

Expression génique

ÉTUDE DE L'EXPRESSION DE GÈNES DE LA FAMILLE *ETS* CHEZ L'ANNELIDE POLYCHÈTE *HEDISTE (NEREIS) DIVERSICOLOR*

par

Béatrice BOCQUET-MUCHEMBLED, Régine LEROUX

et François FONTAINE

La famille *Ets* des facteurs de transcription regroupe des protéines possédant toutes un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé, le domaine ETS. Leurs gènes sont présents chez tous les Métazoaires ; nous avons précédemment identifié deux membres de cette famille, appelés *ets* et *erg*, chez l'Annélide Polychète *Hediste (Nereis) diversicolor*. Les études d'expression de ces deux gènes par *northern blot* et par hybridation *in situ* ont mis en évidence l'expression du gène *ets* au niveau de l'intestin ; le gène *erg* s'exprime dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, dans des massifs cellulaires présents dans la cavité coelomique et dans une région située entre le dernier segment du métastomium et le pygidium, impliquée dans la croissance de l'animal. Ces résultats préliminaires sont discutés mais des recherches ultérieures seront nécessaires pour comprendre l'implication de ces facteurs de transcription dans les fonctions biologiques des Annélides.

Gene expression (*ets*) in the Polychaete Annelid *Hediste (Nereis) diversicolor*

The *Ets* family of transcription factors includes proteins with a highly conserved DNA-binding domain, the ETS domain. Their genes are found throughout the metazoan world ; we previously characterised two members of this family, named *ets* and *erg*, in the polychaete annelid, *Hediste (Nereis) diversicolor*. Expression studies by northern blot and *in situ* hybridization revealed the *ets* gene expression in the intestine ; the *erg* gene is expressed in endothelial cells of blood vessels, in cells of the coelomic cavity and in the cellular area between the last portion of the metastomium and the pygidium, involved in the growth of the animal. These preliminary results are discussed but require further investigations to understand the biological functions of these transcription factors in annelids.

Introduction

Le contrôle correct de l'expression génique joue un rôle essentiel dans le destin cellulaire, lors du développement normal de l'organisme, ainsi que dans la prolifération des cellules matures ou lors de la réponse cellulaire à des stimuli. Ce contrôle de l'expression des gènes se fait à plusieurs niveaux, et en premier lieu au niveau de l'ensemble des facteurs de transcription qui se fixent sur le promoteur des gènes. Cette fonction a été attribuée aux protéines produites par les gènes de la famille *ets*.

C'est l'étude du rétrovirus aviaire E26 qui a permis la caractérisation de *v-ets* (NUNN *et al.*, 1983 ; LEPRINCE *et al.*, 1983), le membre fondateur de la famille des gènes *ets*. D'abord identifiés chez le poulet (GEGONNE *et al.*, 1987), de nombreux membres de cette famille de facteurs de transcription l'ont ensuite été chez des vertébrés supérieurs, l'oursin, le nématode *Caenorhabditis elegans* ou la drosophile (LAUDET *et al.*, 1993 ; 1999) ; quelques courtes séquences ont aussi permis d'identifier ces molécules chez des organismes Diploblastiques (DEGNAN *et al.*, 1993). Dans notre laboratoire nous avons mis en évidence deux membres de cette famille de gènes chez l'Annélide Polychète *Hediste diversicolor* (LELIEVRE-CHOTTEAU *et al.*, 1994b ; BOCQUET-MUCHEMBLED *et al.*, 1997). A la fois orthologues, car présents dans différentes espèces, et paralogues, car présents après duplication dans un même génome, il est vraisemblable que les gènes de la famille *ets* dérivent d'un ancêtre commun (LAUDET *et al.*, 1993).

Les produits de ces gènes ont tous en commun le même domaine protéique d'au moins 85 acides aminés (KARIM *et al.*, 1990), situé le plus souvent en position carboxy-terminale, et qui est le domaine de fixation à l'ADN. Ce domaine, appelé domaine ETS, s'avère très bien conservé du point de vue évolutif et représente le critère d'appartenance à cette grande famille de protéines (GEGONNE *et al.*, 1987). D'un point de vue fonctionnel, des études *in vitro* ont décrit les protéines *Ets* comme étant des facteurs de transcription capables d'activer ou, plus rarement, de réprimer l'expression de nombreux gènes. Le domaine de liaison à l'ADN forme un motif de type hélice-tour-hélice qui permet aux protéines *Ets* d'interagir avec un élément d'ADN d'environ 10 pb et contenant la séquence GGAA/T (revue dans SHARROCKS *et al.*, 1997).

