23, ligne 7). Bien que l'efficacité de formation de ces complexes avec cet oligonucléotide soit plus faible, leur intensité relative ne varie pas (Figure 23, lignes 1 et 7). Ce résultat indique que la séquence centrale a une influence sur l'affinité de fixation de chacun des complexes mais qu'elle n'est pas déterminante pour expliquer la différence d'efficacité de formation des complexes a et b au niveau de GBS1. D'autres caractéristiques importantes en dehors de cette séquence centrale doivent exister pour expliquer cette fixation différentielle.

Les sites GBS1 et GBS3 présentent de fait une même séquence centrale de type 5'GATA3', mais ils diffèrent par leurs nucléotides flanquants en 5' et en 3' (Figure 23, B). En utilisant l'oligonucléotide F, incluant le site GBS3, on observe la formation majoritaire du complexe c et dans une moindre mesure des complexes a et b (Figure 23, ligne 2). Ceci est en faveur de notre hypothèse selon laquelle les bases flanquantes de la séquence centrale GATA jouent un rôle très important dans la formation des complexes a et b.

Pour confirmer cette hypothèse, j'ai utilisé une série de trois oligonucléotides, notés Fm5, Fm3 et Fm53, variant au niveau des bases flanquantes de la séquence centrale GATA. L'oligonucléotide Fm53 possède un site de fixation pour dGATAb qui est rendu identique au site GBS1 mais dans le contexte de l'oligonucléotide F (Figure 23, B).

L'utilisation de l'oligonucléotide Fm5 comme sonde ne permet que la formation majoritaire du complexe c et faiblement celle des complexes a et b (Figure 23, ligne 3). En revanche, l'intensité des complexes a et b est très renforcée en utilisant les sondes Fm3 et Fm53 (Figure 23, lignes 4 et 5). Ces résultats indiquent que la séquence centrale du site GATA joue un rôle déterminant dans l'affinité de fixation des différents complexes. Par ailleurs, la présence de la base A située en 3' de la séquence centrale est cruciale pour la formation des complexes a et b.

Seul le site GBS1 présente la séquence GATAA qui permet la formation efficace des 3 complexes a, b et c. De façon intéressante, les sites de fixation du facteur dGATAb identifiés dans les promoteurs des gènes des peptides de défense immunitaire, *Adh* et *Yp*, présentent tous la séquence GATAA.

La formation des complexes a et b dépend d'une séquence spécifique

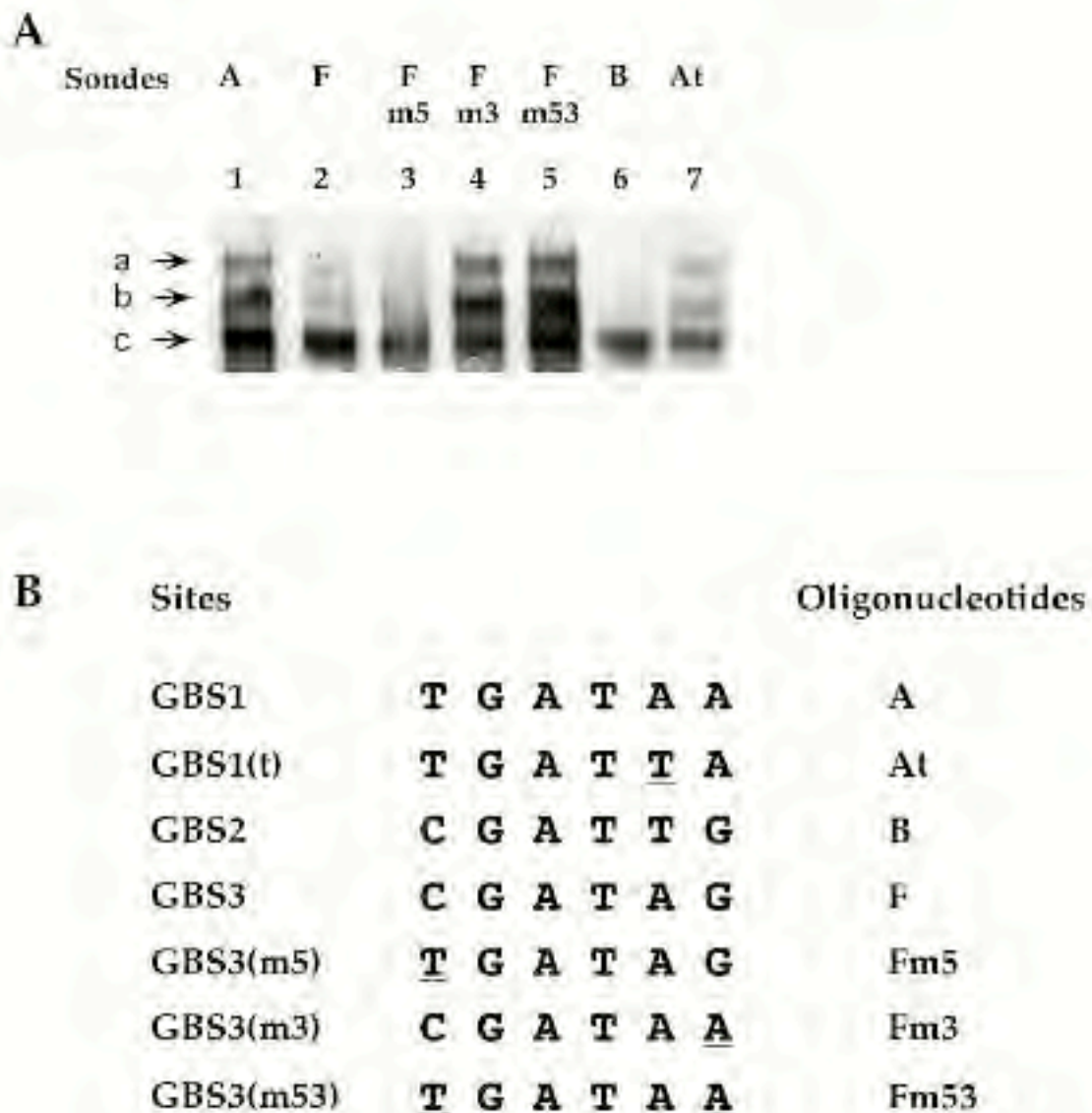


Figure 23 : Comparaison des profils de retardement obtenus avec des sondes radioactives contenant des sites de fixation GBS de séquences différentes.

A. Les complexes a, b et c sont indiqués avec des flèches. Le nom des différentes sondes radioactives est indiqué au dessus de chaque piste.

B. Séquence des sites de fixation GATA (GBS) inclus dans les oligonucléotides ayant servi de sondes radioactives.

2. Capacité d'homodimérisation du facteur dGATAb

M. Crossley et ses collaborateurs ont montré que le facteur GATA-1 humain est capable de former des homodimères en solution mais également des hétérodimères avec les facteurs GATA-2 et GATA-3 humains (Crossley et al., 1995). Ces homo- ou hétérodimères sont tous capables de se fixer sur un site consensus (A/T)GATA(A/G). Les facteurs de la famille GATA comportent deux doigts à zinc, très homologues entre eux. Les auteurs montrent dans cette étude que le doigt carboxy-terminal (C-f) assure la fixation à l'ADN et le doigt amino-terminal (N-f) aurait une fonction de stabilisation de cette fixation. Les capacités de dimérisation de ces facteurs impliquent le doigt C-f de GATA-1.

Nous nous sommes demandé si dGATAb était lui aussi capable de former des dimères et si cette dimérisation pouvait expliquer la formation des complexes a et b.

2.1. Principe du test d'interaction *in vitro*.

Le principe d'interaction *in vitro* repose sur l'incubation de deux protéines produites *in vitro*, dont l'une est couplée à des billes de Sépharose et l'autre est en solution et marquée radioactivement. Si les deux protéines interagissent, on peut retenir la protéine radioactive sur la matrice d'affinité constituée de la protéine couplée aux billes de Sépharose. Cette interaction est rendue visible après électrophorèse en gel et autoradiographie

J'ai testé la capacité à homodimériser de la protéine dGATAb. Pour cela, j'ai réalisé une fusion protéique entre la Glutathion-S-Transférase (ou GST) et la protéine dGATAb. Cette protéine de fusion est produite dans *E. Coli* et purifiée grâce à forte affinité du groupement GST pour les billes de Sépharose. Par ailleurs, la protéine dGATAb a été traduite dans un lysat de réticulocytes en présence de Méthionine marquée par le radio-isotope [35S]. La protéine ainsi synthétisée est donc détectable par autoradiographie.

2.2. Mise en évidence de l'homodimérisation.

En conditions de surexpression dans *E. coli*, la protéine GST-dGATAb s'accumule dans des corps d'inclusion. Une délétion, du côté carboxy-terminal, des 161 derniers acides aminés sur les 951 que comporte la protéine permet la production de la protéine GST-

dGATAb Δ C sous forme soluble. Nous présentons ici les résultats obtenus avec cette protéine délétée. Cependant, un traitement par l'urée de la protéine entière GST-dGATAb a permis de la solubiliser et j'ai obtenu, avec cette protéine, des résultats identiques à ceux présentés ici avec la protéine délétée (Résultats non montrés).

La protéine [35S]-dGATAb traduite *in vitro* est visible par autoradiographie (Figure 24, ligne 1). Cette protéine radioactive est retenue sur les billes de Sépharose couplées à la protéine GST-dGATAb Δ C (Figure 24, ligne 4). Ce résultat indique que les deux protéines interagissent ensemble *in vitro*. Cette dimérisation est spécifique car un signal radioactif n'est pas détecté après incubation de la protéine radioactive avec des billes de Sépharose seules ou des billes de Sépharose couplées à la protéine GST seule (Figure 24, lignes 2 et 3).

La délétion de la partie carboxy-terminale de la protéine dGATAb n'a pas empêché de révéler sa capacité d'homodimérisation. On peut donc d'ores et déjà conclure que cette partie carboxy-terminale n'est pas requise pour l'homodimérisation.

Pour caractériser plus avant le ou les domaines de la protéine dGATAb impliqués dans la dimérisation, j'ai répété ces expériences avec des versions tronquées.

Par analogie avec les facteurs GATA vertébrés pour lesquels il avait été montré que l'intégrité du doigt à zinc C-f était nécessaire et suffisante pour la dimérisation (Crossley et al., 1995), j'ai cherché à déterminer si l'unique domaine à doigt à zinc de dGATAb pouvait être impliqué dans ce phénomène. Pour cela, j'ai produit une protéine fusionnant le domaine du doigt à zinc avec la partie GST (GST-Zn-dGATAb) (Figure 24).

La protéine dGATAb entière traduite *in vitro* n'est pas capable d'interagir avec cette protéine de fusion immobilisée sur des billes de Sépharose (Figure 24, ligne 5). Le domaine à doigt à zinc du facteur dGATAb n'est donc pas suffisant à lui seul pour permettre la dimérisation.

En revanche, la partie de la protéine dGATAb s'étendant de la partie amino-terminale jusqu'à la limite du domaine à doigt à zinc interagit avec la protéine GST-dGATAb Δ C (Figure 24, ligne 9). Par ailleurs, la protéine dGATAb- Δ Zn, pour laquelle le domaine à doigt à zinc a été sélectivement délété, interagit avec la protéine GST-srp Δ C (Figure 24, ligne 12).

De l'ensemble de ces résultats, il apparaît que la protéine dGATAb est capable d'homodimériser. Nos résultats suggèrent que la partie amino-terminale est impliquée dans cette interaction. Ces résultats sont surprenants car les autres membres de la famille GATA font intervenir leur domaine à doigts à zinc pour la dimérisation et non la partie amino-terminale.

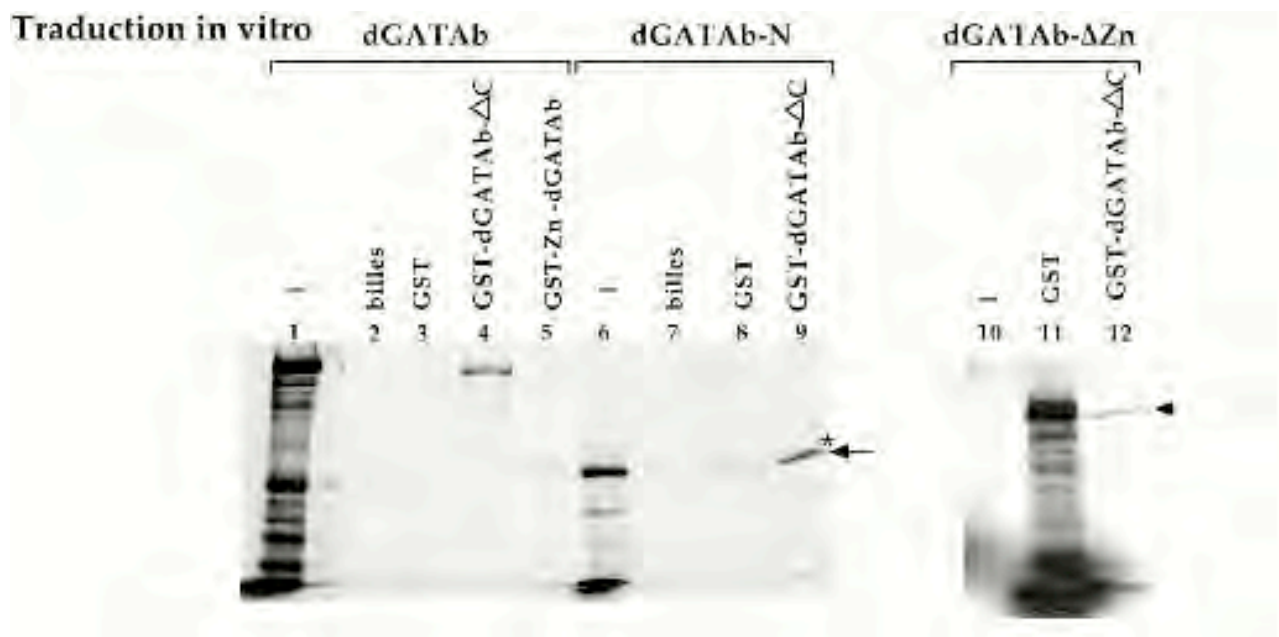
Pour autant, on ne peut pas exclure totalement que le domaine à doigt à zinc ait un rôle si la dimérisation fait intervenir des interactions hétérophiles entre deux domaines distincts de la protéine. Pour éliminer définitivement un rôle éventuel du domaine à doigt à zinc dans la dimérisation, il conviendrait de tester la capacité de dimérisation de la partie amino-terminale de dGATAb traduite *in vitro* avec cette même partie produite en bactéries.

La dimérisation de dGATAb est particulière, par comparaison avec celles des facteurs GATA de vertébrés. Cette particularité pourrait peut-être résider dans le fait que le facteur dGATAb possède un seul doigt à zinc. La comparaison des séquences des domaines à doigts à zinc entre les différents facteurs de la famille GATA montre que l'unique doigt à zinc de dGATAb est plus similaire au doigt C-f qu'au doigt N-f (Rehorn et al., 1996).

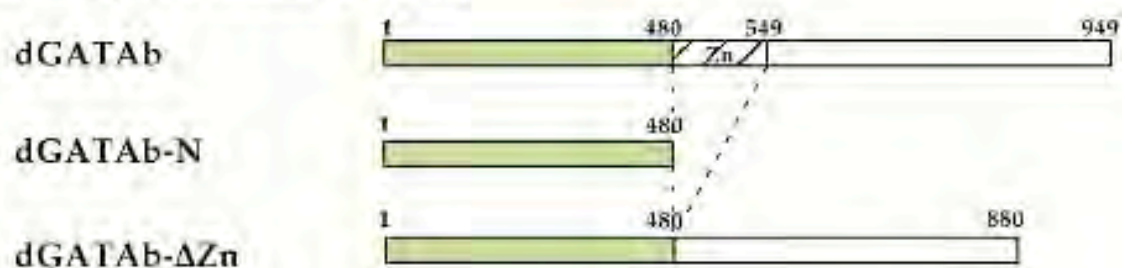
Par retardement sur gel, j'ai observé qu'une protéine délétée sélectivement de son domaine à doigt à zinc n'est plus capable de se fixer sur son site cible (résultats non montrés). Le domaine à doigt à zinc est donc un domaine fonctionnel, absolument requis pour la fixation de dGATAb à l'ADN

A l'heure actuelle, malgré la démonstration que le facteur dGATAb est capable de dimériser en solution, nous ne savons pas sous quelle forme il se fixe *in vivo* sur son site cible. Le facteur dGATAb peut dimériser en solution mais il pourrait se fixer à l'ADN sous forme d'un monomère. De façon alternative, il se pourrait que dGATAb ne puisse se fixer que comme un homodimère.

Cependant, l'utilisation d'un extrait nucléaire de tissu adipeux larvaire a permis de mettre en évidence la capacité d'hétérodimérisation de dGATAb. Cette hétérodimérisation est révélée par la formation des complexes a et b par retardement sur gel. J'ai cherché à caractériser cette capacité d'hétérodimérisation de dGATAb avec un partenaire potentiel : le récepteur hormonal EcR/USP.



Protéines marquées traduites *in vitro*



Protéines produites en bactérie



Figure 24 : Mise en évidence de la capacité d'homodimérisation *in vitro* de la protéine dGATAB

Les différentes parties de la protéines dGATAB traduites *in vitro* et produites en bactérie sont représentées. Les tailles de ces différentes protéines sont données en acides aminés (aa). La région amino-terminale (aa 1 à 480), s'étendant jusqu'au domaine à doigt de zinc, correspond à la région verte. Le domaine à doigt à zinc (aa 481 à 549) est hachuré. La région carboxy-terminale (aa 550 à 949) est en blanc. Pour les protéines produites en bactérie, le groupement GST est en bleu. Les interactions testées avec des différentes parties de la protéine dGATAB sont indiquées au dessus de chaque piste. Un trait correspond à la traduction *in vitro* seule. L'interaction spécifique est indiquée par une flèche. (*) correspond à une bande non spécifique retrouvée dans chaque piste.

2.3. Capacité d'hétérodimérisation avec le récepteur EcR/USP.

Les données de la littérature suggèrent que le facteur GATA-1 interagit avec le récepteur de l'œstrogène et avec le récepteur des glucocorticoïdes (Blobel et al., 1995; Chang et al., 1993). Par analogie, j'ai testé l'interaction du facteur dGATAb avec le récepteur de l'ecdysone.

Des expériences d'interactions *in vitro* nous ont permis de montrer que la protéine EcR interagit spécifiquement avec la protéine GST-dGATAb, et non avec la partie GST seule couplée aux billes de sépharose (Figure 25, ligne 3).

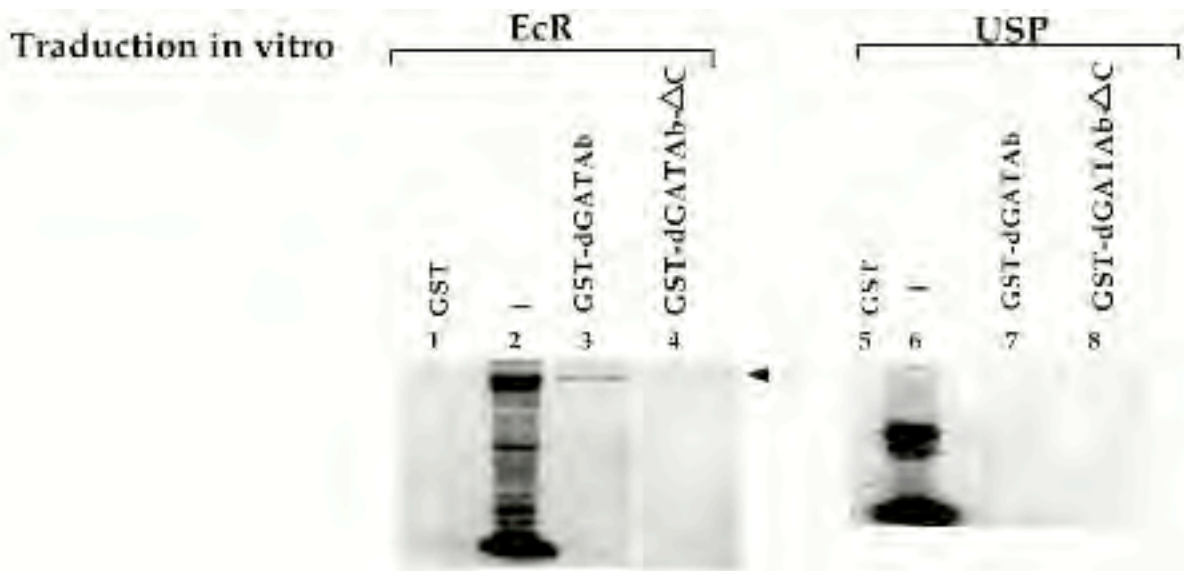
J'ai pu également observer cette interaction avec la protéine GST-srp Δ C, qui présente une délétion de la partie carboxy-terminale (Figure 25, ligne 4). Cependant, l'intensité des bandes visibles sur l'autoradiogramme est plus faible. Pour autant, on ne peut pas conclure que la partie carboxy-terminale joue un rôle dans la stabilisation de cette interaction dans la mesure où les quantités relatives de protéines GST-srp et GST-srp Δ C couplées aux billes utilisées dans cette expérience étaient différentes.

Ces expériences démontrent que la protéine dGATAb interagit *in vitro* avec la protéine EcR. Cependant, je ne dispose pas d'éléments supplémentaires pour préciser les domaines protéiques concernés par cette interaction et je n'ai pas testé l'effet de la présence d'ecdysone sur la stabilité de l'interaction. D'autre part, je n'ai jamais pu mettre en évidence d'interaction de dGATAb avec la protéine USP qui est le partenaire d'EcR pour la formation d'un récepteur actif de l'ecdysone (Figure 25, lignes 7 et 8).

3. Conclusions et perspectives.

3.1. Particularité du site GBS1

De l'ensemble des résultats présentés dans le premier article et dans la section des données complémentaires, il apparaît que le site GBS1 a des propriétés particulières. Tout d'abord c'est le seul site de fixation pour le facteur dGATAb essentiel pour l'activité de l'enhancer *in vivo*. Ensuite, cette importance fonctionnelle est corrélée avec sa particularité de lier spécifiquement dGATAb et ses partenaires avec une forte affinité. Nous avons montré que la séquence spécifique du site GBS1 permet cette liaison. Elle repose sur la présence d'une seule base au sein du site GBS1.



Protéines marquées traduites *in vitro*



Protéines produites en bactérie

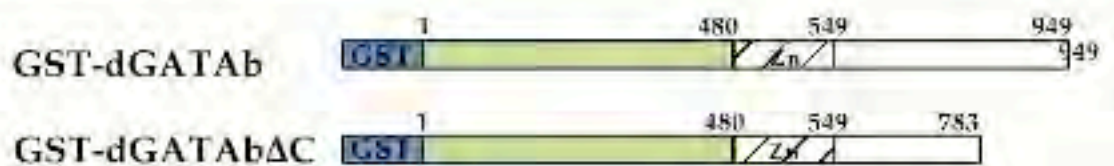


Figure 25 : Test d'interaction *in vitro* de la protéine dGATAb et du récepteur hormonal EcR/USP.

La protéine dGATAb interagit *in vitro* avec la protéine EcR mais pas avec la protéine USP.

Les protéines EcR et USP ont été traduites *in vitro*. Les différentes formes de la protéine dGATAb, fusionnées au groupement GST, ont été produites en bactérie. Se référer à la figure 24 pour les conditions expérimentales. Les tailles des différentes protéines sont données en acides aminés.

3.2. Propriétés du facteur dGATAb *in vitro*

Nous avons mis en évidence la capacité de la protéine de former *in vitro* des homodimères. Cependant, la formation des complexes a et b ne peut pas être expliquée par l'homodimérisation. En effet, l'utilisation, par retardement sur gel, d'un extrait nucléaire de corps gras préparé à partir de larves surexprimant massivement le facteur dGATAb après choc thermique, conduit seulement à un renforcement de la bande c et non à celui des bandes a et b. Si les bandes a ou b résultaient de la dimérisation de dGATAb, on aurait pu s'attendre à un renforcement de leur intensité dans ce contexte de surexpression (Brodu et al., 1999). Ceci conduit à penser que le ou les partenaires de dGATAb impliqués dans la formation des complexes a et b sont limitants dans le tissu adipeux. Les bandes a et b sont reconnues par un anticorps spécifique dirigé contre la protéine dGATAb. Ceci nous permet de conclure que dGATAb participe à la formation de ces complexes soit en association avec une isoforme de dGATAb non encore identifiée à ce jour ou de façon plus probable avec des partenaires hétérologues.

3.3. Interaction de dGATAb avec le récepteur hormonal et importance fonctionnelle.

Nous avons montré la capacité d'hétérodimérisation *in vitro* de dGATAb avec la protéine EcR. Cependant, les bandes a et b ne peuvent être expliquées par cette interaction. Ces bandes ne sont pas reconnues par un anticorps dirigé contre la protéine EcR. L'existence de l'hétérodimère EcR-dGATAb *in vivo* et à fortiori son rôle dans la spécificité tissulaire d'expression restent à établir. En effet, nous avons démontré que le récepteur hormonal peut être substitué par le facteur GAL4 de levure sans changement de la capacité de l'enhancer à diriger la transcription du gène indicateur *lacZ* spécifiquement dans le corps gras. Le récepteur hormonal et le facteur GAL4 de levure ont des structures très différentes et sont très éloignés au plan fonctionnel. Il est donc difficile d'imaginer que le facteur dGATAb interagisse de la même manière avec GAL4 qu'il le fait avec EcR pour diriger spécifiquement une activité transcriptionnelle dans le corps gras. Il est donc peu probable qu'un complexe dGATAb/EcR/USP ait un rôle dans la spécificité tissulaire d'expression du gène *Fbp1*. L'interaction dGATAb/EcR/USP pourrait néanmoins être requise pour potentialiser l'activité du récepteur.

