

FRÉDÉRIC ST-PIERRE

**MÉCANISMES DE RÉGULATION
TRANSCRIPTIONNELLE DU GÈNE DE L'ALPHA-
FOETOPROTÉINE**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2009

Résumé

Le gène *AFP* est exprimé sélectivement par le foie foetal et dans l'hépatome, formant un excellent modèle pour étudier les mécanismes de différenciation qui sont déréglés dans le cancer. L'hépatome, par exemple, est réfractaire à l'action anti-proliférative et AFP-suppressive des hormones glucocorticoïdes. Cette thèse porte sur la régulation transcriptionnelle du locus *AFP* et plus particulièrement sur l'identification des facteurs de différenciation hépatique l'induisant, avec l'objectif ultime de forcer la différenciation tumorale. À l'aide d'empreintes génomiques *in vivo*, je démontre pour la première fois l'occupation d'un site C/EBP au promoteur *AFP*, contrairement au dogme voulant que HNF1 occupe cette position critique. Des études d'immunoprécipitation de chromatine ont établi la présence de C/EBP au promoteur et aux amplificateurs du gène *AFP*. De plus, j'ai montré par transfection et transgenèse que C/EBP active le gène *AFP* en tandem avec le récepteur nucléaire FTF et que cette coopérativité dépend du positionnement précis des deux facteurs l'un par rapport à l'autre au promoteur *AFP*. Une substitution ou une modification de la distance entre les deux sites de fixation des facteurs change radicalement le comportement du gène pendant le développement et dans l'hépatome : ceci semble suggérer une contrainte nucléosomale déterminante dans l'activité onco-fœtale du promoteur *AFP*. On observe aussi une diminution du recrutement de C/EBP ou des corégulateurs CBP/p300 aux régions régulatrices *AFP* au cours du développement hépatique et de la croissance d'une lignée d'hépatome. La suite de ces travaux a permis d'identifier HNF4 sur les régions amplificatrices du gène *AFP* dans un modèle d'hépatome et chez des rats adultes. Ces résultats suggèrent un rôle négatif de HNF4 sur la transcription du gène *AFP* et une dérégulation possible de ce facteur dans les hépatomes. Nos travaux indiquent aussi que les complexes C/EBP présents aux régions amplificatrices *AFP* sont directement ciblés par le récepteur des glucocorticoïdes (via son domaine de liaison à l'ADN) dont la présence empêche le recrutement des cofacteurs sur ces régions. L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse suggère donc un rôle central des protéines C/EBP dans la régulation développementale et hormonale du locus *AFP*. Celles-ci, en combinaison avec FTF, constituent ainsi de bons candidats pour forcer la différenciation tumorale.

Abstract

The *AFP* gene is expressed specifically in the fetal liver as well as in some hepatoma cells, which makes this gene an excellent model to study differentiation processes that are deregulated in cancer. Hepatoma cells, for example, are often refractory to the AFP-suppressive as well as anti-proliferative effects of glucocorticoid hormones. This thesis explores transcriptional regulation of the *AFP* locus with a particular attention given to the identification of hepatic differentiation factors involved in the activation of this locus, the ultimate goal being to enforce tumor differentiation. Using *in vivo* footprinting experiments, I demonstrate for the first time the occupation of a C/EBP site in the *AFP* promoter, a site which was generally believed to be occupied by HNF1 proteins. Chromatin immunoprecipitation experiments confirmed the binding of C/EBP proteins to the *AFP* gene promoter as well as its enhancers. Furthermore, we showed by using transfection and transgenesis experiments that C/EBP proteins activate the *AFP* gene in tandem with the nuclear receptor FTF and that this cooperativity depends on the precise positioning of the two sites relative to one another. A deletion or modification of the distance between these two factors drastically modifies the expression timing of the *AFP* gene during hepatic development, suggesting a nucleosome position effect crucial for the onco-fetal activity of the gene. We also observe a differential recruitment of C/EBP or the coregulators CBP/p300 on *AFP* regulatory regions during hepatic development and growth of a hepatoma cell line. We then identified HNF4 on the enhancer regions of the *AFP* locus in a rat hepatoma model and in adult rat liver. This suggests that HNF4 negatively influences *AFP* gene transcription and underscores a possible deregulation of this factor in hepatoma cells. Our work also indicates that the C/EBP complexes present at two enhancer regions of the *AFP* gene are directly targeted by the glucocorticoid receptor (via its DNA-binding domain), leading to a loss of cofactor recruitment and *AFP* gene repression. On the whole, this thesis underscores a central role for C/EBP proteins in *AFP* locus developmental and hormonal regulation. Therefore, C/EBP combined with FTF represent good candidates to enforce tumor cell differentiation.

Avant-Propos

J'aimerais avant toute chose remercier mon directeur de thèse, le Dr Luc Bélanger, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser mes études graduées dans son laboratoire. Son enseignement m'a permis de développer une bonne rigueur scientifique me permettant de mener à terme ce projet de doctorat. J'aimerais aussi remercier les membres du laboratoire, passés et présents, en particulier Sylvie Roy et le Dr Denis Allard pour leur aide et leurs judicieux conseils qui ont été très appréciés tout au long de mes études graduées.

J'aimerais également remercier le Dr Régen Drouin et son équipe, en particulier Isabelle Paradis, pour leur expertise dans le domaine des interactions protéines-ADN *in vivo*. Leurs nombreux conseils tout au long des expériences d'empreinte génomique *in vivo* ont permis de bien démarrer ce projet de doctorat.

Je voudrais aussi profiter de l'occasion pour remercier le laboratoire du Dr Jacques Côté et l'Interface Clinique pour le prêt d'équipements nécessaires à la réalisation des expériences d'immunoprécipitations de chromatine et de PCR quantitatif.

Finalement, toutes ces années d'étude ne se seraient probablement pas concrétisées si ce n'avait été du support inconditionnel apporté par ma famille, en particulier par mes parents et mes frères, et plus spécialement par ma conjointe Annick, qui est à mes côtés depuis le début de cette aventure et sans qui je n'aurais probablement pas eu autant de plaisir à réaliser ce projet.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-Propos.....	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations	x

Chapitre 1- Introduction générale.....1

1.1	Préambule	2
1.2	Biologie du cancer	3
1.2.1	Cancer et différenciation	3
1.2.2	Origine cellulaire du cancer : le cas de l'hépatocarcinome.....	4
1.3	Développement hépatique.....	5
1.3.1	Compétence.....	5
1.3.2	Induction de l'hépatogenèse.....	7
1.3.3	Migration et prolifération cellulaire	8
1.3.4	Différenciation terminale	10
1.4	Transcription par l'ARN Polymérase II.....	12
1.4.1	Complexe de Préinitiation.....	12
1.4.2	Facteurs de transcription	13
1.4.3	Cofacteurs	16
1.4.4	Complexe Mediator.....	19
1.5	Les hormones glucocorticoïdes.....	21
1.5.1	Action activatrice du récepteur des glucocorticoïdes.....	22
1.5.2	Mécanismes de répression transcriptionnelle par GR.....	22
1.6	Régulation transcriptionnelle de l'AFP	24
1.6.1	Éléments régulateurs	25
1.6.2	Régulation développementale de l'AFP.....	30
1.6.3	Régulation hormonale de l'AFP.....	31
1.7	Objectifs.....	32

Chapitre 2- Caractérisation *in vivo* du promoteur AFP34

2.1	Introduction.....	35
2.2	Matériel et méthodes.....	36
2.2.1	Culture cellulaire.....	36
2.2.2	Constructions plasmidiques	36
2.2.3	Transfections.....	37
2.2.4	Extraits nucléaires de protéines et gels de retardement	38
2.2.5	Empreinte génomique <i>in vivo</i> à la DNase I.....	38
2.2.6	Immunoprécipitation de chromatine	39
2.2.7	PCR quantitatif.....	40

2.3	Résultats.....	41
2.3.1	Occupation du segment -200 à -100 pb du promoteur <i>AFP in vivo</i>	41
2.3.2	Les protéines de la famille C/EBP se lient à la région -125 à -112 pb du promoteur <i>AFP</i>	44
2.3.3	Importance du site C/EBP dans l'activité du promoteur <i>AFP</i>	44
2.3.4	L'activation de l' <i>AFP</i> par C/EBP nécessite la région amplificatrice EI.....	48
2.3.5	C/EBP est détecté directement <i>in vivo</i> sur la chromatine <i>AFP</i>	48
2.3.6	Le positionnement relatif entre FTF et C/EBP est critique dans la régulation transcriptionnelle de l' <i>AFP</i>	52
2.4	Discussion.....	55
2.4.1	Perspectives pour la régulation développementale de l' <i>AFP</i>	59

Chapitre 3- Rôle de C/EBP et de ses corégulateurs dans la régulation onco-développementale du locus *AFP*61

3.1	Introduction.....	62
3.2	Matériel et méthodes.....	64
3.2.1	Culture cellulaire et animaux.....	64
3.2.2	Immunobuvardage de type Western et gel de retardement.....	64
3.2.3	Immunoprécipitation de chromatine.....	65
3.2.4	ARN, ADNc et PCR quantitatif.....	66
3.3	Résultats.....	67
3.3.1	Identification <i>in vivo</i> des domaines de liaison de C/EBP dans les régions amplificatrices du gène <i>AFP</i>	67
3.3.2	Fluctuations de C/EBP aux régions régulatrices de l' <i>AFP</i> dans la lignée 7.6.....	70
3.3.3	Fluctuations de C/EBP aux régions régulatrices du gène <i>AFP</i> lors des derniers stades du développement hépatique.....	72
3.3.4	Les activateurs transcriptionnels liant le promoteur <i>AFP</i> ne fluctuent pas dans les cellules 7.6.....	73
3.3.5	CBP, p300 et Mediator sont recrutés et fluctuent sur les régions régulatrices du gène <i>AFP</i>	76
3.3.6	HNF4 se lie aux régions régulatrices de l' <i>AFP in vivo</i>	79
3.4	Discussion.....	81
3.4.1	Conclusion et perspectives.....	86

Chapitre 4- Étude du mécanisme de répression de l'*AFP* par les hormones glucocorticoïdes87

4.1	Introduction.....	88
4.2	Matériel et méthodes.....	89
4.2.1	Culture cellulaire.....	89
4.2.2	Mutagenèse dirigée.....	89
4.2.3	Transfections.....	89
4.2.4	Immunoprécipitation de chromatine.....	90
4.2.5	ARN, ADNc et PCR quantitatif.....	90
4.3	Résultats.....	91

4.3.1	La mutation des sites C/EBP et FTF du promoteur et de la région EI de l' <i>AFP</i> n'empêche pas la répression par les hormones glucocorticoïdes en transfections transitoires.....	91
4.3.2	GR est recruté aux régions amplificatrices de l' <i>AFP in vivo</i>	93
4.3.3	Le recrutement de GR n'entraîne pas la disparition des facteurs de transcription des régions amplificatrices de l' <i>AFP in vivo</i>	94
4.3.4	Diminution des cofacteurs sur les régions régulatrices de l' <i>AFP in vivo</i> lors du recrutement de GR	97
4.3.5	Le DBD de GR est requis pour son action sur le gène <i>AFP in vivo</i>	100
4.4	Discussion	103
Chapitre 5- Discussion générale		108
5.1	Organisation du promoteur du gène <i>AFP</i>	109
5.2	Implication des régions amplificatrices dans la régulation du gène <i>AFP</i>	112
5.2.1	Rôle des protéines C/EBP dans la régulation du gène <i>AFP</i>	112
5.2.2	Rôle possible du récepteur nucléaire HNF4 dans la régulation du gène <i>AFP</i>	115
5.3	Répression transcriptionnelle du gène <i>AFP</i> par GR	116
5.4	Modèles de régulation transcriptionnelle du gène <i>AFP</i>	118
5.4.1	Régulation développementale	120
5.4.2	Régulation hormonale	122
5.5	Perspectives.....	123
5.6	Conclusion	126
Bibliographie		127

Liste des tableaux

Tableau 2-1 Amorces utilisées dans la mutagenèse dirigée	37
Tableau 2-2 Liste des amorces utilisées dans les immunoprécipitations de chromatine.....	40
Tableau 3-1 Liste des amorces utilisées pour les immunoprécipitations de chromatine.....	66
Tableau 3-2 Amorces utilisées pour les qPCR effectués sur l'ADNc.....	67
Tableau 4-1 Amorces utilisées pour les qPCR effectués sur l'ADNc	91

Liste des figures

Figure 1-1 Étapes précoces du développement hépatique	8
Figure 1-2 Interactions entre les principaux facteurs de transcription impliqués dans le développement hépatique	10
Figure 1-3 Structure des récepteurs nucléaires	15
Figure 1-4 Régulation de la transcription par l'ARN polymérase II	20
Figure 1-5 Mécanismes généraux de la régulation génique par GR	24
Figure 1-6 Locus multigénique de la famille albumine et organisation du locus AFP	26
Figure 2-1 Empreinte génomique <i>in vivo</i> du promoteur <i>AFP</i>	42
Figure 2-2 C/EBP lie le promoteur <i>AFP in vitro</i>	45
Figure 2-3 C/EBP stimule le promoteur <i>AFP</i> et est essentiel à son activité	47
Figure 2-4 Les sites C/EBP de l'amplificateur <i>AFP</i> sont nécessaires à l'activation de l' <i>AFP</i> par C/EBP	49
Figure 2-5 C/EBP est présent <i>in vivo</i> sur le promoteur <i>AFP</i>	51
Figure 2-6 Importance de la région LS dans la régulation transcriptionnelle de l' <i>AFP</i>	53
Figure 3-1 Alignement des régions amplificatrices EII et EIII du locus <i>AFP</i>	68
Figure 3-2 Recrutement de C/EBP α et C/EBP β aux régions amplificatrices du gène <i>AFP in vivo</i>	69
Figure 3-3 Analyse par CHIP du recrutement de C/EBP α , C/EBP β , HNF1 et pol II aux régions régulatrices <i>AFP</i> dans les cellules 7.6 cultivées à faible et haute densité	71
Figure 3-4 Analyse par CHIP du recrutement de C/EBP α et C/EBP β au locus <i>AFP</i> dans les stades tardifs du développement hépatique	73
Figure 3-5 Caractérisation des activateurs du promoteur <i>AFP</i> dans les cellules 7.6	75
Figure 3-6 Analyse par CHIP du recrutement des coactivateurs CBP, p300 et TRAP220 aux régions régulatrices du gène <i>AFP</i> dans les cellules 7.6 cultivées à faible et à haute densité	78
Figure 3-7 Analyse par CHIP du recrutement de HNF4 aux régions amplificatrices de l' <i>AFP</i> dans un modèle d'hépatome et dans le foie de rat normal	80
Figure 4-1 Effet de la mutation des sites C/EBP et FTF des régions régulatrices de l' <i>AFP</i> sur la répression par la Dex en transfections transitoires	93
Figure 4-2 GR est recruté aux régions amplificatrices de l' <i>AFP in vivo</i>	95
Figure 4-3 Analyse par CHIP du recrutement des protéines C/EBP α , C/EBP β et HNF4 aux régions régulatrices du gène <i>AFP</i> lors du traitement des cellules 7.6 avec la Dex	96
Figure 4-4 Analyse par CHIP du recrutement des protéines CBP, p300 et TRAP220 aux régions régulatrices du gène <i>AFP</i> lors du traitement des cellules 7.6 avec la Dex	98
Figure 4-5 Analyse par CHIP du recrutement des facteurs régulateurs du gène <i>AFP</i> au promoteur <i>ALB</i> et à l'amplificateur <i>TAT</i> lors du traitement des cellules 7.6 avec la Dex	99
Figure 4-6- La répression du gène <i>AFP</i> requiert le DBD de GR <i>in vivo</i>	101

Figure 5-1 Modèle proposé pour l'ouverture du locus <i>AFP</i> au cours du développement hépatique	119
Figure 5-2 Mécanismes possibles de régulation développementale du locus <i>AFP</i>	121
Figure 5-3 Mécanisme de répression hormonale du locus <i>AFP</i>	123

Liste des abréviations

AFP :	Alpha-Foetoprotéine
ALB :	Albumine
ALF :	Alpha-Albumine
AP-1:	«Activating Protein 1»
BMP:	«Bone Morphogenic Protein»
Brg-1:	«Brahma-Related Gene 1»
CAT :	«Chloramphenicol Acetyl Transferase»
CBP:	«c-AMP Response Element Binding Protein Binding Protein»
C/EBP :	«CCAAT/Enhancer Binding Protein»
ChIP:	«Chromatin Immunoprecipitation»
CTD:	«C-Terminal Domain»
C-Terminal:	«Carboxy-Terminal»
DBD:	«DNA-Binding Domain»
DBP :	«Vitamin D Binding Protein»
Dex:	Dexamethasone
DH:	Hypersensible à la DNase
DMEM:	«Dulbecco's Modified Eagle Medium»
DMSO:	Dimethyl Sulfoxide
DO:	Densité Optique
FBS:	«Fetal Bovine Serum»
FGF:	«Fibroblast Growth Factor»
FTEF:	Facteurs de Transcription Enrichis au Foie
FTF:	«Fetoprotein Transcription Factor»
FOXA :	«Forkhead Box family A»
GATA :	Facteurs se liant à la séquence GATA
GC :	Glucocorticoïde
GR :	«Glucocorticoid Receptor»
GRE :	«Glucocorticoid Response Element»
GRIP1 :	«Glucocorticoid Receptor Interacting Protein 1»
GST:	Glutathione S-Transferase»

GTF :	«General Transcription Factor»
HAT:	Histone Acétyl-Transférase
HCC :	«Hepatocellular Carcinoma»
HDAC:	Histone Désacétylase
HGF:	«Hepatocyte Growth Factor»
HNF :	«Hepatocyte Nuclear Factor»
HrP:	«Horseradish Peroxidase»
HSP :	«Heat-Shock Protein»
IL-8:	Interleukine-8
ISWI:	«Imitation Switch»
Jour E:	Jour Embryonnaire
kb:	kilobase
LBD:	«Ligand-Binding Domain»
LF :	«Linker Factor»
LMPCR:	PCR par l'intermédiaire d'un adaptateur
LS :	«Linker Sequence»
MAPK:	«Mitogen-Activated Protein Kinase»
MODY3 :	«Maturity Onset Diabetes of the Young 3»
NF-κB:	«Nuclear Factor of κ Light Chain Gene Enhancer in B Cells»
NGFI-B:	«Nerve Growth Factor-Induced B»
Nrf2:	«NF-E2-Related Factor-2»
OSM:	Oncostatine M
p300:	Protéine de 300 kDa
PAGE :	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
pb:	paire de bases
PBS:	Saline tamponnée au phosphate
P/CAF:	«p300/CBP Associated Factor»
PCR :	Réaction en chaîne de la polymérase
PEPCK :	«Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase»
PIC :	«Pre-Initiation Complex»
Pol II:	ARN polymérase II

POMC:	Proopiomelanocortine
P-TEFb:	«Positive Transcription Elongation Factor B»
Région E:	Région amplificatrice («Enhancer»)
RIPA:	«Radio Immuno Precipitation Assay»
S:	Type Sauvage
SDS:	Sodium Dodecyl Sulfate
SHP:	«Short Heterodimer Partner»
SMRT:	«Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptors»
STAT5 :	«Signal Transducer and Activator of Transcription 5»
SUMO:	«Small Ubiquitin-Related Modifier»
SWI/SNF :	«Switch/Sucrose Non-Fermenting»
TAT:	«Tyrosine Amino-Transferase»
TBP :	«TATA-Binding Protein»
TGF:	«Transforming Growth Factor»
Tip60 :	«HIV-1 Tat-Interacting Protein of 60 kDa»
WNT:	«Wingless-Type MMTV Integration Site Family»
ZIP:	«Leucine Zipper»

Chapitre 1- Introduction générale

1.1 Préambule

Notre laboratoire étudie le cancer comme une maladie de la différenciation, et c'est pourquoi nous sommes intéressés par les mécanismes de régulation transcriptionnelle d'un gène étroitement lié à la différenciation hépatique et à la carcinogenèse, soit celui de l'alpha-foetoprotéine (AFP). L'AFP est une protéine de la famille de l'albumine dont l'expression est retrouvée principalement dans le foie fœtal au cours du développement embryonnaire. Le gène *AFP* est réprimé lors de la différenciation terminale des hépatocytes pour être toutefois réactivé conséquemment à l'apparition d'hépatocarcinomes (HCC). L'utilisation de l'AFP comme marqueur des hépatoblastes (voir section 1.3.2) et aussi des hépatocarcinomes est très répandue, mais on ne connaît pas précisément les moyens par lesquels ces différents états cellulaires influent sur l'expression de l'AFP.