L'analyse de la séquence protéique, et plus particulièrement du domaine ETS, a permis de classer ces gènes en 13 groupes (LAUDET *et al.*, 1999). Afin de préciser *in vivo* le rôle de ces protéines, nous nous sommes intéressés à l'expression des deux gènes appartenant à cette famille *ets* chez *Hediste diversicolor*, gènes que nous avons pu classer dans les groupes ETS et ERG (LELIEVRE-CHOTTEAU *et al.*, 1994b ; BOCQUET-MUCHEMBLED *et al.*, 1997).

Ets chez *Hediste diversicolor*

Matériel et méthodes

Matériel biologique

L'Annélide Polychète *Hediste (Nereis) diversicolor* est une espèce marine ou d'eau saumâtre, vivant dans la vase noire des estuaires. Les animaux ont été récoltés sur les côtes de la Manche et de la Mer du Nord, dans la baie de l'Authie et l'estuaire de l'Aa.

Le corps des néréis comporte trois régions distinctes : le *prostomium*, région céphalique pourvue des organes des sens et du cerveau, le *métastomium*, métamérisé et un dernier segment postérieur appelé *pygidium*. Après section, les segments postérieurs et le pygidium sont capables de se régénérer activement ; au niveau du dernier métamère, une zone de prolifération cellulaire assure la croissance de l'animal par la constitution de nouveaux segments.

Chaque métamère comporte une paire de cavités coelomiques ; les enveloppes épithéliales des sacs coelomiques s'affrontent dans le plan sagittal pour former le mésentère ventral et le mésentère dorsal assurant la suspension des organes axiaux (tube digestif et vaisseaux dorsal et ventral) ; le pygidium, portant deux cirres et percé par l'anus, n'a pas de coelome.

Recherche de l'expression des gènes *ets* et *erg*

Northern blots : des électrophorèses en gel dénaturant ont été réalisées avec des ARN messagers, transférés et hybridés avec des sondes spécifiques du gène *ets*.

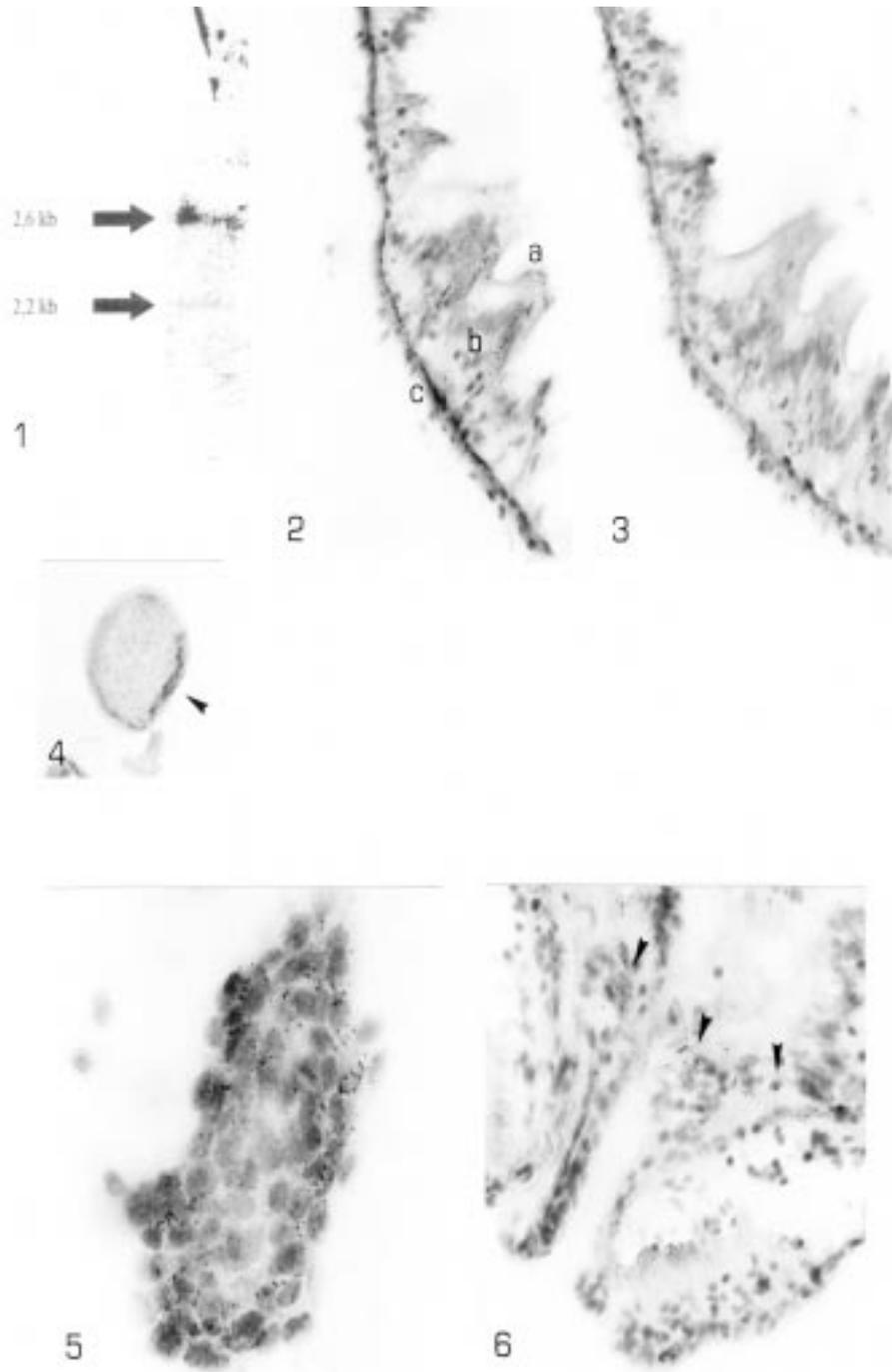
Les hybridations *in situ* sont faites sur des coupes sériées de métamères ou de pygidium déposées alternativement sur différentes lames, pour être hybridées avec des ribosondes anti-sens ou sens (témoins négatifs), spécifiques de l'un ou l'autre gène.