3.4. Le facteur dGATAb et la spécificité tissulaire d'expression du gène *Fbp1*.

La caractérisation des facteurs responsables, en association avec dGATAb, de la formation des complexes a et b, pourrait se révéler être très informative pour comprendre la spécificité tissulaire d'activation de l'enhancer du gène *Fbp1*. Dans ce contexte, Jana Lepesant a entamé au laboratoire un crible en utilisant le système double hybride chez la levure pour identifier des partenaires de dGATAb.

a- Surexpression de dGATAb.

Pour tester l'importance fonctionnelle du complexe formé par le facteur dGATAb associé à ses partenaires éventuels pour l'activation de l'enhancer dans le corps gras, j'ai étudié l'effet de la surexpression ubiquitaire du facteur dGATAb. Cet effet a été testé en suivant l'expression du gène indicateur *lacZ* placé sous contrôle de l'enhancer du gène *Fbp1*.

Dans l'article présenté dans ce chapitre, nous avons montré que la surexpression du facteur dGATAb conduit à l'expression du transgène indicateur *lacZ*, placé sous contrôle de l'enhancer du gène *Fbp1*, dès le milieu du deuxième stade larvaire, dans le corps gras et dans deux tissus supplémentaires, les glandes salivaires et le proventricule.

Une hypothèse peut être formulée pour expliquer la limitation à deux autres tissus seulement de l'expression ectopique du transgène dans un contexte de surexpression ubiquitaire de dGATAb. L'expression du transgène pourrait requérir la combinaison du facteur dGATAb et de ses partenaires. Dans un contexte sauvage, cette combinaison particulière ne serait retrouvée que dans le corps gras. L'absence d'expression dans tous les autres tissus serait due à l'absence d'expression soit du facteur GATA soit de ses partenaires. Dans un contexte de surexpression ubiquitaire, la limitation tissulaire d'expression reflèterait la spécificité tissulaire d'expression des partenaires, limitée aux glandes salivaires et au proventricule.

b- Surexpression d'autres membres de la famille GATA.

Nous avons voulu tester si le complexe dGATAb est requis spécifiquement pour l'activation de l'enhancer ou s'il peut être remplacé par d'autres facteurs GATA. Dans ce but, j'ai examiné l'expression du transgène dans des contextes de surexpression ubiquitaire de différents facteurs GATA. J'ai étudié l'effet de la surexpression des deux autres facteurs GATA de la drosophile : dGATAa et dGATAc qui ne sont normalement pas

exprimés dans le corps gras (lignées transgéniques fournies respectivement par P. Romain et J. Castelli-Gair). J'ai également choisi de tester la surexpression de facteurs GATA vertébrés. Parmi les six facteurs GATA isolés chez les vertébrés, j'ai choisi de tester la surexpression d'un représentant des sous-familles impliquées dans l'hématopoïèse (GATA-1 murin) et dans l'organogenèse (GATA-4 murin) (Lignées transgéniques mises à notre disposition par R. Schulz). Il est à noter que j'ai testé l'effet de la surexpression de ces facteurs GATA dans un contexte sauvage pour le gène dGATAb. En effet, tous les mutants du gène dGATAb isolés à ce jour sont létaux avant la fin de l'embryogenèse.

De façon surprenante, la surexpression, dans les mêmes conditions, des facteurs dGATAa, dGATAc, GATA-1 et GATA-4 a conduit aux mêmes résultats que la surexpression de dGATAb, c'est-à-dire une expression plus précoce et dans le corps gras, les glandes salivaires et le proventricule (Résultats non montrés). L'ensemble des facteurs GATA est capable d'une action sur l'expression du gène *Fbp1*. Cependant cette action reste toujours limitée aux trois mêmes tissus.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces résultats.

Une première hypothèse, pour expliquer la limitation aux glandes salivaires et au proventricule, est que seule la combinaison particulière associant le facteur GATA et ses partenaires puisse assurer l'expression du transgène. Ces partenaires seraient présents dans le corps gras mais également dans les glandes salivaires et le proventricule. Pour cette raison, la surexpression ubiquitaire ne conduirait à une activation que dans ces trois tissus où les partenaires sont présents. Les résultats obtenus avec dGATAa, dGATAc, GATA-1 et GATA-4 suggèrent que tous les facteurs GATA seraient capables d'interagir avec les mêmes partenaires.

L'appartenance d'un facteur de transcription à la famille GATA est fondée sur la présence d'un domaine à doigt à zinc caractéristique. En dehors de ce domaine, les séquences sont très divergentes d'un facteur GATA à l'autre pour une espèce donnée. Si les partenaires de dGATAb sont capables d'interagir avec tous les facteurs GATA utilisés dans ces expériences, il faudrait alors supposer que le domaine concerné par cette interaction est le domaine à doigt à zinc lui-même. Cette hypothèse peut être appuyée par le fait que le domaine d'interaction des facteurs GATA-1, GATA-4 et dGATAa et de leurs co-facteurs respectifs FOG-1, FOG-2 et Ush est le domaine à doigt à zinc (Cubadda et al., 1997; Haenlin et al., 1997; Svensson et al., 1999; Tevosian et al., 1999; Tsang et al., 1997). Par ailleurs, il a été montré que le facteur FOG-1 interagit *in vitro* avec tous les facteurs GATA (Tsang et al., 1997).

Cette hypothèse est purement spéculative dans l'attente de l'identification des partenaires du facteur dGATAb. Cette identification pourrait peut-être aboutir en choisissant précisément le domaine à doigt à zinc de dGATAb comme appât dans le système de double hybride chez la levure.

Une deuxième hypothèse peut être proposée pour expliquer pourquoi la surexpression d'un facteur GATA n'a d'effet que dans le même sous-ensemble de tissus. Le tissu adipeux, les glandes salivaires et le proventricule seraient les seuls tissus susceptibles de répondre à cette surexpression. Cette limitation de la réponse pourrait dépendre de facteurs répresseurs limitant de façon générale l'accessibilité des facteurs GATA à leurs cibles.

Cette deuxième hypothèse fait appel à une notion de compétence des tissus à répondre à la surexpression d'un facteur GATA. Cette compétence serait définie par la combinaison particulière de facteurs présents dans le tissu adipeux, les glandes salivaires et le proventricule. Elle serait indépendante du facteur GATA considéré, la surexpression de n'importe lequel d'entre eux produisant ainsi toujours le même effet.

Dans un contexte sauvage, cette compétence rendrait les glandes salivaires, le proventricule et le corps gras susceptibles de permettre l'expression du transgène *Fbp1*. Cette expression ne serait observée que dans le tissu adipeux car elle serait dépendante de la présence du facteur dGATAb et éventuellement de la présence de ses partenaires. La surexpression de n'importe quel GATA ne révélerait alors que la susceptibilité de ces tissus à répondre à ce facteur. La validation de cette hypothèse attend l'identification de ces facteurs de compétence.

CHAPITRE 5

Le facteur dGATAb et la spécificité tissulaire d'expression de l'enhancer du gène *Fbp1* : une approche par mutagenèse *in vivo*.

1. Introduction.

Dans le chapitre précédent, nous venons de montrer que le récepteur hormonal peut être remplacé par le facteur hétérologue GAL4 de levure pour son activité transactivatrice. Ce remplacement ne conduit qu'à une dérégulation temporelle de l'expression du gène cible *Fbp1*. Dans ce système, le récepteur hormonal se comporte donc comme un simple interrupteur hormono-dépendant. Il intervient comme un régulateur temporel et non comme un régulateur spatial de l'expression de l'enhancer du gène *Fbp1*.

Nous avons également montré que l'enhancer est la cible du facteur dGATAb en trois sites distincts GBS1, GBS2 et GBS3 (Figure 26). Par une approche de mutagenèse *in vivo*, nous avons caractérisé le site GBS1 comme strictement requis pour l'activité de l'enhancer, les sites GBS2 et GBS3 n'apparaissent pas indispensables pour cette activité (Figure 26).

Disposant de ces résultats, nous nous sommes concentrés sur le site GBS1 avec comme objectif de comprendre son rôle dans la détermination de la spécificité tissulaire d'activation de l'enhancer.

Aborder le rôle propre du site GBS1 dans cette spécificité tissulaire d'activation était rendu difficile dans la mesure où il joue un rôle essentiel pour l'activité de l'enhancer. En effet, sa mutation abolit toute expression.

Il nous est donc paru nécessaire d'utiliser une approche permettant de découpler dans la mesure du possible les deux activités potentielles du facteur dGATAb : activateur de transcription et modulateur d'une spécificité tissulaire. Ceci nous a conduit à utiliser à nouveau une approche de substitution du site GBS1 par un site UAS. Cette substitution permet de tester l'effet du remplacement d'un facteur transactivateur d'expression tissulaire limitée par un facteur exprimé de façon ubiquitaire et dont la capacité transactivatrice est autonome.

Cette approche originale nous a permis de mettre en évidence une redondance fonctionnelle partielle entre les sites de fixation GBS1 et GBS3. Elle nous a permis de révéler que le facteur dGATAb est spécifiquement requis pour la spécificité tissulaire d'activation de l'enhancer.

Enfin, cette approche s'est révélée être particulièrement instructive car elle a permis de mettre en évidence que le gène *Fbp1* est, *in vivo*, la cible directe du facteur répresseur AEF-1.

Facteurs de transcription interagissant avec l'enhancer de *Fbp1*

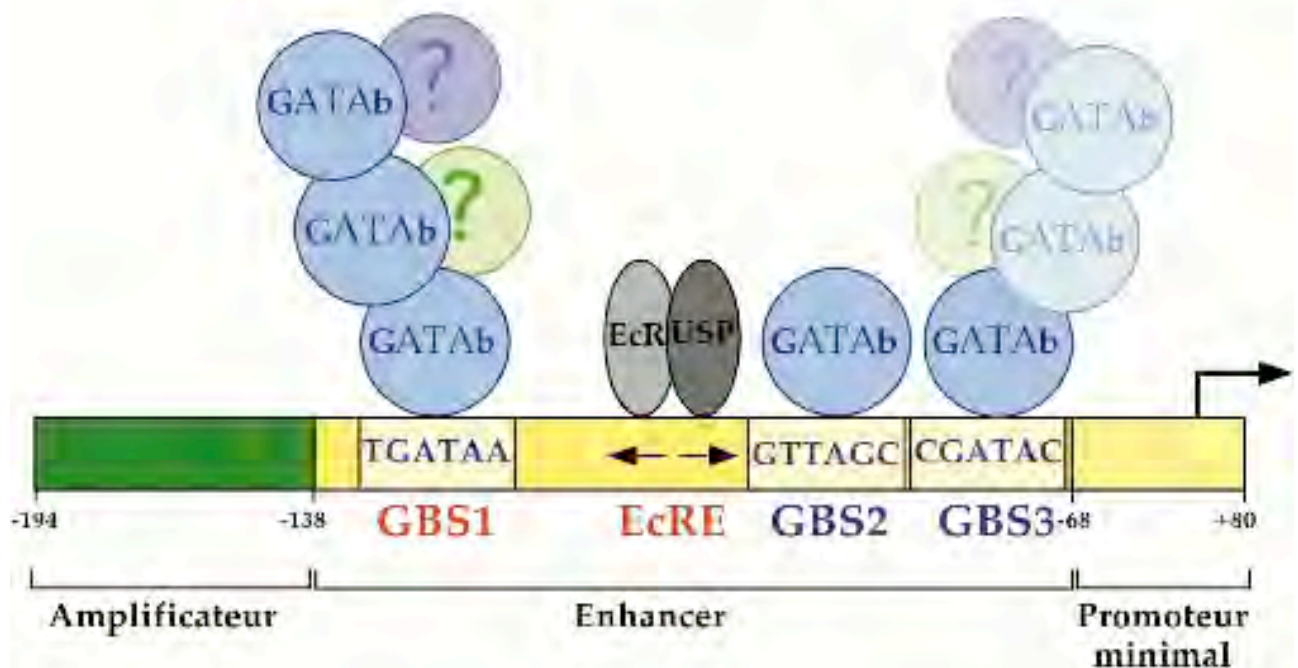


Figure 26 : Représentation schématique des facteurs de transcription interagissant avec l'enhancer de *Fbp1* dans le transgène *Fbp1-lacZ*.

Le transgène *Fbp1-lacZ* est constitué du promoteur minimal (de -68 à +80 par rapport au site de démarrage de la transcription symbolisé par la flèche), de la région "enhancer" (de -138 à -68) et de la région "amplificatrice" (de -194 à -138). Le gène indicateur *lacZ* est placé en aval du promoteur minimal.

Le site de fixation EcRE du récepteur hormonal EcR/USP est symbolisé par une double flèche en orientation inverse.

La position et la séquence des trois sites de fixation GBS pour le facteur dGATAb identifiés dans l'enhancer sont indiquées. Le site GBS1 permet *in vitro* la fixation du facteur dGATAb associé à des partenaires de nature inconnue symbolisés par des points d'interrogation. Le site GBS3 permet la fixation de dGATAb et ses partenaires avec une affinité plus faible. Le site GBS2 ne permet la fixation que de dGATAb seul. Seuls les sites GBS1 et EcRE (en rouge) sont essentiels *in vivo* pour l'activité de l'enhancer.

Les résultats obtenus nous permettent de proposer un nouveau mécanisme de régulation par le facteur AEF-1 faisant intervenir une répression à distance. Ce mécanisme implique une levée de la répression assurée par AEF-1, associée à une activation spécifique par dGATAb, qui reste limitée au tissu adipeux.

2. Résultats

2.1. Contribution du site GBS1

a- Le facteur GAL4 peut se substituer à dGATAb en GBS1.

Pour aborder le rôle du site GBS1 dans la spécificité tissulaire d'activation de l'enhancer, nous l'avons substitué par un site UAS pour obtenir la construction AE-UAS1² (Figure 27, C).

De façon attendue, cette substitution inactive totalement l'expression des lignées transgéniques AE-UAS1 en absence de facteur GAL4 car elle équivaut à une mutation du site GBS1 (Figure 27, C). Ce résultat confirme le caractère indispensable du site GBS1 pour l'activité de l'enhancer, mis en évidence par mutagenèse (Brodu et al., 1999). En revanche, en présence de facteur GAL4 exprimé de façon ubiquitaire, une expression forte de la construction AE-UAS1 est observée, limitée toutefois au seul corps gras et en fin de troisième stade larvaire (Figure 27, D.).

Le profil temporel de l'expression de cette construction est identique au profil d'une construction sauvage. Ceci suggère que le récepteur hormonal est suffisant pour assurer le même contrôle temporel que sur un transgène sauvage. Ce contrôle temporel apporté par le récepteur hormonal module de manière dominante l'activation par GAL4.

Ceci permet de tirer deux premières conclusions :

- Le complexe formé par dGATAb et ses partenaires en GBS1 peut être substitué par le facteur GAL4 sans aucun changement de la spécificité tissulaire de l'activation de l'enhancer.

² Pour désigner les substitutions au sein d'une construction, nous avons adopté une nomenclature où les chiffres 1, 2 et 3 à la suite de UAS indiquent la substitution des sites GBS1, 2 ou 3 respectivement.

Rôle du site GBS1 dans la spécificité tissulaire d'activation de l'enhancer

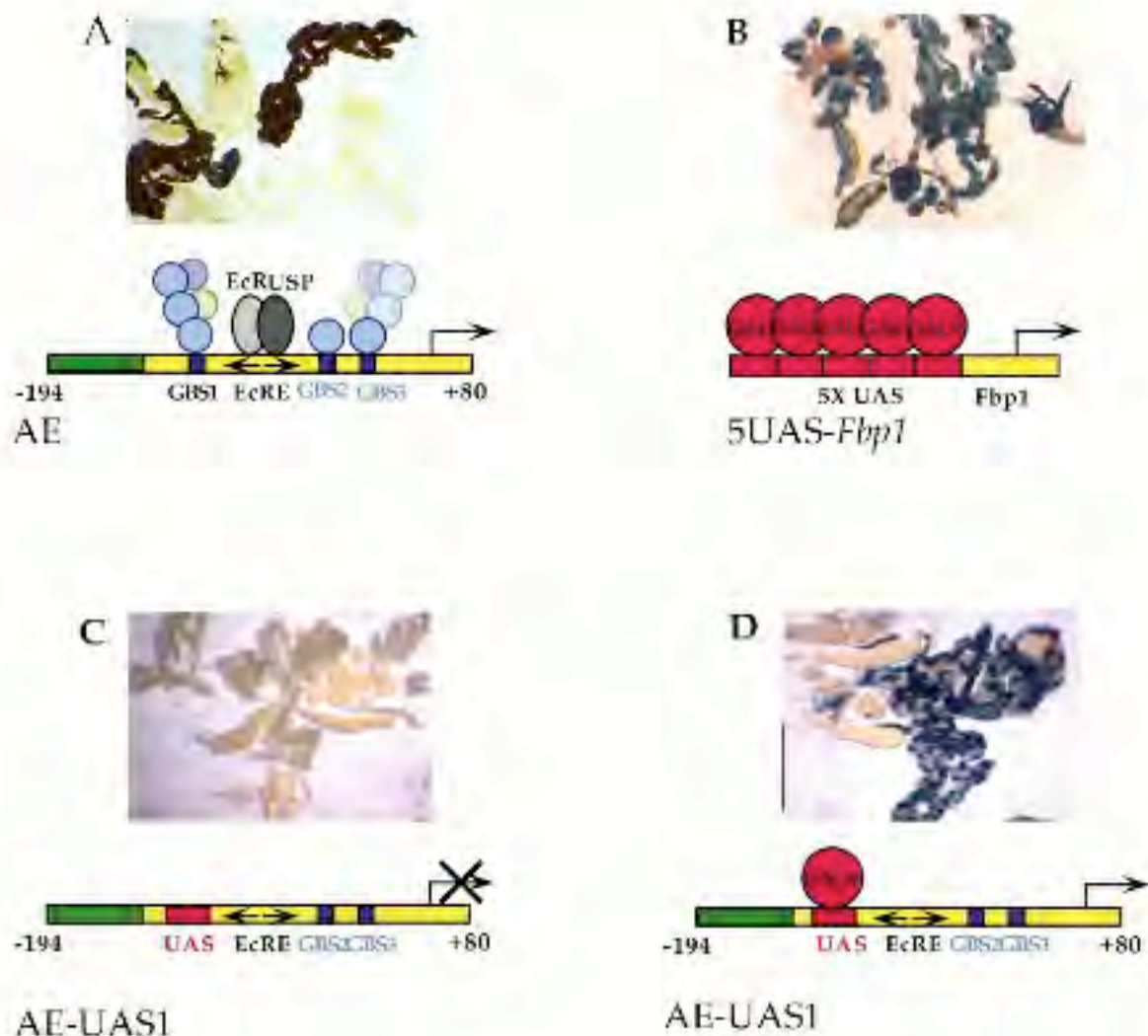


Figure 27 : Effet de la substitution in vivo du site GBS1 par un site UAS

Le panneau A reproduit l'expression de la construction sauvage AE, présentée en détail figure 26. Les facteurs de transcription identifiés ne sont symbolisés qu'une fois, uniquement pour cette construction, et ne le seront plus pour les autres.

Pour désigner les transgènes modifiés, une nomenclature est adoptée selon laquelle les chiffres 1, 2, ou 3 à la suite de UAS indiquent la substitution des sites GBS1, GBS2 et GBS3 respectivement.

Les panneaux C et D correspondent à l'expression du transgène AE-UAS1 respectivement en absence ou en présence du facteur GAL4 exprimé de façon ubiquitaire. L'expression ubiquitaire de GAL4 est illustrée dans le panneau B.

- D'autres sites de fixation en dehors du site essentiel GBS1 sont importants pour moduler, au niveau tissulaire, l'activité de l'enhancer. De manière remarquable, ce résultat montre que ces autres régulateurs sont capables de moduler l'activité du facteur GAL4 fixé en lieu et place de GBS1. Ce résultat nous a conduit à tester le rôle potentiel des sites GBS2 et GBS3 dans cette restriction tissulaire.

b- Redondance fonctionnelle des sites GBS.

Nous avons mutagénisé la construction AE-UAS1 pour tester l'effet de mutations de GBS2 et/ou GBS3 sur l'activité de l'enhancer. Les mutations introduites correspondent à celles qui abolissent *in vitro* la fixation du facteur dGATAb au niveau des sites GBS (Brodu et al., 1999).

La mutation GBS2 (construction AE-UAS1-GBS2^m) n'a pas d'effet détectable sur l'activation par le facteur GAL4 (Figure 28, A). En revanche, la mutation du site GBS3 (construction AE-UAS1-GBS3^m) abolit totalement l'expression du gène indicateur (Figure 28, B). De manière cohérente, la double mutation affectant GBS2 et GBS3 conduit au même résultat (construction AE-UAS1-GBS2^m-GBS3^m) (Figure 28, C).

L'ensemble de ces résultats indiquent que la fixation de dGATAb en GBS3 est capable de moduler l'activation de GAL4. Ceci suggère fortement que la fixation du facteur dGATAb au niveau du site GBS3 pourrait jouer un rôle dans la restriction tissulaire de l'activité de l'enhancer de *Fbp1* qui est masqué dans l'enhancer sauvage par le caractère prévalent du site GBS1.

Conclusions

Deux conclusions peuvent être d'ores et déjà tirées à partir de ces quatre constructions transgéniques :

- Bien que fonctionnellement non équivalent au site GBS1, le site GBS3 apparaît, dans un contexte approprié, doué d'une activité propre qui contribue à assurer l'activation tissulaire correcte de l'enhancer. Notre approche révèle une redondance fonctionnelle partielle entre les sites GBS1 et GBS3.

Cette redondance peut être mise en parallèle avec les capacités différentes des sites GBS pour la fixation du facteur dGATAb complexé aux partenaires qui sont observées dans des expériences de retardement sur gel. En effet, le site GBS1 et dans une moindre mesure le site GBS3 permettent la formation de trois complexes mettant en jeu le facteur dGATAb alors que le site GBS2 ne permet que la formation d'un seul complexe.

Mise en évidence de l'importance fonctionnelle des sites GBS

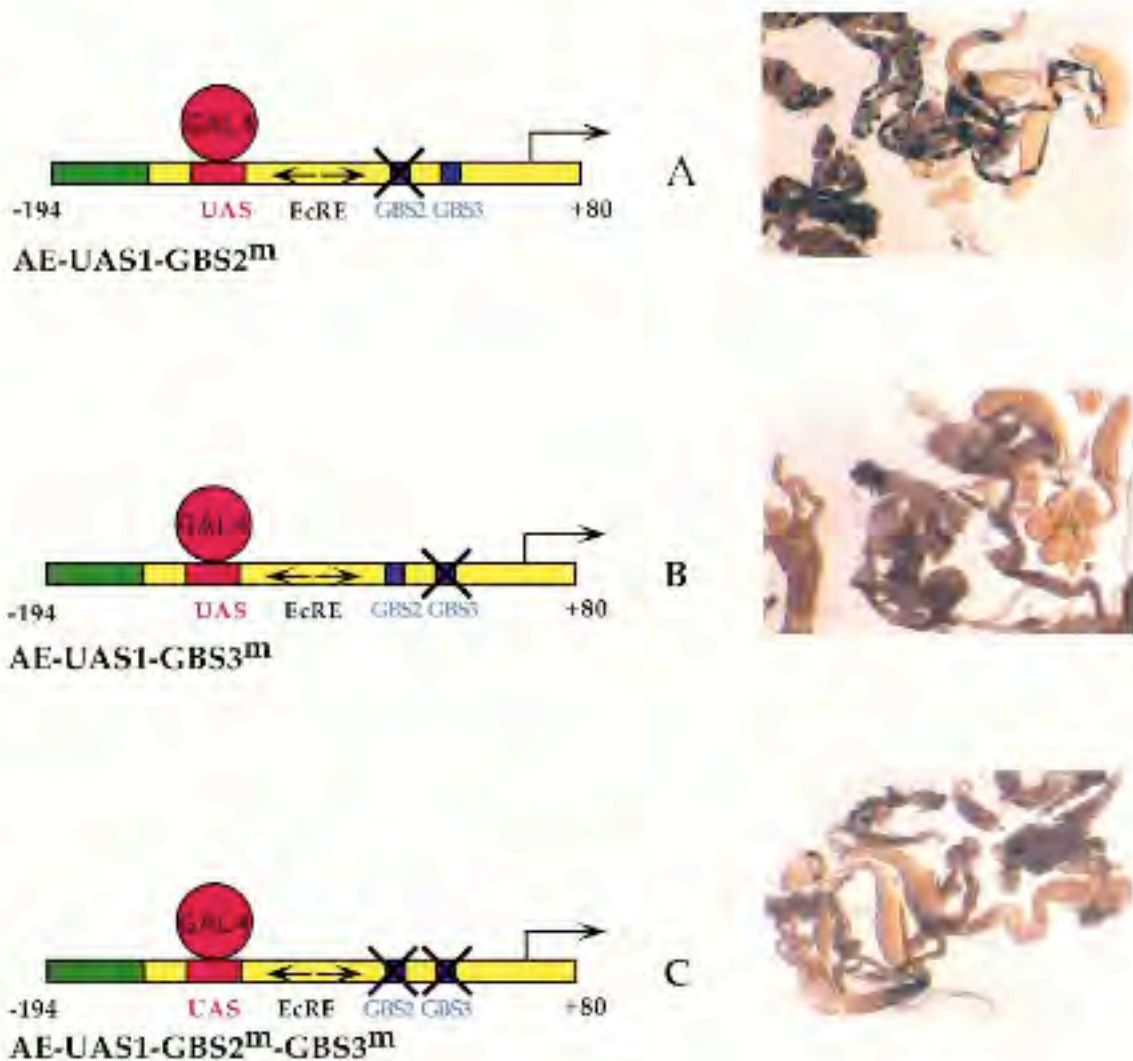


Figure 28 : Mutagenèse de la construction AE-UAS1

Les mutations des sites GBS, symbolisées par des croix, abolissent *in vitro* la fixation du facteur dGATAb. Les mutations des sites sont désignées par la lettre m en exposant.