On observe une association marquée de l'expression de l'AFP avec les phénomènes de prolifération hépatocellulaire. Ainsi, cette protéine est exprimée presque exclusivement par des hépatocytes en prolifération, comme par exemple les hépatoblastes, les hépatocarcinomes et les hépatocytes en régénération, et son expression est associée à plusieurs maladies impliquant une régénération active du foie, comme les hépatites et la tyrosinémie par exemple (123). De plus, au cours du développement, l'AFP est réprimée prématurément et de façon réversible par l'action d'hormones glucocorticoïdes (GC) exogènes (16), qui activent la maturation et réduisent la prolifération des hépatocytes. Fait à noter, les hépatomes deviennent souvent résistants à ces effets, autant sur l'AFP que sur la prolifération cellulaire (15). Comme l'expression de l'AFP est régulée principalement de façon transcriptionnelle et que c'est la première fonction hépatique à être exprimée par le foie fœtal (dès la phase de spécification, voir section 1.3.2), il semble évident que ce gène soit activé par des facteurs de transcription précoces de la différenciation hépatique. Le caractère carcino-embryonnaire du gène *AFP* et la résistance des hépatomes aux effets répressifs des hormones glucocorticoïdes font donc de ce gène un excellent modèle d'étude afin d'identifier les différents mécanismes de différenciation qui sont déréglés dans les cancers hépatiques. Ceci constitue l'objectif immédiat de cette thèse.

1.2 Biologie du cancer

Malgré l'hétérogénéité retrouvée dans les différents types de cancer en ce qui a trait à leur localisation, leurs symptômes et leur pronostic, les mécanismes cellulaires menant à la transformation tumorale opèrent selon des sentiers communs. Alors, comment se forment ces cancers?

1.2.1 Cancer et différenciation

Tout organisme pluricellulaire doit coordonner de façon précise chacune de ses cellules pour s'assurer de son bon fonctionnement global. Ainsi, chaque cellule doit obéir à certaines règles (provenant des signaux endocrines et paracrines de l'organisme) qui lui dictent le comportement à adopter afin d'assurer l'homéostasie des tissus et de l'organisme. À l'intérieur d'un tissu différencié, l'homéostasie est maintenue par plusieurs mécanismes fondamentaux. Tout d'abord un équilibre entre des signaux prolifératifs et anti-prolifératifs favorise normalement la quiescence des cellules. De plus, des signaux de survie et de mort cellulaire s'opposent à l'intérieur des tissus afin de permettre aux cellules saines de survivre dans cet environnement alors que les cellules anormales seront induites vers la voie de l'apoptose, évitant ainsi la propagation d'anomalies à l'intérieur des tissus. Les cellules sont également confinées à l'intérieur des tissus par des contraintes physiques introduites principalement par la présence des cellules avoisinantes, de la matrice extracellulaire et de vaisseaux sanguins à proximité pour l'apport en nutriment. Finalement, le raccourcissement des télomères à l'extrémité des chromosomes à chaque cycle cellulaire permet de limiter le potentiel réplicatif de chaque cellule à un nombre fini ce qui empêche une cellule d'accumuler et de transmettre trop de mutations génétiques.

Les cancers surviennent lorsqu'une ou plusieurs cellules échappent à ces contrôles et commencent à se comporter de façon dérégulée, mettant en péril l'homéostasie de l'organisme (revue dans (88)). Cette dérégulation des sentiers cellulaires est occasionnée par des mutations survenant entre autres lors de la réplication cellulaire ou en présence d'agents mutagènes. Les cellules tumorales vont ainsi gagner un avantage sélectif sur les cellules normales en détournant certains sentiers utilisés au cours du développement normal, notamment ceux reliés à la prolifération, à la migration cellulaire et à la vascularisation, pour échapper à la quiescence et se propager. Les caractéristiques

cellulaires des tumeurs les rapprochent d'ailleurs beaucoup de cellules d'un niveau de différenciation plus précoce car elles réexpriment souvent des fonctions fœtales ou immatures, ce qui permet de considérer le cancer comme une maladie de différenciation cellulaire (1).

1.2.2 Origine cellulaire du cancer : le cas de l'hépatocarcinome

On retrouve principalement deux façons de concevoir l'origine cellulaire du cancer. En premier lieu, les cancers pourraient prendre source de cellules matures qui se sont par la suite dédifférenciées, c'est-à-dire qu'elles ont perdu des traits cellulaires matures. Cette façon de voir les cancers a été jusqu'à maintenant la plus répandue; cependant, de plus en plus de groupes de recherche tendent maintenant à favoriser un autre mode de pensée, c'est-à-dire que les cancers pourraient provenir de cellules souches ayant perdu la capacité de se différencier, ce qui introduit le concept de cellules souches cancéreuses (revue dans (198)).

Comme pratiquement tous les tissus contiennent des cellules souches ou progénitrices, qui ont donc la capacité de croître et de se renouveler, il est facilement concevable que celles-ci puissent représenter une source non négligeable de cancers. Deux principaux indices nous amènent donc à considérer cette hypothèse. D'abord, les protocoles d'induction de tumeurs hépatiques (particulièrement des hépatocarcinomes) consistent souvent en l'administration d'un agent carcinogène inhibant la prolifération des hépatocytes couplé à un stimulus de régénération, ce qui active les cellules progénitrices présentes dans le foie, appelées aussi cellules ovals (6). Celles-ci vont alors se mettre à proliférer (et à exprimer l'AFP) ce qui fait de ces cellules en prolifération des cibles préférentielles pour l'accumulation de mutations. Ensuite, plus de la moitié des foyers dysplasiques de petites cellules dans le foie (les lésions précurseurs les plus précoces de la tumorigenèse hépatique) contiennent des cellules ovals et des cellules d'un phénotype intermédiaire entre celles-ci et les hépatocytes différenciés (129). Comme on n'y retrouve pas de cellules plus différenciées, il semble improbable que ces tumeurs proviennent des hépatocytes matures.

Un des problèmes concernant le traitement des patients atteints d'un cancer semble provenir de ces mêmes cellules souches qui vont souvent être résistantes au traitement anti-

tumoral (revue dans (4) et (252)). Suite à des traitements éradiquant des cellules tumorales partiellement différenciées, ces cellules souches tumorales vont donc pouvoir reformer intégralement la tumeur après les traitements pour mener à une rechute du patient. Donc l'application de thérapies différenciatrices permettrait entre autres d'épuiser le réservoir de cellules souches tumorales en leur faisant perdre leur caractère souche, ce qui permettrait de mieux traiter la tumeur et d'éliminer les risques de récives. Si une cellule différenciée répond à un traitement anti-tumoral alors qu'une cellule souche y est résistante, pousser la cellule souche vers un stade de différenciation plus tardif pourrait permettre de traiter et d'éliminer ces cellules (5). Par ailleurs, réactiver ou forcer un programme de différenciation particulier pourrait permettre de reprogrammer une cellule tumorale ayant passé le stade souche et la mener ultimement vers l'arrêt de sa prolifération ou la quiescence.

Mais comment forcer des cellules tumorales à se différencier? Là est toute la question et notre approche exploite le modèle de la régulation transcriptionnelle du gène *AFP* pour y parvenir. Avant toute chose, pour bien situer et comprendre les processus régulant l'expression de l'AFP dans le contexte du développement hépatique, voici les bases de ce processus complexe.

1.3 Développement hépatique

Plusieurs étapes distinctes se succèdent de façon précise au cours de l'embryogenèse afin de former un foie mature capable d'assurer ses nombreuses fonctions de détoxification, de métabolisme énergétique, de production des protéines sériques ainsi que de synthèse des acides biliaires. Cette succession d'étapes permet d'établir un réseau transcriptionnel stable permettant de mettre en place le phénotype hépatique. Voici donc une brève description des différentes étapes et des facteurs qui y sont impliqués.

1.3.1 Compétence

La différenciation hépatique débute au niveau de l'endoderme ventral du tube digestif qui se forme après la gastrulation (78, 265). C'est seulement à cet endroit et dans une fenêtre de temps précise que pourront être induits les gènes menant à la différenciation hépatique (259). Ce phénomène de compétence peut être expliqué par la présence préalable dans ces cellules de facteurs qui sont nécessaires à l'induction des gènes de différenciation. Dans le

développement hépatique, deux régulateurs endodermiques très importants, soit HNF3 β /FOXA2 et GATA6, remplissent cette fonction (24, 39).

HNF3 β , un facteur de transcription de la famille Forkhead box, joue un rôle clé au cours de la gastrulation, dans la formation du nœud et l'établissement de la ligne primitive, précurseur de l'endoderme (71). Ces événements sont cruciaux pour les étapes subséquentes de l'embryogenèse. L'expression de cette protéine est par la suite restreinte principalement aux cellules endodermiques qui donneront naissance au foie, aux reins, au pancréas et aux intestins (7). Les facteurs de la famille GATA sont pour leur part des facteurs de transcription à doigts de zinc qui sont de puissants inducteurs du phénotype endodermique (161, 190). GATA6 et GATA4 plus particulièrement se sont avérés essentiels pour l'induction de l'hépatogenèse (266), tout comme HNF3 β (124). Ces deux familles de protéines semblent donc jouer un rôle primordial dans l'initiation et le maintien de la lignée endodermique et aussi dans la compétence à la différenciation hépatique (revue dans (259)).

L'étude de la région amplificatrice du gène de l'albumine, un gène hépatique exprimé au cours de la vie fœtale et chez l'adulte, a permis d'établir les fondements moléculaires de ce processus de compétence hépatocellulaire. Cette région amplificatrice possède des sites de liaison pour plusieurs protéines dont HNF3 et GATA. Lorsque des empreintes génomiques *in vivo* ont été réalisées sur cette région au cours du développement embryonnaire, seuls les sites de liaison pour HNF3 et GATA étaient occupés par ces facteurs au jour embryonnaire 7 (E7), avant même que ne soit transcrit le gène de l'albumine et ce, seulement dans les tissus endodermiques pré-hépatiques ayant le potentiel de l'induire (24, 83). De plus, il a été démontré que HNF3 β et GATA4 lient leur site de liaison même lorsque celui-ci est disposé à l'intérieur de la structure compacte de la chromatine (33, 40), probablement, du moins dans HNF3, par la présence d'un domaine globulaire homologue à l'histone H5 (41). La liaison de ces deux facteurs à leur site altère la conformation chromatinienne ce qui libère les sites adjacents des contraintes chromatiniennes et permet la liaison subséquente des autres activateurs du locus albumine (39). Cela fait de HNF3 et GATA des facteurs pionniers dans l'ouverture de la chromatine et l'établissement de domaines de compétence

transcriptionnelle, c'est-à-dire des domaines chromatinien devenus accessibles à d'autres facteurs de transcription.

1.3.2 Induction de l'hépatogenèse

La spécification de la voie hépatique se produit au jour E8-9 (chez la souris), alors que l'endoderme ventral du tube digestif se retrouve à proximité du mésoderme cardiaque et juxtaposé au septum transversum, tel que schématisé à la figure 1-1. Ces deux tissus d'origine mésodermique vont sécréter des facteurs solubles qui vont agir de concert pour induire la différenciation de l'endoderme. Ainsi les cellules mésodermiques du septum transversum vont sécréter les facteurs BMP-2 et BMP-4 de la superfamille de TGF- β (199) alors que le mésoderme cardiaque va sécréter des facteurs de la famille FGF, principalement FGF1 et FGF2 (103). Ces derniers mènent à l'activation de sentiers de signalisation endodermiques qui vont permettre d'induire le phénotype hépatique tout en réprimant le programme de différenciation pancréatique (56). C'est ainsi que l'endoderme formera les hépatoblastes, cellules progénitrices qui vont mener à la formation des deux types cellulaires majeurs du foie soient les hépatocytes, l'unité métabolique du foie mature, et les cholangiocytes, les cellules des canaux biliaires (74, 209).

L'apparition des hépatoblastes est caractérisée entre autres par l'induction dans ces cellules de la transcription des gènes AFP et ALB qui sont parmi les marqueurs les plus précoces de ces cellules. De plus, cette étape est aussi marquée par l'induction des facteurs de transcription hépatique HNF4, HNF1 α et des membres de la famille C/EBP (23, 251) dans les hépatoblastes. Ces facteurs transcriptionnels sont des régulateurs clés du phénotype hépatique puisqu'ils contribuent à l'établissement d'un réseau transcriptionnel qui s'avère primordial pour la suite du développement hépatique (118). La hiérarchie simplifiée des facteurs de transcription hépatiques opérant au cours du développement embryonnaire et menant à l'activation du gène AFP est schématisée dans la figure 1-2. Le facteur de transcription « fetoprotein transcription factor » (FTF) sera introduit plus en détail à la section 1.6.1.1.

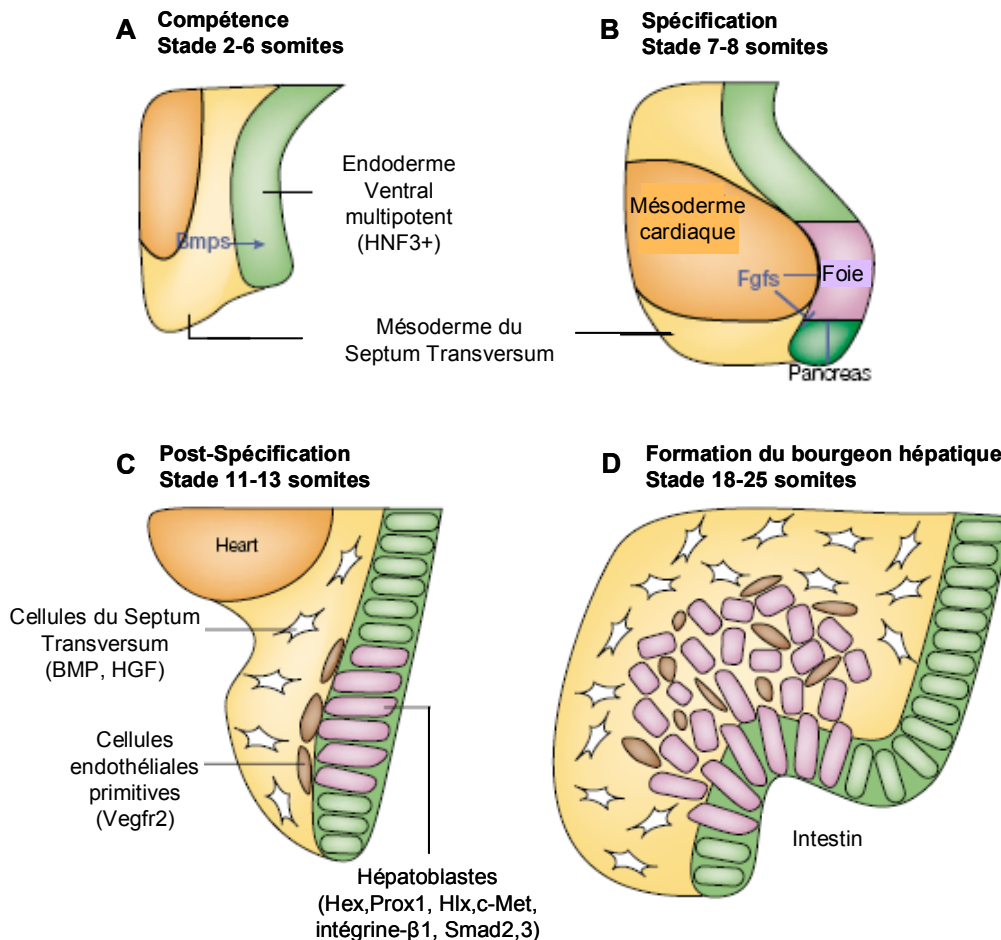


Figure 1-1 Étapes précoces du développement hépatique

Le développement embryonnaire du foie est accompli au cours de quatre étapes cruciales soit la compétence, la spécification, la post-spécification et la formation du bourgeon hépatique. A) Au cours du stade de compétence, les cellules du septum transversum sécrètent des facteurs BMP pour induire la compétence hépatique de l'endoderme ventral adjacent. B) Le mésoderme cardiaque sécrète quant à lui des facteurs FGF qui, en coopérant avec les BMP, vont spécifier la voie hépatique au détriment de la voie pancréatique. C) Au stade post-spécification, plusieurs signaux émis par les cellules du septum transversum et par les cellules endothéliales adjacentes aux hépatoblastes vont promouvoir la croissance et la migration des hépatoblastes vers le septum transversum, menant (en D) à la formation du bourgeon hépatique. Les gènes identifiés entre parenthèses sont essentiels à ces processus.

Adapté de (259)

1.3.3 Migration et prolifération cellulaire

Après l'apparition des premières cellules hépatiques chez l'embryon, plusieurs étapes doivent être coordonnées afin de mener à la formation du foie (revue dans (265)). Ainsi les

hépatoblastes doivent se mettre à proliférer et à migrer dans le septum transversum afin d'éventuellement générer une masse suffisante pour le bon fonctionnement du foie mature tout en constituant une niche primordiale pour supporter l'hématopoïèse (c'est à cette période que les cellules hématopoïétiques viennent coloniser le primordium hépatique, soit au jour E10 chez la souris) (258). De plus tous ces événements doivent survenir tout en permettant la formation conjointe de la vasculature hépatique qui permettra de nourrir les cellules tout au long du développement jusque chez l'adulte. Tous ces phénomènes sont induits encore une fois par des interactions entre les hépatoblastes et les différents autres types cellulaires composant ce système.

Donc après que les hépatoblastes aient proliféré pour former une structure en forme de colonne suite aux signaux des mésodermes adjacents, il y a formation du bourgeon hépatique. Pour ce faire, il y a perte de la membrane basale et décollement des hépatoblastes qui migrent dans le septum transversum. Cette étape est régulée principalement par le facteur de transcription Prox1 qui diminue les interactions intercellulaires, en diminuant la quantité d'E-cadhérine dans les hépatoblastes (213), et en remodelant la matrice extracellulaire, par l'induction de protéases extracellulaires (172). L'importance, à cette étape, des interactions cellulaires avec la matrice extracellulaire, est soulignée par la dépendance de l'hépatogenèse aux signaux provenant de l'intégrine $\beta 1$ (64). Il y a aussi présence dans le bourgeon hépatique de cellules endothéliales qui vont mener à la formation des vaisseaux sanguins. Ces cellules, tout comme les cellules hématopoïétiques, vont influencer positivement la prolifération et la maturation des hépatoblastes (146). Plusieurs facteurs sont par la suite nécessaires à la croissance et la survie des cellules du bourgeon hépatique. Parmi ceux-ci on retrouve encore une fois GATA6, essentiel à la prolifération des hépatoblastes (266), mais aussi les BMP et FGF toujours sécrétés par les cellules du septum transversum et du mésoderme cardiaque, respectivement (103, 199), et un autre facteur de survie sécrété par le septum transversum, soit HGF qui se fixe à son récepteur c-met à la surface des hépatoblastes (202).