Résultats et discussion

1. Recherche de l'expression du gène *ets*

Le gène *ets* d'*Hediste diversicolor* a été mis en évidence par rétro-transcription couplée à la P. C. R. (*Polymerase Chain Reaction*) sur des ARN messagers extraits de régénérats de l'extrémité postérieure de l'animal, obtenus après amputation (LELIEVRE-CHOTTEAU *et al.*, 1994b). La séquence alors identifiée a servi de sonde moléculaire et a permis, par criblage d'une banque d'ADN génomique, la caractérisation de toute la séquence correspondant au domaine ETS. Cette séquence traduite en acides aminés, présente plus de 80% d'identité avec la protéine Ets-1 humaine et 94% avec la protéine Ets-2 de drosophile (BOCQUET-MUCHEMBLED *et al.*, 1997). Le rôle éventuel d'*ets* lors de la régénération, suggéré par la stratégie qui a permis sa mise en évidence, reste à confirmer.

Des études de transfert/hybridation (*northern blot*) ont été réalisées sur des ARN messagers extraits de métamères ou de cellules récupérées par ponction dans la cavité



Ets chez Hediste diversicolor

coelomique. Pour l'hybridation, une ribosonde radiomarquée spécifique du gène *ets* et reconnaissant une portion codant le domaine ETS a été utilisée.

Sur les ARNm extraits des métamères de l'animal, après exposition autoradiographique, deux transcrits ont été révélés : un transcrit majeur de 2,6 kb et un transcrit mineur de 2,2 kb (figure 1). Aucun signal n'a été détecté sur les ARNm extraits des cellules coelomiques de l'animal. Comme contrôle, des *northern blots* réalisés dans les mêmes conditions mais en utilisant cette fois-ci une ribosonde de même sens que la séquence d'ARN recherchée, n'ont mis en évidence aucun signal en autoradiographie, ceci attestant d'un signal spécifique. La présence de transcrits de tailles différentes peut s'expliquer par un épissage alternatif ou par l'utilisation de signaux différents de début et de fin de transcription. Les produits des gènes *ets* actuellement connus peuvent présenter ces caractéristiques ; ainsi, les produits du gène *ets1* humain sont présents en *northern blot* sous forme de deux transcrits dont l'un est majoritairement exprimé, mais des études plus fines ont montré un grand nombre de produits non identifiables par cette technique, dus à des épissages différents, à différents sites de début de transcription et à la présence de deux signaux de polyadénylation (revue dans GILLES, 1996).