Le rond rouge, symbolisant le facteur GAL4, indique que les résultats sont observés en présence de ce facteur.

- Par ailleurs, ces résultats suggèrent que la fixation du facteur dGATAb à certaines séquences cibles (GBS1 ou GBS3) peut restreindre spatialement au tissu adipeux la capacité transactivatrice d'autres facteurs de transcription, comme le récepteur de l'ecdysone ou le facteur hétérologue GAL4. Ainsi, dans notre système *Fbp1-lacZ*, la révélation de l'activité du facteur GAL4 dépend de la présence d'au moins un site de fixation GBS dans le voisinage du site UAS.

2.2. Le facteur dGATAb module l'activation de l'enhancer par GAL4.

Afin de confirmer les conclusions qui viennent d'être exposées ci-dessus, nous avons examiné l'expression de constructions dans lesquelles les sites GBS2 et GBS3 ont été substitués par un site UAS unique dans un contexte où le site GBS1 était soit intact soit muté (Figure 29).

La construction transgénique AE-UAS2-3 est exprimée dans le corps gras en fin de troisième stade larvaire, même en absence du facteur GAL4 (Figure 29, A). Ce résultat est conforme au fait que la présence du seul site GATA en GBS1 est nécessaire et suffisante pour l'activité spécifique de l'enhancer, comme l'avait déjà montré la construction dans laquelle les sites GBS2 et GBS3 sont inactivés (Brodu et al., 1999).

L'introduction dans la même construction d'une mutation du site GBS1 (AE-GBS1^m-UAS2-3) abolit l'expression du gène indicateur en absence ou en présence de GAL4 (Figure 29, D). Ceci confirme que la présence d'un site GBS est nécessaire pour que l'enhancer puisse être activé par GAL4.

Cette conclusion est illustrée de façon spectaculaire par la construction AE-UAS1-UAS2-3 dans laquelle tous les sites GBS sont remplacés par des sites UAS (Figure 29, C). En effet, bien que possédant 2 sites UAS, cette construction a détruit les sites GBS1 et GBS3. Elle demeure silencieuse à tous les stades du développement depuis l'embryogenèse jusqu'à la formation du puparium.

Une démonstration que 2 sites UAS dans le contexte de l'enhancer peuvent être fonctionnels, à la condition qu'un site GBS soit présent, est fournie par la construction AE-UAS1-UAS^{EcRE} dans laquelle les sites GBS1 et EcRE sont remplacés par un site UAS (Figure 29, D). Cette construction s'exprime, quand elle est activée par GAL4, exclusivement dans le corps gras.

Un site GBS est nécessaire pour l'activation par le facteur GAL4



Figure 29 : Mutagenèse de la construction AE-UAS1

Le facteur GAL4 n'est pas schématisé pour la première construction. Cette construction AE-UAS2-3 s'exprime en absence de GAL4.

Conclusions

Deux conclusions majeures émergent de l'ensemble de cette approche par substitution :

- La fixation du facteur dGATAb est indispensable pour l'activation correcte de l'enhancer dans le corps gras. Il se révèle jouer un double rôle d'activation transcriptionnelle et de limitation tissulaire de cette activation.

- Par ailleurs, l'absence surprenante de transactivation de GAL4 en absence de site GBS conduit à se poser plusieurs questions. Dans un premier temps, nous pouvons nous demander si la présence de dGATAb comme co-facteur est indispensable à la transactivation par GAL4 dans le corps gras. Cette hypothèse peut être immédiatement éliminée car l'ensemble des résultats obtenus par l'approche "enhancer-trap" indique que GAL4 est actif non seulement dans le tissu adipeux mais également dans tous les autres tissus (Phelps and Brand, 1998). De plus, une construction possédant seulement 5 sites UAS en amont du promoteur minimal (entre -68 et +80 par rapport au site de démarrage de la transcription) du gène *Fbp1* fonctionne dans tous les tissus où GAL4 est exprimé à l'exception d'une partie du système nerveux central et des gonades (construction 5xUAS-*Fbp1*) (Figure 27, B). Ceci montre que le facteur GAL4 peut être actif dans tous les tissus, à toutes les périodes du développement et qu'il peut présenter une activité de transactivation en absence de site GBS.

Ces considérations et l'absence paradoxale d'expression de la lignée AE-UAS1-UAS2-3 nous a conduit à postuler la présence, dans nos constructions, en dehors des sites GBS, de séquences de fixation d'un répresseur qui empêcherait la transactivation par GAL4. Cette hypothèse a deux implications que nous avons cherchées à tester : le répresseur serait exprimé dans tous les tissus et à toutes les périodes du développement. L'effet répresseur serait levé par la fixation de dGATAb à l'enhancer.

2.3. Mise en évidence de la répression.

En considérant la structure du système indicateur *AE-Fbp1-lacZ* que nous utilisons, nous pouvons envisager trois possibilités de fixation pour des facteurs répresseurs (Figure 26) :

- une fixation en aval au niveau du promoteur minimal du gène *Fbp1* (entre les positions -68 et +80 par rapport au site de démarrage de la transcription). Cette

possibilité peut être écartée d'emblée car la construction 5xUAS-*Fbp1* présente une

Mise en évidence d'une séquence réprimant l'activation par le facteur GAL4

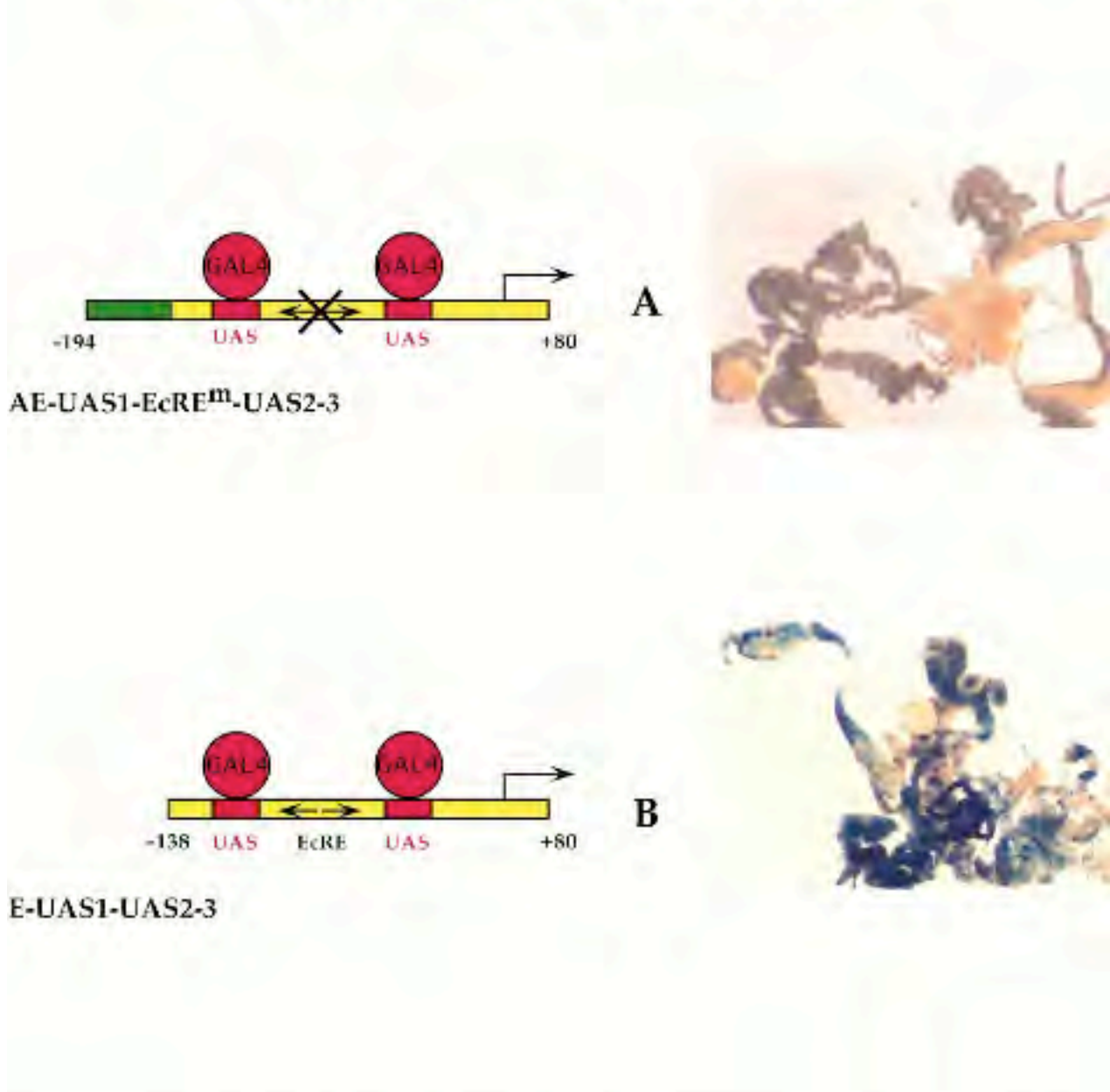


Figure 30 : Rôle du site de fixation du récepteur hormonal et de l'élément amplificateur A dans la modulation de l'activation par le facteur GAL4.

La mutation de l'EcRE, symbolisée par une croix, abolit *in vitro* la fixation du récepteur hormonal EcR/USP.

expression dans pratiquement tous les tissus en réponse au facteur GAL4 ubiquitaire (voir plus haut) (Figure 27, B).

- une fixation dans la région située entre les sites GBS1 et GBS3 au niveau de l'enhancer. Il est à noter que dans cette région se trouve le site de fixation du récepteur hormonal. Celui-ci pourrait être la cible de co-répresseur (Xu et al., 1999).

- une fixation en amont des sites GBS au niveau de la région "amplificateur", région non encore explorée pour une fonction répressive.

a- Rôle du site de fixation du récepteur hormonal.

Dans un premier temps, nous avons testé si un répresseur pouvait agir, de façon directe ou indirecte, au niveau du site de fixation EcRE du récepteur hormonal. Pour cela, nous avons muté, au sein de la construction AE-UAS1-UAS2-3, le site de fixation du récepteur de l'ecdysone et établi des lignées transgéniques (Lignées AE-UAS1-EcRE^m-UAS2-3) (Figure 30, A). En présence du facteur GAL4, cette construction demeure silencieuse.

Ce résultat montre que si une activité de répression s'exerce sur GAL4, elle ne procède pas exclusivement par l'intermédiaire du site de fixation du récepteur hormonal.

b- Rôle de l'élément "amplificateur" (A).

Nous avons ensuite testé le rôle de la séquence située en amont des sites GBS. Cette séquence située entre les positions -194 et -138 par rapport au site de démarrage de la transcription a été définie comme un élément "amplificateur" (A) (Figure 26). Cette séquence A n'est pas nécessaire pour l'activité tissulaire de l'enhancer E car un transgène possédant seulement cet élément enhancer E dirige l'expression du gène indicateur *lacZ* dans le corps gras (Lignées E) (Résultats non montrés). En revanche, dans le contexte de l'enhancer sauvage, elle contribue à augmenter d'un facteur de 5 à 10 le niveau d'expression du transgène (Lignées AE). Pour cette raison, elle avait été systématiquement incluse dans tous les transgènes décrits jusqu'à présent.

Nous nous sommes demandés si cette séquence pouvait être la cible d'un répresseur qui modulerait l'activité de GAL4. Nous avons testé l'effet de la délétion de l'élément A

avec la construction E-UAS1-UAS2-3 dans laquelle tous les sites GBS ont été substitués par des sites UAS (Figure 30, B).

De façon remarquable, en présence de facteur GAL4 exprimé de manière ubiquitaire, cette construction est exprimée dans tous les tissus, à l'exception d'une partie du système nerveux central et des gonades. De plus, cette expression prend place à tous les stades de développement depuis l'embryogenèse jusqu'à la formation du puparium (Figure 30, B et résultats non montrés).

Ces résultats confortent notre hypothèse initiale dans la mesure où :

- La séquence A permet, à elle seule, la fixation d'un ou plusieurs facteurs empêchant l'activation de l'enhancer par GAL4 dans tous les tissus à toutes les périodes de développement.

- Ce(s) répresseur(s) est (sont) actif(s) dans tous les tissus, y compris dans le corps gras.

- Cet effet de répression de ce ou de ces facteurs ne peut être mis en évidence qu'en absence du facteur dGATAb fixé à l'enhancer. En effet dans les constructions possédant un site UAS en association avec GBS1 ou GBS3 (constructions AE-UAS1 et AE-UAS2-3), la répression est levée dans le corps gras (Figures 27, D et 29, A) . Ceci suggère que dGATAb aurait une fonction d'antagoniste sur le répresseur.

- Enfin, l'absence d'expression de la construction E-UAS1-UAS2-3 dans les gonades et le système nerveux central pourrait être due à une restriction de l'activité du promoteur minimal du gène *Fbp1* dans ces deux tissus, comme le suggère le profil d'expression tissulaire de la construction 5xUAS-*Fbp1* (Figure 27, B). En effet, la construction 5xUAS-*Fbp1*, en présence de GAL4, ne s'exprime pas dans ces tissus.

2.4. Caractérisation du facteur répresseur.

Nous avons cherché à identifier le(s) facteur(s) interagissant avec la séquence A et responsable(s) de la fonction répressive.

4.1. Identification du site de fixation du facteur AEF-1.

Nous avons préparé cinq fragments, notés A1, A2, A3, A4 et A5, se chevauchant deux à deux et couvrant toute la région amplificatrice A (Figure 31). Ces cinq fragments ont été utilisés comme sondes radioactives dans des expériences de retardement sur gel en présence d'un extrait nucléaire de corps gras larvaire. En effet, nous venons de montrer que l'action du répresseur prend également place dans ce tissu.

Un complexe de forte intensité se forme sur la sonde A1 (Figure 32). Un complexe de faible intensité se forme sur chacune des sondes A3 et A5 (Figure 32). On n'observe aucun complexe formé sur les sondes A2 et A4 (Figure 32). Dans ces conditions, nous nous sommes donc concentrés sur l'identification du complexe formé sur la sonde A1.

Le complexe se forme sur l'oligonucléotide A1 et non sur l'oligonucléotide A2, deux oligonucléotides chevauchants sur 10 paires de base (Figure 31). Ceci nous permet de localiser plus précisément le site de fixation du complexe dans la partie gauche de la sonde A1, ou à la limite entre cette région spécifique et la région de recouvrement avec A2.

Nous avons poursuivi cette localisation en utilisant une série d'oligonucléotides compétiteurs (A1-1 à A1-5) portant des mutations de 4 à 5 bases chevauchantes dans l'oligonucléotide A1 (Figure 31).

L'addition d'un excès molaire de 200X, par rapport à la sonde A1 radioactive, de l'oligonucléotide A1-1 fait disparaître le complexe (Figure 33, ligne 3). L'ajout des oligonucléotides compétiteurs A1-2 et A1-3 n'a aucun effet sur sa formation (Figure 33, lignes 4 et 5). L'ajout des oligonucléotides compétiteurs A1-4 et A1-5 permet d'observer la disparition du complexe (Figure 33, lignes 6 et 7). Ce résultat était prévisible car les mutations portées par ces deux oligonucléotides correspondent à la partie commune entre A1 et A2 et nous venons de montrer que le complexe ne se forme pas sur A2 utilisé comme sonde.

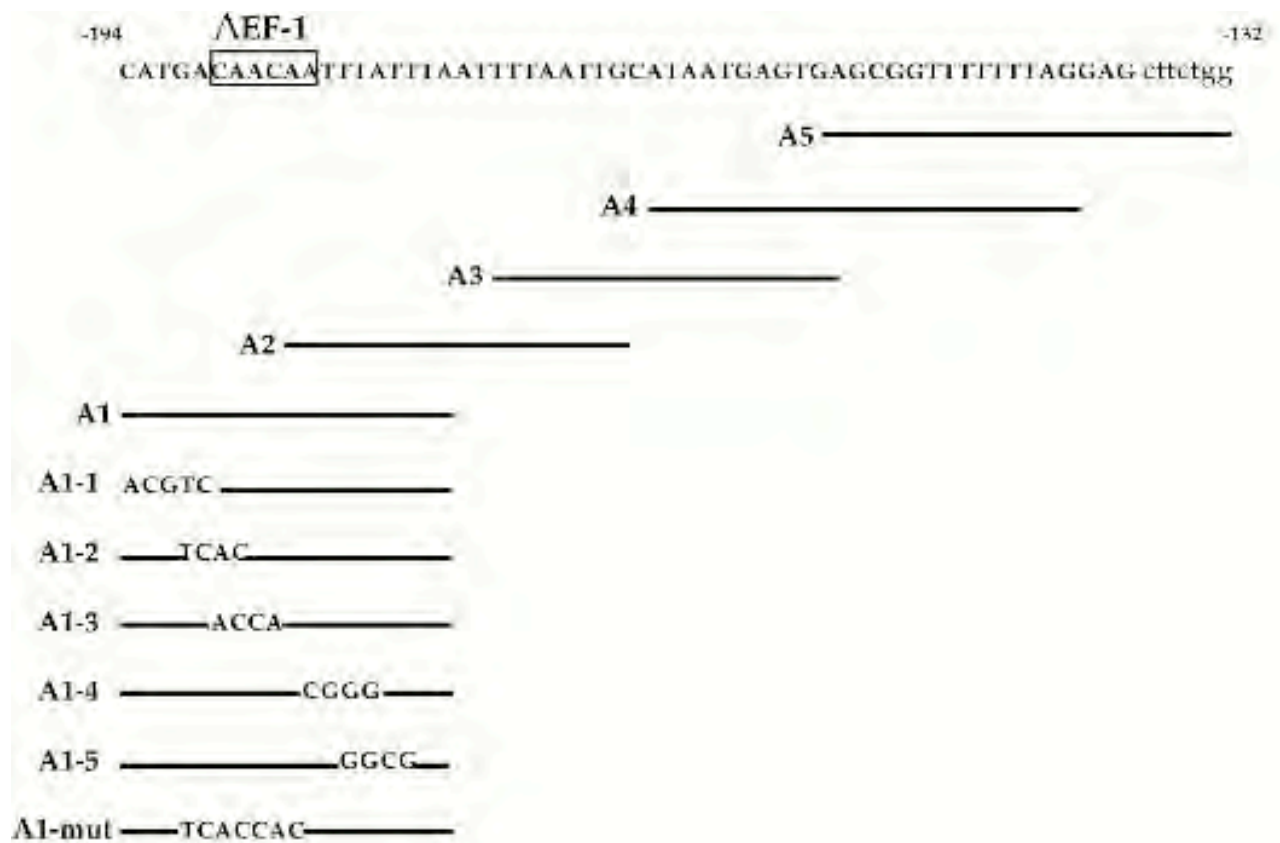


Figure 31 : Structure de la région amplificatrice A.

La séquence de la région amplificatrice, s'étendant entre les positions -194 et -138 par rapport au site de démarrage de la transcription, est écrite en lettres capitales. Le site de fixation du facteur Δ EF-1, identifié dans cette séquence, est encadré.

La position et la taille des différents oligonucléotides, utilisés comme sondes radioactives dans des expériences de retardement sur gel (A1a A5), sont indiquées en dessous de cette séquence.

La séquence des substitutions est indiquée pour chacun des oligonucléotides compétiteurs mutés (A1-1 à A1-mut).



Figure 32 : Comparaison des profils de retardement obtenus avec différents fragments de la région amplificatrice A utilisés comme sondes radioactives.
 Les fragments A1 à A5, présentés dans la figure 31, sont utilisés comme sonde radioactives en présence d'un extrait nucléaire de tissu adipeux.

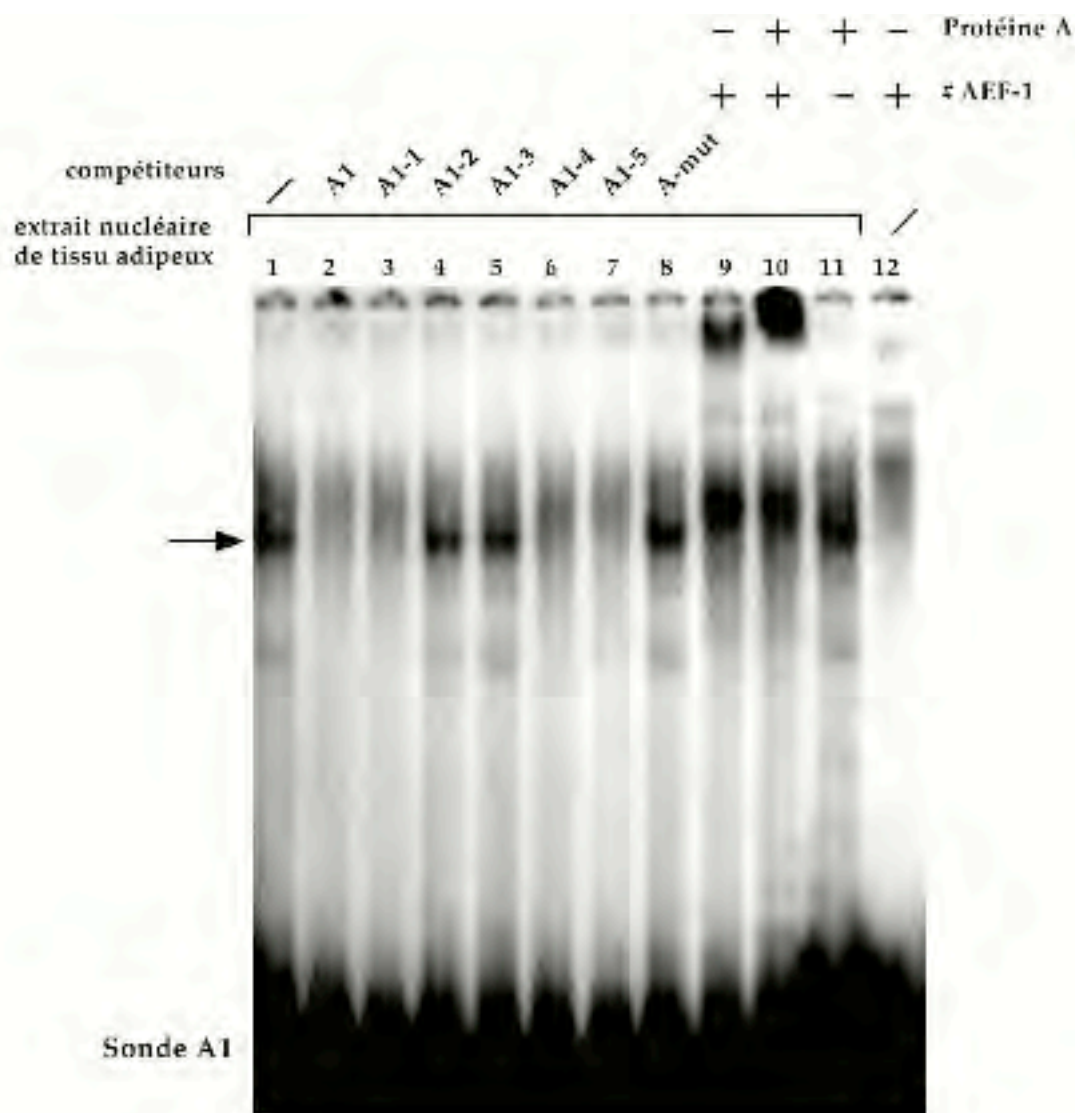


Figure 33 : Cartographie du site de fixation du facteur interagissant avec le fragment A1 et identification du facteur AEF-1.

Fixation des protéines présentes dans un extrait nucléaire de tissu adipeux sur le fragment A1 de la région amplificatrice A, utilisé comme sonde radioactive, dans une expérience de retardement sur gel. Le complexe se formant sur ce fragment A1 est indiqué avec une flèche.

La présence d'anticorps polyclonal dirigé spécifiquement contre la protéine AEF-1 (# AEF-1), de protéine A, ou d'oligonucléotides compétiteurs, est indiquée. Les différents oligonucléotides compétiteurs sont représentés dans la figure 31.

Les oligonucléotides A1-2 et A1-3 ne sont pas des compétiteurs. Les bases mutées dans ces deux oligonucléotides sont donc impliquées dans la formation du complexe. Ces bases correspondent à la séquence CAACAA dans l'oligonucléotide A1. De façon attendue, l'oligonucléotide A1-mut, portant des mutations spécifiquement dans cette séquence, n'est pas un compétiteur (Figure 33, ligne 8).

L'ensemble de ces résultats indiquent que le complexe se forme sur la sonde A1 au niveau de la séquence CAACAA.

La séquence CAACAA correspond à un site consensus pour le facteur AEF-1. Le facteur AEF-1 est un bon candidat au rôle de répresseur recherché. En effet, ce facteur est caractérisé comme un facteur répresseur de l'expression de gènes exprimés dans le tissu adipeux : le gène *Yp* de *D. melanogaster* et les gènes *Adh* de *D. melanogaster* et *D. mulleri*, (Falb and Maniatis, 1992a). De plus, ce facteur est exprimé dans tous les tissus, tout au cours du développement (Falb and Maniatis, 1992).

4.2. Le facteur AEF-1 se fixe sur la sonde A1.

Nous avons réalisé des expériences de retardement sur gel en présence d'un anticorps polyclonal dirigé spécifiquement contre la protéine AEF-1 (fourni par T. Abel et T. Maniatis). L'ajout d'anticorps spécifique du facteur AEF-1 conduit à la disparition du complexe formé sur la bande A1 et à l'apparition d'une bande migrant plus lentement (Figure 33, ligne 9). La migration de cette dernière n'est pas modifiée en présence de protéine A ajoutée avec l'anticorps (Figure 33, ligne 10). Elle ne résulte donc pas d'un retard de migration consécutif à l'interaction du complexe formé sur A1 et de l'anticorps. L'ensemble de ces résultats indique que le complexe formé sur la sonde A1 est reconnu spécifiquement par l'anticorps anti-AEF-1 et que celui-ci conduit à une inhibition de sa fixation. Le facteur AEF-1, présent dans un extrait nucléaire de tissu adipeux, est donc impliqué dans la formation du complexe observé avec la sonde A1.