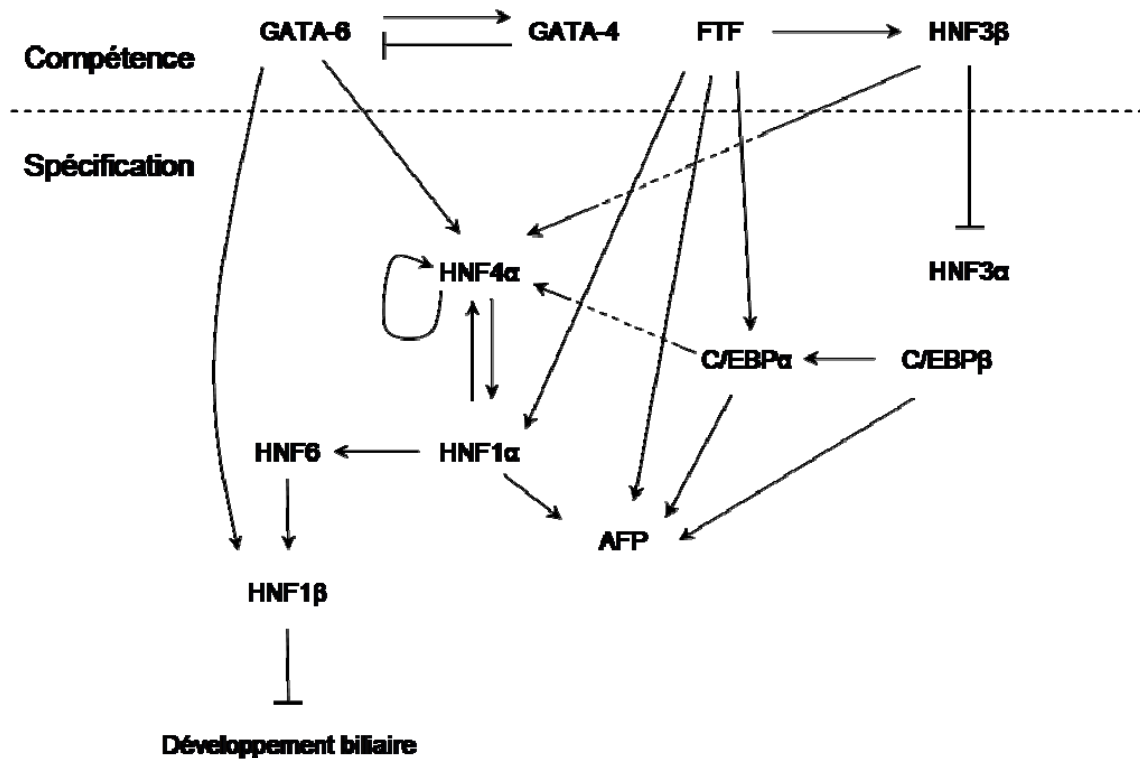


Figure 1-2 Interactions entre les principaux facteurs de transcription impliqués dans le développement hépatique

Une pointe de flèche symbolise une régulation positive alors qu'un trait perpendiculaire symbolise une régulation négative.

Adapté de (44)

La croissance et l'expansion des hépatoblastes dépendent enfin d'une voie de signalisation très bien caractérisée et essentielle dans plusieurs processus développementaux, la voie WNT/ β -caténine. Cette voie de signalisation est également nécessaire à la différenciation des hépatoblastes en cellules biliaires, qui s'initie à cette étape du développement (94, 154). Ce processus requiert l'inactivation du facteur de transcription HNF6 dont le rôle, en activant HNF1 β , est de contrôler la morphogenèse biliaire (43).

1.3.4 Différenciation terminale

La dernière étape du développement hépatique implique des changements cellulaires majeurs. Ainsi, aux environs du jour E17 (chez la souris) les hépatoblastes se différencient en hépatocytes qui vont former, par le biais des jonctions intercellulaires, un épithélium polarisé, le côté apical sécrétant les acides biliaires alors que le côté basal repose sur les

cellules endothéliales. Cette architecture est très importante pour l'expression des gènes du foie mature puisque la suppression des jonctions cellulaires amène la perte de l'expression de plusieurs gènes reliés au phénotype hépatique adulte (42).

L'étape de différenciation terminale est encore une fois régulée par des interactions avec la matrice extracellulaire et par des facteurs sécrétés par les cellules hématopoïétiques, dont l'oncostatine M (OSM) qui, lorsqu'utilisée en combinaison avec les hormones glucocorticoïdes, permet d'induire la maturation de cellules hépatiques embryonnaires en culture (105-107). Cette maturation est caractérisée par la perte de la capacité de ces cellules hépatiques à supporter l'hématopoïèse, phénomène qui se produit aussi *in vivo* alors que les cellules hématopoïétiques migrent vers la moelle osseuse et la rate lors de la différenciation terminale du foie (106, 111).

La différenciation terminale des hépatocytes nécessite enfin l'action des « Facteurs de Transcription Enrichis au Foie » (FTEF), groupe de protéines représenté principalement par les membres de la famille HNF et de la famille C/EBP. Parmi ceux-ci, HNF4 α et C/EBP α semblent y jouer les rôles les plus importants. HNF4 joue un rôle primordial dans l'établissement de l'architecture du foie mature en régulant l'expression de plusieurs gènes impliqués dans les contacts intercellulaires caractéristiques des épithéliums (176, 215, 248). De plus, HNF4 est au cœur du réseau transcriptionnel assurant le maintien du phénotype différencié des hépatocytes : il est notamment lié aux régions régulatrices d'environ 40% des gènes occupés par l'ARN polymérase II dans les hépatocytes (167) et il coopère avec tous les autres FTEF dans l'établissement du réseau de régulation croisée qui permet la stabilité du phénotype hépatique (118, 166). Finalement, HNF4 semble requis pour la régionalisation, observée dans le foie mature, de l'expression de gènes impliqués entre autres dans la production de l'urée, comme la glutamate synthétase (218). C/EBP α pour sa part est responsable, entre autres, de l'induction de plusieurs gènes métaboliques essentiels au fonctionnement du foie adulte, en plus d'être impliqué dans l'arrêt de la prolifération qui se produit lors de la différenciation terminale des hépatocytes (230, 246).

L'étape de différenciation terminale des hépatocytes mène à l'activation de la transcription de plusieurs autres gènes codant de nouveaux facteurs de transcription, des récepteurs nucléaires, des protéines sériques et c'est aussi à ce moment que survient la répression de la

transcription du gène *AFP* par des mécanismes spécifiques qui font l'objet de la présente thèse.

1.4 Transcription par l'ARN Polymérase II

La plupart des changements phénotypiques majeurs observés au cours du développement surviennent au niveau transcriptionnel, par la production différentielle de nouveaux ARNm. Ce type d'ARN est transcrit exclusivement par l'ARN polymérase II et les mécanismes complexes régulant son activité sont de mieux en mieux caractérisés.

1.4.1 Complexe de Préinitiation

L'ARN polymérase II (pol II) est un complexe protéique d'environ 500 kDa qui n'est capable en soi ni d'initier la transcription ni de reconnaître les différents promoteurs auxquels il doit se fixer pour produire les ARNm requis par la cellule. Pour ce faire il nécessite la présence de facteurs protéiques, au nombre de cinq et appelés Facteurs Généraux de Transcription (GTF) (revue dans (255)). L'assemblage de la pol II et des GTF mène à la formation du complexe de préinitiation de la transcription (PIC), qui est compétent pour initier la transcription d'un gène.

Parmi les GTF, le facteur TFIID contient plusieurs sous-unités dont la protéine TBP, la seule du complexe à se lier à l'ADN de façon spécifique. TFIID est donc le premier facteur à s'attacher au promoteur d'un gène, en reconnaissant la boîte TATA par la sous-unité TBP (178). La liaison de TFIID à la boîte TATA induit une courbure de l'ADN qui facilitera par la suite l'interaction entre la pol II et l'ADN (165). La présence de TFIID au promoteur d'un gène permet ensuite l'arrivée de TFIIB qui sert entre autres de pont pour l'interaction entre TFIID et l'ARN polymérase II et qui permettrait de positionner la polymérase au bon endroit pour initier la transcription (128). Ensuite l'ARN polymérase II fait son entrée avec le facteur TFIIF, qui interagit avec la polymérase et stabilise le complexe formé entre TFIID, TFIIB et la polymérase II. La formation de ce complexe permet ensuite l'entrée de TFIIE qui à son tour recrute et régule le dernier facteur, TFIIH. TFIIH est le seul GTF à posséder une activité enzymatique puisqu'il comporte deux sous-unités ADN hélicase ATP-dépendante et une sous-unité kinase cycline-dépendante (165). Ces activités enzymatiques, tout comme la présence de TFIIE et TFIIF, sont nécessaires pour l'ouverture

de l'ADN et la formation de la bulle transcriptionnelle. Ces trois mêmes facteurs affecteront aussi les étapes subséquentes du processus transcriptionnel en favorisant la transition de l'ARN polymérase II vers l'étape d'élongation de la transcription (61).

Enfin, la plus grosse composante du PIC, l'ARN polymérase II, possède un domaine C-terminal (CTD) contenant des répétitions de l'heptapeptide Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. Ces répétitions subissent plusieurs modifications post-traductionnelles régulant l'activité de la polymérase (revue dans (179)). Cette région est notamment phosphorylée par TFIIH pour conditionner l'initiation de la transcription. De plus, le recrutement d'autres facteurs importants pour les étapes subséquentes de la transcription est effectué via le CTD, soit : l'ajout de la coiffe en 5', du poly-A en 3' et l'épissage de l'ARNm.

La formation du PIC est donc une étape cruciale pour l'initiation de la transcription, mais ce processus général soulève une question primordiale : comment le complexe GTF/pol II est-il ciblé spécifiquement sur les gènes qui doivent être transcrits à un moment précis?

1.4.2 Facteurs de transcription

Afin de permettre une régulation spatio-temporelle fine de la transcription, tous les promoteurs de gènes transcrits par l'ARN polymérase II possèdent, en plus d'une boîte TATA (pour la majorité des gènes), des sites de liaison pour d'autres type de protéines : les facteurs de transcription. Ceux-ci se lient spécifiquement à l'ADN des régions régulatrices de leurs gènes cibles par leur domaine de liaison à l'ADN (DBD) et vont orchestrer le recrutement du PIC et permettre la modulation de l'expression de ces gènes. La spécificité des différents facteurs de transcription est assurée par des différences de séquences peptidiques et de conformations de leur DBD. La présence de régions génomiques régulatrices et modulaires d'un gène à l'autre, et de plusieurs facteurs de transcription différents à l'intérieur d'une même cellule, permet donc de cibler spécifiquement et différenciellement un grand éventail de gènes.

Les facteurs de transcription sont regroupés selon la conservation de certains domaines protéiques fonctionnels importants pour leur activité. Ainsi, il existe différentes familles de facteurs de transcription, dont la superfamille des récepteurs nucléaires qui représente une des plus grandes familles connues jusqu'à présent et à laquelle appartient FTF (voir section

1.6.1.1). Cette famille de récepteurs regroupe des membres qui sont très conservés à travers les espèces et dont certains sont retrouvés chez tous les organismes eucaryotes. Vu leurs nombreux rôles exercés au sein de la cellule, ces protéines ont fait l'objet de plusieurs études qui ont mené à une caractérisation très précise de celles-ci (revue dans (10)). Ainsi, tel qu'il est schématisé à la figure 1-3, les différents récepteurs nucléaires présentent une structure très conservée pour tous les membres de la famille. Parmi les domaines fonctionnels les plus conservés de cette famille, on retrouve le DBD et le domaine de liaison pour un ligand (LBD). Le DBD, situé au centre de la molécule, comprend deux structures en doigt de zinc ainsi que deux hélices α hautement conservées (69). La première hélice contient la boîte P, et permet la reconnaissance d'une séquence d'ADN précise dans le sillon majeur, soit l'hémisite de type AGGTCA, ce qui induit un changement de conformation de la boîte D dans le deuxième doigt de zinc du DBD, ce qui facilite la dimérisation du récepteur (12). L'importance de la boîte P pour diriger la liaison spécifique des récepteurs nucléaires est soulignée par des travaux de mutagenèse dans lesquels la mutation de cette région permet à un récepteur nucléaire de se lier à une nouvelle séquence d'ADN tout en ne permettant plus à cette protéine de se lier à sa séquence de reconnaissance normale (79).

Le LBD, situé quant à lui en C-terminal des récepteurs nucléaires, contient un domaine d'activation de la transcription (AF-2) qui permet le recrutement de cofacteurs essentiels à son activité transcriptionnelle. La liaison au LBD de ligands va mener à un changement de conformation de celui-ci et au recrutement de coactivateurs (revue dans (256)). Ce domaine est aussi en grande partie responsable de la dimérisation des récepteurs nucléaires lors de leur liaison à l'ADN (116). La partie N-terminale des récepteurs nucléaires contient le domaine le moins conservé de ces protéines, soit le premier domaine d'activation (AF-1) qui interagit avec des cofacteurs de façon indépendante de la présence du ligand (226).

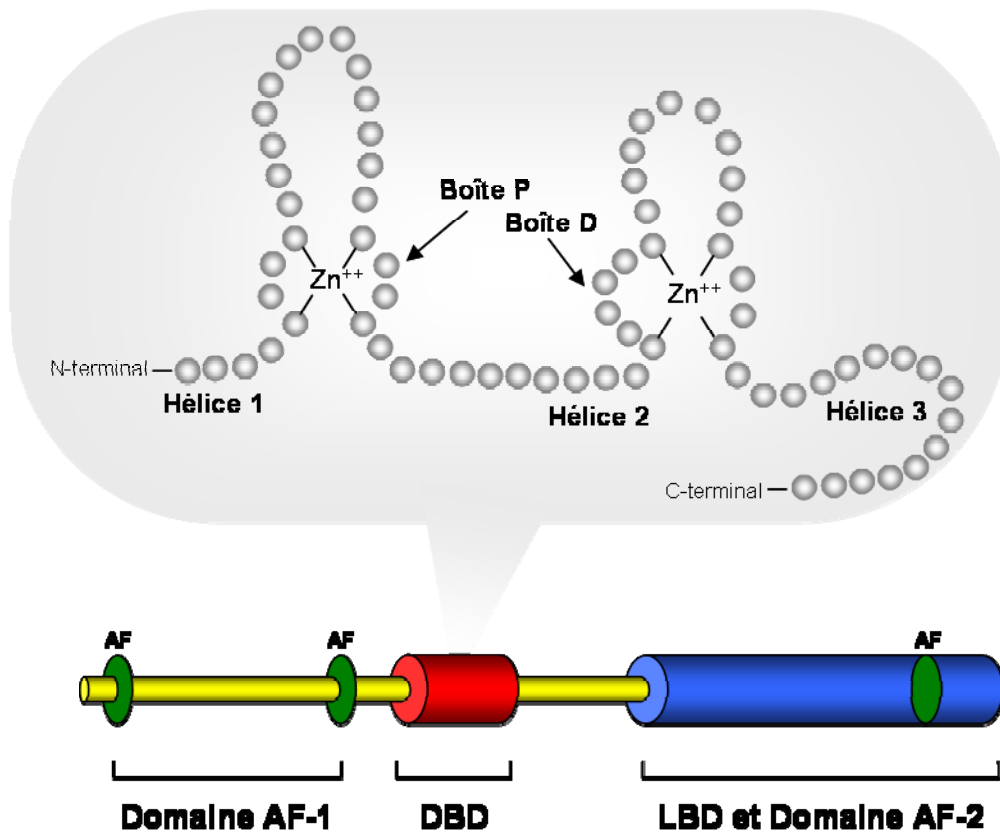


Figure 1-3 Structure des récepteurs nucléaires

Schéma de la structure générale des protéines de la superfamille des récepteurs nucléaires. Les trois domaines fonctionnels des membres de cette famille sont identifiés au bas de la figure. L'encadré, au haut de la figure, représente une structure plus détaillée du DBD avec les deux doigts de zinc en évidence. AF, fonction d'activation; DBD, Domaine de liaison à l'ADN; LBD, domaine de liaison du ligand.

Adapté de (193)

Comme une région régulatrice d'un gène peut posséder plusieurs sites de liaison différents, les interactions entre les protéines qui s'y lient peuvent mener à des réponses distinctes. Par exemple, deux facteurs peuvent se lier à une séquence d'ADN de façon coopérative ou même synergique, c'est-à-dire que le gène sera activé plus fortement par la présence des deux protéines alors qu'une protéine seule donnerait un niveau de transcription de base (31). Dans un deuxième cas, deux facteurs peuvent se lier à une séquence d'ADN de façon exclusive, c'est-à-dire que les deux protéines auront un effet antagoniste sur la transcription d'un même gène en entrant en compétition pour la liaison de la même séquence d'ADN (18, 219). De plus, certaines protéines ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ADN

(comme le récepteur nucléaire SHP par exemple) et la liaison de ces protéines à d'autres activateurs de la transcription inhibe l'activité transcriptionnelle de ceux-ci (205, 206).

Cette façon de voir la transcription demeure toutefois très simplifiée. Comme l'ADN est enroulé autour d'octamères d'histones pour former la structure dense et compacte qu'est la chromatine, les processus transcriptionnels doivent d'abord surmonter cet obstacle pour avoir accès à l'ADN. Plusieurs facteurs de transcription étant incapables de le surmonter par eux-mêmes (39), ils vont donc nécessiter la présence de cofacteurs particuliers qui vont être recrutés par les domaines d'activation de la transcription portés par les facteurs de transcription.

1.4.3 Cofacteurs

On retrouve encore une fois une grande diversité de familles de protéines agissant comme cofacteurs. Celles-ci vont effectuer plusieurs fonctions cruciales dans la régulation de la transcription soit : I) la modification des histones pour permettre à la structure chromatinienne de se relâcher, II) le déplacement des octamères d'histones pour exposer une région d'ADN particulière, III) l'échafaudage d'un complexe protéique permettant d'établir un pont entre les différents facteurs de transcription présents sur un gène, et IV) le recrutement de la machinerie transcriptionnelle (complexe GTF/pol II) pour permettre d'initier la transcription (voir figure 1-4) (revue dans (132)). Vu la grande importance de ces familles de protéines dans la régulation de la transcription, il n'est pas surprenant de constater qu'elles semblent impliquées directement dans la régulation de plusieurs processus physiologiques fondamentaux (revue dans (216)).