Nous avons recherché la localisation tissulaire des ARN messagers par hybridation *in situ*. Des coupes frontales alternées de métamères ou de pygidium ont été réalisées et hybridées avec des ribosondes spécifiques d'*ets*, marquées au ³⁵S-CTP. Les lames émulsionnées, puis révélées après un mois d'exposition, ont été colorées au bleu azur II 0,1%. Un marquage spécifique a été obtenu dans la muqueuse intestinale tant au niveau apical des entérocytes, qu'au niveau du tissu conjonctif sous-jacent et des cellules épithéliales formant le péritoine (figures 2 et 3). Ce résultat confirme donc la présence des transcrits identifiés par *northern blot* et précise leur localisation tissulaire. Chez d'autres organismes, les études réalisées sur les gènes du groupe ETS n'ont jamais montré d'expression dans des cellules épithéliales mais plutôt dans les cellules lymphoïdes ou pendant le développement embryonnaire dans les lignées cellulaires d'origine mésodermique (revues dans : CREPIEUX *et al.*, 1994 ; DITTMER *et al.*, 1998). Il n'en est pas de même pour un membre de la famille *ets* classé dans le groupe ESE : il s'agit du gène *ESE-1* humain. L'expression de ce gène n'a été détectée que dans des cellules épithéliales : par hybridation *in situ*, son expression a été mise en évidence au niveau de l'épithélium gastrique ou encore de l'épithélium du colon (OETTGEN *et al.*, 1997).

Figure 1 : *Northern blot* sur des ARN messagers extraits de métamères et hybridés avec une ribosonde spécifique d'*ets*.

Figures 2 à 6 : Recherche de l'expression des gènes *ets* (Fig. 2 et 3) et *erg* (Fig. 4 à 6) d'*Hediste diversicolor* par hybridation *in situ*. Ces études ont été réalisées avec des ribosondes marquées au ³⁵S-CTP spécifiques de l'un ou l'autre gène, sur des coupes frontales alternées de métamères ou de pygidium.

Fig. 2 : expression du gène *ets* dans l'intestin. Notez la présence de grains d'argent à l'apex des entérocytes (a), dans le tissu conjonctif sous-jacent (b) ainsi que dans les cellules épithéliales du péritoine (c) (x1400).

Fig. 3 : contrôle de la Fig. 2 ; hybridation réalisée avec une sonde de même sens que la séquence recherchée. Aucun marquage n'est détecté (x1400).

Fig. 4 : expression du gène *erg* dans les cellules endothéliales d'un vaisseau sanguin (en coupe transversale) (x2400).

Fig. 5 : expression du gène *erg* dans un massif mésodermique de la cavité coelomique (x1300).

Fig. 6 : expression du gène *erg* dans la zone de prolifération cellulaire du dernier métamère (x1300).

2. Recherche de l'expression du gène *erg*

Un second gène a été identifié par amplification enzymatique (P.C.R.) d'ADN génomique d'*H. diversicolor* et a été classé dans le groupe ERG (LELIEVRE-CHOTTEAU *et al.*, 1994b).

Des études de *northern blot* ont montré l'expression de ce gène lors de la régénération des segments postérieurs et du pygidium et cette technique a permis de détecter un transcrite de 2,5 kb (LELIEVRE-CHOTTEAU, 1994a). De plus, un transcrite de même taille a été mis en évidence sur des ARN messagers issus de cellules coelomiques (LELIEVRE-CHOTTEAU *et al.*, 1994b).

Les expériences d'hybridation *in situ* réalisées dans les mêmes conditions que précédemment mais avec une sonde spécifique de ce gène *erg*, nous ont permis d'obtenir un marquage dans les cellules endothéliales bordant les vaisseaux sanguins (figure 4), dans un massif mésodermique présent dans le coelome (figure 5), ainsi qu'au niveau d'une zone de prolifération cellulaire permettant l'accroissement du nombre des métamères chez l'organisme adulte, présente entre le dernier métamère et le pygidium (figure 6).