L'ensemble de ces résultats indiquent que le facteur répresseur AEF-1 se fixe à l'élément A au niveau d'un site de fixation correspondant au site consensus défini pour ce facteur.

4.3. Effet de la mutation *in vivo*

Nous avons cherché à tester si le facteur AEF-1 pouvait être le facteur empêchant l'activation de l'enhancer par GAL4. Pour cela, au sein de la construction AE-UAS1-UAS2-3, nous avons muté ce site de fixation du facteur AEF-1 (construction AE-AEF1^m-UAS1-UAS2-3) (Figure 34). La mutation introduite ici, correspondant à celle de l'oligonucléotide A1-mut, abolit *in vitro* la fixation de ce facteur au niveau de son site cible. En présence de facteur GAL4, cette construction est exprimée dans tous les tissus selon un profil d'expression identique à la lignée E-UAS1-UAS2-3 (Figure 34, B). Ce résultat est la preuve que l'interaction du facteur AEF-1 avec l'élément amplificateur empêche l'activation de l'enhancer par GAL4. Le facteur répresseur AEF-1 exerce son action à distance sur un facteur hétérologue GAL4.

Le facteur AEF-1 réprime à distance l'activation de l'enhancer par GAL4.



A



B



Figure 34 : Effet de la mutation du site de fixation du facteur AEF-1 dans le contexte de la construction AE-UAS1-UAS2-3.

A. Construction AE-UAS1-UAS2-3 présentée dans la figure 29, C.

B. Le site de fixation du facteur AEF-1 est situé dans la séquence amplificateur, entre les positions -188 et -183 par rapport au site de démarrage de la transcription.

La mutation du site AEF-1, symbolisée par une croix, abolit *in vitro* la fixation du facteur AEF-1.

3. Discussion

Nous avons développé une approche de substitution pour tester *in vivo* l'influence d'un facteur de transcription d'expression tissulaire limitée sur la restriction d'expression d'un gène cible. Cette approche repose sur la substitution du site de fixation du facteur dGATAb par un site de fixation UAS du facteur hétérologue GAL4 de levure. Nous pensons que les résultats obtenus valident notre stratégie et nous renseignent sur le rôle de dGATAb.

3.1. Redondance fonctionnelle partielle entre les sites GBS pour une activation transcriptionnelle restreinte au tissu adipeux.

Nous avons montré que le complexe formé par dGATAb et ses partenaires en GBS1 peut être substitué par le facteur GAL4 sans changement de la spécificité tissulaire.

Si cette substitution avait conduit à une expression nulle, on aurait conclu qu'il n'est pas possible de remplacer, dans notre système, dGATAb par GAL4. Si cette substitution avait conduit à une expression ubiquitaire, cela aurait suggéré fortement que le site GBS1 est le seul site impliqué dans la restriction tissulaire de l'activité de l'enhancer du gène *Fbp1*.

Nous avons obtenu un résultat qui est particulièrement informatif car il met en lumière que d'autres sites de fixation, en dehors du site essentiel GBS1, sont impliqués dans la modulation tissulaire de l'activité de GAL4. Nous avons montré, par mutagenèse, que le site GBS3 correspond à l'un de ces sites.

L'un des intérêts de notre approche par substitution est qu'elle nous a permis de montrer qu'un site non essentiel pour le fonctionnement de l'enhancer peut néanmoins participer à la restriction tissulaire de son activité. Elle a permis de mettre en évidence une redondance fonctionnelle partielle entre les sites GBS1 et GBS3, totalement masquée jusqu'alors par le caractère prévalent du site GBS1. Cette mise en évidence n'aurait jamais pu être réalisée par une approche classique de découpage du promoteur et de mutagenèse destructive.

Notre approche par substitution a montré de nouveau que le facteur dGATAb est essentiel pour l'expression de l'enhancer du gène *Fbp1* dans le tissu adipeux. Le facteur dGATAb semble jouer un rôle central dans l'expression de gènes dans le tissu adipeux, comme nous l'avons mentionné au cours de l'introduction bibliographique. Ainsi, il

pourrait jouer le rôle de facteur de compétence, indispensable pour une réponse transcriptionnelle dans le tissu adipeux.

3.2. Modulation de l'activité de GAL4.

a- Modulation par dGATAb et AEF-1

Une conclusion plutôt surprenante peut être dégagée de notre approche par substitution de site *in vivo*.

Bien que le facteur GAL4 soit connu pour être doté d'une capacité transactivatrice autonome et ubiquitaire, dans notre système, cette capacité est modulée. En effet, nous avons montré que l'activation de l'enhancer par GAL4 nécessite la présence d'au moins un site de fixation du facteur dGATAb. De plus, en absence de site GBS dans notre système, l'activation de l'enhancer par GAL4 nécessite aussi l'absence du site de fixation du facteur AEF-1. Ces observations révèlent un mécanisme complexe d'action de dGATAb. Ce facteur semble intervenir à la fois pour relever la répression médiée par le facteur AEF-1 et pour activer l'enhancer du gène *Fbp1* spécifiquement dans le tissu adipeux.

Rien ne permet de penser que les facteurs dGATAb, AEF-1 et le facteur Gal4 de levure aient des origines évolutives communes. GAL4 est un transactivateur autonome et il est difficile d'imaginer que les modulations positive et négative de l'activité de GAL4, apportées par les facteur dGATAb et AEF-1 respectivement, prennent place par des interactions directes.

Une possibilité d'interaction indirecte pourrait être que le facteur dGATAb module positivement l'accessibilité du facteur GAL4 au site UAS lorsqu'il est positionné dans l'enhancer du gène *Fbp1*. Une telle hypothèse est renforcée par les données existantes sur le mode d'action des facteurs de la famille GATA.

En effet, comme nous l'avons présenté dans le chapitre 2 de l'introduction, la fixation du facteur GATA-1 de vertébrés conduit à un changement de la position des nucléosomes (Boyes et al., 1998; Muro-Pastor et al., 1999). Ces données suggèrent que la fixation d'un facteur GATA est une des premières étapes conduisant à un changement de la structure de la chromatine. Des données récentes indiquent qu'au niveau du locus LCR des gènes de globines, le facteur GATA-1 joue un double rôle. Il est impliqué, d'une part, dans l'activation transcriptionnelle des gènes de globines et, d'autre part, dans le maintien de la décondensation de la chromatine au locus LCR qui permet ainsi l'accessibilité des facteurs de transcription (McDowell and Dean, 1999).

Dans notre système génique, le facteur dGATAb pourrait intervenir, au niveau de l'enhancer, pour déclencher le déplacement des nucléosomes ou pour maintenir la chromatine dans un état décondensé. Le facteur dGATAb pourrait intervenir également dans le maintien de cet état décondensé. Ceci permettrait de découvrir le site UAS qui serait rendu accessible au facteur GAL4.

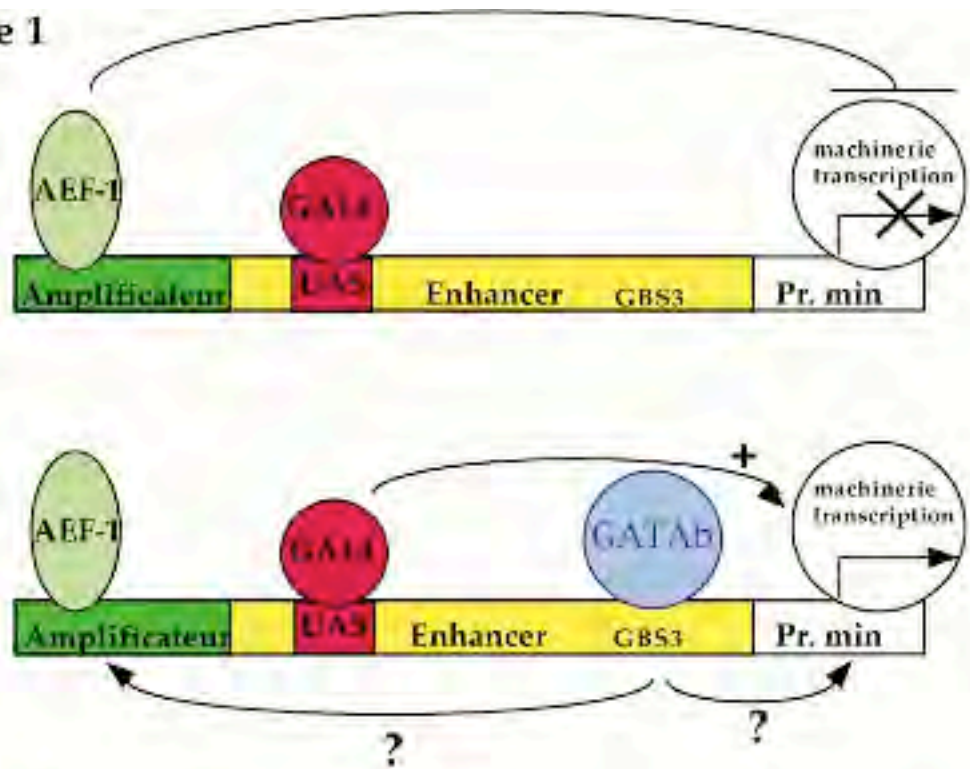
Le facteur AEF-1 a été caractérisé comme un facteur répresseur de l'expression des gènes *Yp* de *D. melanogaster* et *Adh* de *D. melanogaster* et *D. mulleri* qui sont également exprimés dans le tissu adipeux (Falb and Maniatis, 1992). Un premier mode d'action du facteur AEF-1 a été ainsi mis en évidence. Au niveau des séquences régulatrices de ces gènes, les sites de fixation pour le facteur AEF-1 et le facteur activateur C/EBP sont chevauchants ou très proches. Le facteur AEF-1, en entrant en compétition avec le facteur activateur C/EBP, participe à la répression de l'expression des gènes *Yp* et *Adh* (Falb and Maniatis, 1992). Cependant, la mutation du site de fixation d'AEF-1 ne conduit qu'à une augmentation du niveau d'expression, sans changement des profils tissulaire et temporel. Ceci indique que la fonction répressive d'AEF-1 ne joue pas un rôle dans la spécificité temporelle ou tissulaire d'expression (Falb and Maniatis, 1992).

Un deuxième mode de régulation par le facteur AEF-1 a été mis en évidence plus récemment dans le cas du gène *Adh* de *D. melanogaster* (Chapitre 2, paragraphe 2.3.b). La transcription du gène *Adh* est initiée à partir de deux promoteurs indépendants. Le promoteur distal est actif pendant la fin de vie larvaire et adulte alors que le promoteur proximal est actif au cours du développement embryonnaire et larvaire. Le facteur AEF-1 se fixe directement au niveau de la boîte TATA du promoteur proximal en plus des régions précédemment mentionnées (Ren and Maniatis, 1998). Dans ce cas, le facteur n'entre pas en compétition avec la fixation de C/EBP mais avec la fixation de la machinerie basale de transcription. La fixation du facteur AEF-1 au niveau de ce promoteur conduit ainsi à une diminution de son activité, favorisant alors l'utilisation du promoteur distal.

Nous mettons en évidence ici une nouvelle situation dans laquelle le facteur AEF-1 n'agit plus en compétition avec d'autres facteurs pour leur fixation mais agit comme un facteur répresseur sur un site activateur distant de 60 paires de bases.

Il existe au moins deux manières d'envisager la répression de l'activité de l'enhancer par AEF-1.

Modèle 1



Modèle 2

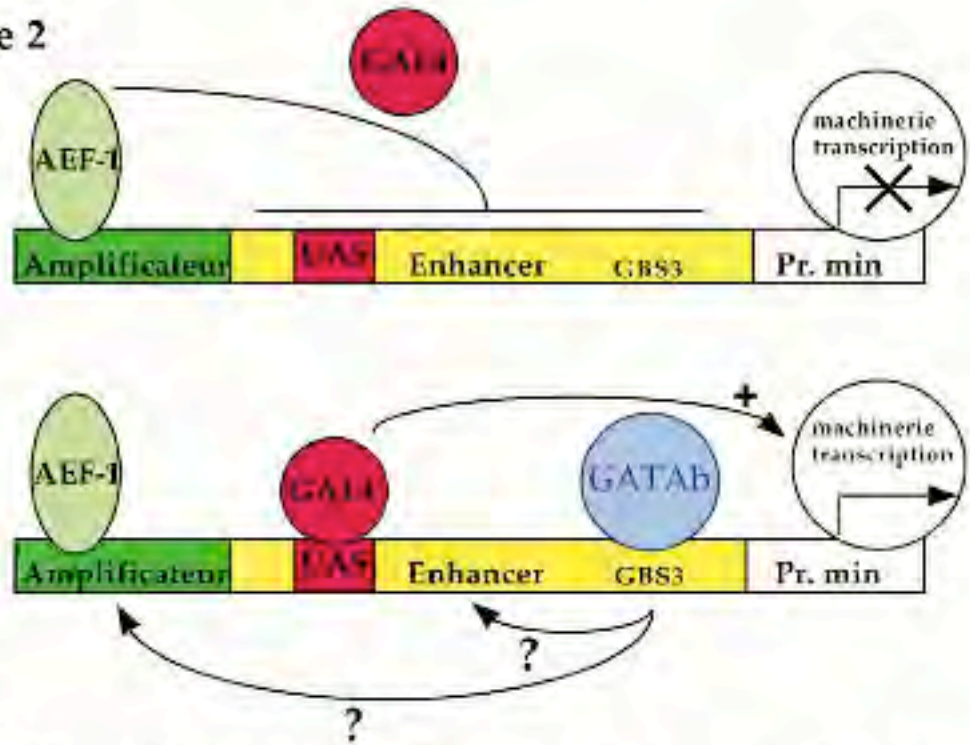


Figure 35 : Modèles pour la répression de l'activité de l'enhancer par AEF-1.

Modèle 1 : La répression à distance de AEF-1 déstabilise la machinerie basale de transcription (représentée par une flèche dans un cercle) et empêche l'initiation de la transcription. Le facteur dGATAb contrebalance l'action de AEF-1 en interagissant à AEF-1 et/ou avec la machinerie de transcription. Le facteur GAL4 peut dès lors activer la transcription.

Modèle 2 : AEF-1 maintient la chromatine dans un état condensé et GAL4 ne peut pas se fixer à son site UAS. dGATAb intervient pour permettre le passage de la chromatine vers un état décondensé en agissant sur AEF-1 et/ou sur la chromatine. GAL4 peut alors se fixer au site UAS et activer la transcription.

Selon une première manière schématisée dans le modèle 1 (Figure 35), la répression à distance d'AEF-1 pourrait faire intervenir la déstabilisation de la machinerie basale de transcription. Dans ces conditions, la fixation du facteur GAL4 sur son site UAS ne conduirait pas à une activation transcriptionnelle. En effet, l'initiation de la transcription ne pourrait se produire car le facteur AEF-1 empêcherait la machinerie de base d'agir. L'action de dGATAb serait nécessaire pour contrecarrer l'effet répresseur d'AEF-1 et permettre à la transcription de démarrer.

Selon un deuxième mécanisme schématisé dans le modèle 2 (Figure 35), le facteur AEF-1 pourrait agir en maintenant un état condensé empêchant le facteur GAL4 d'accéder à son site UAS dans l'enhancer. Le facteur dGATAb interviendrait pour le passage de la chromatine vers un état décondensé.

La modulation de l'activation par GAL4 pourrait ainsi dépendre, de manière non exclusive, de la modulation de l'accessibilité de la chromatine ou de la modulation de la fixation de la machinerie basale de transcription.

Selon le premier modèle, la fixation du facteur GAL4 peut prendre place mais n'est pas suivie d'une activité transcriptionnelle. Selon, le deuxième modèle, l'accessibilité du facteur GAL4 à l'ADN est un élément déterminant. Il serait possible de discriminer entre ces deux modèles en réalisant des expériences d'empreinte génomique *in vivo* afin de tester si le facteur GAL4 peut se fixer à son site UAS dans l'enhancer, au cours du troisième stade larvaire.

La caractérisation complète de ce mode de répression par AEF-1 nécessite de déterminer si l'action d'AEF-1 peut s'exercer à une grande distance du promoteur minimal ou si celle-ci ne peut s'exercer qu'à une courte distance, ici inférieure à 200 paires de bases. Il reste également à déterminer si l'action d'AEF-1 s'exerce spécifiquement sur le promoteur minimal du gène *Fbp1* ou si son action peut s'exercer sur d'autres promoteurs. Enfin, il reste à déterminer si le facteur AEF-1 peut médier, de façon systématique, une condensation locale de chromatine à laquelle la séquence de l'enhancer participe.

b- Modulation par le récepteur hormonal.

L'activation de l'enhancer par GAL4 est non seulement restreinte au tissu adipeux mais elle est de plus limitée dans le temps. L'expression des différentes constructions transgéniques reste identique à celle d'un transgène sauvage, à l'exception de la construction AE-UAS1-UAS^{EcrE}. Cette dernière s'exprime dès le début du troisième stade larvaire, selon le même profil d'expression que celui de la construction possédant uniquement la substitution de l'EcRE par un site UAS (Brodu et al., 1999). Ce résultat

suggère que l'activité de GAL4 est également modulée de manière dominante par le récepteur hormonal.

Il reste cependant à comprendre pourquoi les constructions AE-UAS1-UAS^{EcrE} et AE-UAS^{EcrE} ne sont malgré tout exprimées qu'au troisième stade larvaire et pas avant. Nous pouvons nous demander si la levée de l'inhibition d'AEF-1 par dGATAb pourrait être modulée au cours du développement.

Un élément de réponse à cette hypothèse est apportée par la construction E-UAS1-UAS2-3, ne possédant pas l'élément A. En effet, cette construction permet d'observer une expression ubiquitaire du transgène indicateur *lacZ*, à tous les stades du développement. Par ailleurs, des dosages d'activités β -galactosidase ont cependant révélé que l'activité de ce transgène était renforcée au cours du troisième stade larvaire, selon un profil comparable à l'augmentation de la concentration en ecdysone. Ce résultat suggère que l'expression de la construction E-UAS1-UAS2-3 reste en partie modulée par le récepteur hormonal associé à son ligand en fin de troisième stade larvaire. Cette modulation conduit à une augmentation du niveau de base d'expression, niveau conféré par la transactivation par GAL4.

c- Modulation par des facteurs interagissant avec le promoteur minimal.

La construction 5xUAS-*Fbp1*, possédant 5 sites UAS en amont du promoteur minimal du gène *Fbp1*, s'exprime dans tous les tissus en réponse au facteur GAL4 ubiquitaire, à l'exception d'une partie du système nerveux central et des gonades. Ce résultat indique qu'à l'exception de ces deux tissus, le promoteur minimal du gène *Fbp1* ne comporte pas de site de fixation de facteur pouvant interférer avec la transactivation par GAL4. En revanche, dans une partie du système nerveux central et dans les gonades, il existerait des facteurs inhibant l'activation par GAL4. Une alternative est qu'il pourrait exister une machinerie basale de transcription spécifique des gonades et de cette partie du système nerveux central qui serait incompatible avec le promoteur du gène *Fbp1*.

3.3. Modèle de régulation par dGATAb de l'activation de l'enhancer du gène *Fbp1* dans le tissu adipeux.

Nos résultats montrent que l'activation de l'enhancer du gène *Fbp1* dans le tissu adipeux est modulée par le facteur répresseur AEF-1 et est dépendante du facteur activateur dGATAb. Le facteur dGATAb est essentiel pour l'activation dans le tissu adipeux. Cette activation tissulaire serait, en partie, le résultat de la relèxe de la répression exercée par AEF-1 dans le tissu adipeux. La figure 36 résume de manière schématique ce mécanisme supposé.

Cependant, nos résultats montrent que l'action du facteur répresseur AEF-1 n'est pas strictement requise pour limiter au tissu adipeux l'expression du gène *Fbp1*. La spécificité d'expression est également conférée de façon autonome par l'enhancer seul et requiert le facteur dGATAb.

Cependant, si le facteur dGATAb était le seul impliqué, le gène *Fbp1* devrait être exprimé selon le profil d'expression de ce facteur qui est plus large et inclut le proventricule, les cellules péricardiales et les glandes de la lymphe. L'activation de dGATAb est limitée au seul tissu adipeux ce qui suggère que des co-facteurs, spécifiquement retrouvés dans le tissu adipeux, viennent moduler son activité. Le site GBS1, et dans une moindre mesure le site GBS3, permettent la formation, *in vitro*, de trois complexes incluant le facteur dGATAb et d'autres facteurs dont la nature reste à déterminer (Brodu et al., 1999). Ces facteurs pourraient être ces co-facteurs que nous venons d'évoquer.

L'expression du gène *Fbp1* dans le tissu adipeux dépend d'un double mécanisme existant spécifiquement dans ce tissu et pour lequel le facteur dGATAb occupe une position centrale (Figure 36). D'une part, le complexe formé du facteur dGATAb associé à des co-facteurs pourrait agir pour relever la répression exercée de façon ubiquitaire par AEF-1. D'autre part, ce complexe permettrait, dans le même temps, l'activation spécifique du gène *Fbp1* dans le tissu adipeux. Cette activation reste contrôlée temporellement par le récepteur EcR/USP associé à son ligand hormonal.

Les modes d'action des facteurs AEF-1 et dGATAb dans ce double mécanisme sont encore inconnus. Il reste à déterminer s'ils interagissent directement ou si un troisième partenaire est requis. Ce troisième partenaire serait soit un composant de la chromatine au niveau de l'enhancer, soit des éléments dans la machinerie basale de transcription au niveau du promoteur. A l'heure actuelle, nous n'avons pas été capables de mettre en évidence, *in vitro*, dans nos conditions, une interaction directe entre dGATAb et AEF-1. La relèxe de la répression par dGATAb pourrait faire intervenir un intermédiaire qui reste à caractériser.

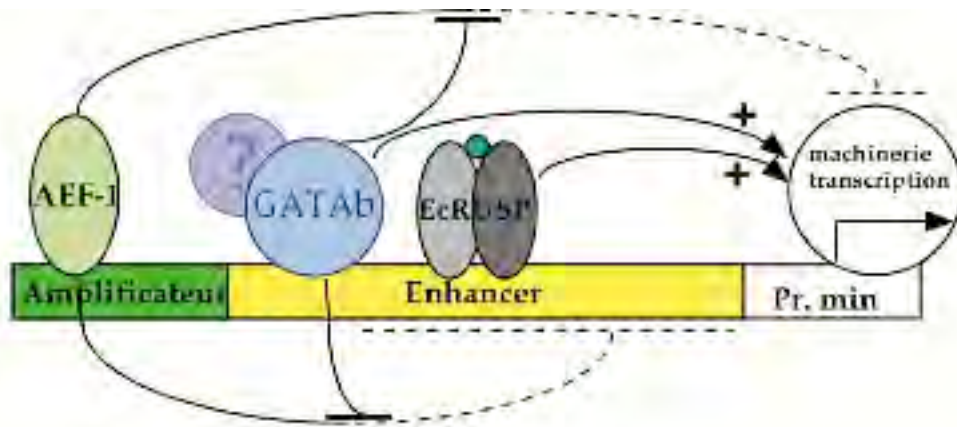


Figure 36 : Modèle de régulation par dGATAb de l'activation de l'enhancer du gène *Fbp1*.

La répression à distance exercée par AEF-1 dans tous les tissus intervient en destabilisant la machinerie de transcription ou en maintenant la chromatine dans un état condensé. Dans un premier temps, le facteur dGATAb, en association avec un cofacteur, agit en relevant la répression. Cette action est symbolisée par la transformation des lignes continues en lignes pointillées. Dans un deuxième temps, dGATAb permet l'activation de l'enhancer du gène *Fbp1* spécifiquement dans le tissu adipeux. L'expression du gène *Fbp1* ne prend place qu'après l'activation supplémentaire par récepteur hormonal EcR/USP associé à son ligand.

CHAPITRE 6

L'expression dynamique des isoformes du gène *Broad-complex* contrôle l'expression temporelle du gène *Fbp1*.

1. Données préliminaires

1. Présentation générale des protéines à domaine BTB/POZ.

1.1. Caractéristiques des protéines à domaine BTB/POZ.

a- Les différentes catégories de protéines à domaine BTB/POZ

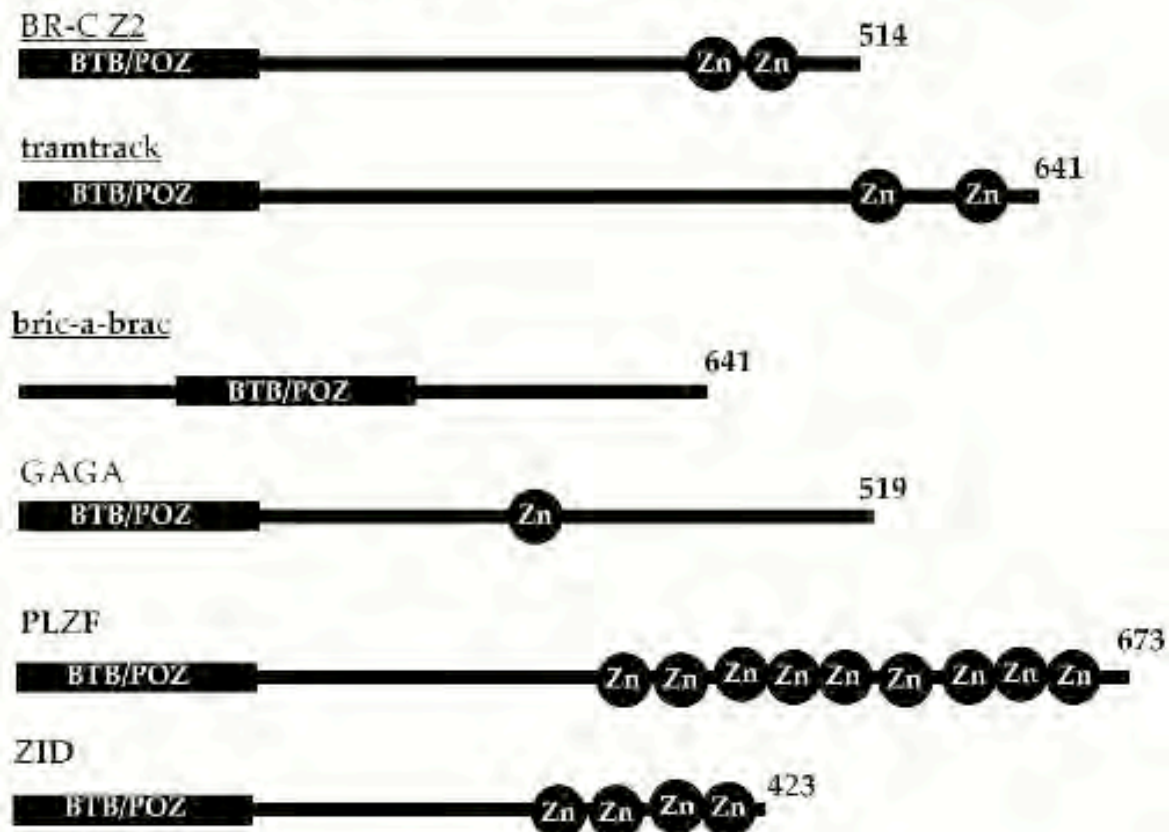
Le domaine BTB/POZ (*Broad-Complex*, *tramtrack*, *bric-a-brac*/*Poxviruses* and *zinc finger*) est un domaine d'environ 120 acides aminés en général retrouvé dans la partie amino-terminale. De façon remarquable, ce domaine est très conservé dans les nombreuses protéines de l'ensemble des métazoaires et des poxvirus chez lesquelles il est présent (Bardwell and Treisman, 1994; Koonin et al., 1992; Zollman et al., 1994). Ces protéines peuvent être classées en trois catégories en fonction de la présence d'un domaine caractéristique et/ou de leur fonction présumée.