1.4.3.1 Modificateurs d'histones

La régulation de l'accès à l'ADN étant primordiale dans les différents processus transcriptionnels, comment la cellule peut-elle changer le degré de compaction de la chromatine? La détermination de la structure du nucléosome, l'unité de base de la chromatine, a permis d'observer des projections disposées tout autour de cette structure dense et qui proviennent des parties N-terminales des histones (139). Ces queues d'histones contiennent plusieurs résidus pouvant être ciblés par la plupart des modifications post-traductionnelles connues à ce jour et dont certaines entraînent des changements majeurs du

degré de compaction de la chromatine. Les effets les plus marquants sur la structure nucleosomale proviennent du niveau d'acétylation des queues N-terminales des histones. Une hyperacétylation de ces régions neutralise les charges positives présentes sur les histones et affaiblit leur interaction avec l'ADN, relâchant ainsi la structure de la chromatine (125, 235). Les protéines possédant une activité histone acétyl-transférase (HAT) remplissent donc généralement un rôle de coactivateurs puisqu'elles vont rendre l'ADN accessible à la machinerie transcriptionnelle (207). Parmi ces protéines HAT nous retrouvons entre autres les protéines CBP/p300, les protéines de la famille p160, et le complexe P/CAF qui coactivent un grand éventail de gènes (133). Dans le cas inverse, une hypoacétylation des queues N-terminales accentue l'interaction entre les histones et l'ADN ce qui a pour effet de former une chromatine très dense qui n'est pas accessible aux facteurs de transcription. Ainsi, les protéines possédant une activité histone désacétylase (HDAC) jouent généralement un rôle de corépresseurs (revue dans (53)).

Ces deux types d'activités enzymatiques semblent entrer en compétition à la grandeur du génome pour contrôler les différents processus cellulaires utilisant l'ADN comme substrat. Ainsi, l'équilibre entre les activités HAT et HDAC semble occuper un rôle déterminant dans le phénotype d'une cellule, notamment ses propriétés tumorales et différenciées, comme exemplifié par les effets des inhibiteurs de HDAC sur le degré de différenciation de plusieurs lignées cellulaires et aussi sur leur tumorigénicité (revue dans (58)).

Les autres modifications post-traductionnelles touchant les histones, notamment la phosphorylation, la méthylation, la sumoylation et l'ubiquitination, ont un effet moins bien défini et on commence seulement à apprécier leur rôle dans la régulation transcriptionnelle. Quoique leur effet ne semble pas s'exercer au niveau de la structure de la chromatine comme c'est le cas pour l'acétylation/désacétylation des histones, ces marques laissées sur les histones semblent également très importantes pour la régulation transcriptionnelle et renforcent l'existence d'un « code des histones » (99). Ce code suppose qu'une modification précise sur un résidu spécifique d'une queue d'histone permet ou bloque une autre modification sur un résidu spécifique. Ce code est d'autant plus significatif que de nombreux cofacteurs possèdent des domaines protéiques capables de reconnaître ces marques. Ainsi il existe par exemple des domaines bromo et chromo qui reconnaissent

respectivement les histones acétylées et les histones méthylées (52). Ces marques permettraient de stabiliser certains complexes protéiques sur les régions régulatrices d'un gène et ainsi favoriser l'action de ces complexes. Deux exemples de cette situation sont l'ancrage stable des corépresseurs SMRT et Sin3 sur la chromatine en présence d'histones H3 hypoacétylées et le recrutement de facteurs d'épissage sur les histones H3 triméthylées sur la lysine 4 (211, 241).

Outre les modifications d'histones, les cofacteurs possédant une activité enzymatique peuvent aussi cibler certains résidus présents sur les autres cofacteurs et aussi sur les facteurs de transcription engendrant ainsi une autre variété de réponses dépendamment des résidus ciblés (revue dans (242)).

Enfin, le domaine enzymatique d'un cofacteur n'est toutefois pas toujours requis pour moduler la transcription d'un gène. Certains cofacteurs vont plutôt servir de protéines d'échafaudage qui vont permettre l'assemblage d'autres cofacteurs dont l'activité enzymatique est essentielle à la transcription de ce gène (30). Le contexte présent sur une région régulatrice est donc très important pour ce qui est de la réponse d'un gène à un cofacteur donné.

1.4.3.2 Remodeleurs dépendants de l'ATP

L'autre classe majeure de cofacteurs est représentée par des complexes protéiques possédant une activité ATPase et qui ont la capacité de déplacer les nucléosomes pour rendre l'ADN accessible. Ces complexes sont regroupés sous trois principales familles soient : SWI/SNF, ISWI et Tip60 (revue dans (72)). Chaque sous-unité présente à l'intérieur de ces complexes joue un rôle spécifique. Certaines sous-unités se lient aux domaines activateurs des facteurs de transcription pour cibler le complexe à un gène précis alors que d'autres sous-unités sont responsables de l'activité catalytique du complexe ou de la régulation de cette activité.

Les remodeleurs dépendants de l'ATP agissent en transloquant l'ADN autour des nucléosomes ou tout simplement en désassemblant les nucléosomes présents (136, 137), laissant ainsi des fragments d'ADN nus (principalement au niveau des promoteurs des gènes). Le remaniement des nucléosomes peut agir de façon positive ou négative sur la

transcription d'un gène, dépendamment du contexte génomique. Leur fonction consiste surtout à éliminer le nucléosome présent sur la boîte TATA d'un gène pour permettre la formation du PIC (263). Dans certains cas cependant, ces complexes vont causer le déplacement d'un nucléosome sur cette région pour ainsi réprimer la transcription du gène (155).

Une question qui n'a toujours pas été clairement résolue est la hiérarchie selon laquelle les cofacteurs interviennent dans l'ouverture de la chromatine d'un locus donné. Est-ce que l'activité ATP-dépendante des complexes de remodelage de la chromatine précède ou suit l'activité acétyl-transférase des coactivateurs pour activer la transcription d'un gène? Il semble qu'il y ait un ordre de recrutement défini de ces différents complexes, qui dépend du gène ciblé et encore une fois du contexte qui s'y crée (149). Notons à cet égard que l'activité de plusieurs de ces cofacteurs, voire tous, est modulée par les voies de signalisation cellulaire, ce qui ajoute une autre dimension de complexité dans la réponse transcriptionnelle des gènes dans différentes conditions (132, 134, 216).

1.4.4 Complexe Mediator

À mi-chemin entre un cofacteur et un GTF se retrouve un complexe particulièrement intéressant dans la régulation transcriptionnelle, soit le complexe Mediator. Ce complexe a la particularité d'être requis pour la majorité sinon la totalité des processus transcriptionnels impliquant l'ARN polymérase II (225). Ses effets se retrouvent principalement à deux niveaux : premièrement il sert d'adaptateur entre les facteurs de transcription ou les cofacteurs et l'ARN polymérase II, et deuxièmement il augmente l'efficacité et le taux d'assemblage du PIC. Ainsi, Mediator joue un rôle très important dans la communication sur de grandes distances entre les régions amplificatrices et promotrices des gènes et sa présence au niveau du site d'initiation de la transcription permet de faciliter l'initiation de la transcription en stimulant l'activité CTD kinase de TFIIH (101). De plus, le recrutement du complexe Mediator augmente aussi le taux de réinitiation de la transcription par l'ARN polymérase II (2, 117).

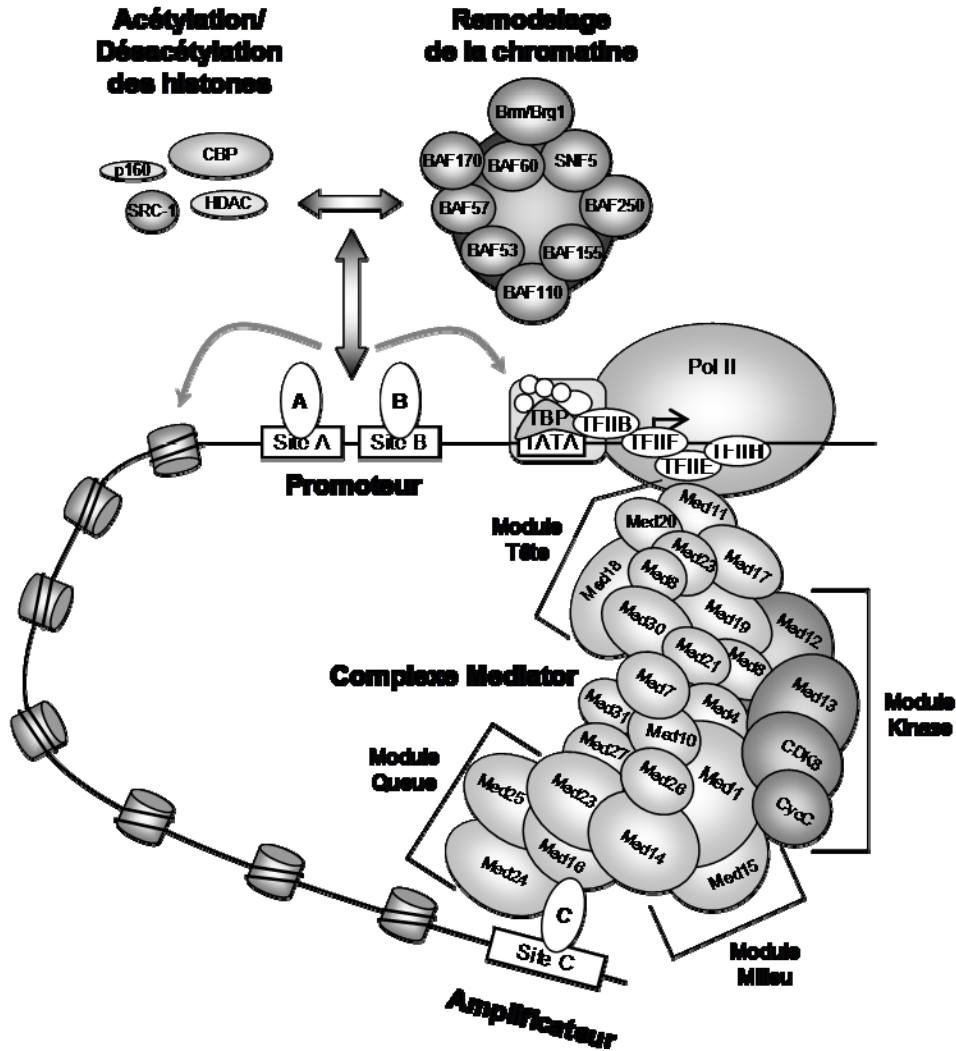


Figure 1-4 Régulation de la transcription par l'ARN polymérase II

Dans ce modèle, les régulateurs transcriptionnels (A, B et C) se lient à leur sites respectifs et recrutent des cofacteurs aux effets multiples. Premièrement, le recrutement de cofacteurs modifiant l'état d'acétylation des histones ou remodelant la chromatine, représenté ici au niveau du promoteur, permet de moduler la structure chromatinienne et influencer la transcription du gène. De plus, le recrutement du complexe Mediator, représenté ici au niveau de l'amplificateur, permet entre autres de faciliter le recrutement de l'ARN polymérase II sur le site d'initiation de la transcription et de stimuler l'activité du PIC.

Adapté de (140)

Le complexe Mediator est composé d'environ 30 sous-unités. Plusieurs sous-unités permettent son interaction avec des facteurs de transcription ou des cofacteurs, et ainsi son recrutement ciblé sur les gènes (223). De plus, ces différentes interactions avec les facteurs de transcription modulent sa conformation tridimensionnelle et par le fait même son action

sur le gène auquel il est recruté (221, 222). Ces sous-unités sont organisées en trois principaux modules : un module de tête, un module de milieu et un module de queue. Le module de tête interagit avec le complexe formé par l'ARN polymérase II et TFIIF, ce qui permet de stabiliser le complexe Mediator au niveau du promoteur des gènes à activer (224). Les modules de milieu et de queue permettent l'interaction avec les facteurs de transcription et les cofacteurs. Ces trois modules sont présents invariablement à l'intérieur du complexe alors qu'un quatrième module, possédant une activité kinase, se retrouve seulement dans des complexes réprimant la transcription (3). La composition du complexe Mediator et son action spécifique diffèrent donc d'un gène à l'autre dépendamment, encore une fois, du contexte génomique et cellulaire.

1.5 Les hormones glucocorticoïdes

Les hormones glucocorticoïdes (GC) sont des hormones stéroïdiennes synthétisées et sécrétées par le cortex surrénalien sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Les hormones glucocorticoïdes exercent plusieurs rôles homéostatiques dans l'organisme. Entre autres, elles antagonisent la signalisation de l'insuline lors du jeûne, avec un effet notamment sur le gène de la PEPCK, impliqué dans la gluconéogenèse (revue dans (201)). Elles sont aussi impliquées dans l'homéostasie des protéines et des sucres dans le foie (169, 180) ainsi que dans le métabolisme des lipides (revue dans (240)). Un déséquilibre dans la synthèse ou la sécrétion de ces hormones résulte en un effet systémique important notamment au niveau du métabolisme énergétique et de la réponse au stress.

L'importance de la signalisation par les hormones glucocorticoïdes est soulignée par le phénotype létal chez le nouveau-né obtenu par l'inactivation ciblée de GR chez la souris (45, 46). En inactivant GR spécifiquement dans les hépatocytes, un autre groupe a pu démontrer un rôle pour ce récepteur dans le contrôle post-natal de la croissance corporelle des souris, via une interaction avec la protéine STAT5, activée en réponse à plusieurs cytokines (63). De plus, les hormones glucocorticoïdes ont un effet marqué sur la différenciation de certains types cellulaires en culture, dont les hépatocytes et les adipocytes. Ainsi, ces hormones sont utilisées en cultures primaires d'hépatocytes pour maintenir les fonctions différenciées de ces cellules alors qu'elles sont utilisées pour

induire la différenciation de lignées pré-adipocytaires en adipocytes (9, 253, 254). Un rôle physiologique direct *in vivo* n'a toutefois pas encore été démontré de ce côté. Fait intéressant, l'ajout de dexaméthasone (Dex), une hormone glucocorticoïde synthétique, à une lignée cellulaire pancréatique induit sa transdifférenciation en hépatocytes (208). Enfin, les hormones GC sont aussi utilisées en clinique, à des concentrations supraphysiologiques, comme agents anti-inflammatoires (92).

1.5.1 Action activatrice du récepteur des glucocorticoïdes

Les hormones GC sont des molécules hydrophobes qui diffusent passivement dans les cellules où elles vont activer le récepteur des hormones glucocorticoïdes (GR), qui est principalement responsable des effets de ces hormones en régulant plusieurs gènes suite à sa stimulation (13). GR est un récepteur hormonal de la superfamille des récepteurs nucléaires. En absence de son ligand naturel, le cortisol, il est maintenu dans une conformation inactive et séquestré dans le cytoplasme des cellules par un complexe protéique contenant entre autres les protéines HSP90 et HSP70, deux chaperonnes moléculaires se liant au LBD de GR et assurant son bon repliement (figure 1-5) (revue dans (92)). En présence de son ligand à l'intérieur de la cellule, GR est hyperphosphorylé et change de conformation ce qui provoque le relargage du complexe de protéines chaperonnes et la translocation de GR au noyau. Arrivé dans le noyau, GR peut activer ses gènes cibles en se liant sous forme de dimères à des séquences d'ADN contenant un ou plusieurs éléments palindromiques de réponse aux hormones glucocorticoïdes (GRE) (consensus 5'-AGAACANNNTGTTCT-3'). Pour activer la transcription, GR interagit avec plusieurs cofacteurs comme CBP/p300 (120), GRIP1 (de la famille p160) (93), SWI/SNF (164) et avec Mediator par l'entremise de deux sous-unités du complexe (37).

1.5.2 Mécanismes de répression transcriptionnelle par GR

En plus de mener à l'activation de plusieurs gènes, GR peut aussi réprimer spécifiquement la transcription d'autres gènes. Il existe trois principaux mécanismes documentés par lesquels GR va réprimer directement la transcription de ses gènes cibles : par liaison directe à l'ADN, par compétition avec un activateur pour la liaison à un site chevauchant ou par la fixation de GR à une autre protéine activatrice sans nécessiter sa liaison à l'ADN.

Un exemple de la répression par GR impliquant sa liaison directe à un GRE présent sur le gène cible, est celui de la glutathione S-transférase (GST). Sur ce gène, la liaison de GR mène au recrutement du corépresseur SMRT qui va se lier aux deux autres activateurs du gène, soit C/EBP et Nrf2, ce qui mène à la répression de leur activité et à l'arrêt de la transcription du gène *GST* (109). Un exemple de la répression de la transcription par GR impliquant la compétition entre GR et un activateur pour la liaison à l'ADN est celui du gène de l'ostéocalcine : GR lie l'ADN à un site chevauchant une boîte TATA de faible affinité, ce qui empêche la liaison des facteurs de transcription généraux et, par le fait même, la transcription du gène (150, 219).

Le troisième mode de répression par GR implique sa fixation sur les activateurs de gènes cibles par des interactions protéine-protéine. Quelques gènes sont déjà connus comme étant réprimés par la fixation de GR. Parmi celles-ci, on retrouve les protéines AP-1, C/EBP, NF- κ B, NGFI-B/Nur77 (91, 130, 142, 168, 257). Malgré les similarités de ce mécanisme de répression par GR, il diffère selon le contexte présent sur ces régions cibles. Ainsi, le gène de la POMC, activé par NGFI-B/Nur77, est réprimé par la fixation de GR qui recrute HDAC2 et Brg1 (19); le gène du IL-8, activé par NF- κ B, est réprimé lorsque la fixation de GR bloque le recrutement de p-TEFb, un facteur essentiel à l'élongation par l'ARN polymérase II (138); et en ce qui concerne le gène de la collagénase-3, activé par AP-1, il est réprimé par la fixation de GR, qui recrute alors GRIP1, un cofacteur activant généralement la transcription, qui a ici un effet négatif (194).

Les souris exprimant un GR incapable de se lier à l'ADN (mutant de dimérisation) mais toujours capable d'interagir avec d'autres protéines se développent normalement et peuvent par la suite se reproduire (191). Malgré que le mutant de dimérisation de GR active encore certaines cibles directes (195), ces résultats soulignent l'importance des interactions entre GR et d'autres protéines dans l'activation comme dans la répression des gènes.

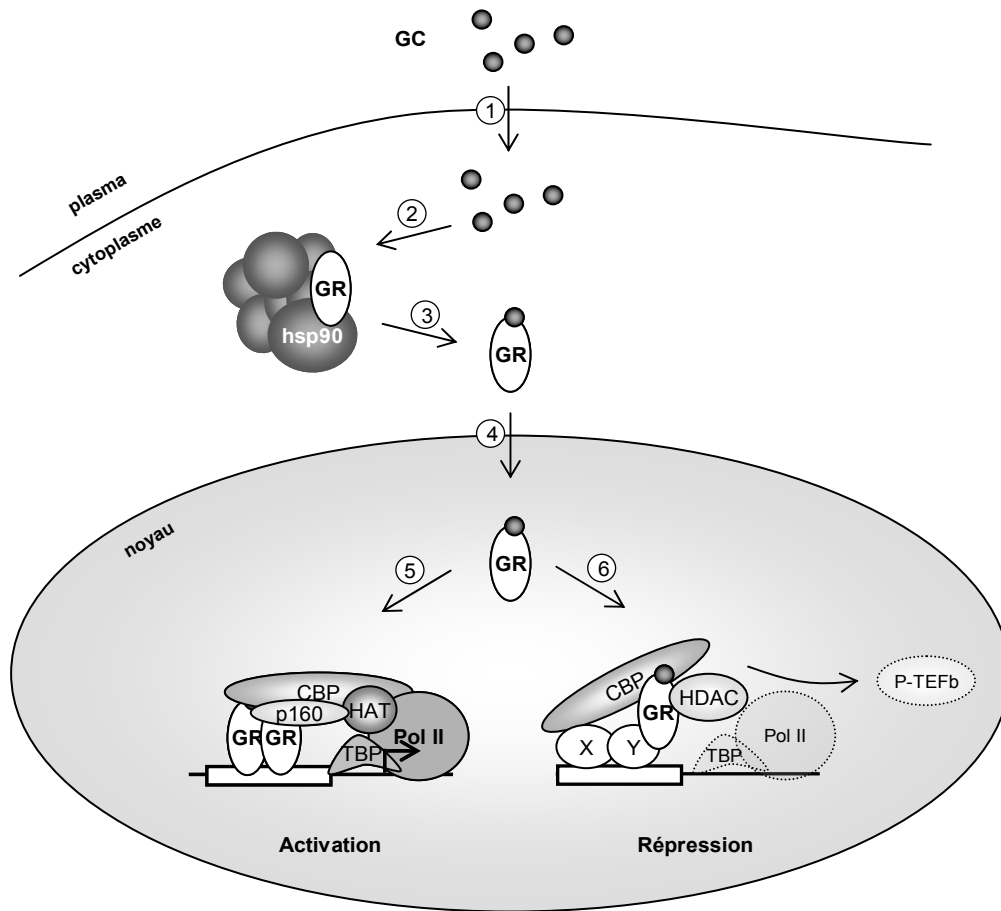


Figure 1-5 Mécanismes généraux de la régulation génique par GR

Les hormones GC diffusent passivement à l'intérieur de la cellule (1) pour aller se lier à GR (2). Après liaison de l'hormone, GR est libéré du complexe de chaperonnes le retenant dans le cytoplasme (3) et est transporté au noyau (4). Dans le noyau, GR peut réguler la transcription de deux principales façons : en se liant à des GRE sous forme d'homodimères, GR recrute des coactivateurs qui vont permettre d'activer la transcription de ses gènes cibles (5); ou, en interagissant avec d'autres facteurs de transcription, des monomères de GR recrutent des corépresseurs qui vont réprimer la transcription de ses gènes cibles (6).