La présence d'un marquage au niveau de massif cellulaire intracoelomique confirme les résultats précédemment obtenus par *northern blot*. Les cellules libres présentes dans les cavités coelomiques des Annélides Polychètes sont de différents types : les gamètes, les éléocytes (lieu de synthèse de la vitellogénine absorbée par l'ovocyte en cours de maturation) (BAERT & SLOMIANNY, 1992) et les granulocytes dont trois types sont bien caractérisés du point de vue morphologique et immunologique (DHAINAUT & PORCHET-HENNERE, 1988). Ces granulocytes constituent un système de défense à médiation humorale (DHAINAUT-COURTOIS *et al.*, 1987) et à médiation cellulaire mettant en jeu une coopération entre les trois types de granulocytes (PORCHET-HENNERE *et al.*, 1987a ; 1990). Les granulocytes de type I (GI) proviennent de la différenciation de cellules présentes sous forme de massifs dans le coelome, ces massifs mésodermiques effectuant la transcription du gène d'une métalloprotéine (la MPII) intervenant dans les processus de détoxification (SALZET-RAVEILLON *et al.*, 1993), ces molécules étant ensuite véhiculées par les GI libres dans le coelome (PORCHET-HENNERE *et al.*, 1987b). Le massif cellulaire marqué après hybridation *in situ* (figure 5) peut correspondre à de tels centres différenciateurs.

Conclusion

Si l'on compare les patrons d'expression des gènes *ets* et *erg* obtenus après hybridation *in situ*, ces gènes ne sont pas toujours exprimés dans les mêmes territoires tissulaires : en effet, l'expression d'*ets* est détectée dans l'intestin alors que celle d'*erg* a été détectée au niveau des vaisseaux sanguins, dans des cellules de la cavité coelomique et dans la zone cellulaire permettant la croissance de l'animal par la constitution de nouveaux métamères.

Ets chez Hediste diversicolor

Le rôle du gène *ets* dans l'intestin, alors que nous n'y avons noté aucune expression d'*erg*, reste à explorer.

L'expression d'*erg* dans un massif mésodermique est un résultat particulièrement intéressant, puisque ces cellules donneront après différenciation les granulocytes GI impliqués dans des mécanismes de défense immunitaire. Nous n'avons pas observé d'expression du gène *ets* dans ces mêmes cellules. Les gènes du groupe ERG qui se sont diversifiés, par duplication et divergence, chez les organismes supérieurs, sont réputés s'exprimer dans les lignées hématopoïétiques : il sera important de rechercher la fonction biologique du gène *erg* de *Nereis*, qui paraît proche de l'ancêtre non dupliqué (LELIEVRE-CHOTTEAU *et al.*, 1994b), dans le système immunitaire des Polychètes.

Il a aussi été montré que ces deux gènes s'exprimaient lors de la régénération ; cette observation a aussi été faite chez les organismes supérieurs où des gènes des groupes ERG et ETS s'expriment dans des phénomènes de différenciation et de prolifération cellulaire normale ou pathologique.

Les protéines possédant un domaine ETS sont une importante famille de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de nombreux gènes ayant une grande variété de fonctions différentes. Bien que des progrès significatifs aient été faits ces dernières années dans la compréhension des fonctions de ces molécules, beaucoup reste à faire tant aux niveaux moléculaire que biologique. L'étude de l'expression de ces gènes chez différents organismes est une voie d'accès permettant de mieux comprendre la fonction biologique des protéines Ets.

Laboratoire des Écosystèmes Littoraux et Côtiers (ELICO) ; UPRES-A 8013
Université des Sciences et Technologies de Lille - Bâtiment SN3
59 655 Villeneuve d'Ascq Cedex - France.

RÉFÉRENCES

- BAERT, J. -L. & SLOMIANNY, M.-C. (1992).- Vitellin accumulation and vitellogenin synthesis in relation to oogenesis in *Perinereis cultrifera* (Polychaete Annelida). *Invert. Reprod. Develop.*, **21**, 121-128.
- BOCQUET-MUCHEMBLED, B., LELIEVRE-CHOTTEAU, A., DHAINAUT, A. & FONTAINE, F. (1997).- Les gènes *ets* et *erg* chez les Annélides Polychètes. Données préliminaires à une étude évolutive de ces gènes chez les Invertébrés. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **122**, 4, 381-387.
- CREPIEUX, P., COLL, J. & STEHELIN, D. (1994).- The Ets family of proteins : weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners. *Critical Reviews in Oncogenesis*, **5**, 6, 615-638.
- DEGNAN, B. M., DEGNAN, S. M., NAGANUMA, T. & MORSE, D. E. (1993).- The *ets* multigene family is conserved throughout the Metazoa. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3479-3484.
- DHAINAUT, A. & PORCHET-HENNERE, E. (1988).- Haemocytes and coelomocytes. *Microfauna marina*, **4**, 215-230.
- DHAINAUT-COURTOIS, N., NEJMEDDINE, A., BAERT, J.-L. & DHAINAUT, A. (1987).- Localisation immunocytochimique en microscopie électronique d'une protéine complexant le cadmium chez un ver marin (*Nereis diversicolor* O.F. Müller). *C. R. Acad. Sci. Paris*, **305**, III, 237-241.