La première catégorie comprend des protéines présentant, en plus du domaine BTB/POZ, un domaine à doigts à zinc ou de fixation à l'ADN (Figure 37). Les protéines de drosophile Broad-Complex (BR-C) et Tramtrack (Ttk), à l'origine de la caractérisation du domaine BTB, appartiennent à cette première catégorie.

La deuxième catégorie comprend des protéines cytoplasmiques présentant, dans la partie carboxy-terminale, des répétitions imparfaites de 50 acides aminés se terminant par un résidu glycine (Figure 37). Ces répétitions définissent le domaine "Glycine". Cette catégorie regroupe les protéines virales des poxvirus (Bardwell and Treisman, 1994; Koonin et al., 1992). Chez la drosophile, un exemple de ce type de protéine est la protéine Kelch (Figure 37). Le domaine "Glycine" permettrait la fixation de l'actine (Cooley and Theurkauf, 1994). Par cette fixation, la protéine Kelch semble moduler la polymérisation de l'actine globulaire et surtout compacter les câbles d'actine filamenteuse. L'ensemble assure l'intégrité de la région interne des ponts intercellulaires permettant l'accumulation de protéines dans l'ovocyte en maturation.

La dernière catégorie comprend des protéines ne contenant qu'un domaine BTB/POZ et aucune autre structure caractéristique. Chez la drosophile, le produit du gène *germ cell-less* (*gcl*) appartient à cette catégorie. Il semble faire partie des pores nucléaires des cellules précurseurs des cellules germinales (Jongens et al., 1994).

Facteurs BTB/POZ à doigt de zinc ou se fixant à l'ADN



Facteurs BTB/POZ cytoplasmiques



Figure 37 : Structure de deux des catégories de facteurs à domaine BTB/POZ.

Selon ces catégories, le nom des facteurs BTB/POZ de drosophile sont soulignés, celui des facteurs de virus écrit en blanc et celui des facteurs humains en **noir**. Zn représente une structure à doigt de zinc. G représente un motif de 50 acides aminés, se terminant par un résidu Glycine. Ce motif G est retrouvé répété, de façon imparfaite, dans les facteurs BTB/POZ cytoplasmiques. Le nombre associé à chaque facteur indique le nombre d'acides aminés. Des quatre isoformes du gène *BR-C*, seule l'isoforme Z2 est représentée. (d'après Algabli et al, 1995).

b- Fonction de dimérisation du domaine BTB/POZ

Dans le cas des facteurs ZID (zinc finger with interaction domain), PLZF (promyelocytic zinc finger protein) humains et des facteurs GAGA, Ttk, Bab (*bric-a-brac*) et Kelch de drosophile, le domaine BTB/POZ est capable de médier des interactions homotypiques (Bardwell and Treisman, 1994; Chen et al., 1995). Il peut également médier des interactions hétérotypiques. Ainsi, le domaine BTB/POZ de *Ttk* est impliqué dans l'hétérodimérisation de ce facteur avec le facteur GAGA (Bardwell and Treisman, 1994). La structure cristalline du facteur PLZF a montré que le domaine BTB/POZ constituait une région très hydrophobe. Sa dimérisation lui permet d'exister en solution (Ahmad et al., 1998).

c- Fonction de répression transcriptionnelle du domaine BTB/POZ.

La délétion du domaine BTB/POZ des facteurs ZID, GAGA et Ttk, conduit à une augmentation de leur fixation sur leur site cible d'ADN. Ce résultat suggère que le domaine BTB/POZ module négativement la fixation à l'ADN des protéines qui le contiennent (Bardwell and Treisman, 1994).

Des expériences de transfection de cellules ont permis de montrer que le domaine BTB/POZ du facteur LAZ3/BCL6 présente des propriétés répressives. En effet, la délétion de ce domaine diminue la capacité de la protéine LAZ3/BCL6 de réprimer la transcription d'un gène cible (Albagli et al., 1995). La fusion du domaine BTB/POZ de LAZ3/BCL6 au domaine de liaison à l'ADN du facteur GAL4 de levure produit une chimère fortement répressive. Ce résultat indique la participation directe du domaine BTB/POZ dans la fonction répressive. La fusion avec le domaine BTB/POZ du facteur Bab de drosophile inhibe également la transcription lorsqu'il est ciblé, sous forme de chimère avec GAL4, sur un promoteur minimum (Chen et al., 1995).

Les deux protéines PLZF et BCL6 sont capables d'interagir avec les co-répresseurs des récepteurs nucléaires ainsi qu'avec l'histone déacétylase HDAC1 (David et al., 1998; Hong et al., 1997; Huynh and Bardwell, 1998). Cette interaction permet de faire un lien entre l'inhibition de la fixation à l'ADN et la répression transcriptionnelle des facteurs à domaine BTB/POZ.

1.2. Protéines nucléaires à domaine BTB/POZ et régulation de la structure de la chromatine.

a- Membres des groupes *Polycomb* et *Trithorax*

L'aptitude de certaines protéines nucléaires à domaine BTB/POZ à former des sous-structures nucléaires ponctuées n'est pas sans évoquer celle de certaines des protéines du groupe *Polycomb* (*Pc-G*) de drosophile (Albagli et al., 1995).

Les produits des gènes du groupe *Pc-G* maintiennent la répression de régulateurs du développement, dont les gènes homéotiques, et participent à l'identité segmentaire, en fermant localement et définitivement la chromatine (Orlando and Paro, 1995). Par ailleurs, les gènes du groupe *Trithorax* (*Trx-G*), dont le gène *trithorax* est l'un des représentants, possèdent une fonction antagoniste de celle des protéines du groupe *Polycomb*. Ils sont impliqués dans la régulation positive de l'expression des gènes homéotiques. Le rôle des gènes du groupe *Trx-G* serait de maintenir la structure chromatinienne localement et durablement ouverte et donc de la rendre susceptible d'être transcrite (Orlando and Paro, 1995). Les gènes des groupes *Pc-G* et *Trx-G* sont identifiés comme des régulateurs de la mémoire cellulaire. En effet, les décisions développementales prises par des facteurs régulateurs exprimés de façon transitoire doivent être maintenues et en quelque sorte gardées en mémoire tout au cours du développement.

En plus de la structure nucléaire ponctuée, il existe des liens fonctionnels entre les protéines BTB/POZ et *Pc-G*. D'une part, l'inactivation du gène *bab* de drosophile conduit à des transformations homéotiques similaires à la mutation de certains gènes *Pc-G* (Zollman et al., 1994). D'autre part, les effets de nombreuses protéines du groupe *Pc-G* et de certaines protéines à domaine BTB/POZ, comme *Bab*, semblent étroitement dépendre de leur concentration. Ce résultat suggère que ces deux types de protéines appartiennent à des complexes macromoléculaires dont la stœchiométrie est cruciale (Orlando and Paro, 1995; Zollman et al., 1994).

Les produits d'au moins deux gènes à domaine BTB/POZ de drosophile régulent positivement l'expression des gènes des complexes homéotiques. Il s'agit du facteur GAGA régulant le gène *ultrabithorax* et le produit des gènes *E(var)3-93D* régulant les gènes du complexe *Bithorax* (Dorn et al., 1993; Farkas et al., 1994; Paro, 1993). Dans ces deux cas, la régulation est positive, classant ainsi les gènes GAGA et *E(var)3-93D* parmi les gènes du groupe *Trx-G*.

Chez la drosophile, la "variégation par effet de position", ou VEP, est la conséquence du rapprochement, par remaniement chromosomique par exemple, d'un gène transcrit de la chromatine active (euchromatine) avec une région inactive de la chromatine (hétérochromatine). Cette proximité accidentelle peut, de façon stable, éteindre ce gène de manière alternative selon la cellule. Ceci conduit à une expression mosaïque du gène

(Henikoff, 1990). L'inactivation des gènes *GAGA* et *E(var)3-93D* du groupe *Trx-G* augmente la VEP. Ce résultat indique qu'en absence de ces gènes, l'hétérochromatine est plus étendue et dès lors, la probabilité d'extinction stable supérieure. Les protéines *GAGA* et *E(var)3-93D* réguleraient leurs gènes cibles en permettant la décondensation de la structure chromatinienne.

Des données biochimiques corrélient ces données génétiques. Le facteur *GAGA* semble être un régulateur indirect préparant la chromatine pour la fixation d'autres facteurs de transcription. Le facteur *GAGA* favoriserait le déplacement des nucléosomes et empêcherait la répression médiée par l'histone H1 (Granok et al., 1995).

De l'ensemble des résultats exposés, il apparaît pour la première fois que le lien entre la VEP et les gènes des groupes *Pc-G* et *Trx-G* peut être établi, par l'intermédiaire des protéines à domaine BTB/POZ, *Bab*, *GAGA* et *E(var)3-93D*. Les mutations des facteurs BTB/POZ peuvent se comporter comme des mutations des groupes *Pc-G* ou *Trx-G*, ce qui suggère que ces facteurs peuvent agir de façon antagoniste sur un même mécanisme. Ces facteurs pourraient agir en maintenant localement un état condensé ou décondensé, diminuant ou augmentant l'accessibilité de l'ADN pour d'autres protéines régulatrices.

b- Mise en place d'éléments "isolateurs"

On peut dès lors se demander dans quel contexte physiologique pourrait être utilisée la capacité de ces protéines à domaine BTB/POZ de moduler l'architecture de la chromatine. Une étude a montré que les produits de *E(var)3-93D* (recloné sous le nom de *mod(mdg4)*, *modifier of mgd4*) participent à la mise en place d'éléments "isolateurs" capables de séparer des domaines dans la chromatine en fixant des frontières autour d'une séquence régulatrice donnée (Figure 38) (Cai and Levine, 1997; Gerasimova et al., 1995). En effet, l'insertion, entre un enhancer et un promoteur, d'une séquence multimérique du rétrotransposon *gypsy* reconnue par la protéine à doigt à zinc *suppressor of Hairy wing* (*su(Hw)*), inactive cet enhancer tandis que les enhancers en aval de la séquence multimérique ne sont pas affectés (Figure 38, C). Cependant, en absence de *E(var)3-93D*, l'effet inhibiteur de *su(Hw)* devient bidirectionnel, de sorte que tous les enhancers sont inactivés (Figure 38, B). Pour expliquer le rôle du facteur *E(var)3-93D*, les auteurs proposent un modèle selon lequel un ou plusieurs produits de *E(var)3-93D* empêchent, en aval de la séquence multimérique, l'hétérochromatinisation induite par la fixation de *su(Hw)*. La séquence multimérique présente ainsi toutes les propriétés d'un "isolateur" puisqu'elle définit une région avale où les enhancers sont actifs et elle élimine l'influence des enhancers présents en amont.

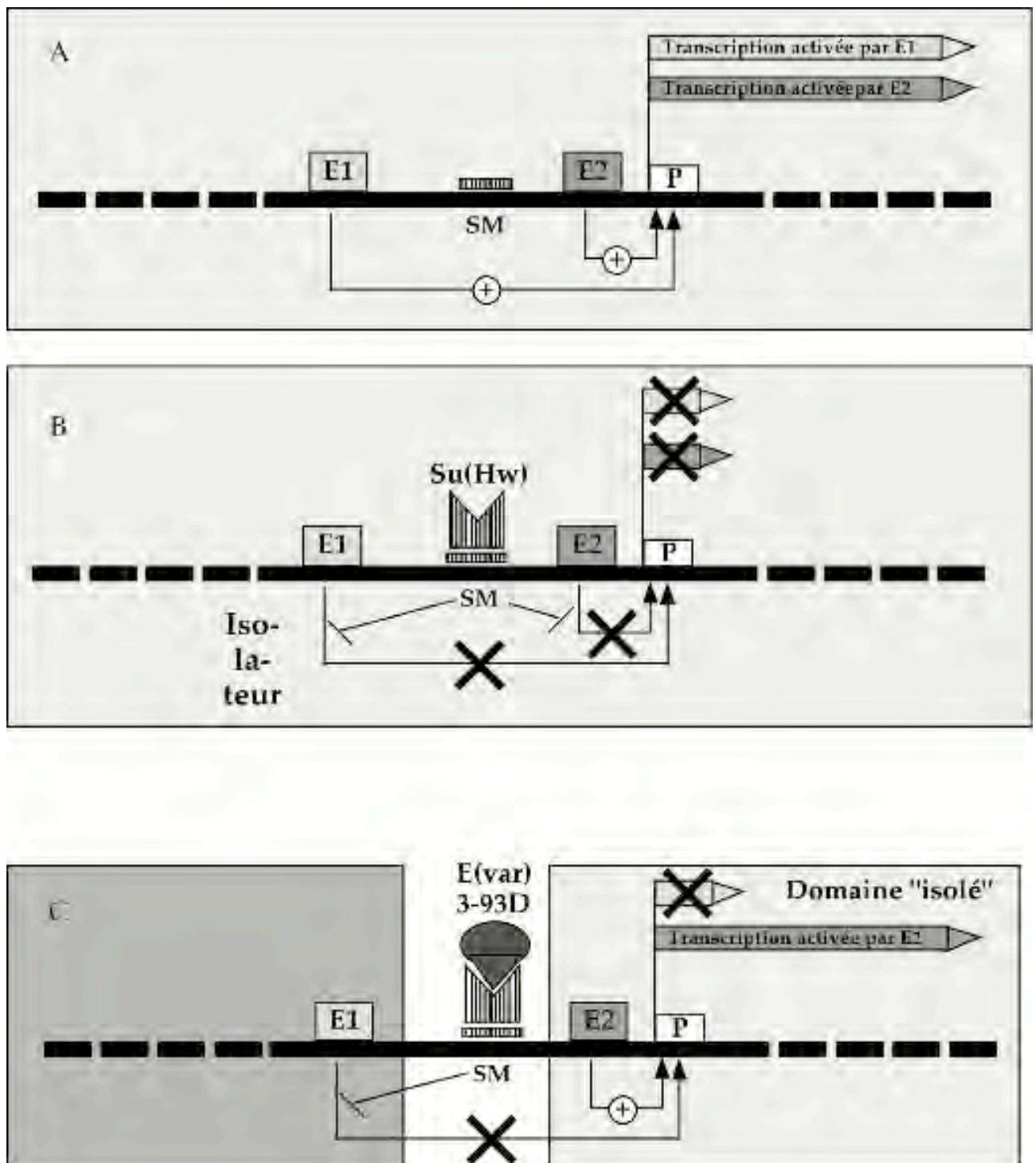


Figure 38 : Protéine E(var)3-93D et fonction de l'élément "isolateur" du rétro-transposon *gypsy* de drosophile

A. La séquence SM du rétrotransposon *gypsy* contient un site de fixation pour la protéine suppressor of hairy wing (Su(Hw)). En absence de Su(Hw), SM n'a pas d'influence sur l'activité des deux enhancers (E1 et E2) qui stimulent l'activité transcriptionnelle du promoteur P.

B. La fixation de Su(Hw) sur SM induit une inactivation bidirectionnelle des séquences régulatrices. Les deux enhancers ne sont plus capables d'activer la transcription du promoteur P.

C. La protéine à domaine BTB/POZ E(var)3-93D est requise pour imposer une direction à l'inactivation des séquences régulatrices induite par la fixation de Su(Hw) sur SM. Le promoteur ne subit plus l'influence de E1 mais que de E2. La séquence SM constitue alors un élément "isolateur" séparant fonctionnellement deux domaines de chromatine.

L'existence de tels isolateurs chez la drosophile, au génome beaucoup plus compact que celui des vertébrés, pourrait permettre de moduler l'influence d'un élément régulateur sur l'expression d'un gène. Des protéines à domaine BTB/POZ pourraient réguler la transcription au moyen d'un tel mécanisme.

2. Le gène *Broad-Complex* de *D. melanogaster*.

2.1. Les isoformes et les groupes de complémentation.

Selon le modèle d'Ashburner, le gène *BR-C* appartient à la catégorie des gènes précoces, induits directement par l'ecdysone. Les transcrits du gène *BR-C* codent au moins quatre protéines (*Z1*, *Z2*, *Z3*, *Z4*) possédant une région amino-terminale commune, incluant un domaine BTB/POZ, et chacune un motif distinct à deux doigts à zinc de type C2H2 dans la partie carboxy-terminale (Bayer et al., 1996; DiBello et al., 1991).

Des analyses génétiques ont permis de définir au moins 3 groupes de complémentation : *broad (br)*, *reduced bristles on palpus (rbp)*, *2Bc*. Une dernière classe de mutants *non pupariating (npr)* ne complémente aucune des mutations des autres groupes (Belyaeva et al., 1981; Kiss et al., 1988). Une correspondance entre les groupes de complémentation et le produit du gène *BR-C*, fondée sur l'analyse génétique et moléculaire des certains mutants, a été proposée (DiBello et al., 1991). Cette correspondance repose de plus sur des expériences de sauvetage, à la suite de la surexpression d'une isoforme particulière, de la létalité induite par des mutations appartenant aux différents groupes de complémentation, (Bayer et al., 1996). Les fonctions *rbp*, *br* et *2Bc* seraient associées respectivement aux isoformes *Z1*, *Z2* et *Z3*. L'absence de mutant affectant spécifiquement l'isoforme *Z4* empêche d'établir une correspondance avec un groupe de complémentation.

2.2. Rôles des protéines BR-C au cours du développement.

Les fonctions du gène *BR-C* sont importantes au cours du troisième stade larvaire et du développement pupal (Belyaeva et al., 1981), ainsi qu'au cours de l'ovogenèse (Buszczak et al., 1999). En fin de troisième stade larvaire, le gène *BR-C* est impliqué dans la morphogenèse des disques imaginaux, la métamorphose des glandes salivaires, de

l'intestin et des muscles du vol (Kiss et al., 1988; Restifo and White, 1991). Il est également

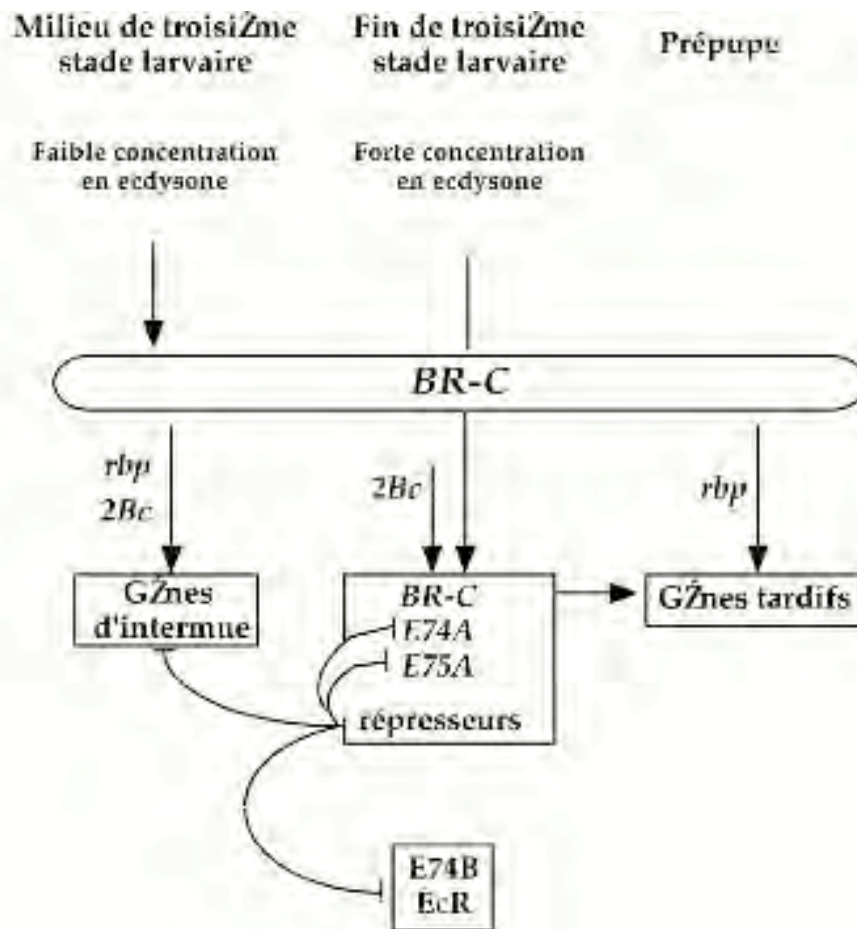


Figure 39 : Modèle d'expression de régulation des gènes par le gène BR-C dans les glandes salivaires au cours du développement

A la moitié du troisième stade larvaire, la concentration d'ecdysone est faible. Elle induit l'expression des fonctions *rbp* et *2Bc* du gène BR-C qui à leur tour induisent l'expression des gènes d'intermue. A la fin du troisième stade larvaire, l'augmentation de la concentration en ecdysone induit l'expression des gènes précoces *E74*, *E75* et BR-C. L'induction maximale de ces gènes est dépendante de la fonction *2Bc*. Des protéines de type répresseur sont également synthétisées. Elles interviennent pour réprimer l'expression des gènes d'intermue et précoces. Dans la prépupe, la fonction *rbp* du BR-C est essentielle pour l'activation des gènes tardifs (d'après Karim et al., 1993).

impliqué dans le remodelage du système nerveux central (Restifo and Hauglum, 1998; Restifo and White, 1991) ainsi que dans la différenciation des ommatidies dans le disque imaginal d'œil (Brennan et al., 1998; Liu and Restifo, 1998).

Les mutants du gène *BR-C* meurent au cours du troisième stade larvaire ou du stade pupal. Ceci met en évidence son rôle crucial dans la métamorphose. Ces mutants présentent un profil modifié d'apparition des puffs dans les glandes salivaires. En effet, les puffs précoces 74EF et 75B sont réduits et le puff d'inter-mue 68C ne régresse plus. De plus, certains puffs tardifs ne se forment pas (Belyaeva et al., 1981). La disparition ou la diminution de la taille des puffs sont corrélées avec la réduction de la transcription des gènes au locus concerné (Guay and Guild, 1991).

L'analyse de la transcription de certains gènes d'inter-mue, précoces et tardifs dans ces différents contextes mutants pour le gène *BR-C* confirme l'importance de ce gène dans la régulation transcriptionnelle en réponse à l'ecdysone (Karim et al., 1993). Ces auteurs ont proposé un modèle pour expliquer les effets multiples, au cours du temps, des produits du gène *BR-C* sur l'expression des gènes dans les glandes salivaires (Figure 39). Selon ce modèle, les fonctions *rbp* et *2Bc* seraient nécessaires à l'activation de la transcription des gènes d'inter-mue et la fonction *2Bc* à leur répression. L'induction des gènes précoces nécessiterait la fonction *2Bc* et celle des gènes tardifs la fonction *rbp* (Figure 39). Cependant, l'intensité et le moment d'expression des différentes isoformes varient d'un tissu à un autre et ce modèle ne pourrait s'appliquer uniquement à la régulation des gènes exprimés spécifiquement dans les glandes salivaires (Huet et al., 1995). Les protéines *BR-C* seraient impliquées dans des fonctions régulatrices différentes dans des tissus particuliers. Les variations d'expression et de fonctions des protéines *BR-C*, dans différents tissus, sont à rapprocher du modèle de coordination tissulaire (Chapitre 1).

2.3. Mode d'action des protéines BR-C

L'utilisation d'anticorps spécifiques a permis de détecter les protéines *BR-C* à la fois au niveau des puffs précoces, des puffs tardifs et d'autres bandes sur les chromosomes polytènes des glandes salivaires (Emery et al., 1994). Ces résultats sont en accord avec le modèle d'action proposé par M. Ashburner selon lequel les protéines codées par les gènes précoces, comme le gène *BR-C*, sont à la fois des régulateurs de leur propre transcription et de la transcription des puffs tardifs. Ces résultats indiquent également que de nombreux gènes, au locus des autres bandes chromosomiques détectées avec les anticorps, sont la cible des protéines *BR-C*.