Adapté de (34) et (163)

Parmi les modèles de répression transcriptionnelle par GR, celui du gène *AFP* est établi depuis longtemps, sans que son mécanisme moléculaire ait encore été élucidé, ce à quoi s'adresse la présente thèse.

1.6 Régulation transcriptionnelle de l'*AFP*

AFP est un gène faisant partie de la famille de l'albumine, exprimée par l'hépatocyte et dont l'organisation groupée sur un même chromosome est conservée entre les espèces, ce

qui suggère un partage d'éléments régulateurs entre les différents membres de la famille et l'existence possible d'une région de contrôle de locus (LCR) (123). Malgré la présence d'éléments de régulation similaires entre les divers membres de la famille, chacun possède son propre patron d'expression au cours du développement, l'albumine (ALB) étant exprimée autant chez l'embryon que chez l'adulte, l'AFP seulement chez l'embryon et l'alpha-albumine (ALF) seulement après la naissance (17, 229) (figure 1-6A et B). Plusieurs laboratoires ont tenté d'expliquer la régulation particulière des membres de cette famille, notamment en ce qui a trait à l'AFP, étant donné son patron d'expression fœtale et sa réexpression dans l'hépatocarcinome.

1.6.1 Éléments régulateurs

Il a été établi par transgénèse que les 7 kb en amont du site d'initiation de la transcription de l'*AFP* suffisaient à conférer un patron d'expression comparable au gène endogène tout en conservant un haut niveau d'expression (113). Divers segments aux propriétés amplificatrices, promotrices ou atténuantes ont été identifiés à l'intérieur de cette région (figure 1-6C).

L'étude des sites hypersensibles à la DNase I, qui permet d'identifier les sites chromatiniens ayant une conformation plus relâchée, a localisé 3 principales régions susceptibles d'influencer la transcription du gène *AFP* (18, 237). Ces sites correspondent au promoteur et à deux segments de la région amplificatrice (EI et EII). Un troisième domaine (EIII), plus distal, a aussi été caractérisé *in vitro* par des expériences de transfection (76, 250). Lorsque couplés individuellement ou en groupe à un promoteur hétérologue, ces trois domaines ont présenté de l'activité dans un foie de souris adulte, concentrée autour de la région péricentrale seulement (186). Il semblerait donc que ces régions ne soient pas strictement responsables de la perte d'activité du gène *AFP* au cours du développement. De plus, les 1000 premières bases en amont du site d'initiation de la transcription de l'*AFP*, lorsque couplées à un amplificateur hétérologue, sont suffisantes pour conférer à un transgène la spécificité d'expression et la régulation développementale caractéristiques de l'*AFP* (28). Cependant, comme le promoteur opère *in vivo* avec ses propres amplificateurs, on ne peut pas exclure un rôle combiné entre les amplificateurs et le promoteur dans la régulation développementale de l'*AFP*.

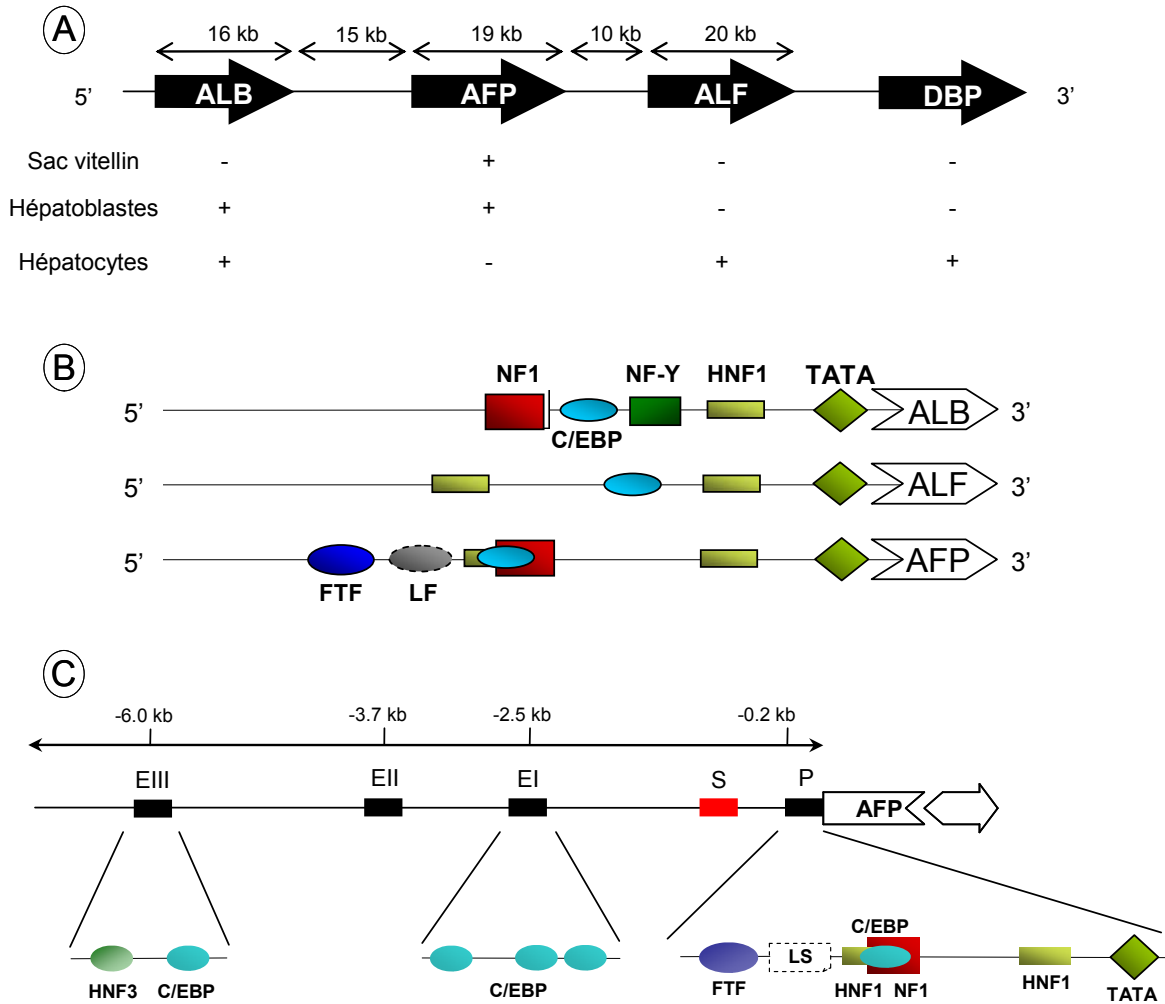


Figure 1-6 Locus multigénique de la famille albumine et organisation du locus AFP

A) Organisation groupée des gènes de la famille albumine sur le chromosome 14 du rat. La spécificité d'expression de chacun des membres est illustrée pour les trois principaux types cellulaires les exprimant, par un signe + ou -. B) Représentation graphique des similitudes retrouvées dans les régions promotrices des gènes *ALB*, *ALF* et *AFP* en ce qui a trait aux sites de liaison pour des facteurs de transcription. C) Organisation du locus *AFP* avec ses 3 domaines de la région amplificatrice (EIII à EI), son promoteur (P) et une région présumément atténuante (S).

La région EIII est caractérisée par la présence de sites de liaison pour les facteurs C/EBP et HNF3 (82, 151, 232). Cette région permettrait entre autres d'obtenir une expression plus constante d'un transgène lorsqu'il est introduit dans des souris transgéniques (151). La région EII, quant à elle, est peu caractérisée. On ne connaît que sa position au niveau de la région intergénique entre *AFP* et *ALB* ainsi que le fait qu'il soit dans une conformation ouverte (hypersensible à la DNase) dans les tissus exprimant l'*AFP*, sans toutefois être

régulée de façon développementale (158, 237). Pour ce qui est de la région EI, elle est composée majoritairement de sites de liaison pour les protéines de la famille C/EBP. Cette région régulatrice est la plus active du domaine amplificateur du gène *AFP* (262) et elle est requise pour diriger une forte expression du gène dans les tissus permissifs, tout en étant spécifique aux stades précoces du développement hépatique (237). Finalement, la région P (promoteur) de l'*AFP* répond étroitement aux différents changements développementaux ainsi qu'aux hormones glucocorticoïdes et ainsi semble jouer un rôle clé dans la régulation de l'*AFP* (237). La situation est toutefois complexe en ce qui a trait aux sites de liaison qu'on retrouve dans la région P. Des études, réalisées *in vitro* pour la plupart, ont permis d'identifier une variété de sites de liaison à l'intérieur de ce court segment de 200 pb (47, 67, 85, 102, 261). Des études fonctionnelles subséquentes ont permis de cerner plus précisément les sites les plus probants pour la régulation du gène. Parmi ceux-ci se retrouvent des sites de liaison pour les protéines FTF, HNF1, NF1 et C/EBP.

1.6.1.1 FTF

Une protéine a été identifiée il y a quelques années par notre laboratoire à partir du promoteur *AFP* et son site de reconnaissance semble absent des autres membres de la famille albumine (73). Cette protéine, appelée FTF, s'est avérée essentielle pour le développement embryonnaire puisque l'inactivation ciblée de *FTF* chez la souris mène à la mort des embryons au jour E7.5, résultant d'un défaut de gastrulation (119, 173). Certaines évidences indiquent aussi un rôle pour FTF dans la différenciation de l'endoderme et l'établissement du phénotype hépatique (174). De plus FTF joue un rôle majeur dans le métabolisme hépatique adulte, principalement au niveau du métabolisme du cholestérol (54, 144) mais aussi en ce qui a trait au métabolisme énergétique (Malenfant et al, en préparation). FTF est un récepteur nucléaire orphelin se liant à la séquence TCAAGGTCA sous forme de monomère (73) et exprimé dans divers tissus d'origine endodermique comme le foie, le pancréas et les intestins, ainsi qu'au niveau des ovaires et des pré-adipocytes (pour une revue voir (65)). Malgré le statut dit « orphelin » de FTF, des phospholipides ont récemment été identifiés comme étant ses ligands chez l'humain sans toutefois que la portée physiologique de ce résultat ait encore été clairement établie (114, 170, 264).

Au niveau du promoteur de l'*AFP*, FTF serait un facteur « couplant », c'est-à-dire qu'il permettrait le couplage entre la région amplificatrice et le promoteur pour activer la transcription du gène (249). Sans la présence de FTF au promoteur *AFP*, la région amplificatrice n'a effectivement aucun effet sur la transcription du gène, qui devient essentiellement inactif (18, 73, 85).

1.6.1.2 LS

Le « Linker Segment » (LS) du promoteur *AFP* est une séquence d'ADN des plus énigmatiques. Analysée en 1996 par notre laboratoire et située entre le site FTF et le site HNF1 distal (figure 1-6C), cette séquence est conservée dans sa longueur mais sa composition est très peu conservée à travers les espèces, si ce n'est que la présence d'une répétition directe séparée par une paire de base (DR-1) (73). *In vitro*, les protéines de la famille GATA et AP-1 ainsi que certains récepteurs nucléaires, comme FTF, HNF4 et RXR se lient plus ou moins fortement au segment LS (121). Malgré les efforts mis de l'avant pour identifier l'hypothétique facteur se liant à cette séquence (« Linker Factor » ou LF), une telle identification n'a pas été faite. Cependant, il a été établi par notre laboratoire que FTF peut se lier avec faible affinité à la séquence LS, adjacente au site FTF fort, ce qui a suggéré l'hypothèse que le site FTF/LF permettrait l'interaction entre le site FTF distal et le site HNF1 adjacent, et ainsi la transcription du gène *AFP* (73).

1.6.1.3 HNF1

AFP possède deux sites de liaison pour HNF1 au niveau de son promoteur. Le site HNF1 proximal est essentiel à l'activité du promoteur *AFP* (67, 260). HNF1 représente une famille de protéines à homéodomaine qui régule, tout comme HNF4, l'expression d'un grand éventail de gènes hépatiques dont plusieurs codent des protéines sériques (166, 167). Cette famille comprend deux gènes, soit HNF1 α et HNF1 β (ou vHNF1), qui possèdent des rôles redondants mais aussi spécifiques. Ainsi HNF1 β est requis chez l'embryon au niveau de l'endoderme viscéral alors que le rôle de HNF1 α se situe plutôt du côté des hépatoblastes et du foie mature (44, 183). L'inactivation ciblée de *HNF1 α* a été effectuée chez la souris et celles-ci ne présentent aucune anomalie au cours de l'embryogenèse. À la naissance cependant, ces souris présentent plusieurs problèmes majeurs : dysfonctions hépatique, rénale et pancréatique, retard de croissance et phénylcétonurie, qui se traduisent

inévitablement par une mortalité post-natale. De plus, ces souris présentent une dysfonction dans la sécrétion de l'insuline qui cause un phénotype diabétique correspondant au MODY3, un type de diabète juvénile héréditaire (127). Les protéines HNF1 sont donc très importantes dans la régulation du métabolisme chez l'adulte.

1.6.1.4 NF1

Un site de liaison pour les protéines de la famille NF1 est présent au niveau du promoteur *AFP*. Ce site est lui aussi très conservé et de haute affinité et il chevauche le site de liaison HNF1 distal (figure 1-6). Malgré que les protéines NF1 puissent être des activateurs de la transcription dans plusieurs cas, la liaison de NF1 au promoteur *AFP* réprime la transcription du gène (18). La famille NF1 est composée de cinq membres qui ont un patron d'expression ubiquitaire. Plusieurs rôles sont identifiés pour ces protéines, par exemple au niveau du développement du cerveau et aussi de la réplication des adénovirus dans le foie (revue dans (81)).

1.6.1.5 C/EBP

Des sites de liaison pour les protéines de la famille C/EBP sont retrouvés principalement au niveau de la région amplificatrice *AFP*, particulièrement EI, mais deux sites ont aussi été identifiés *in vitro* au niveau du promoteur du gène, sans toutefois que leur importance *in vivo* n'ait été établie (18, 228, 260). Les membres de la famille C/EBP sont impliqués étroitement dans la différenciation et la prolifération de plusieurs tissus dont le foie, les adipocytes et les cellules hématopoïétiques (98, 122, 204). Les gènes *C/EBP* sont sans intron et peuvent produire des formes de différentes longueurs de la même protéine par l'usage de codons d'initiation alternatifs pour la traduction de l'ARNm (revue dans (187)). Il existe plusieurs membres de la famille C/EBP, chacun pouvant former des homodimères et des hétérodimères avec les autres membres de la famille par leur domaine de dimérisation qui consiste en un motif de fermeture éclair à leucines (ZIP). Les deux membres les plus documentés et aussi les plus abondants au niveau du foie sont C/EBP α et C/EBP β .

Au cours du développement hépatique, on peut détecter l'expression de C/EBP α et C/EBP β à partir du jour E9, soit lors de la spécification des hépatoblastes (251). Leur expression persiste jusqu'à la naissance où leur production s'intensifie considérablement (51). Les

rôles attribués à ces deux protéines sont très variés et vont de la régulation du métabolisme énergétique à la réponse aux stimuli inflammatoires et à la régulation de la régénération hépatique (26, 48, 57, 212, 246). Malgré le rôle distinct de C/EBP α et C/EBP β dans d'autres tissus, elles semblent jouer un rôle redondant dans les cellules hépatiques (36).

C/EBP β et, dans une moins grande proportion, C/EBP α sont les cibles de plusieurs voies de signalisation cellulaire qui modulent leur activité transcriptionnelle, résultant ainsi en une transmission de l'information de la membrane au noyau. Ces voies de signalisation affectent les protéines C/EBP à l'aide de modifications post-traductionnelles qui ciblent des résidus spécifiques (25, 110, 131, 243). Cela résulte en des changements de conformation des C/EBP ou en des changements d'interaction avec d'autres protéines (89, 153, 243). Le ciblage des protéines C/EBP par les différentes voies de signalisation, en particulier les voies liées à la prolifération cellulaire, de même que le rôle qu'occupent ces protéines dans la différenciation cellulaire tendent aussi à supporter leur implication dans le développement de plusieurs types de tumeurs (revue dans (162)). Les protéines de la famille C/EBP semblent jouer un rôle central dans l'intégration d'un ensemble de signaux cellulaires.

1.6.2 Régulation développementale de l'AFP

Plusieurs hypothèses ont été avancées jusqu'à maintenant sur le mécanisme contrôlant l'expression développementale du gène *AFP* sans qu'une seule d'entre elles se confirme. Voici les trois principales hypothèses.

En premier lieu, une mutation retrouvée chez une famille présentant une persistance héréditaire de l'expression de l'AFP a été identifiée au promoteur dans les sites de liaison se chevauchant pour les protéines HNF1 et NF1 (148). Cette mutation change l'affinité de ce site en faveur de HNF1, ce qui a suggéré que la compétition entre les protéines HNF1 et NF1 pour leurs sites respectifs serait responsable de la répression développementale du gène *AFP* (18). Quoique très attrayant, ce modèle ne permet pas d'expliquer totalement la régulation développementale du gène de l'AFP. Premièrement, il n'y a pas de changement dans le rapport de la quantité totale de ces deux protéines au cours du développement hépatique qui pourrait appuyer une compétition entre les deux facteurs pour un même site

de liaison (121). Deuxièmement, la quantité d'AFP produite dans les cas de persistance héréditaire est au moins mille fois moindre que lorsque la production de l'AFP est à son maximum, soit au cours de la vie foetale. Troisièmement, une mutation réalisée dans notre laboratoire, renforçant la mutation retrouvée dans la persistance héréditaire et éliminant le site NF1 en même temps qu'il introduit un site consensus pour HNF1, ne permet pas de persistance significative d'expression d'un transgène AFP/rapporteur dans le foie de souris adultes. Enfin, la provenance de l'AFP, dans le modèle de la persistance héréditaire, n'a pas été déterminée et pourrait possiblement provenir d'autres organes, notamment le rein qui exprime faiblement l'AFP au cours du développement et qui exprime aussi HNF1 (185).