Bulletin de la Société zoologique de France 124 (4)

- DITTMER, J. & NORDHEIM, A. (1998).- Ets transcription factors and human disease. *Biochem. Biophys. Acta*, **1377**, F1-F11.
- GEGONNE, A., LEPRINCE, D., DUTERQUE-COQUILLAUD, M., VANDENBUNDER, B., FLOURENS, A., GHYSDAEL, J., DEBUIRE, B. & STEHELIN, D. (1987).- Multiple domains for the chicken cellular sequences homologous to the *v-ets* oncogene of the E26 retrovirus. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 806-812.
- GILLES, F. (1996).- Etude de la régulation de l'expression du proto-oncogène *c-est1* dans les fibroblastes humains. Thèse, Université des Sciences et Technologies de Lille.
- KARIM, F. D., URNESS, L. D., THUMMEL, C. S., KLEMSZ, M. J., MCKERCHER, S. R., CELADA, A., VAN BEVEREN, C., MAKI, R. A., GUNTHER, C. V., NYE, J. A. & GRAVES, B. J. (1990).- The ETS-domain : a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence. *Genes and Dev.*, **4**, 1451-1453.
- LAUDET, V., NIEL, C., DUTERQUE-COQUILLAUD, M., LEPRINCE, D., & STEHELIN, D. (1993).- Evolution of the *ets* gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **190**, 8-14.
- LAUDET, V., HFNNI, C., STEHELIN, D. & DUTERQUE-COQUILLAUD, M.- Molecular phylogeny of the *ets* gene family. *Oncogene* (sous presse)
- LELIEVRE-CHOTTEAU, A., (1994a).- Identification de deux gènes de la famille des proto-oncogènes *ets* chez une Annelide Polychète, *Nereis diversicolor*. Thèse, Université des Sciences et Technologies de Lille.
- LELIEVRE-CHOTTEAU, A., LAUDET, V., FLOURENS, A., BEGUE, A., LEPRINCE, D. & FONTAINE, F. (1994b).- Identification of two *ets* related genes in a marine worm, the polychaete annelid *Nereis diversicolor*. *FEBS Letters*, **354**, 62-66.
- LEPRINCE, D., GEGONNE, A., COLL., J., DE TAISNE, C., SCHNEEBERGER, A., LAGROU, C. & STEHELIN, D. (1983).- A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature*, **306**, 395-397.
- NUNN, M. F., SEEBURG, P. H., MOSCOVICI, C. & DUESBERG, P. H. (1983).- Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature*, **306**, 391-395.
- OETTGEN, P., ALANI, R., M., BARCINSKI, M., A., BROWN, L., AKBARALI, Y., BOLTAX, J., KUNSCH, C., MUNGER, K. & LIBERMANN, T., A. (1997).- Isolation and characterization of a novel epithelium-specific transcription factor, ESE-1, a member of the *ets* family. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 8, 4419-4433.
- PORCHET-HENNERE, E., M'BERI, M., DHAINAUT, A. & PORCHET, M. (1987a).- Ultrastructural study of the encapsulation-response of the Polychaete Annelid *Nereis diversicolor*. *Cell Tissue Res.*, **248**, 463-471.
- PORCHET-HENNERE, E., NEJMEDDINE, A., BAERT, J. L. & DHAINAUT-COURTOIS, N. (1987b).- Selective immunostaining of type 1 granulocytes of the Polychaete Annelid *Nereis diversicolor* by a monoclonal antibody against a cadmium-binding protein (MP II). *Biol. Cell.*, **60**, 259-261.
- PORCHET-HENNERE, E. (1990).- Cooperation between different coelomocyte populations during the encapsulation response of *Nereis diversicolor* demonstrated by using monoclonal antibodies. *J. Invert. Pathol.*, **56**, 1-9.
- SALZET-RAVEILLON, B., RENTIER-DELRUE, F. & DHAINAUT, A. (1993).- Detection of mRNA encoding an antibacterial-metalloprotein (MPII) by *in situ* hybridization with a cDNA probe generated by polymerase chain reaction in the worm *Nereis diversicolor*. *Cell Mol. Biol.*, **39**, 1, 105-14.
- SHARROCKS, A. D., BROWN, A. L., LING, Y., & YATES, P. R. (1997).- The ETS-domain transcription factor family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **29**, 12, 1371-1387.