Le mode d'action des protéines BR-C, au niveau de leurs gènes cibles, est largement inconnu. Les seules données moléculaires existantes reposent sur des expériences de protection contre l'action de la DNase I réalisées avec des quantités élevées de protéines BR-C produites et purifiées à partir de bactéries. Ces expériences ont été réalisées sur les séquences *cis*-régulatrices du gène tardif *L71* et du gène *Dopacarboxylase (Ddc)* et des gènes de glu *sgs4*, trois gènes effecteurs de la métamorphose induits par l'ecdysone (Crossgrove et al., 1996; Hodgetts et al., 1995; von Kalm et al., 1994). Elles ont révélé de nombreuses régions régulatrices protégées de l'action de la DNase I par la fixation de protéines BR-C. A partir des régions protégées, les auteurs ont déduit une séquence consensus de fixation, riche en nucléotides A et T, pour chacune des protéines BR-C. Sa validation requiert la mise en évidence de la fixation des protéines BR-C dans des conditions plus physiologiques. L'implication du domaine à doigts à zinc dans la fixation n'est pas démontrée.

Des tests de sensibilité à la DNase ont été réalisés, *in vivo*, sur les promoteurs de gènes *hsp* inductibles par l'ecdysone. Ces expériences ont permis de révéler les régions impliquées dans l'activité transcriptionnelle. Dans différents contextes BR-C mutants, ces régions ne sont plus protégées contre l'action de la DNase et le promoteur qu'elles contrôlent n'est plus actif (Dubrovsky et al., 1994). Ces résultats, obtenus *in vivo*, suggèrent que la fixation des protéines BR-C est impliquée dans l'activation transcriptionnelle des gènes *hsp* en se fixant au niveau des régions régulatrices. Les protéines BR-C pourraient ainsi être impliquées dans le maintien d'un état chromatinien ouvert, transcriptionnellement actif.

3. Le gène *Fbp1* : gène cible des protéines BR-C.

Des expériences réalisées au laboratoire ont montré que certaines mutations du gène *BR-C* conduisent à une diminution de l'activité du gène *Fbp1* (Lepesant et al., 1986). Elles indiquent que le gène *Fbp1* est une cible du gène *BR-C*. Ce gène représente donc un modèle pour aborder le rôle régulateur des protéines BR-C dans un autre tissu que les glandes salivaires, ici le tissu adipeux.

Dans ce contexte, nous avons généré des anticorps spécifiques contre chacune des 4 isoformes BR-C et établi ainsi leurs profils dynamiques d'expression dans le tissu adipeux. L'isoforme Z2 est exprimée précocement dans le tissu adipeux et son expression diminue

pour disparaître au milieu du troisième stade larvaire. L'expression des trois autres isoformes intervient à ce moment, période qui voit également l'induction du gène *Fbp1*.

L'expression, dans le tissu adipeux larvaire, d'un gène indicateur *lacZ* placé sous le contrôle des séquences régulatrices du gène *Fbp1*, est fortement réduite dans un contexte mutant abolissant complètement la fonction du gène *BR-C*. Dans ce même contexte *BR-C* nul, l'expression du gène indicateur est restaurée spécifiquement dans le tissu adipeux si l'on apporte en *trans*, par croisement génétique, un transgène thermo-inductible codant pour les protéines *BR-C* Z1, Z3 ou Z4. En revanche, l'expression spécifique du gène indicateur n'est pas restaurée si l'on apporte par croisement génétique un transgène thermo-inductible codant pour la protéine *BR-C* Z2.

Au contraire, dans un contexte sauvage, le maintien de l'expression de l'isoforme Z2 en fin de troisième stade larvaire, stade de développement où il n'est normalement plus exprimé dans le tissu adipeux, conduit à la diminution d'un facteur quatre du niveau d'expression du transgène indicateur *lacZ* sous contrôle de l'enhancer du gène *Fbp1*. A l'inverse, la surexpression de l'isoforme Z3 au début du troisième stade larvaire conduit à l'expression plus précoce de ce transgène indicateur *lacZ*. Dans ces 2 cas, elle reste limitée exclusivement au corps gras. L'ensemble des résultats suggère que la dynamique d'expression des protéines *BR-C* régule l'expression temporelle du gène *Fbp1*.

Nos expériences indiquent que la fonction des protéines *BR-C* est indispensable pour que le gène *Fbp1* réponde à l'ecdysone. Cependant, il ne nous a pas été possible de montrer que ces protéines se fixent directement au niveau de l'enhancer de *Fbp1*. Nous pensons à l'heure actuelle que les protéines *BR-C* pourraient être impliquées dans le contrôle temporel de l'accessibilité de l'enhancer à différents facteurs régulateurs. Ces derniers seraient requis pour l'expression spatiale et temporelle correcte du gène *Fbp1*. Une alternative serait que les protéines *BR-C* agissent de manière indirecte en régulant l'expression d'autres facteurs venant agir eux directement au niveau de l'enhancer de *Fbp1*. L'ensemble des résultats concernant la régulation du gène *Fbp1* par les protéines *BR-C* est présenté sous forme d'un manuscrit à soumettre pour publication.

2. Article

Dynamic expression of Broad-Complex isoforms mediates temporal control of an ecdysteroid target gene expression at the onset of *Drosophila* metamorphosis.

Bruno MUGAT, Véronique BRODU, Jana KEJZLAROVA-LEPESANT, Christophe ANTONIEWSKI, Cynthia A. BAYER and Jean-Antoine LEPESANT.

Dynamic Expression of *Broad-Complex* Isoforms Mediates Temporal Control of an Ecdysteroid Target Gene at the Onset of *Drosophila* Metamorphosis

Bruno Mugat,* Véronique Brodu,* Jana Kejzlarova-Lepesant,*
Christophe Antoniewski,* Cynthia A. Bayer,† James W. Fristrom,‡
and Jean-Antoine Lepesant*¹

*Institut Jacques-Monod, CNRS et Universités Paris 6–P. et M. Curie et Paris 7–Denis Diderot, 2, place Jussieu, F-75251 Paris Cedex 05, France; †Department of Biology, University of Central Florida, 4000 Central Florida Boulevard, Orlando, Florida 32816-2368; and ‡Department of Molecular and Cellular Biology, University of California at Berkeley, Berkeley, California 94720-3200

Metamorphosis in *Drosophila melanogaster* is orchestrated by the steroid hormone ecdysone, which triggers a cascade of primary-response transcriptional regulators and secondary effector genes during the third larval instar and prepupal periods of development. The early ecdysone-response *Broad-Complex* (*BR-C*) gene, a key regulator of this cascade, is defined by three complementing functions (*rbp*, *br*, and *2Bc*) and encodes several distinct zinc-finger-containing isoforms (Z1 to Z4). Using isoform-specific polyclonal antibodies we observe in the fat body a switch in *BR-C* isoform expression from the Z2 to the other three isoforms during the third instar. We show that the *2Bc*⁺ function that corresponds presumably to the Z3 isoform is required for the larval fat body-specific expression of a transgenic construct (*AE*) in which the *lacZ* gene is under the control of the ecdysone-regulated enhancer and minimal promoter of the *fat body protein 1* (*Fbp1*) gene. Using *hs(BR-C)* transgenes, we demonstrate that overexpression of Z1, Z3, or Z4, but not Z2, is able to rescue *AE* activity with faithful tissue specificity in a *BR-C* null (*brp1*) genetic context, demonstrating a partial functional redundancy between Z1, Z3, and Z4 isoforms. We also show that continuous overexpression of Z2 during the third instar represses *AE*, while conversely, expression of Z3 earlier than its normal onset induces precocious expression of the construct. This finding establishes a tight correlation between the dynamic pattern of expression of the *BR-C* isoforms and their individual repressive or inductive roles in *AE* regulation. Altogether our results demonstrate that the balance between *BR-C* protein isoforms in the fat body mediates, in part, the precise timing of the ecdysone activation of the *AE* construct but does not modulate its tissue specificity. © 2000 Academic Press

Key Words: larval fat body; ecdysone; fat body protein 1 gene; temporal regulation; zinc fingers.

INTRODUCTION

Metamorphosis in holometabolous insects is a remarkable developmental process leading to the remodeling of the larva into the adult. During this period, initiation of new

programs of gene expression lead to important morphological and physiological modifications within larval and imaginal tissues. Larval tissues are histolyzed or reorganized while imaginal tissues develop into adult structures. In *Drosophila*, this metamorphic transformation is orchestrated by successive waves of the steroid hormone 20-hydroxyecdysone (referred to here as ecdysone) (Riddiford, 1993). How the hormonal signal is correctly interpreted in each target tissue remains an open question. Cytological studies of ecdysone-induced pulling of polytene chromo-

¹ To whom correspondence should be addressed at the Institut Jacques Monod, CNRS et Universités Paris 6–P. et M. Curie et Paris 7–Denis Diderot, 2, place Jussieu, F-75251 Paris Cedex 05, France. Fax: +33 1 44 27 52 65. E-mail: lepesant@im.jussieu.fr.

CHAPITRE 7

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'ensemble de nos résultats a apporté des éléments nouveaux pour comprendre comment l'activation de l'enhancer du gène *Fbp1* est régulée temporellement, tissulairement et en réponse au signal hormonal. Nous allons revenir sur chacun des mécanismes de régulation mis en évidence au cours de ce travail et qui sont schématisés dans la figure 40.

1. Le contrôle temporel d'expression du gène *Fbp1* : le récepteur hormonal et le gène BR-C.

1.1. Rôle du récepteur de l'ecdysone dans la régulation temporelle d'expression du gène *Fbp1*.

Un site de fixation du récepteur de l'ecdysone, constitué d'un hétérodimère entre les protéines USP et EcR-B1 a été identifié dans l'enhancer du gène *Fbp1*. Au cours du troisième stade larvaire, parmi les trois isoformes identifiées du gène EcR, l'isoforme EcR-B1 est préférentiellement exprimée dans les tissus larvaires. En revanche, l'isoforme EcR-A est préférentiellement exprimée dans les tissus imaginaux, à l'origine des futurs tissus adultes. Ces deux isoformes ne sont jamais retrouvées co-exprimées dans un même tissu (Talbot et al., 1993). Cette observation avait conduit à formuler l'hypothèse qu'elles pouvaient être impliquées dans l'expression différentielle des gènes, selon le tissu cible de l'ecdysone.

De façon très surprenante, l'expression d'un transgène *Fbp1-lacZ*, possédant un site de fixation UAS pour le facteur GAL4 à la place du site de fixation du récepteur hormonal, reste limitée au corps gras, même si le facteur GAL4 est exprimé dans tous les tissus. Le récepteur hormonal peut être ainsi remplacé par un facteur activateur, exprimé de façon ubiquitaire, sans que cela conduise à un changement tissulaire d'expression du gène *Fbp1*. Ce résultat est la première démonstration que l'utilisation différentielle des isoformes du gène EcR n'est pas à elle seule à l'origine de la spécificité tissulaire de la réponse à l'ecdysone. Il suggère fortement que l'activation du gène *Fbp1* par le récepteur de l'ecdysone est indépendante de la nature de l'isoforme de la protéine EcR. Pour tester cette hypothèse, l'expression du gène *Fbp1* pourrait être étudiée en surexprimant l'isoforme EcR-A dans un contexte mutant pour l'isoforme EcR-B1.

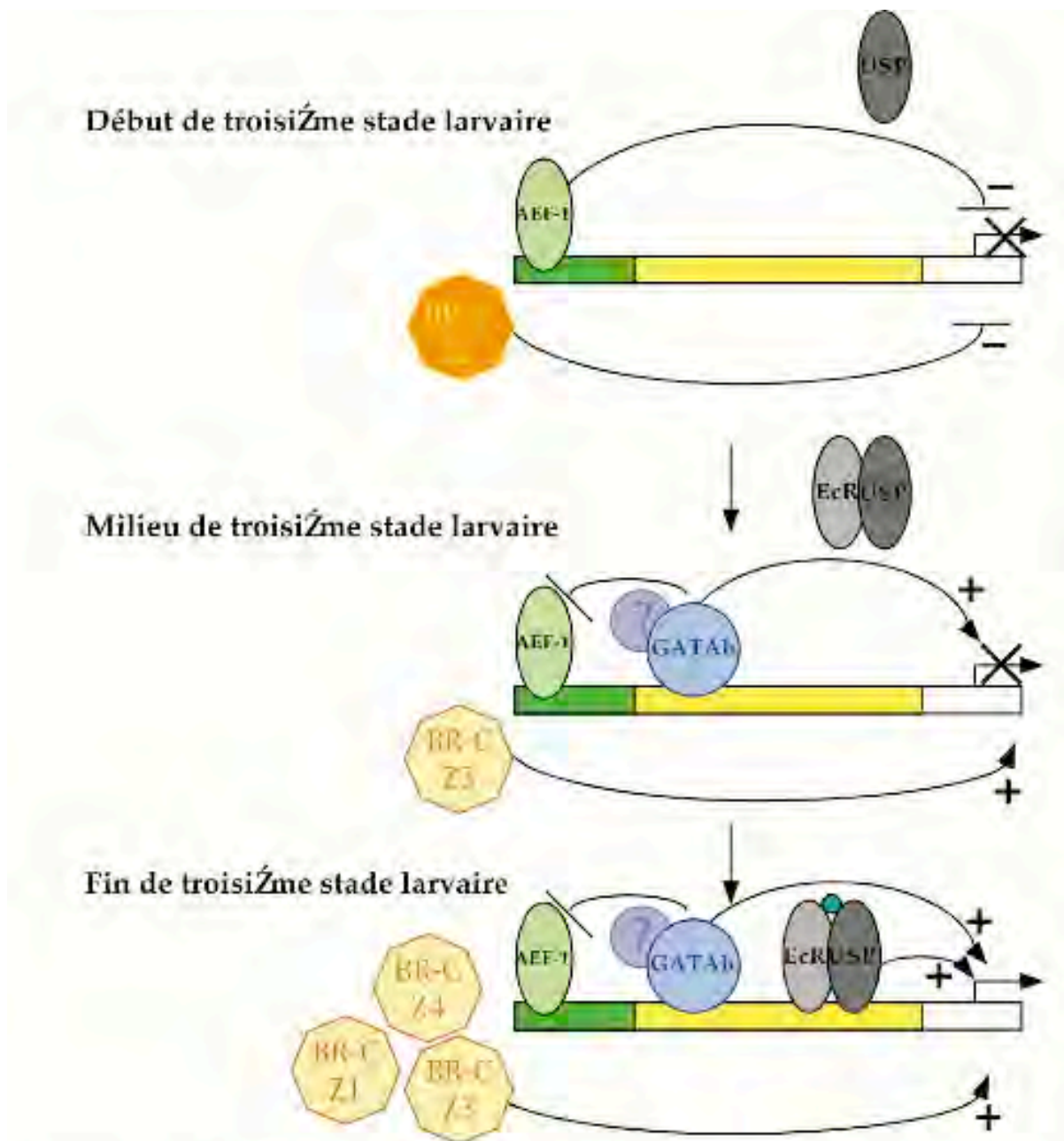


Figure 40 : Modèle de régulation tissulaire et temporelle de l'expression du gène *Fbp1*.

L'expression temporelle du gène *Fbp1* est contrôlée de manière directe par le récepteur hormonal EcR/USP. La protéine USP est exprimée à un niveau constant au cours du troisième stade larvaire. La protéine EcR n'est exprimée qu'à partir du milieu de ce stade de développement. L'augmentation de la concentration en ecdysone, en fin de troisième stade larvaire, stabilise la formation et la fixation à son site cible de l'hétérodimère EcR/USP.

L'expression temporelle du gène *Fbp1* est également contrôlée, de manière indirecte, par une combinaison d'isoformes codées par le gène *BR-C*. L'expression du gène *Fbp1* est réprimée par l'isoforme Z2, exprimée au début du troisième stade larvaire, et activée par l'expression progressive des isoformes Z3, puis Z1 et Z4.

Le facteur dGATAb, en association avec un co-facteur, agit en relevant la répression exercée par le facteur AEF-1. Le facteur dGATAb permet l'activation de l'enhancer du gène *Fbp1* spécifiquement dans le tissu adipeux.

L'expression du gène *Fbp1* est ainsi dépendante de l'activation par le récepteur hormonal associé à son ligand, par les isoformes Z1, Z3 et Z4 du gène *BR-C*, et par le facteur dGATAb associé avec un co-facteur. Cette situation n'est retrouvée que dans le tissu adipeux en fin de troisième stade larvaire.

A l'appui de cette hypothèse, deux études menées par deux équipes indépendantes ont permis d'observer que la létalité induite par une mutation aboutissant à l'élimination de l'isoforme EcR-B1, peut être sauvée par la surexpression, dans tous les tissus, de n'importe quelle isoforme de EcR (Li and Bender, 1999; Maroy et al., 1999). Ces résultats indiquent qu'une isoforme d'EcR peut se substituer à une autre sans perturber le bon déroulement de la cascade d'événements morphogénétiques régulés par l'ecdysone.

Dans un contexte où le facteur GAL4 est exprimé à un niveau constant, l'expression du transgène possédant un site de fixation UAS à la place du récepteur hormonal s'exprime plus tôt que le transgène sauvage au cours du troisième stade larvaire. Ce résultat indique que le récepteur intervient comme un régulateur temporel, hormono-dépendant. Le moment d'expression du gène *Fbp1* pourrait être contrôlé, en partie, par le niveau d'expression d'EcR et par la concentration d'ecdysone. Si tel est le cas, nous pouvons espérer modifier le profil d'expression temporel du gène *Fbp1* en surexprimant précocement l'une des isoformes EcR et /ou en nourrissant les larves avec de l'ecdysone. En effet, l'expression du gène EcR est induite directement par l'ecdysone ce qui conduit à l'établissement d'une boucle d'auto-régulation du niveau d'expression. L'ajout d'ecdysone permet ainsi d'observer, de façon transitoire, une induction prématurée de la protéine EcR (Deak et al., 1988). Celle-ci pourrait conduire à l'expression prématurée du gène *Fbp1*.

Nous avons déjà effectué des tentatives pour tester cette hypothèse en surexprimant l'isoforme EcR-B1 en ajoutant de l'ecdysone dans la nourriture des larves. Nous n'avons pas observé d'avancée significative du moment d'expression du gène *Fbp1*, soulignant la difficulté de manipuler un système biologique. La surexpression des autres isoformes de la protéine EcR reste à réaliser.

1.2. Le gène précoce *BR-C* et la régulation temporelle d'expression du gène *Fbp1*.

La régulation temporelle d'expression du gène *Fbp1* est en partie contrôlée par le récepteur de l'ecdysone. Cependant, nous avons également montré que le gène précoce *BR-C* est impliqué dans cette régulation temporelle.

Le gène *BR-C* appartient à la catégorie des gènes régulateurs précoces, induits directement par l'ecdysone. Nous avons montré que le gène *Fbp1* est une de ses cibles génétiques. Le gène *Fbp1* constitue donc un modèle pour étudier les mécanismes de régulation par un gène précoce de la réponse hormonale codant un facteur de transcription à domaine BTB/POZ.

La présence d'un domaine à doigt de zinc dans chacune des quatre isoformes *BR-C* laisse supposer que ces protéines peuvent se fixer directement à l'ADN. A l'appui de cette hypothèse, des expériences d'empreinte à la DNase I, sur les promoteurs des gènes *L71*, *Ddc* et *sgs4*, ont révélé que ces protéines étaient capables de se fixer à l'ADN (Crossgrove et al., 1996; Hodgetts et al., 1995; von Kalm et al., 1994). Cependant, ces expériences ont nécessité des quantités élevées de protéines et la fixation de ces protéines dans des conditions plus physiologiques reste à mettre en évidence. En utilisant une autre source de protéines, comme les traductions *in vitro* ou des extraits nucléaires de tissu adipeux, nous n'avons jamais pu mettre en évidence de fixation des protéines *BR-C* au niveau de l'enhancer du gène *Fbp1*.

Les expériences d'empreinte à la DNase I ont été réalisées avec des protéines *BR-C* entières (Crossgrove et al., 1996; Hodgetts et al., 1995; von Kalm et al., 1994). Il serait intéressant d'essayer de reproduire, dans les mêmes conditions, ces expériences avec des protéines possédant une délétion du domaine à doigt de zinc afin de tester si ce domaine est impliqué dans la fixation à l'ADN.

La délétion du domaine BTB/POZ des facteurs ZID, GAGA et Ttk conduit à une augmentation de leur fixation sur leur site cible (Bardwell and Treisman, 1994). Il serait également intéressant de tester si la délétion du domaine BTB/POZ de *BR-C* a le même effet. La délétion de ce domaine particulier, si elle conduisait à une augmentation de la fixation, pourrait permettre d'utiliser des quantités plus faibles de protéines dans des expériences d'empreintes à la DNase I. Elle pourrait aussi permettre de les voir se fixer dans des expériences de retardement sur gel.

Le domaine BTB/POZ est impliqué dans les fonctions répressives du facteur LAZ3/BCL6 et dans les interactions du facteur PLZF avec l'histone déacétylase HDAC1 (David et al., 1998; Hong et al., 1997; Huynh and Bardwell, 1998). Il est également impliqué

dans des interactions homo- ou hétérotypiques (Bardwell and Treisman, 1994; Chen et al., 1995). Dans ce contexte, il serait également intéressant de tester *in vivo*, par transgénèse, si la délétion du domaine BTB/POZ des protéines BR-C modifie leurs propriétés régulatrices. Le gène *Fbp1* constitue une bonne cible pour effectuer cette expérience. En effet, nous pourrions tester, dans un contexte *BR-C* nul, si une isoforme délétée de son domaine BTB/POZ se révèle encore capable de déclencher l'expression du gène *Fbp1*.

Dans un contexte sauvage, la surexpression des isoformes Z2 et Z3 permet de modifier temporellement l'activation de l'enhancer du gène *Fbp1*. Celle-ci est retardée après la surexpression de Z2 et avancée après la surexpression de Z3. Nous pourrions tester si la délétion du domaine BTB/POZ de ces deux isoformes permet d'observer des modifications encore plus importantes du profil temporel d'expression.

L'activation de l'enhancer du gène *Fbp1* résulte de la superposition de deux niveaux de contrôle temporel : le premier niveau est apporté par le récepteur de l'ecdysone, le deuxième par une combinaison d'isoformes codées par le gène *BR-C* qui est lui-même sous contrôle de l'ecdysone.

Nous ne savons pas, à l'heure actuelle, par quels mécanismes le gène *BR-C* exerce son contrôle temporel. Cependant, nous avons montré que les deux constructions AE-UAS^{EcrE} (Brodu et al., 1999) et AE-UAS1-UAS^{EcrE} (Chapitre 5) ne s'expriment qu'à partir du début du troisième stade larvaire. Nous pourrions faire appel au rôle du deuxième commutateur temporel joué par le gène *BR-C* pour expliquer pourquoi ces constructions ne s'expriment pas avant le troisième stade larvaire. Une telle hypothèse implique que le gène *BR-C* modulerait l'expression de ces deux constructions de manière indépendante de EcR/USP.

1.3. Le gène BR-C et la spécificité tissulaire : discussion du modèle de coordination tissulaire.

Nos résultats montrent que l'expression du gène *Fbp1* est activée par les isoformes Z1, Z3 et Z4 et réprimée par l'isoforme Z2. Il reste à établir si ces isoformes possèdent les mêmes fonctions pour l'expression d'autres gènes cibles prenant place dans d'autres tissus. Un premier élément de réponse est apporté par l'étude de la régulation du gène tardif *L71*, exprimé dans les glandes salivaires. L'expression de *L71* dépend de l'activation par l'isoforme Z2. La surexpression de l'isoforme Z3 conduit à la répression de son expression (Crossgrove et al., 1996).

L'ensemble de ces résultats montrent que les isoformes n'ont pas les mêmes propriétés régulatrices d'un tissu à l'autre. Ceci suggère que les niveaux d'expression de chacune des isoformes dans un tissu donné pourrait conduire à des effets régulateurs différents. Par ailleurs, ces résultats suggèrent que la régulation par les protéines BR-C pourrait dépendre de l'action d'autres facteurs dont l'expression serait variable selon les tissus.

Le modèle de coordination tissulaire repose sur la proposition que chaque tissu renferme, à un moment donné, une combinatoire particulière et caractéristique de produits de gènes précoces, à l'origine de l'expression tissulaire spécifique des gènes effecteurs de la métamorphose (Thummel et al., 1990). Nos résultats montrent que les modifications de cette combinatoire, en surexprimant de façon ubiquitaire chacune des isoformes BR-C ne modifient jamais le profil tissulaire d'expression du gène *Fbp1*. Nous avons montré, en revanche, que les variations de niveaux d'expression des isoformes Z2 et Z3, influencent le moment où le gène *Fbp1* s'exprime.

Ces résultats vont à l'encontre des prédictions du modèle de coordination tissulaire et suggèrent que la combinatoire des produits des gènes précoces est plutôt impliquée dans la régulation temporelle de l'expression des gènes cibles.

Le modèle de coordination tissulaire ne peut expliquer à lui seul comment un gène régulé par l'ecdysone s'exprime dans un tissu particulier. Il faut donc faire appel à d'autres facteurs de transcription, autres que les produits des gènes précoces, pour expliquer cette restriction tissulaire d'expression en réponse à un signal hormonal ubiquitaire.

2. Le facteur dGATAb : un facteur clé pour une expression dans le tissu adipeux.

2.1. La substitution de sites *in vivo*, une approche très informative.

Nous avons montré que le gène *Fbp1* est, *in vivo*, la cible directe du facteur activateur dGATAb et du facteur répresseur AEF-1. Au laboratoire, P. Lapie a identifié, *in vitro*, entre les positions -1100 et -1108 par rapport au site de démarrage de la transcription, un site de fixation pour le facteur activateur C/EBP (Lapie, 1993).

Le gène *Yp* de *D. melanogaster* et les gènes *Adh* de *D. melanogaster* et *D. mulleri* sont régulés par ces trois mêmes facteurs dGATAb, AEF-1 et C/EBP (Abel et al., 1993; Falb and Maniatis, 1992). Le gène *Fbp1* constitue ainsi un exemple supplémentaire de gènes exprimés dans le tissu adipeux et régulés par ces trois facteurs de transcription. Les mécanismes de régulation de l'expression dans le tissu adipeux semblent partagés entre différents gènes et conservés entre des espèces différentes.