Une seconde hypothèse concerne le segment LS qui a été décrit comme un site de liaison de faible affinité pour FTF (73). Le gène *AFP* serait réprimé au cours du développement hépatique alors que la protéine FTF perdrait la capacité à se lier à un site de faible affinité. Comme FTF stabiliserait la protéine HNF1 adjacente, la disparition de FTF entraînerait le remplacement de HNF1 par NF1 et la répression du gène. Cependant, aucune expérience jusqu'à maintenant n'a pu confirmer cette théorie.

La troisième hypothèse implique la présence d'une région atténuante entre le promoteur et la région EI (159, 239). Cette région comporte des sites de liaison chevauchants pour les protéines HNF3 et p53. Ainsi au cours de la vie foetale, la protéine HNF3 occuperait ce site et permettrait l'activation de l'*AFP* alors qu'après la naissance, l'augmentation de la quantité de la protéine p53 viendrait concurrencer HNF3 ce qui empêcherait les régions amplificatrices d'activer l'*AFP* (49, 50, 126). Cependant, lorsqu'on enlève cette région, on obtient une persistance incomplète et très variable de l'expression du transgène d'une lignée de souris à l'autre et ce, seulement dans la zone péricentrale du foie (62). De plus cette région atténuante semble aussi posséder un effet négatif dans des lignées d'hépatomes qui expriment l'AFP (159, 239). Ces observations suggèrent donc fortement que cette région ne contrôle pas à elle seule la répression développementale de l'*AFP*.

1.6.3 Régulation hormonale de l'AFP

L'injection de dexaméthasone, une hormone glucocorticoïde synthétique, à des rats nouveau-nés mène à l'arrêt prématuré et réversible de la transcription du gène *AFP* ainsi

qu'à l'arrêt de la prolifération (16). Cette répression de l'*AFP* n'a toutefois pas de connotation physiologique, à prime abord, avec la répression développementale du gène puisque des rats surrénalectomisés répriment toujours l'*AFP* lors de la différenciation terminale des hépatocytes (15). Par ailleurs, les HCC deviennent souvent résistants à l'action anti-proliférative et *AFP*-suppressive des hormones GC par un mécanisme toujours inconnu. Certains éléments sont cependant bien établis sur la répression du gène de l'*AFP* par les hormones GC.

Premièrement, la répression du gène s'effectue au niveau transcriptionnel et résulte en la disparition rapide d'un site hypersensible à la DNase I qui correspond au promoteur *AFP* (la région P, figure 1-6C) (84, 236, 237). La cinétique de cette répression corrèle fortement avec la translocation de GR au noyau des cellules traitées et ne nécessite pas de nouvelle synthèse protéique (84, 237). Il nous est donc permis de croire que cette répression est un phénomène direct. Ensuite, la répression par les hormones GC requiert le DBD de GR, sans toutefois nécessiter sa liaison à l'ADN (121). Comme ce domaine est impliqué dans les interactions entre GR et d'autres protéines, il semble que la répression de l'*AFP* implique la liaison de GR à une protéine présente sur les régions régulatrices de l'*AFP* lorsque le gène est activement transcrit.

La cible de GR sur l'*AFP* et le mécanisme par lequel GR réprime celui-ci n'ont donc pas encore été identifiés. Fait à noter cependant, le phénomène de résistance aux hormones GC dans les hépatomes, du moins en ce qui a trait à la croissance cellulaire, semble impliquer C/EBP α , faisant de cette famille de protéines des candidats intéressants dans la régulation de l'*AFP* par GR (188, 189).

1.7 Objectifs

Le but premier concernant mon étude du gène *AFP* est d'identifier et de comprendre les mécanismes de différenciation qui sont dérégulés dans les hépatomes afin d'élaborer des traitements plus appropriés à ce type de tumeur. Pour ce faire j'ai voulu élucider les mécanismes de régulation transcriptionnelle gouvernant l'expression de l'*AFP*. Cela implique donc la résolution du contrôle développemental du gène *AFP* et en particulier le lien entre sa répression et l'arrêt de la prolifération cellulaire. De plus, le mécanisme de

répression du gène *AFP* par les hormones GC ainsi que la résistance des hépatomes à cet effet sont aussi explorés.

Plusieurs questions demeurent en suspens concernant la régulation transcriptionnelle de l'*AFP* en ce que la majorité des travaux effectués jusqu'à présent a été réalisée *in vitro* ou avec des fragments de régions régulatrices isolés de leur contexte natif. Les travaux de cette thèse visent à améliorer la situation en conduisant une étude combinant des expériences réalisées *in vivo* et *in vitro* impliquant les différentes protéines régulant la transcription de l'*AFP* et les différents mécanismes de contrôle proposés au cours du développement hépatique et en réponse aux hormones GC.

Comme les études précédentes ont démontré une grande importance de la région distale (-100 à -200 pb) du promoteur *AFP* dans la régulation transcriptionnelle du locus, j'ai d'abord concentré mes efforts sur les protéines se liant à cette région afin d'en identifier les sites authentiquement utilisés *in vivo* et essentiels à son activité. Par la suite, j'ai voulu vérifier de quelle façon le locus *AFP* est réprimé dans un modèle cellulaire d'hépatome, en regardant particulièrement les interactions se produisant entre les régions amplificatrices et promotrices du gène et leur effet sur la transcription de l'*AFP*. Enfin, je me suis intéressé au phénomène de répression transcriptionnelle du gène *AFP* par les hormones GC en tentant d'en identifier le mécanisme d'action et la cible sur le locus *AFP*.

Chapitre 2- Caractérisation *in vivo* du promoteur *AFP*

2.1 Introduction

L'étude des sites hypersensibles à la DNase I a permis d'identifier deux régions critiques où l'on observe un changement de conformation lors de la différenciation terminale des hépatocytes, soit le promoteur et la région EI (18). De plus, un groupe a pu démontrer que la région située de -1000 pb jusqu'au site d'initiation de la transcription permettait de conférer à un transgène un patron d'expression similaire au gène *AFP* endogène (28). L'activité du promoteur *AFP* semble donc étroitement liée aux différentes conditions de transcription active du gène.

On retrouve une grande homologie entre les différents membres de la famille ALB lorsqu'on regarde les différents sites de liaison retrouvés à l'intérieur de leurs régions régulatrices. Un court segment d'ADN semble néanmoins spécifiquement retrouvé dans la partie distale du promoteur *AFP*, située de -200 à -100 pb. Une mutation G→A en position -119 pb a été retrouvée chez une famille présentant une persistance héréditaire de l'expression de l'*AFP* (148). De plus, la modification du segment LS, situé de -150 à -130 pb, permet d'obtenir la persistance d'expression d'un transgène dans le foie de souris adultes (121). La partie distale du promoteur semble donc jouer un rôle critique dans la régulation développementale du gène *AFP*; toutefois les protéines impliquées directement dans ce processus ainsi que leur régulation spécifique restent encore à être identifiées.

Cette première partie expérimentale de ma thèse avait pour but de clarifier la situation retrouvée au niveau du promoteur *AFP* en ce qui a trait aux facteurs de transcription permettant d'activer ce gène. Comme cette région est essentielle à la régulation développementale du gène *AFP*, une meilleure compréhension des différentes interactions pouvant y prendre place pourrait permettre de mieux cerner les processus conduisant à la répression de l'*AFP* lors de la différenciation terminale hépatique. Étant donné que la plupart des études précédentes ont été réalisées *in vitro*, je me suis plutôt tourné vers des méthodes d'expérimentation *in vivo*, qui exploitent le contexte endogène du locus *AFP* afin d'obtenir des résultats le plus près possible de la réalité. Pour ce faire, j'ai entre autres tiré profit des méthodes d'empreinte génomique *in vivo* et d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) afin d'identifier avec précision les facteurs de transcription recrutés au promoteur *AFP* lorsque ce gène est activement transcrit dans un modèle d'hépatome.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Culture cellulaire

Les cellules des lignées Hep3B (HCC humain), HepG2 (HCC humain) et 7.6 (variant sous-cloné de la lignée d'hépatome de rat Morris 7777 (85)) ont été cultivées dans du milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Gibco), faible en glucose et supplémenté de 10% de sérum fœtal bovin (FBS, Wisent), de 100 U/ml de pénicilline et de 100 µg/ml de streptomycine (Gibco-BRL). Pour la condition de faible densité, les cellules 7.6 ont été étalées à 1×10^4 cellules/cm² alors que pour la condition de haute densité, elles ont été étalées à 1×10^5 cellules/cm². Les cellules ont par la suite été cultivées pendant 40 heures avant d'être analysées.

2.2.2 Constructions plasmidiques

Les différents mutants des régions régulatrices de l'AFP ont été construits à partir du vecteur AFP/CAT de type sauvage (S), qui contient la région 5' flanquante de l'AFP allant de -4400 à +5 pb placée en amont du gène de la chloramphénicol acétyl-transférase (CAT) (73). Les mutations ont été introduites à l'intérieur des régions régulatrices de l'AFP à l'aide du « QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit » selon le protocole « Pfu turbo DNA polymerase » (Stratagene). Les amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée ainsi que les vecteurs utilisés pour chaque couple d'amorces sont consignés dans le tableau 2-1; les mutations introduites y sont inscrites en lettres minuscules. Le vecteur d'expression pCi-C/EBP α a été obtenu à partir du vecteur pMSV-C/EBP α , obtenu du Dr Steven L. McKnight (70). Un fragment contenant l'ADNc de C/EBP α de rat a été isolé de pMSV-C/EBP α par une digestion avec les enzymes BamHI et HindIII, traité à la Klenow et inséré dans le site EcoRV du vecteur SK+. Par la suite, le même fragment a été transféré dans le vecteur pCi par une digestion XhoI et BamHI, pour donner le vecteur d'expression pCi-C/EBP α . Le vecteur d'expression pour C/EBP β de rat provient d'un criblage effectué dans notre laboratoire (228). Pour les besoins de cette étude, le troisième ATG (Met153) de cette protéine a été muté en leucine pour éliminer la production de la plus petite isoforme de C/EBP β , qui agit comme un dominant négatif sur les membres de la famille C/EBP (55). La mutation M153L a été effectuée par mutagenèse dirigée (55).

2.2.3 Transfections

Pour les transfections stables, les cellules 7.6 ont été étalées à 700 000 cellules dans des pétris de 35 mm de diamètre et transfectées en utilisant le réactif Effectene (Qiagen) avec 500 ng d'ADN plasmidique AFP/CAT et 10 ng de pMCneo pour la sélection des clones avec du G-418 (analogue de la généticine, Gibco-BRL). Les clones résistants (100 à 200 clones) ont été combinés ensemble et analysés pour leur activité CAT. L'activité CAT de chaque rapporteur a été quantifiée après chromatographie sur couche mince avec un appareil Storm 860 et le logiciel Image Quant (Molecular Dynamics) et normalisée à la quantité totale de protéines de chacun des extraits. Pour les transfections transitoires, les cellules Hep3B et HepG2 ont été étalées à 1 million de cellules dans des pétris de 10 cm de diamètre et transfectées en utilisant la technique du précipité de phosphate de calcium avec 5 µg de plasmide rapporteur et 2.5 µg de pRSV-LacZ comme contrôle interne d'efficacité de transfection; 0,5 à 1 µg des vecteurs d'expression pCi-C/EBP α et pCi C/EBP β a été ajouté à la réaction et la quantité d'ADN total a été uniformisée avec un vecteur vide (pCi). Les cellules ont été récoltées 48h après transfection et l'activité CAT a été quantifiée et normalisée à l'activité β -galactosidase de chaque extrait.

Tableau 2-1 Amorces utilisées dans la mutagenèse dirigée

Mutation	Vecteur utilisé	Brin	Séquence des amorces (5'-3')
mC/EBP-	S	+	GCTGTTAATTATTGGCtttaaGCCTAACTTCAAC
		-	GTTGAAGTTAGGCttaaGCCAATAATTAACAGC
mC/EBP+	S	+	GCTGTTAATTATTGgcAATTGCCTAACTTCAAC
		-	GTTGAAGTTAGGCAATTgCgCAATAATTAACAGC
mHNF1-	S	+	AGTGACCCCTGTGCTcagcATTATTGGCAAATTG
		-	CAATTTGCCAATAATgctgAGCACAGGGGTCACT
mHNF1-	m01	+	AGTGACCCCTGTGCTcagcATTATTAACAAATTG
		-	CAATTTGTTAATAATgctgAGCACAGGGGTCACT
mHNF1-	dLS m01	+	CCTTGAACATAAGCCTGTGCTcagcATTATTAACAAATTGCC
		-	GGCAATTTGTTAATAATgctgAGCACAGGCTTATGTTCAAGG
mHNF1-	2FTF	+	AGTGACCTTGATGCTcagcATTATTGGCAAATTG
		-	CAATTTGCCAATAATgctgAGCATCAAGGTCACT
mLF-	mHNF1-	+	AACATAAGATAGAAgaaAaaaaTGTGCTCAGCATTAA
		-	TAATGCTGAGCACAtttTtCTTCTATCTTATGTT
+5 pb	S	+	GTCCTTGAACATAAGAAgcttaAGAAGTGACCCCTGTGCTG
		-	CAGCACAGGGGTCACCTCTaagcTTCTTATGTTCAAGGAC
mAmpli(1)	S	+	GGTATGTGGTGCGAGCTCAGCCCgactagtcAAGCTTTGAGCAACAGCC
		-	GGCTGTTGCTCAAAGCTTgactagtcGGGCTGAGCTCGCACCACATACC
mAmpli(1,2)	mAmpli(1)	+	CTCAGCCCGACTAGTCAAGCTcaccgctgCAGCCCCGCTGGGCTTAGGG
		-	CCCTAAGCCACGCGGGCTGcaecgctgAGCTTGACTAGTCTGGGCTGAG
mAmpli(1,2,3)	mAmpli(1,2)	+	GTCCAGTTTGTTAACCATAgactagtcGTGGGGTTTCATGGGCTCAGG
		-	CCTGAGCCCATGAAACCCACgactagtcTATGGTTAAACAAACTGGAC

2.2.4 Extraits nucléaires de protéines et gels de retardement

La préparation des extraits nucléaires a été effectuée comme suit: les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et recueillies dans un tampon de récolte (40 mM de Tris-Cl pH 7.4, 1 mM d'EDTA, 150 mM de NaCl). Après centrifugation, le culot de cellules est resuspendu dans du tampon A contenant du NP-40 à 10% (10mM d'HEPES pH 7,6, 10mM de KCl, 0,1mM d'EDTA, 0,1mM d'EGTA, 1mM de DTT, 0,5mM de PMSF, 2µg/ml d'aprotinine, 1,5µM de leupeptine) et agité vigoureusement pendant 15 secondes à 4°C pour briser les membranes cytoplasmiques. Après 2 lavages avec le tampon A sans NP-40, les noyaux sont resuspendus dans un tampon à haute teneur en sels (20mM d'HEPES pH 7,6, 700mM de NaCl, 1mM d'EDTA, 1mM d'EGTA, 25% de glycérol, 1mM de DTT, 1mM de PMSF, 2µg/ml d'aprotinine, 1,5µM de leupeptine) et agités vigoureusement à 4°C pendant 30 minutes. Le surnageant (contenant les protéines nucléaires) est par la suite éclairci par centrifugation à 13000 rpm à 4°C pendant 15 minutes et congelé en billes dans l'azote liquide. Les gels de retardement ont été réalisés avec 3 µg de protéines d'extrait nucléaire et une sonde double brin couvrant la région -133 à -112 ou -125 à -112 du promoteur *AFP* selon le protocole décrit précédemment (18).

2.2.5 Empreinte génomique *in vivo* à la DNase I

Les expériences d'empreinte génomique *in vivo* tout comme *in vitro* ont été réalisées telles que décrites par Drouin et al. (59). Brièvement, pour les traitements à la DNase I *in vivo*, les cellules 7.6 ont tout d'abord été perméabilisées à la lysolécithine pendant 1 minute à la température de la pièce, pour être ensuite traitées à la DNase I pendant 20 minutes aussi à la température de la pièce. Les cellules ont par la suite été récoltées et l'ADN en a été extrait. Pour les traitements à la DNase I *in vitro*, 40 µg d'ADN génomique purifié des cellules 7.6 ont été utilisés. La longueur moyenne des fragments obtenus *in vitro* et *in vivo* a été déterminée à l'aide d'une électrophorèse des échantillons sur un gel d'agarose alcalin. Les échantillons avec des fragments d'une moyenne de 1 kb ont été utilisés pour les réactions de « Linker-Mediated PCR » (LMPCR). En parallèle, l'ADN génomique purifié des cellules 7.6 a été clivé chimiquement tel que décrit (59) aux résidus G, A, T+C ou C et utilisés comme marqueurs de séquence, de pair avec les échantillons traités à la DNase I, dans les réactions de LMPCR. Les réactions de LMPCR utilisées dans la caractérisation de la région -175 à -100 du promoteur *AFP* ont été effectuées à l'aide des amorces suivantes :

amorce AFP1 (étape d'élongation d'amorce) 5'-GTAGAAGCCGGATACTG-3' et amorce AFP2 (étape d'amplification) 5'-GTGAGCAGTAGCGCTGAAGTTCTTTTATATCC-3'. L'étape d'élongation d'amorce a été effectuée avec l'ADN polymérase Pfu exo- (Roche) et l'amorce AFP1 hybridée à 53°C. Un adaptateur, constitué d'un duplex, sans phosphate en 5', de L25 (5'-GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC-3') et L11 (5'-GAATTCAGATC-3') a ensuite été ajouté, par ligation, aux bouts francs générés par l'étape d'élongation d'amorce. L'étape d'amplification exponentielle par PCR a été effectuée avec l'ADN polymérase Taq (Roche) et les amorces AFP2 et LP25 (spécifique au plus long brin de l'adaptateur) hybridée à 63°C.

2.2.6 Immunoprécipitation de chromatine

Les cellules 7.6 sont fixées directement dans le pétri en ajoutant une solution de formaldéhyde à une concentration finale de 1.1% directement dans le milieu de culture. La réaction est laissée pendant 10 minutes à la température de la pièce avant d'être titrée avec de la glycine à 125mM. L'ADN des cellules est par la suite fragmenté, sur glace à l'aide d'ultrasons, dans un tampon contenant des inhibiteurs de protéases (Complete, Roche). La fragmentation a été effectuée sur un appareil Bioruptor (Diagenode) par pulsations de 30 secondes à la puissance « High », avec des intervalles de 30 secondes pour éviter de chauffer les échantillons, jusqu'à l'obtention de fragments d'ADN ayant en moyenne 500 pb à 1 kb de longueur. Les extraits sont par la suite dosés à 260 nm et chaque immunoprécipitation est réalisée en utilisant 0,7 unités de DO à 260nm de chaque échantillon fragmenté et 2 µg d'anticorps (IgG) couplés à des billes magnétiques (Dynabeads Protein G). Les échantillons sont incubés avec les billes-anticorps pendant 16 heures sur un support rotatif à 4°C et les billes-anticorps-chromatine sont précipitées à l'aide d'un support magnétique. Les échantillons sont lavés 8 fois avec un tampon RIPA et l'élution est obtenue à l'aide d'une solution de Tris-EDTA contenant 1% SDS. L'ADN est par la suite isolé par traitement à la RNase I (0,1 mg/ml) et à la protéinase K (0,2 mg/ml) suivi d'extractions au phénol/chloroforme. Les anticorps utilisés pour les CHIP sont : C/EBPα (sc-9314x), C/EBPβ (sc-150x), pol II (sc-9001x), HNF1α (sc-6547x) et IgG contrôles (sc-2027), tous de Santa Cruz Biotechnology. L'enrichissement des fragments d'ADN a été mesuré par PCR quantitatif. Les CHIP ont été réalisés sur au moins deux expériences indépendantes.

2.2.7 PCR quantitatif

Les réactions de PCR quantitatif en temps réel ont été effectuées sur un appareil LightCycler (Roche) en utilisant le réactif SYBRGreen (Invitrogen) dans un volume final de 10 µl. Les amorces spécifiques ont été choisies, à l'aide du logiciel LightCycler Probe Design Software version 2.0 (Roche), pour amplifier des fragments de 100 à 150 pb, et sont inscrites dans le tableau 3-2. Après un premier cycle de 2 minutes à 50°C et 2 minutes à 95°C, les échantillons ont été amplifiés par 45 cycles de 5 secondes à 94°C, 10 secondes à 55°C et 10 secondes à 72°C, suivi d'un cycle de dénaturation. Les échantillons ont été quantifiés relativement à un calibrateur avec courbe standard externe, selon la formule suivante : $E_T^{(CpT(C)- CpT(S))} \times E_R^{(CpR(S)-CpR(C))}$ où T, locus cible; R, locus de référence (-6,63kb AFP); C, calibrateur (dilution de l'« input »); S, échantillon; E, coefficient d'efficacité d'amplification. Le coefficient d'efficacité d'amplification a été calculé pour chaque couple d'amorces à l'aide d'une courbe standard effectuée sur des dilutions séquentielles de l'« input » et calculé avec l'équation : $-1 / \text{pente de la courbe standard}$. La spécificité des réactions d'amplification a été déterminée en vérifiant la taille du produit par électrophorèse sur gel d'agarose 2% et par l'analyse des courbes de dénaturation de chaque réaction d'amplification.

Tableau 2-2 Liste des amorces utilisées dans les immunoprécipitations de chromatine

Région	Brin	Séquence des amorces (5'-3')
-6,63	+	CTACAGCCAGGTGATTAG
	-	ATTCCTCGAATCTGATGTC
-2,43	+	TGAGCAACAGCCCGT
	-	CCAAAGCATGTGATCAGAAC
-1,87	+	CAAGTGTTGAGACAGGACCCA
	-	ATGCAAACGATTGACCA
-0,10	+	TTGGAAGAGTTTAGTTGGCA
	-	ACAGTGGTAGAAGCCGGA
+0,10	+	CAACCATGAAGTGGAGC
	-	CAAAGCATCTTACCTATTCCAA
+0,60	+	GTGCTAAGTCTGCAACTGA
	-	TGTTAGGAACCACCTGT

2.3 Résultats

2.3.1 Occupation du segment -200 à -100 pb du promoteur *AFP in vivo*

Comme plusieurs sites de liaison étaient retrouvés *in vitro* dans le court segment d'ADN situé entre les bases -200 et -100 du promoteur *AFP*, j'ai voulu déterminer hors de tout doute les éléments de cette région qui sont utilisés lorsque le gène est activement transcrit. Pour ce faire, j'ai utilisé la technique d'empreinte génomique *in vivo*. Celle-ci permet de délimiter précisément les séquences d'ADN occupées par des facteurs de transcription sur un gène dans son contexte endogène, donc dans des conditions natives.

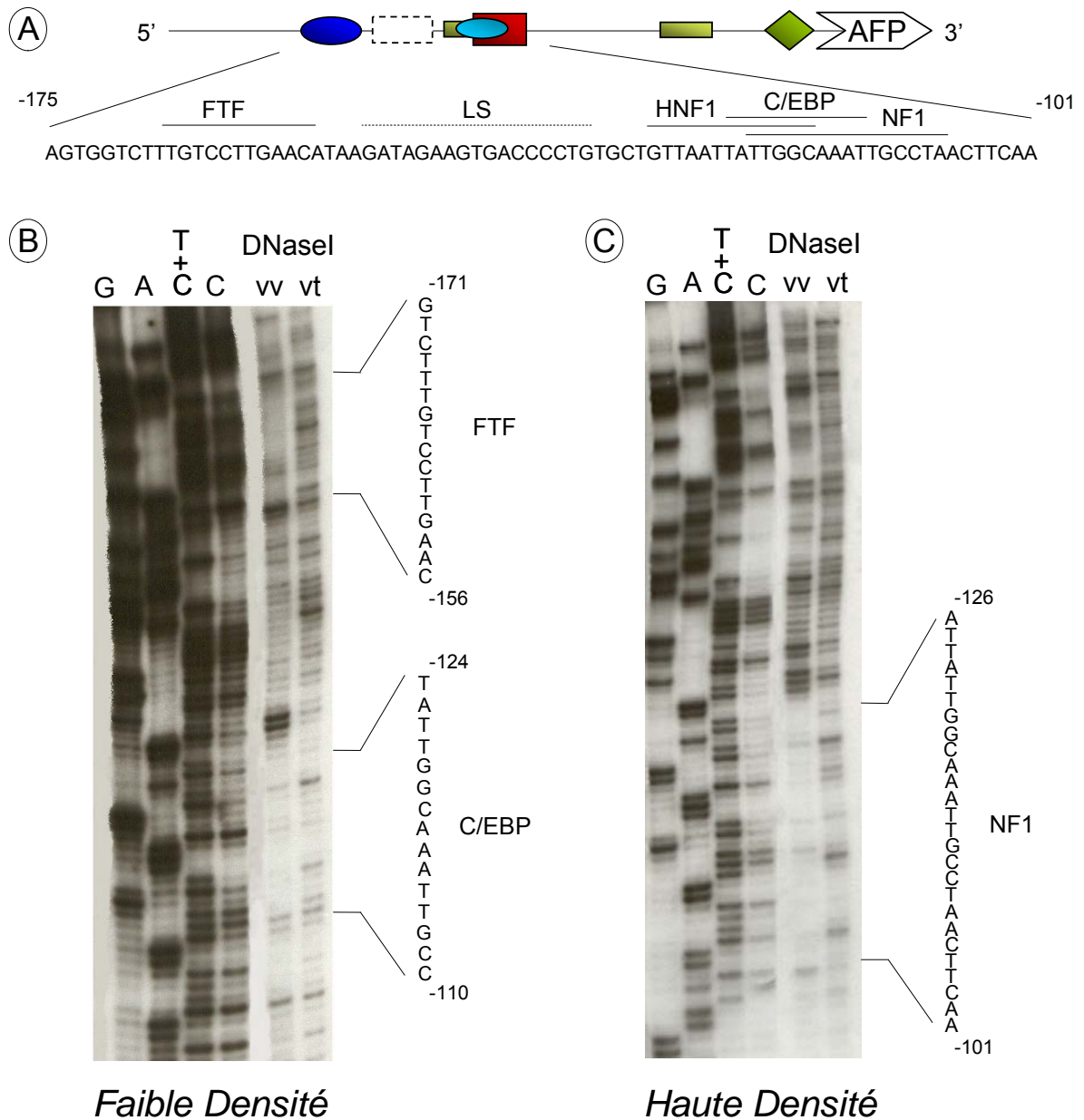


Figure 2-1 Empreinte génomique *in vivo* du promoteur *AFP*

A) Schématisation de la région promotrice du gène *AFP*. Les traits au-dessus de la séquence indiquent l'emplacement des séquences de reconnaissance pour les facteurs de transcription identifiés au-dessus de ces traits. B) et C) Gels d'empreinte génomique *in vivo* réalisés sur des cellules 7.6 cultivées à faible (B) et à haute densité (C). Les quatre premières pistes de chaque gel sont les réactions de séquençage sur l'ADN purifié : G, guanine; A, adénine; T+C, pyrimidine; C, cytosine. Les deux dernières pistes de chaque gel sont les échantillons traités *in vitro* (vt) et *in vivo* (vv) à la DNase I; les régions protégées de l'action de la DNase I *in vivo* sont identifiées par des crochets à côté des gels et les séquences correspondantes y sont inscrites.

Pour étudier la région promotrice de l'*AFP*, un sous-clone (désigné 7.6) de la lignée cellulaire d'hépatome de rat Morris 7777 a été utilisé. Cette lignée d'hépatome est bien différenciée et exprime l'*AFP* de façon transitoire, soit dans ses premiers stades de croissance, pour être totalement réprimée vers le stade de confluence cellulaire (97). J'ai donc pu comparer, à partir de la même lignée cellulaire, les régions d'ADN protégées contre l'action de la DNase I dans des conditions permettant la transcription de l'*AFP*, c'est-à-dire lorsque les cellules 7.6 sont cultivées à faible densité, ou dans des conditions ne permettant pas la transcription du gène, c'est-à-dire lorsque ces mêmes cellules sont cultivées à haute densité. Les résultats de ces expériences sont présentés à la figure 2-1.

On observe qu'à haute densité des cellules 7.6, donc en phase stationnaire alors que le gène *AFP* est réprimé, seulement un segment d'ADN est protégé dans la région -200 à -100 du promoteur *AFP*. Cette région, située de la position -126 à -100, correspond au site de liaison pour les protéines de la famille NF1, identifié il y a plusieurs années *in vitro*. Ces résultats sont en accord avec la littérature puisque NF1 a déjà été documenté comme un répresseur de la transcription du gène *AFP* par l'intermédiaire de ce site de liaison (18, 20, 121).

Une question encore plus intéressante était de savoir quels sites de liaison étaient occupés lorsque le gène *AFP* est transcrit, soit lorsque les cellules 7.6 sont cultivées à faible densité et en croissance exponentielle. Dans ces conditions, on observe la présence de deux régions fortement protégées de l'action de la DNase I. La région la plus distale (positionnée de -171 à -156) se retrouve au niveau du site de liaison pour la protéine FTF, déjà identifié et documenté dans notre laboratoire. Ce résultat était encore une fois attendu puisque FTF agit comme un activateur de la transcription du gène *AFP*. La deuxième région protégée, plus proximale celle-là (positionnée de -124 à -110), se situe dans la même région contenant les sites chevauchants pour les protéines HNF1 et NF1. La séquence protégée n'est pas la même qu'observé à confluence, donc ne correspond pas au site NF1. Mais elle ne concorde pas non plus avec le site de liaison pour la protéine HNF1, qui se situe plus en 5' de la région protégée.

L'analyse de la séquence a permis d'identifier à l'intérieur de cette région un site de liaison pour les protéines de la famille C/EBP, différent et légèrement décalé en 5' par rapport au

site identifié *in vitro* dans cette région (228). Cette observation est cruciale pour la suite du travail, et elle met fin au dogme voulant que ce segment soit occupé exclusivement par HNF1 lorsque le gène *AFP* est actif. Une dernière observation concerne la région LS, dans laquelle aucune séquence ne semble protégée significativement de l'action de la DNase I, que ce soit en condition AFP-positive ou AFP-négative. Ce résultat suggère que la région LS ne recrute aucun facteur de transcription nécessaire à la régulation de l'*AFP*.

2.3.2 Les protéines de la famille C/EBP se lient à la région -125 à -112 pb du promoteur *AFP*

Afin de vérifier que le site occupé *in vivo* était bel et bien un site de liaison pour les membres de la famille C/EBP, des expériences de gels de retardement ont été réalisées. Ainsi, des extraits de cellules 7.6 ont été incubés avec une sonde marquée couvrant la région s'étendant de la position -125 à -112 et en ajoutant à cette réaction des anticorps dirigés contre les protéines C/EBP α et C/EBP β , les deux membres de la famille C/EBP les plus abondants dans le foie. Ainsi on peut voir à la figure 2-2B que l'ajout d'anticorps contre C/EBP α et C/EBP β retarde la migration des complexes protéines-ADN dans le gel par rapport au puits contrôle, ce qui démontre que les protéines C/EBP ont la capacité de se lier à cette région du promoteur. De plus, avec une sonde -133/-112 (contenant les sites HNF1 et C/EBP), l'ajout à la réaction d'une séquence froide contenant un site C/EBP consensus (celui de l'amplificateur *AFP*, ATTGCGCAAT) permet d'atténuer sélectivement le signal produit dans la région où l'on retrouve les complexes C/EBP-ADN, alors qu'une mutation du site C/EBP (mC/EBP-) dans un compétiteur -133/-112 est sans effet.

2.3.3 Importance du site C/EBP dans l'activité du promoteur *AFP*

Pour vérifier la fonctionnalité du site C/EBP du promoteur *AFP*, j'ai par la suite effectué des expériences de transfections transitoires dans lesquelles j'ai surexprimé C/EBP α ou C/EBP β , en présence de constructions contenant la région régulatrice de l'*AFP* jusqu'à -4.4kb mutée ou non dans le site C/EBP identifié par empreinte *in vivo*. L'effet d'une mutation nulle (mC/EBP-, figure 2-2A) et celui d'une mutation créant un site canonique parfait (mC/EBP+, données non montrées) a été testé par gels de retardement. Comme on peut le voir à la figure 2-3B, la surexpression de C/EBP dans deux types d'hépatomes, soit les Hep3B et les HepG2, mène à l'activation du rapporteur 4.4AFP/CAT de type sauvage

ou dont le site C/EBP a été converti en un site C/EBP consensus (RTTGCGCAAT), alors qu'aucune activation n'est observée lorsque le site C/EBP du promoteur est détruit. Les protéines de la famille C/EBP sont donc en mesure de se lier au site C/EBP du promoteur du gène *AFP* et ce site est essentiel pour en activer la transcription, en cotransfection, par C/EBP. Il est à noter que la surexpression de C/EBP β mène à une plus forte activation du rapporteur 4.4AFP/CAT que C/EBP α , alors que l'inverse est retrouvé au niveau du promoteur *ALB* (données non montrées). Ceci suggère donc un lien entre C/EBP β , un facteur souvent associé à croissance cellulaire, et la régulation de l'*AFP*.

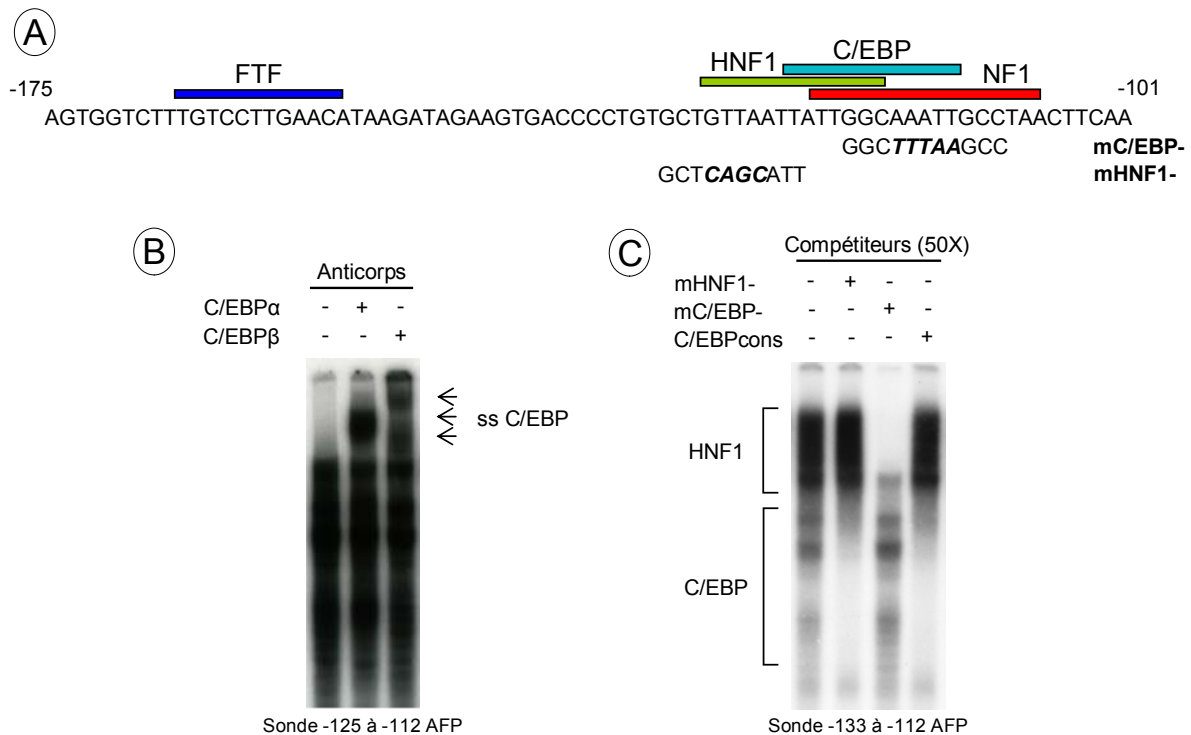


Figure 2-2 C/EBP lie le promoteur *AFP* *in vitro*

A) Représentation du promoteur du gène *AFP*. Les boîtes de couleur représentent les sites de liaison pour des facteurs de transcription. Les mutations introduites dans le promoteur *AFP* sont inscrites en gras sous la séquence et le nom de la mutation est inscrit à la droite de celle-ci. B) et C) Gels de retardement réalisés avec des extraits nucléaires de cellules 7.6. La région du promoteur *AFP* utilisée comme sonde est inscrite sous chaque gel. Les retards sur gel (ss) produits par l'ajout d'anticorps sont identifiés par des flèches à droite du gel alors que les complexes protéines-ADN sont identifiés par un crochet à la gauche du gel. C/EBP cons = site C/EBP consensus.

Le site C/EBP identifié *in vivo* au niveau du promoteur *AFP* chevauche le site de liaison pour la protéine HNF1, qu'on présumait jusqu'à maintenant avoir un effet positif sur la

transcription de l'*AFP* via ce site. Comme ces deux sites sont conservés entre les espèces j'ai voulu évaluer l'importance de chacun dans l'activité des régions régulatrices de l'*AFP*. J'ai donc effectué des transfections stables dans les cellules 7.6 avec différentes constructions contenant les régions régulatrices de l'*AFP* dont les sites HNF1 et/ou C/EBP ont été mutés. Ce système d'intégration stable dans le génome (plutôt qu'épisomique en transitoire) permet de recréer un environnement chromatinien dans les régions régulatrices plus représentatif du contexte présent au locus endogène. Les résultats présentés dans la figure 2-3C nous permettent de constater que l'élimination du site C/EBP au niveau du promoteur *AFP* diminue beaucoup l'activité du gène rapporteur. La destruction du site HNF1 mène également à une perte d'activité, quoiqu'un peu moindre. Lorsqu'on convertit le site C/EBP du promoteur *AFP* en un site C/EBP consensus (mutation mC/EBP+, qui élimine le site de liaison pour la protéine NF1 (données non montrées)), on obtient aucun changement du rapporteur par rapport au type sauvage. Cependant lorsqu'on mute le site HNF1 en un site canonique de très haute affinité (mutation m01, qui élimine aussi le site de liaison pour NF1) on obtient une activation du gène rapporteur d'environ 100 fois par rapport au type sauvage. Comme l'introduction d'un site C/EBP de haute affinité au niveau du promoteur *AFP* conserve un niveau d'activité semblable au type sauvage, contrairement à l'introduction d'un site HNF1 de très haute affinité, cela suggère que le site C/EBP et non le site HNF1 de la région -130 à -110 est utilisé *in vivo* pour activer la transcription du gène *AFP*. Cette interprétation concorde avec l'empreinte génomique trouvée *in vivo* dans les mêmes cellules. La diminution de l'activité du rapporteur par la destruction du site HNF1 pourrait s'expliquer par deux mécanismes : cette mutation pourrait altérer la liaison de C/EBP; ou une certaine proportion des transgènes pourrait utiliser HNF1 dans ce système de transfection. Dans l'ensemble, ces résultats renforcent donc la conclusion que la séquence de type sauvage lie la protéine C/EBP au promoteur *AFP* dans un contexte physiologique et que cette protéine est essentielle pour l'activité du gène *AFP*.