L'approche originale de substitution de sites de fixation *in vivo* s'est révélée être une approche particulièrement instructive pour montrer comment le facteur dGATAb joue un rôle central pour diriger l'expression d'un gène dans le tissu adipeux.

Dans un premier temps, cette approche nous a permis de mettre en évidence une redondance fonctionnelle partielle entre les sites de fixation GBS1 et GBS3. L'un des intérêts de notre approche par substitution est qu'elle nous a permis de montrer qu'un site non essentiel pour le fonctionnement de l'enhancer peut néanmoins participer à la restriction tissulaire de son activité.

Dans un deuxième temps, cette approche nous a révélé que le facteur dGATAb est spécifiquement requis pour l'activation de l'enhancer et qu'il ne peut pas être remplacé totalement par le transactivateur hétérologue GAL4 pour cette fonction activatrice.

Nous avons montré, qu'en absence de facteur dGATAb, l'activation de l'enhancer par GAL4 est bloquée. Cette répression est indépendante des co-répresseurs des récepteurs nucléaires, mais nécessite l'action du facteur AEF-1 interagissant avec la région amplificatrice située en amont de l'enhancer. Cette approche a permis ainsi de révéler un nouveau mécanisme de régulation par le facteur AEF-1. En effet, jusqu'à présent, le facteur AEF-1 avait été décrit comme un répresseur entrant en compétition pour la fixation du facteur C/EBP et de la machinerie de transcription (Falb and Maniatis, 1992; Ren and Maniatis, 1998). Nos résultats montrent que le facteur AEF-1 peut également agir comme un répresseur à distance.

Notre approche révèle que la séquence A est le siège de deux fonctions antagonistes : une fonction d'amplification, pour laquelle elle a été définie, et une fonction de

répression. Au laboratoire, P. Lapie a étudié les propriétés amplificatrices de la séquence A. Elle a identifié dans celle-ci un site potentiel de fixation pour le facteur C/EBP (Lapie, 1993). Cependant, par retardement sur gel, l'interaction de la protéine C/EBP avec son site potentiel n'a pas pu être mise en évidence. L'identification de ce transactivateur impliqué dans la fonction activatrice de la séquence A reste à réaliser. Cette identification pourrait se révéler intéressante pour appréhender le mode de régulation par dGATAb.

2.2. Mécanismes régulateurs de dGATAb et AEF-1.

La régulation de l'expression des gènes n'est pas simplement dépendante de la présence ou non de facteurs activateurs. La répression de la transcription joue un rôle, de mieux en mieux caractérisé au cours de ces dernières années, dans cette régulation. En dehors de facteurs modifiant les histones et la structure de la chromatine, l'identification de séquences spécifiques permettant directement ou indirectement la fixation de facteurs répresseurs est croissante (Mannervik et al., 1999). De façon générale, les facteurs répresseurs peuvent intervenir pour empêcher la fixation ou moduler l'activité de facteurs activateurs. Ils peuvent également interférer, à courte ou longue distance, avec la machinerie basale de transcription.

La répression par AEF-1 est spécifiquement relevée sous l'action de dGATAb au niveau de l'enhancer. Les sites de fixation pour les facteurs AEF-1 et dGATAb sont éloignés de 60 à 120 pb. L'effet de la levée de la répression d'AEF-1 par dGATAb ne passe donc pas par une compétition de fixation de ces deux facteurs sur des sites chevauchants. Nous n'avons pas été capables de mettre en évidence, *in vitro*, dans nos conditions, une interaction directe entre dGATAb et AEF-1. La relève par dGATAb de la répression est un mécanisme encore inconnu et pourrait faire intervenir un intermédiaire qui reste à caractériser.

Les facteurs dGATAb et AEF-1 pourraient intervenir pour moduler l'accessibilité de la chromatine aux différents facteurs de transcription. Ils pourraient également moduler l'activité transcriptionnelle en interagissant avec la machinerie basale de transcription. Selon ces deux possibilités, dGATAb et AEF-1 ont des effets antagonistes et l'effet produit par dGATAb est dominant sur celui produit par AEF-1.

Pour discriminer entre les deux modes de régulation possibles de dGATAb et AEF-1, il serait intéressant de réaliser des expériences d'empreintes génomique *in vivo*. Nous pourrions ainsi savoir si l'absence d'activation par le facteur GAL4, en absence de fixation du facteur dGATAb, est due à une absence de sa fixation au site UAS. Il serait également

intéressant d'étudier le positionnement des nucléosomes et la modification de l'état d'acétylation de la chromatine en fonction de la fixation de dGATAb et AEF-1. Nous pourrions tester si, de manière similaire au facteur GATA-1 de vertébrés, le facteur dGATAb est la cible d'acétyltransférases. La fixation de dGATAb pourrait être un pré-requis pour permettre la fixation d'autres facteurs de transcription. Ce facteur dGATAb satisferait alors la définition de facteur de compétence requis pour l'expression de gènes dans le tissu adipeux.

De façon plus générale, il reste à déterminer si le facteur AEF-1 nécessite l'action de co-répresseur pour son activité répressive. Il serait également intéressant de savoir si l'activité répressive d'AEF-1 s'exerce sur la machinerie de transcription recrutée spécifiquement au niveau de promoteur minimal du gène *Fbp1* ou si elle s'exerce sur un spectre plus large de promoteurs (Mannervik et al., 1999). Pour aborder cette question, il faudrait tester l'activité répressive d'AEF-1 sur le facteur GAL4 au sein du même transgène mais fusionné à un autre promoteur minimal.

Nous avons montré que le facteur AEF-1 est un facteur répresseur pouvant agir à distance. Il reste à déterminer si ce facteur possède des propriétés propres, capable d'agir de manière autonome, ou s'il dépend pour son action d'autres facteurs interagissant avec l'enhancer et que nous n'avons pas pu mettre en évidence par la technique de retardement sur gel. Pour cela, il conviendrait de tester l'activité de répression d'AEF-1 sur l'expression d'un transgène possédant le site de fixation d'AEF-1 en amont de 5 répétitions du site UAS et du promoteur minimal du gène *Fbp1*.

De plus, il reste à déterminer si le facteur AEF-1 appartient à la catégorie des répresseurs pouvant agir à courte distance ou à longue distance. Nous pourrions tester cette hypothèse en faisant varier la distance entre son site de fixation et le promoteur minimal (Gray and Levine, 1996).

2.3. Utilisation pour une expression conditionnelle.

Notre approche de substitution a permis d'aboutir à une situation artificielle dans laquelle deux sites de fixation pour le transactivateur GAL4 restent silencieux en présence d'un site cible d'AEF-1. L'activation par GAL4 est permise en présence de la fixation de dGATAb.

Ainsi, nous disposons d'un système d'expression conditionné à la présence de dGATAb et qui pourrait nous permettre d'exprimer spécifiquement dans le corps gras une

protéine d'intérêt. En fusionnant la phase ouverte de lecture d'un gène d'intérêt en aval du transgène *Fbp1* portant un site UAS en GBS1, nous pouvons nous attendre à la produire dans le tissu adipeux et ce seulement quand le facteur GAL4 est présent.

L'ensemble de ce travail a apporté des éléments supplémentaires pour comprendre la régulation du gène *Fbp1*. Nous avons montré que la régulation temporelle de ce gène est assurée par la cascade génétique de réponse à l'ecdysone et par le récepteur hormonal lui-même.

Nous avons montré que le gène *Fbp1* est la cible des deux nouveaux facteurs de transcription dGATAb et AEF-1. Nous avons proposé un mécanisme permettant d'expliquer en partie la restriction tissulaire d'expression du gène *Fbp1*. Ce mécanisme implique une levée de répression assurée par AEF-1, associée à une activation spécifique par dGATAb, qui reste limitée au tissu adipeux. Cependant, les facteurs dGATAb et AEF-1 ne sont pas suffisants à eux seuls pour expliquer la restriction tissulaire de *Fbp1*.

L'issue de cette étude pointe vers la nécessité d'un facteur activateur supplémentaire pour expliquer complètement cette restriction. Ce facteur, dont l'identité reste inconnue, jouerait le rôle d'un verrou supplémentaire permettant de limiter l'expression au tissu adipeux. Les 70 pb de l'enhancer n'ont pas encore livré tous leurs secrets. Le gène *Fbp1* reste définitivement un gène modèle de grande qualité à l'épreuve du temps et des thésards.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abel, T., Michelson, A. M., and Maniatis, T. (1993). A *Drosophila* GATA family member that binds to Adh regulatory sequences is expressed in the developing fat body. *Development* 119, 623-33.
- Ahmad, K. F., Engel, C. K., and Prive, G. G. (1998). Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12123-8.
- Albagli, O., Dhordain, P., Deweindt, C., Lecocq, G., and Leprince, D. (1995). The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ* 6, 1193-8.
- 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.
- Anderson, K. P., Crable, S. C., and Lingrel, J. B. (1998). Multiple proteins binding to a GATA-E box-GATA motif regulate the erythroid Kruppel-like factor (EKLF) gene. *J Biol Chem* 273, 14347-54.
- Andres, A. J., Fletcher, J. C., Karim, F. D., and Thummel, C. S. (1993). Molecular analysis of the initiation of insect metamorphosis: a comparative study of *Drosophila* ecdysteroid-regulated transcription. *Dev. Biol.* 160, 388-404.
- Andres, A. J., and Thummel, C. S. (1992). Hormones, Puffs and flies : the molecular control of metamorphosis by ecdysone. *Trends Genet.* 8, 132-138.
- Antoniewski, C., Laval, M., Dahan, A., and Lepesant, J. A. (1994). The ecdysone-response enhancer of the *Fbp1* gene of *D. melanogaster* is a direct target for the EcR/USP nuclear receptor. *Mol. Cell Biol.* 14, 4465-4474.
- Antoniewski, C., Mugat, B., Delbac, F., and Lepesant, J. A. (1996). Direct repeats bind the EcR/USP receptor and mediate ecdysteroid responses in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 16, 2977-86.
- Aplan, P. D., Begley, C. G., Bertness, V., Nussmeier, M., Ezquerra, A., Coligan, J., and Kirsch, I. R. (1990). The SCL gene is formed from a transcriptionally complex locus. *Mol Cell Biol* 10, 6426-35.
- Arceci, R. J., King, A. A., Simon, M. C., Orkin, S. H., and Wilson, D. B. (1993). Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 13, 2235-46.
- Ashburner, M., Chihara, C., Meltzer, P., and Richards, G. (1974). Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38, 655-662.
- Baehrecke, E. H., and Thummel, C. S. (1995). The *Drosophila* E93 gene from the 93F early puff displays stage- and tissue-specific regulation by 20-hydroxyecdysone. *Dev Biol* 171, 85-97.
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-3.

- Bardwell, V. J., and Treisman, R. (1994). The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev.* 8, 1664-1677.
- Baretino, D., Vivanco-Ruiz, M. d. M., and Stunnenberg, H. G. (1994). Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. *Embo J.* 13, 3039-3049.
- Bate, M. (1993). The mesoderm and its derivatives. The development of *Drosophila melanogaster II*, 1013-1090.
- Bauer, A., Tronche, F., Wessely, O., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Steinlein, P., Schutz, G., and Beug, H. (1999). The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes Dev* 13, 2996-3002.
- Bayer, C. A., Holley, B., and Fristrom, J. W. (1996). A switch in broad-complex zinc-finger isoform expression is regulated posttranscriptionally during the metamorphosis of *Drosophila* imaginal discs. *Dev Biol* 177, 1-14.
- Bayer, C. A., von Kalm, L., and Fristrom, J. W. (1997). Relationships between protein isoforms and genetic functions demonstrate functional redundancy at the Broad-Complex during *Drosophila* metamorphosis. *Dev. Biol.* 187, 267-82.
- Belyaeva, E. S., Vlassova, I. E., Biyasheva, Z. M., Kakpakov, V. T., Richards, G., and Zhimulev, I. F. (1981). Cytogenetic analysis of the 2B3-4-2B11 region of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. II. Changes in 20-OH ecdysone puffing caused by genetic defects of puff 2B5. *Chromosoma* 84, 207-19.
- Birkenmeier, E. H., Gwynn, B., Howard, S., Jerry, J., Gordon, J. I., Landschulz, W. H., and McKnight, S. L. (1989). Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein. *Genes Dev* 3, 1146-56.
- Blobel, G. A., Nakajima, T., Eckner, R., Montminy, M., and Orkin, S. H. (1998). CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2061-6.
- Blobel, G. A., Sieff, C. A., and Orkin, S. H. (1995). Ligand-dependent repression of the erythroid transcription factor GATA-1 by the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 15, 3147-53.
- Bodmer, R., and Venkatesh, T. V. (1998). Heart development in *Drosophila* and vertebrates: conservation of molecular mechanisms. *Dev Genet* 22, 181-6.
- Bour, B. A., O'Brien, M. A., Lockwood, W. L., Goldstein, E. S., Bodmer, R., Taghert, P. H., Abmayr, S. M., and Nguyen, H. T. (1995). *Drosophila* MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev* 9, 730-41.
- Bownes, M., and Hames, B. D. (1978). Analysis of the yolk proteins in *Drosophila melanogaster*. Translation in a cell free system and peptide analysis. *FEBS Lett* 96, 327-30.
- Boyes, J., Omichinski, J., Clark, D., Pikaart, M., and Felsenfeld, G. (1998). Perturbation of nucleosome structure by the erythroid transcription factor GATA-1. *J Mol Biol* 279, 529-44.
- Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-15.

- Brennan, C. A., Ashburner, M., and Moses, K. (1998). Ecdysone pathway is required for furrow progression in the developing *Drosophila* eye. *Development* 125, 2653-64.
- Broadus, J., McCabe, J. R., Endrizzi, B., Thummel, C. S., and Woodard, C. T. (1999). The *Drosophila* beta FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Mol Cell* 3, 143-9.
- Brodu, V., Mugat, B., Roignant, J. Y., Lepesant, J. A., and Antoniewski, C. (1999). Dual requirement for the EcR/USP nuclear receptor and the dGATAb factor in an ecdysone response in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 19, 5732-42.
- Bruhat, A., Dreau, D., Drake, M. E., Tourmente, S., Chapel, S., Couderc, J. L., and Dastugue, B. (1993). Intronic and 5' flanking sequences of the *Drosophila beta-3 tubulin* gene are essential to confer ecdysone responsiveness. *Mol. Cell. Endocrinol.* 94, 61-71.
- Burmester, T., Antoniewski, C., and Lepesant, J. A. (1999). Ecdysone-regulation of synthesis and processing of fat body protein 1, the larval serum protein receptor of *Drosophila melanogaster*. *Eur J Biochem* 262, 49-55.
- Burtis, K. C., Thummel, C. S., Jones, C. W., Karim, F. D., and Hogness, D. S. (1990). The *Drosophila* 74EF early puff contains *E74*, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two *ets*-related proteins. *Cell* 61, 85-99.
- Buszczak, M., Freeman, M. R., Carlson, J. R., Bender, M., Cooley, L., and Segraves, W. A. (1999). Ecdysone response genes govern egg chamber development during mid-oogenesis in *Drosophila*. *Development* 126, 4581-9.
- Cai, H. N., and Levine, M. (1997). The gypsy insulator can function as a promoter-specific silencer in the *Drosophila* embryo. *Embo J* 16, 1732-41.
- Chang, T. J., Scher, B. M., Waxman, S., and Scher, W. (1993). Inhibition of mouse GATA-1 function by the glucocorticoid receptor: possible mechanism of steroid inhibition of erythroleukemia cell differentiation [published erratum appears in *Mol Endocrinol* 1993 Jun;7(6):786]. *Mol Endocrinol* 7, 528-42.
- Chen, J. D., and Evans, R. M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors [see comments]. *Nature* 377, 454-7.
- Chen, W., Zollman, S., Couderc, J. L., and Laski, F. A. (1995). The BTB domain of bric a brac mediates dimerization in vitro [retracted by Chen W, Zollman S, Couderc JL, Laski FA. In: *Mol Cell Biol* 1997 Nov;17(11):6772]. *Mol Cell Biol* 15, 3424-9.
- Cherbas, L., Lee, K., and Cherbas, P. (1991). Identification of ecdysone response elements by analysis of the *Drosophila Eip28/29* gene. *Genes Dev.* 5, 120-131.
- Clark, W. C., Doctor, J., Fristrom, J. W., and Hodgetts, R. B. (1986). Differential responses of the dopa decarboxylase gene to 20-OH-ecdysone in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 114, 141-150.
- Clever, U., and Karlson, P. (1960). Induktion von puff-Veränderungen in den speicheldrüsenchromosomen von *Chironomus tentans* durch ecdyson. *Exp. Cell. Res.* 20, 623-626.

- Cooley, L., and Theurkauf, W. E. (1994). Cytoskeletal functions during *Drosophila* oogenesis. *Science* 266, 590-6.
- Corbin, V., and Maniatis, T. (1990). Identification of cis-regulatory elements required for larval expression of the *Drosophila melanogaster* alcohol dehydrogenase gene. *Genetics* 124, 637-46.
- Corbin, V., and Maniatis, T. (1989). Role of transcriptional interference in the *Drosophila melanogaster* Adh promoter switch. *Nature* 337, 279-82.
- Cripps, R. M., Black, B. L., Zhao, B., Lien, C. L., Schulz, R. A., and Olson, E. N. (1998). The myogenic regulatory gene Mef2 is a direct target for transcriptional activation by Twist during *Drosophila* myogenesis. *Genes Dev* 12, 422-34.
- Crossgrove, K., Bayer, C. A., Fristrom, J. W., and Guild, G. M. (1996). The *Drosophila* Broad-Complex early gene directly regulates late gene transcription during the ecdysone-induced puffing cascade. *Dev Biol* 180, 745-58.
- Crossley, M., Merika, M., and Orkin, S. H. (1995). Self-association of the erythroid transcription factor GATA-1 mediated by its zinc finger domains. *Mol Cell Biol* 15, 2448-56.
- Cubadda, Y., Heitzler, P., Ray, R. P., Bourouis, M., Romain, P., Gelbart, W., Simpson, P., and Haenlin, M. (1997). *u-shaped* encodes a zinc finger protein that regulates the proneural genes *achaete* and *scute* during the formation of bristles in *Drosophila*. *Genes Dev* 11, 3083-95.
- Danielian, P. S., White, R., Lees, J. A., and Parker, M. G. (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* 11, 1025-1033.
- David, G., Alland, L., Hong, S. H., Wong, C. W., DePinho, R. A., and Dejean, A. (1998). Histone deacetylase associated with mSin3A mediates repression by the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein. *Oncogene* 16, 2549-56.
- Deak, P., Zavorszky, P., and Maroy, P. (1988). moulting hormone regulates its receptor level in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem* 18, 847-852.
- Deutsch, J., Laval, M., Lepesant, J. A., Maschat, F., Pourrain, F., and Rat, L. (1989). Larval fat body-specific gene expression in *D. melanogaster*. *Dev. Genetics* 10, 220-231.
- DiBello, P. R., Withers, D. A., Bayer, C. A., Fristrom, J. W., and Guild, G. M. (1991). The *Drosophila* Broad-Complex encodes a family of related proteins containing zinc fingers. *Genetics* 129, 385-97.
- Dittmer, N. T., and Raikhel, A. S. (1997). Analysis of the mosquito lysosomal aspartic protease gene: an insect housekeeping gene with fat body-enhanced expression. *Insect Biochem Mol Biol* 27, 323-35.
- Dorn, R., Krauss, V., Reuter, G., and Saumweber, H. (1993). The enhancer of position-effect variegation of *Drosophila*, E(var)3-93D, codes for a chromatin protein containing a conserved domain common to several transcriptional regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11376-80.

- Dubrovsky, E. B., Dretzen, G., and Bellard, M. (1994). The *Drosophila* broad-complex regulates developmental changes in transcription and chromatin structure of the 67B heat-shock gene cluster. *J Mol Biol* 241, 353-62.
- Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R., and Chambon, P. (1994). Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *Embo J* 13, 5370-5382.
- Durocher, D., and Nemer, M. (1998). Combinatorial interactions regulating cardiac transcription. *Dev Genet* 22, 250-62.
- Dushay, M. S., Asling, B., and Hultmark, D. (1996). Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10343-7.
- Emery, I. F., Bedian, V., and Guild, G. M. (1994). Differential expression of Broad-Complex transcription factors may forecast tissue-specific developmental fates during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 120, 3275-87.
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-95.
- Falb, D., and Maniatis, T. (1992). A conserved regulatory unit implicated in tissue-specific gene expression in *Drosophila* and man. *Genes Dev* 6, 454-65.
- Falb, D., and Maniatis, T. (1992). *Drosophila* transcriptional repressor protein that binds specifically to negative control elements in fat body enhancers. *Mol Cell Biol* 12, 4093-103.
- Farkas, G., Gausz, J., Galloni, M., Reuter, G., Gyurkovics, H., and Karch, F. (1994). The Trithorax-like gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature* 371, 806-8.
- Fischer, J. A., and Maniatis, T. (1988). *Drosophila* Adh: a promoter element expands the tissue specificity of an enhancer. *Cell* 53, 451-61.
- Fischer, J. A., and Maniatis, T. (1986). Regulatory elements involved in *Drosophila* Adh gene expression are conserved in divergent species and separate elements mediate expression in different tissues. *Embo J* 5, 1275-89.
- Fisk, G. J., and Thummel, C. S. (1998). The DHR78 nuclear receptor is required for ecdysteroid signaling during the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Cell* 93, 543-55.
- Fisk, G. J., and Thummel, C. S. (1995). Isolation, regulation, and DNA-binding properties of three *Drosophila* nuclear hormone receptor superfamily members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10604-8.
- Forrester, W. C., Epner, E., Driscoll, M. C., Enver, T., Brice, M., Papayannopoulou, T., and Groudine, M. (1990). A deletion of the human beta-globin locus activation region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire beta-globin locus. *Genes Dev* 4, 1637-49.
- Fox, A. H., Liew, C., Holmes, M., Kowalski, K., Mackay, J., and Crossley, M. (1999). Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *Embo J* 18, 2812-22.

- Fujiwara, Y., Browne, C. P., Cunniff, K., Goff, S. C., and Orkin, S. H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12355-8.
- Gajewski, K., Fossett, N., Molkenstin, J. D., and Schulz, R. A. (1999). The zinc finger proteins Pannier and GATA4 function as cardiogenic factors in *Drosophila*. *Development* 126, 5679-5688.
- Gajewski, K., Kim, Y., Choi, C. Y., and Schulz, R. A. (1998). Combinatorial control of *Drosophila* mef2 gene expression in cardiac and somatic muscle cell lineages. *Dev Genes Evol* 208, 382-92.
- Gajewski, K., Kim, Y., Lee, Y. M., Olson, E. N., and Schulz, R. A. (1997). D-mef2 is a target for Tinman activation during *Drosophila* heart development. *Embo J* 16, 515-22.
- Garabedian, M. J., Hung, M. C., and Wensink, P. C. (1985). Independent control elements that determine yolk protein gene expression in alternative *Drosophila* tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 1396-400.
- Garabedian, M. J., Shepherd, B. M., and Wensink, P. C. (1986). A tissue-specific transcription enhancer from the *Drosophila* yolk protein 1 gene. *Cell* 45, 859-67.
- Garcia-Garcia, M. J., Ramain, P., Simpson, P., and Modolell, J. (1999). Different contributions of pannier and wingless to the patterning of the dorsal mesothorax of *Drosophila*. *Development* 126, 3523-32.
- Gerasimova, T. I., Gdula, D. A., Gerasimov, D. V., Simonova, O., and Corces, V. G. (1995). A *Drosophila* protein that imparts directionality on a chromatin insulator is an enhancer of position-effect variegation. *Cell* 82, 587-97.
- Giguere, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R. M., and Otulakowski, G. (1994). Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev* 8, 538-53.
- Gottschalk, L. R., Giannola, D. M., and Emerson, S. G. (1993). Molecular regulation of the human IL-3 gene: inducible T cell-restricted expression requires intact AP-1 and Elf-1 nuclear protein binding sites. *J Exp Med* 178, 1681-92.
- Granok, H., Leibovitch, B. A., Shaffer, C. D., and Elgin, S. C. (1995). Chromatin. Ga-ga over GAGA factor. *Curr Biol* 5, 238-41.
- Gray, S., and Levine, M. (1996). Transcriptional repression in development. *Curr Opin Cell Biol* 8, 358-64.
- Green, S., and Chambon, P. (1987). Oestradiol induction of a glucocorticoid-responsive gene by a chimaeric receptor. *Nature* 325, 75-8.
- Green, S., Kumar, V., Theulaz, I., Wahli, W., and Chambon, P. (1988). The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *Embo J* 7, 3037-44.

- 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, 4095-102.
- Guay, P. S., and Guild, G. M. (1991). The ecdysone-induced puffing cascade in *Drosophila* salivary glands: a Broad-Complex early gene regulates intermolt and late gene transcription. *Genetics* 129, 169-75.
- Guichet, A., Copeland, J. W., Erdelyi, M., Hlousek, D., Zavorszky, P., Ho, J., Brown, S., Percival-Smith, A., Krause, H. M., and Ephrussi, A. (1997). The nuclear receptor homologue Ftz-F1 and the homeodomain protein Ftz are mutually dependent cofactors. *Nature* 385, 548-52.
- Haenlin, M., Cubadda, Y., Blondeau, F., Heitzler, P., Lutz, Y., Simpson, P., and Romain, P. (1997). Transcriptional activity of pannier is regulated negatively by heterodimerization of the GATA DNA-binding domain with a cofactor encoded by the u-shaped gene of *Drosophila*. *Genes Dev* 11, 3096-108.
- Hall, B. L., and Thummel, C. S. (1998). The RXR homolog ultraspiracle is an essential component of the *Drosophila* ecdysone receptor. *Development* 125, 4709-17.
- Hansen, S. K., and Tjian, R. (1995). TAFs and TFIIA mediate differential utilization of the tandem *Adh* promoters. *Cell* 82, 565-75.
- Henikoff, S. (1990). Position-effect variegation after 60 years. *Trends Genet* 6, 422-6.
- Henrich, V. C., and Brown, N. E. (1995). Insect nuclear receptors: a developmental and comparative perspective. *Insect Biochem Mol Biol* 25, 881-97.
- Henrich, V. C., Sliter, T. J., Lubahn, D. B., MacIntyre, A., and Gilbert, L. I. (1990). A steroid/thyroid hormone receptor superfamily member in *Drosophila melanogaster* that shares extensive similarity with a mammalian homologue. *Nucl. Acid Res.* 18, 4143-4148.
- Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., Stein, R. B., Eichele, G., Evans, R. M., and Thaller, C. (1992). 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68, 397-406.
- Hodgetts, R. B., Clark, W. C., O'Keefe, S. L., Schouls, M., Crossgrove, K., Guild, G. M., and von Kalm, L. (1995). Hormonal induction of Dopa decarboxylase in the epidermis of *Drosophila* is mediated by the Broad-Complex. *Development* 121, 3913-22.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., and Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-8.
- Hoffmann, J. A., Reichhart, J. M., and Hetru, C. (1996). Innate immunity in higher insects. *Curr Opin Immunol* 8, 8-13.
- Hong, S. H., David, G., Wong, C. W., Dejean, A., and Privalsky, M. L. (1997). SMRT corepressor interacts with PLZF and with the PML-retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and PLZF-RARalpha oncoproteins associated with acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9028-33.

- Horner, M. A., Chen, T., and Thummel, C. S. (1995). Ecdysteroid regulation and DNA binding properties of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members. *Dev. Biol.* 168, 490-502.
- Huet, F., Ruiz, C., and Richards, G. (1993). Puffs and PCR: The *in vivo* dynamics of early gene expression during ecdysone responses in *Drosophila*. *Development* 118, 613-627.
- Huet, F., Ruiz, C., and Richards, G. (1995). Sequential gene activation by ecdysone in *Drosophila melanogaster*: the hierarchical equivalence of early and early late genes. *Development* 121, 1195-1204.
- Huynh, K. D., and Bardwell, V. J. (1998). The BCL-6 POZ domain and other POZ domains interact with the co-repressors N-CoR and SMRT. *Oncogene* 17, 2473-84.
- Ip, Y. T., Reach, M., Engstrom, Y., Kadalayil, L., Cai, H., Gonzalez-Crespo, S., Tatei, K., and Levine, M. (1993). Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*. *Cell* 75, 753-63.
- Ireland, R., and Berger, E. M. (1982). Synthesis of low molecular weight heat-shock peptides stimulated by ecdysterone in a cultured *Drosophila* cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 855-859.
- Jackson, T. A., Richer, J. K., Bain, D. L., Takimoto, G. S., Tung, L., and Horwitz, K. B. (1997). The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol* 11, 693-705.
- Janknecht, R., and Hunter, T. (1996). Transcription. A growing coactivator network [news; comment]. *Nature* 383, 22-3.
- Jones, G., and Sharp, P. A. (1997). Ultraspiracle: an invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13499-503.
- Jongens, T. A., Ackerman, L. D., Swedlow, J. R., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1994). Germ cell-less encodes a cell type-specific nuclear pore-associated protein and functions early in the germ-cell specification pathway of *Drosophila*. *Genes Dev* 8, 2123-36.
- Kadalayil, L., Petersen, U. M., and Engstrom, Y. (1997). Adjacent GATA and kappa B-like motifs regulate the expression of a *Drosophila* immune gene. *Nucleic Acids Res* 25, 1233-9.
- Karim, F. D., Guild, G. M., and Thummel, C. S. (1993). The *Drosophila* Broad-Complex plays a key role in controlling ecdysone-regulated gene expression at the onset of metamorphosis. *Development* 118, 977-88.
- Karim, F. D., and Thummel, C. S. (1991). Ecdysone coordinates the timing and amounts of E74A and E74B transcription in *Drosophila*. *Genes Dev* 5, 1067-79.
- Karim, F. D., and Thummel, C. S. (1992). Temporal coordination of regulatory gene expression by the steroid hormone ecdysone. *Embo J* 11, 4083-93.
- Kimbrell, D. A., Tojo, S. J., Alexander, S., Brown, E. E., Tobin, S. L., and Fristrom, J. W. (1989). Regulation of larval cuticle protein gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Dev Genet* 10, 198-209.

- Kiss, I., Beaton, A. H., Tardiff, J., Fristrom, D., and Fristrom, J. W. (1988). Interactions and developmental effects of mutations in the Broad- Complex of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118, 247-59.
- Koelle, M. R., Segraves, W. A., and Hogness, D. S. (1992). DHR3: a *Drosophila* steroid receptor homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6167-6171.
- Koelle, M. R., Talbot, W. S., Segraves, W. A., Bender, M. T., Cherbas, P., and Hogness, D. S. (1991). The *Drosophila* *EcR* gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 67, 59-77.
- Koonin, E. V., Senkevich, T. G., and Chernos, V. I. (1992). A family of DNA virus genes that consists of fused portions of unrelated cellular genes. *Trends Biochem Sci* 17, 213-4.
- Koutsourakis, M., Langeveld, A., Patient, R., Beddington, R., and Grosveld, F. (1999). The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development [corrected and republished in *Development* 1999 May;126(9):723-32]. *Development* 126, 723-32.
- Kuo, C. T., Morrisey, E. E., Anandappa, R., Sigrist, K., Lu, M. M., Parmacek, M. S., Soudais, C., and Leiden, J. M. (1997). GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 11, 1048-60.
- Kurokawa, R., Soderstrom, M., Horlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M. G., and Glass, C. K. (1995). Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor [see comments]. *Nature* 377, 451-4.
- Kurokawa, R., Yu, V. C., Naar, A., Kyakumoto, S., Han, Z., Silverman, S., Rosenfeld, M. G., and Glass, C. K. (1993). Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes Dev* 7, 1423-35.
- Lam, G. T., Jiang, C., and Thummel, C. S. (1997). Coordination of larval and prepupal gene expression by the DHR3 orphan receptor during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 124, 1757-1769.
- Lapie, P. (1993). Localisation des séquences *cis*-régulatrices et identification de facteurs *trans*-régulateurs du gène *Fbp1* de *D. melanogaster*: Université Paris 6).
- Lapie, P., Nasr, F., Lepesant, J. A., and Deutsch, J. (1993). Deletion scanning of the regulatory sequences of the *Fbp1* gene of *Drosophila melanogaster* using P transposase-induced deficiencies. *Genetics* 135, 801-16.
- Laudet, V., Hänni, C., Coll, J., Catzeflis, F., and Stéhelin (1992). Evolution of the nuclear receptor superfamily. *EMBO J.* 11, 1003-1013.
- Laval, M., Pourrain, F., Deutsch, J., and Lepesant, J. A. (1993). *In vivo* functional characterization of an ecdysone-response enhancer in the proximal upstream region of the *Fbp1* gene of *D. melanogaster*. *Mech. Dev.* 44, 123-138.
- Laverriere, A. C., MacNeill, C., Mueller, C., Poelmann, R. E., Burch, J. B., and Evans, T. (1994). GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem* 269, 23177-84.

- Lavinsky, R. M., Jepsen, K., Heinzl, T., Torchia, J., Mullen, T. M., Schiff, R., Del-Rio, A. L., Ricote, M., Ngo, S., Gemsch, J., Hilsenbeck, S. G., Osborne, C. K., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., and Rose, D. W. (1998). Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2920-5.
- Lavorgna, G., Karim, F. D., Thummel, C. S., and Wu, C. (1993). Potential role for a FTZ-F1 steroid receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3004-8.
- Lavorgna, G., Ueda, H., Clos, J., and Wu, C. (1991). FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of fushi tarazu. *Science* 252, 848-51.
- Lenardo, M. J., and Baltimore, D. (1989). NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* 58, 227-9.
- Lepesant, J.-A., Maschat, F., Kejzlarova-Lepesant, J., Benes, H., and Yanicostas, C. (1986). Developmental and ecdysteroid regulation of gene expression in the larval fat body of *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect Biochem. Physiol. Supp.* 1, 133-141.
- Lepesant, J. A., Kejzlarová-Lepesant, J., and Garen, A. (1978). Ecdysone-inducible functions of larval fat bodies in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5570-5574.
- Lepesant, J. A., Levine, M., Garen, A., Lepesant-Kejzlarová, J., Rat, L., and Sommé-Martin, G. (1982). Developmentally regulated gene expression in *Drosophila* larval fat bodies. *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 371-383.
- Li, Q., Harju, S., and Peterson, K. R. (1999). Locus control regions: coming of age at a decade plus [In Process Citation]. *Trends Genet* 15, 403-8.
- Li, T., and Bender, M. (1999). Conditionnal *Drosophila* EcR mutants reveal essential functions of EcR during molting and metamorphosis. Abstract, 40th annual *Drosophila* Research Conference, Seattle.
- Lilly, B., Zhao, B., Ranganayakulu, G., Paterson, B. M., Schulz, R. A., and Olson, E. N. (1995). Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*. *Science* 267, 688-93.
- Lin, W. H., Huang, L. H., Yeh, J. Y., Hoheisel, J., Lehrach, H., Sun, Y. H., and Tsai, S. F. (1995). Expression of a *Drosophila* GATA transcription factor in multiple tissues in the developing embryos. Identification of homozygous lethal mutants with P-element insertion at the promoter region. *J Biol Chem* 270, 25150-8.
- Lints, T. J., Parsons, L. M., Hartley, L., Lyons, I., and Harvey, R. P. (1993). Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants [published erratum appears in *Development* 1993 Nov;119(3):969]. *Development* 119, 419-31.
- Liu, E., and Restifo, L. L. (1998). Identification of a broad complex-regulated enhancer in the developing visual system of *Drosophila*. *J Neurobiol* 34, 253-70.
- Logan, S. K., Garabedian, M. J., and Wensink, P. C. (1989). DNA regions that regulate the ovarian transcriptional specificity of *Drosophila* yolk protein genes. *Genes Dev* 3, 1453-61.

- Lucas, P. C., and Granner, D. K. (1992). Hormone response domains in gene transcription. *Annu Rev Biochem* 61, 1131-73.
- Mangelsdorf, D. J., and Evans, R. M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-50.
- Mannervik, M., Nibu, Y., Zhang, H., and Levine, M. (1999). Transcriptional coregulators in development. *Science* 284, 606-9.
- Maroy, P., Bodai, L., and Komonyi, O. (1999). Everted repeat response element is involved in *EcR* autoregulation. Abstracts. Sixteenth European *Drosophila* Research Conference, Zurich, 1999.
- Maschat, F., Dubertret, M. L., and Lepasant, J. A. (1991). Transformation mapping of the regulatory elements of the ecdysone-inducible *P1* gene of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2913-2917.
- Maschat, F., Dubertret, M. L., Thérond, P., Claverie, J. M., and Lepasant, J. A. (1990). Structure of the ecdysone-inducible *P1* gene of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 214, 359-372.
- McDowell, J. C., and Dean, A. (1999). Structural and functional cross-talk between a distant enhancer and the epsilon-globin gene promoter shows interdependence of the two elements in chromatin. *Mol Cell Biol* 19, 7600-9.
- Merika, M., and Orkin, S. H. (1993). DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol* 13, 3999-4010.
- Molkentin, J. D., Lin, Q., Duncan, S. A., and Olson, E. N. (1997). Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 11, 1061-72.
- Montell, D. J., Rorth, P., and Spradling, A. C. (1992). slow border cells, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes *Drosophila* C/EBP. *Cell* 71, 51-62.
- Moore, L. A., Broihier, H. T., Van Doren, M., and Lehmann, R. (1998). Gonadal mesoderm and fat body initially follow a common developmental path in *Drosophila*. *Development* 125, 837-44.
- Moras, D., and Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 10, 384-91.
- Morganelli, C. M., Berger, E. M., and Pelham, H. R. B. (1985). Transcription of *Drosophila* small hsp-tk hybrid genes is induced by heat shock and by ecdysterone in transfected *Drosophila* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5865-5869.
- Morrissey, E. E., Tang, Z., Sigrist, K., Lu, M. M., Jiang, F., Ip, H. S., and Parmacek, M. S. (1998). GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev* 12, 3579-90.
- Muro-Pastor, M. I., Gonzalez, R., Strauss, J., Narendja, F., and Scazzocchio, C. (1999). The GATA factor AreA is essential for chromatin remodelling in a eukaryotic bidirectional

- promoter [published erratum appears in EMBO J 1999 May 4;18(9):2670]. *Embo J* 18, 1584-97.
- 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, 373-80.
- Nakanishi, Y., and Garen, A. (1983). Selective gene expression induced by ecdysterone in cultured fat bodies of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2971-2975.
- Natzle, J. E. (1993). Temporal regulation of *Drosophila* imaginal disc morphogenesis: A hierarchy of primary and secondary 20-hydroxyecdysone-responsive loci. *Dev. Biol.* 155, 516-532.
- Newman, C. S., and Krieg, P. A. (1998). tinman-related genes expressed during heart development in *Xenopus*. *Dev Genet* 22, 230-8.
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-9.
- Olson, E. N., Perry, M., and Schulz, R. A. (1995). Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev Biol* 172, 2-14.
- Orkin, S. H. (1990). Globin gene regulation and switching: circa 1990. *Cell* 63, 665-72.
- Orkin, S. H. (1995). Hematopoiesis: how does it happen? *Curr Opin Cell Biol* 7, 870-7.
- Orkin, S. H. (1995). Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem* 270, 4955-8.
- Orlando, V., and Paro, R. (1995). Chromatin multiprotein complexes involved in the maintenance of transcription patterns. *Curr Opin Genet Dev* 5, 174-9.
- Oro, A. E., McKeown, M., and Evans, E. M. (1990). Relationship between the *Drosophila ultraspiracle* locus and the vertebrate retinoid X receptor. *Nature* 347, 298-301.
- Pandolfi, P. P., Roth, M. E., Karis, A., Leonard, M. W., Dzierzak, E., Grosveld, F. G., Engel, J. D., and Lindenbaum, M. H. (1995). Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis [see comments]. *Nat Genet* 11, 40-4.
- Paro, R. (1993). Mechanisms of heritable gene repression during development of *Drosophila*. *Curr Opin Cell Biol* 5, 999-1005.
- Perlmann, T., and Wrangé, O. (1988). Specific glucocorticoid receptor binding to DNA reconstituted in a nucleosome. *Embo J* 7, 3073-9.
- Petersen, U. M., Bjorklund, G., Ip, Y. T., and Engstrom, Y. (1995). The dorsal-related immunity factor, Dif, is a sequence-specific trans- activator of *Drosophila* Cecropin gene expression. *Embo J* 14, 3146-58.
- Petersen, U. M., Kadalayil, L., Rehorn, K. P., Hoshizaki, D. K., Reuter, R., and Engstrom, Y. (1999). Serpent regulates *Drosophila* immunity genes in the larval fat body through an essential GATA motif. *Embo J* 18, 4013-22.

- Pevny, L., Lin, C. S., D'Agati, V., Simon, M. C., Orkin, S. H., and Costantini, F. (1995). Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* 121, 163-72.
- Pham, T. A., McDonnell, D. P., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1992). Modulation of progesterone receptor binding to progesterone response elements by positioned nucleosomes. *Biochemistry* 31, 1570-8.
- Phelps, C. B., and Brand, A. H. (1998). Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods* 14, 367-79.
- Pierceall, W. E., Li, C., Biran, A., Miura, K., Raikhel, A. S., and Segraves, W. A. (1999). E75 expression in mosquito ovary and fat body suggests reiterative use of ecdysone-regulated hierarchies in development and reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 150, 73-89.
- Posakony, J. W., Fischer, J. A., and Maniatis, T. (1985). Identification of DNA sequences required for the regulation of *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 50, 515-20.
- Ramain, P., Heitzler, P., Haenlin, M., and Simpson, P. (1993). *pannier*, a negative regulator of achaete and scute in *Drosophila*, encodes a zinc finger protein with homology to the vertebrate transcription factor GATA-1. *Development* 119, 1277-91.
- Ranganayakulu, G., Zhao, B., Dokidis, A., Molkentin, J. D., Olson, E. N., and Schulz, R. A. (1995). A series of mutations in the D-MEF2 transcription factor reveal multiple functions in larval and adult myogenesis in *Drosophila*. *Dev Biol* 171, 169-81.
- Rehorn, K. P., Thelen, H., Michelson, A. M., and Reuter, R. (1996). A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* 122, 4023-31.
- Ren, B., and Maniatis, T. (1998). Regulation of *Drosophila* Adh promoter switching by an initiator- targeted repression mechanism. *Embo J* 17, 1076-86.
- Restifo, L. L., and Guild, G. M. (1986). An ecdysterone-responsive puff site in *Drosophila* contains a cluster of seven differentially regulated genes. *J Mol Biol* 188, 517-28.
- Restifo, L. L., and Hauglum, W. (1998). Parallel molecular genetic pathways operate during CNS metamorphosis in *Drosophila*. *Mol Cell Neurosci* 11, 134-48.
- Restifo, L. L., and White, K. (1991). Mutations in a steroid hormone-regulated gene disrupt the metamorphosis of the central nervous system in *Drosophila*. *Dev Biol* 148, 174-94.
- Reuter, R. (1994). The gene *serpent* has homeotic properties and specifies endoderm versus ectoderm within the *Drosophila* gut. *Development* 120, 1123-35.
- Richards, G. (1997). The ecdysone regulatory cascades in *Drosophila*. *Developmental Biology* 5, 81-135.
- Richards, G. (1981). The radioimmune assay of ecdysteroid titres in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Endocrinol* 21, 181-97.

- Richards, G. (1976). Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. IV. The mid prepupal period. *Dev Biol* 54, 256-63.
- Richards, G. (1976). Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. V. The late prepupal puffs. *Dev Biol* 54, 264-75.
- Riechmann, V., Rehorn, K. P., Reuter, R., and Leptin, M. (1998). The genetic control of the distinction between fat body and gonadal mesoderm in *Drosophila*. *Development* 125, 713-23.
- Sam, S., Leise, W., and Hoshizaki, D. K. (1996). The serpent gene is necessary for progression through the early stages of fat-body development. *Mech Dev* 60, 197-205.
- Segraves, W. A., and Hogness, D. S. (1990). The *E75* ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two members of the steroid receptor superfamily. *Genes Dev.* 4, 204-219.
- Shea, M. J., King, D. L., Conboy, M. J., Mariani, B. D., and Kafatos, F. C. (1990). Proteins that bind to *Drosophila* chorion cis-regulatory elements: a new C2H2 zinc finger protein and a C2C2 steroid receptor-like component. *Genes Dev* 4, 1128-40.
- Shepherd, B., Garabedian, M. J., Hung, M. C., and Wensink, P. C. (1985). Developmental control of *Drosophila* yolk protein 1 gene by cis-acting DNA elements. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 50, 521-6.
- Shibata, H., Nawaz, Z., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W., and Tsai, M. J. (1997). Gene silencing by chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI) is mediated by transcriptional corepressors, nuclear receptor-corepressor (N-CoR) and silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor (SMRT). *Mol Endocrinol* 11, 714-24.
- Smith, C. L., Nawaz, Z., and O'Malley, B. W. (1997). Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol* 11, 657-66.
- Sommé-Martin, G., Colardeau, J., Beydon, P., Blais, C., Lepesant, J. A., and Lafont, R. (1990). *P1* gene expression in *Drosophila* larval fat body: induction by various ecdysteroids. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 15, 43-56.
- Soudais, C., Bielinska, M., Heikinheimo, M., MacArthur, C. A., Narita, N., Saffitz, J. E., Simon, M. C., Leiden, J. M., and Wilson, D. B. (1995). Targeted mutagenesis of the transcription factor GATA-4 gene in mouse embryonic stem cells disrupts visceral endoderm differentiation in vitro. *Development* 121, 3877-88.
- Stancovski, I., and Baltimore, D. (1997). NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed? *Cell* 91, 299-302.
- Steward, R. (1987). Dorsal, an embryonic polarity gene in *Drosophila*, is homologous to the vertebrate proto-oncogene, c-rel. *Science* 238, 692-4.
- Stone, B. L., and Thummel, C. S. (1993). The *Drosophila* 78C early late puff contains *E78*, an ecdysone-inducible gene that encodes a novel member of the nuclear hormone receptor superfamily. *Cell* 75, 307-20.

- Stowers, R. S., Russell, S., and Garza, D. (1999). The 82F late puff contains the L82 gene, an essential member of a novel gene family. *Dev Biol* 213, 116-30.
- Svensson, E. C., Tufts, R. L., Polk, C. E., and Leiden, J. M. (1999). Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 956-61.
- Talbot, W. S., Swyryd, E. A., and Hogness, D. S. (1993). *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell* 73, 1323-1337.
- Tamura, S., Wang, X. H., Maeda, M., and Futai, M. (1993). Gastric DNA-binding proteins recognize upstream sequence motifs of parietal cell-specific genes [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 May 10;91(10):4609]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10876-80.
- Tanaka, M., Kasahara, H., Bartunkova, S., Schinke, M., Komuro, I., Inagaki, H., Lee, Y., Lyons, G. E., and Izumo, S. (1998). Vertebrate homologs of tinman and bagpipe: roles of the homeobox genes in cardiovascular development. *Dev Genet* 22, 239-49.
- Taylor, I. C., Workman, J. L., Schuetz, T. J., and Kingston, R. E. (1991). Facilitated binding of GAL4 and heat shock factor to nucleosomal templates: differential function of DNA-binding domains. *Genes Dev* 5, 1285-98.
- Tevosian, S. G., Deconinck, A. E., Cantor, A. B., Rieff, H. I., Fujiwara, Y., Corfas, G., and Orkin, S. H. (1999). FOG-2: A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins Friend of GATA-1 and U-shaped. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 950-5.
- Thomas, H. E., Stunnenberg, H. G., and Stewart, A. F. (1993). Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and *ultraspiracle*. *Nature* 362, 471-475.
- Thummel, C. S. (1996). Files on steroids--*Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends Genet* 12, 306-10.
- Thummel, C. S., Burtis, K. C., and Hogness, D. S. (1990). Spatial and temporal patterns of E74 transcription during *Drosophila* development. *Cell* 61, 101-11.
- Ting, C. N., Olson, M. C., Barton, K. P., and Leiden, J. M. (1996). Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* 384, 474-8.
- Tone, Y., Collingwood, T. N., Adams, M., and Chatterjee, V. K. (1994). Functional analysis of a transactivation domain in the thyroid hormone beta receptor. *J Biol Chem* 269, 31157-61.
- Torchia, J., Glass, C., and Rosenfeld, M. G. (1998). Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr Opin Cell Biol* 10, 373-83.
- Tourmente, S., Chapel, S., Dreau, D., Drake, M. E., Bruhat, A., Couderc, J. L., and Dastugue, B. (1993). Enhancer and silencer elements within the 1st intron mediate the transcriptional regulation of the *beta-3 tubulin* gene by 20-Hydroxyecdysone in *drosophila* Kc-Cells. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23, 137-143.

- Tsai, C. C., Kao, H. Y., Yao, T. P., McKeown, M., and Evans, R. M. (1999). SMRTER, a *Drosophila* nuclear receptor coregulator, reveals that EcR-mediated repression is critical for development [In Process Citation]. *Mol Cell* 4, 175-86.
- 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, 221-6.
- 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, 109-19.
- Umesono, K., and Evans, R. M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57, 1139-46.
- von Kalm, L., Crossgrove, K., Von Seggern, D., Guild, G. M., and Beckendorf, S. K. (1994). The Broad-Complex directly controls a tissue-specific response to the steroid hormone ecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Embo J* 13, 3505-16.
- White, K. P., Hurban, P., Watanabe, T., and Hogness, D. S. (1997). Coordination of *Drosophila* metamorphosis by two ecdysone-induced nuclear receptors. *Science* 276, 114-117.
- Winick, J., Abel, T., Leonard, M. W., Michelson, A. M., Chardon-Loriaux, I., Holmgren, R. A., Maniatis, T., and Engel, J. D. (1993). A GATA family transcription factor is expressed along the embryonic dorsoventral axis in *Drosophila melanogaster*. *Development* 119, 1055-65.
- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M., and Knust, E. (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* 82, 67-76.
- Wong, J., Shi, Y. B., and Wolffe, A. P. (1995). A role for nucleosome assembly in both silencing and activation of the *Xenopus* TR beta A gene by the thyroid hormone receptor. *Genes Dev* 9, 2696-711.
- Woodard, C. T., Baehrecke, E. H., and Thummel, C. S. (1994). A molecular mechanism for the stage specificity of the *drosophila* prepupal genetic response to ecdysone. *Cell* 79, 607-615.
- Xu, L., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* 9, 140-7.
- Yao, T. P., Forman, B. M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J.-D., McKeown, M., Cherbas, P., and Evans, R. M. (1993). Functional ecdysone receptor is the product of *EcR* and *Ultraspiracle* genes. *Nature* 336, 476-479.
- Yao, T. P., Segraves, W. A., Oro, A. E., McKeown, M., and Evans, R. M. (1992). *Drosophila* ultraspiracle modulates receptor function via heterodimer formation. *Cell* 71, 63-72.
- Yin, Z., and Frasch, M. (1998). Regulation and function of tinman during dorsal mesoderm induction and heart specification in *Drosophila*. *Dev Genet* 22, 187-200.

Zaret, K. (1999). Developmental competence of the gut endoderm: genetic potentiation by GATA and HNF3/fork head proteins. *Dev Biol* 209, 1-10.

Zelhof, A. C., Yao, T. P., Evans, R. M., and McKeown, M. (1995). Identification and characterization of a *Drosophila* nuclear receptor with the ability to inhibit the ecdysone response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10477-81.

Zhang, W., and Bieker, J. J. (1998). Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9855-60.

Zollman, S., Godt, D., Prive, G. G., Couderc, J. L., and Laski, F. A. (1994). The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10717-21.