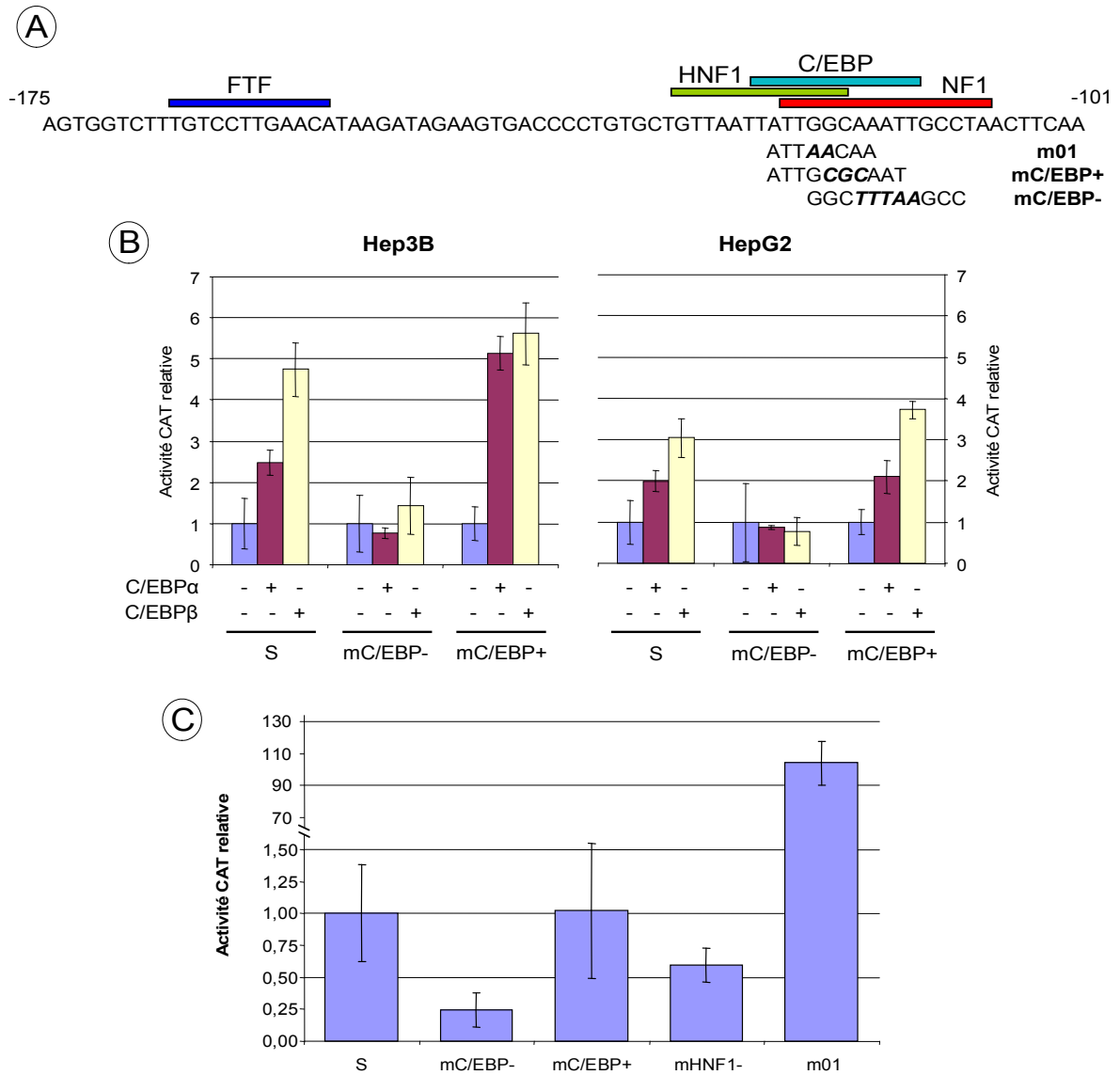


Figure 2-3 C/EBP stimule le promoteur *AFP* et est essentiel à son activité

A) Représentation du promoteur du gène *AFP*. Les boîtes de couleur représentent les sites de liaison pour des facteurs de transcription. Les mutations introduites dans le site HNF1/C/EBP/NF1 sont inscrites en gras sous la séquence. B) Transfections transitoires effectuées dans deux lignées d'hépatome avec les régions régulatrices de type sauvage (S) ou mutées dans le site C/EBP du promoteur (mC/EBP-, mC/EBP+) et co-transfectées avec des vecteurs d'expression pour les protéines C/EBP α et C/EBP β . L'activité CAT des vecteurs transfectés seuls a été ramenée à 1 comme valeur de référence. C) Transfections stables dans les cellules 7.6 avec le rapporteur 4.4AFP/CAT de type sauvage (S) ou muté dans les sites de liaison pour les protéines HNF1 ou C/EBP. L'activité CAT obtenue pour le vecteur de type sauvage a été ramenée à 1 comme valeur de référence. Les résultats illustrés (en B et C) proviennent de la moyenne (\pm écart-type) d'au moins trois expériences indépendantes.

2.3.4 L'activation de l'*AFP* par C/EBP nécessite la région amplificatrice EI

Plusieurs sites de liaison pour la famille C/EBP ont déjà été caractérisés dans l'amplificateur EI de l'*AFP* par notre laboratoire (18, 228). Or, on constate une perte complète de la stimulation des constructions mutées dans le site C/EBP du promoteur *AFP* lors d'une surexpression des protéines C/EBP, alors qu'il reste encore des sites C/EBP fonctionnels à l'amplificateur EI de ces constructions. J'ai donc voulu vérifier si le même résultat pouvait être obtenu par la mutation exclusive des sites C/EBP de l'amplificateur. Effectivement, l'élimination des sites C/EBP de l'amplificateur EI mène à une résistance de cette construction à l'effet activateur de C/EBP α et de C/EBP β (figure 2-4). Ce résultat indique donc une interdépendance entre les sites C/EBP de l'amplificateur EI et du promoteur dans l'activation du gène *AFP* par les membres de la famille C/EBP.

2.3.5 C/EBP est détecté directement *in vivo* sur la chromatine *AFP*

Afin de valider encore davantage nos résultats, j'ai voulu vérifier *in vivo* si on pouvait détecter C/EBP sur le promoteur *AFP* (et dans la région EI) sous forme de chromatine native. Pour ce faire j'ai utilisé la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) qui permet, en fixant les cellules au formaldéhyde, de prendre un cliché, en quelque sorte, des protéines présentes *in vivo* sur une région d'ADN précise à un temps donné. En utilisant des anticorps dirigés contre les protéines qui nous intéressent, on peut précipiter et par la suite amplifier les fragments d'ADN qui sont liés à ces protéines de façon spécifique. Pour ces expériences, j'ai utilisé les cellules 7.6 cultivées à faible densité afin de comparer par le fait même les résultats d'empreinte génomique *in vivo* obtenus précédemment.

Comme la figure 2-5 le démontre, j'ai été en mesure d'immunoprécipiter spécifiquement les fragments attendus de la région EI et du promoteur *AFP* avec des anticorps dirigés contre les protéines C/EBP α et C/EBP β alors que les régions adjacentes sont négatives et qu'un contrôle négatif (IgG non-immuns) ne donne aucun signal d'enrichissement significatif.

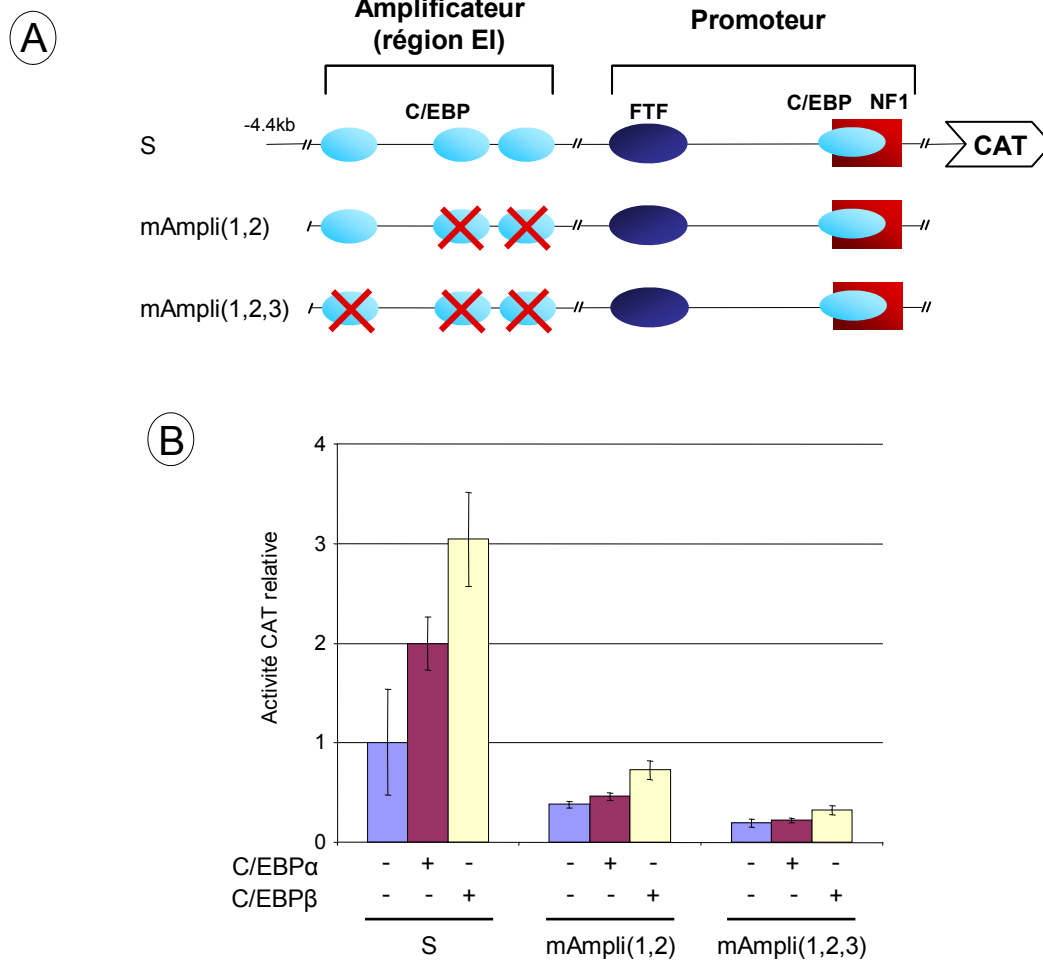


Figure 2-4 Les sites C/EBP de l'amplificateur *AFP* sont nécessaires à l'activation de l'*AFP* par C/EBP

A) Représentation schématique des sites de liaison retrouvés dans les vecteurs utilisés pour les transfections transitoires. Les sites mutés sont identifiés par des x rouges et le nom de chaque construction est inscrit à gauche. B) Transfections transitoires dans les cellules HepG2 du rapporteur 4.4AFP/CAT de type sauvage (S) ou muté dans les sites C/EBP de la région EI (mAmpli) avec co-transfection des vecteurs d'expression pour les protéines C/EBP α ou C/EBP β . L'activité CAT obtenue pour le vecteur de type sauvage (S) a été ramenée à 1 comme valeur de référence. Les résultats illustrés proviennent de la moyenne (\pm écart-type) d'au moins trois expériences indépendantes.

La fixation des complexes protéiques sur l'ADN à l'aide de formaldéhyde peut cependant introduire certaines ambiguïtés dans l'interprétation des résultats obtenus. Ainsi, certains autres gènes fonctionnant avec une région promotrice et des régions amplificatrices, comme le gène de la β -globine et le gène HNF4 par exemple, forment des boucles entre ces régions

régulatrices, par interaction entre les complexes présents sur l'une ou l'autre de ces régions (90, 231). Lorsque fixées avec le formaldéhyde, certaines protéines liées à la région promotrice du gène peuvent être détectées au niveau de régions amplificatrices, et vice versa. Comme l'amplificateur *AFP* lie les protéines C/EBP et que celui-ci peut être impliqué dans la formation d'une boucle liant les complexes protéiques situés au promoteur, il se pourrait que le signal détecté au niveau du promoteur provienne de molécules C/EBP liées à l'amplificateur et récupérées dans un complexe multi-protéique promoteur/amplificateur. Ainsi, le signal détecté au promoteur ne serait pas spécifique au promoteur, mais au couple promoteur/amplificateur.

Pour établir la spécificité du signal d'enrichissement C/EBP obtenu précédemment au promoteur *AFP*, j'ai mesuré l'enrichissement obtenu pour deux autres protéines, soit HNF1, qui se lie à la région -50 du promoteur *AFP*, et l'ARN polymérase II, qui devrait se retrouver spécifiquement au niveau du promoteur du gène. Les figures 2-5D et 2-5E montrent la spécificité du signal obtenu avec les anticorps contre HNF1 et pol II pour le promoteur *AFP*. Ceci indique très fortement que les signaux d'enrichissement obtenus avec les anticorps dirigés contre C/EBP sont bel et bien spécifiques au promoteur *AFP* et ne proviennent pas d'un complexe protéique impliqué dans un phénomène de boucle entre les régions amplificatrices et le promoteur.

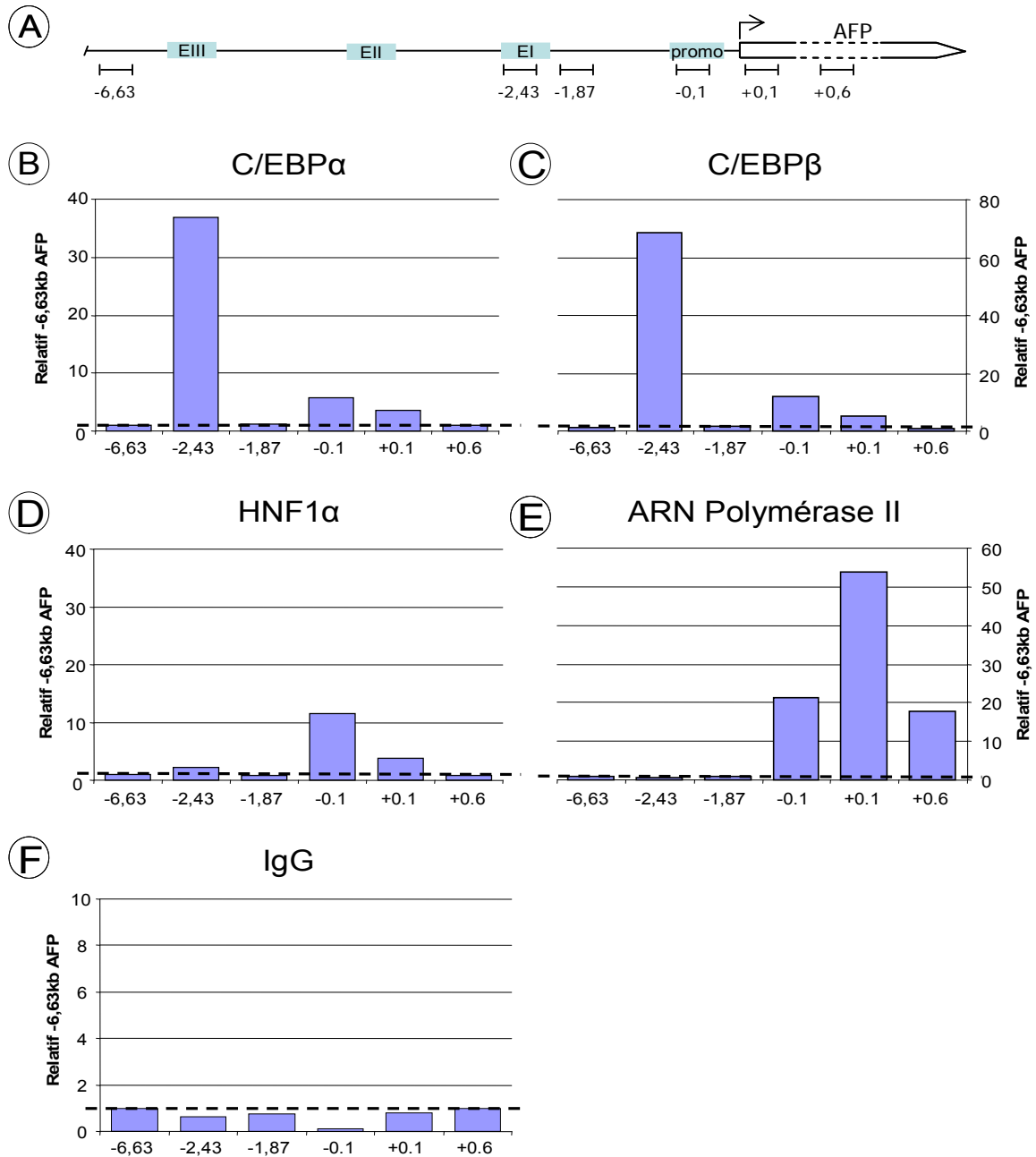


Figure 2-5 C/EBP est présent *in vivo* sur le promoteur *AFP*

A) Représentation schématique des régions régulatrices du gène *AFP*. La position des amorces utilisées pour les ChIP est inscrite, en kilobases par rapport au site d'initiation de la transcription de l'AFP. B-F) ChIPs réalisés sur les cellules 7.6 cultivées à faible densité. Les traits pointillés représentent le bruit de fond obtenu pour chaque anticorps. Les enrichissements obtenus sont relativisés au signal obtenu à une région contrôle, soit la région -6.63. Chaque ChIP a été effectué au moins trois fois et les graphiques illustrent les résultats d'une expérience représentative.

2.3.6 Le positionnement relatif entre FTF et C/EBP est critique dans la régulation transcriptionnelle de l'AFP

Des résultats obtenus précédemment dans notre laboratoire suggéraient un rôle important de la région LS dans la régulation du locus *AFP* (73, 121). Ainsi, lorsqu'on y crée, dans un transgène AFP/rapporteur, un site consensus pour FTF ou HNF4 (dans un contexte où NF1 ne peut plus lier son site, soit la mutation m01), on obtient une persistance d'expression du transgène dans le foie des souris adultes (121, 184); le même phénomène est observé lorsqu'on enlève 10 pb du segment LS (Dr Denis Allard, communication personnelle). Or, les résultats d'empreinte génomique *in vivo* (figure 2-1) indiquent qu'aucune protéine occupe ce segment d'ADN. J'ai donc approfondi les effets de mutations et délétions de la région LS sur l'activité transcriptionnelle du locus en portant attention particulièrement sur le degré d'activation par les C/EBP en transfections transitoires. Comme présenté à la figure 2-6B, la mutation non-spécifique du segment LS ne change pas le niveau de base du rapporteur alors que celui-ci augmente bien par la délétion de 10 pb ou l'ajout d'un activateur FTF dans la région LS. Aucune différence n'est toutefois observée au niveau de la transactivation causée par la surexpression de C/EBP α ou C/EBP β . Donc, la séquence intrinsèque de cette région ne semble pas critique pour ce qui est de l'activation par C/EBP.

Ce type d'expérience ne reflétant pas parfaitement le contexte chromatinien présent sur le gène endogène, j'ai par la suite transfecté de façon stable, dans les cellules 7.6, différents rapporteurs 4.4AFP/CAT dont le segment LS a été modifié seul ou conjointement avec les sites C/EBP ou HNF1 adjacents pour vérifier l'effet de ces mutations sur leur niveau de base dans un contexte chromatinien.

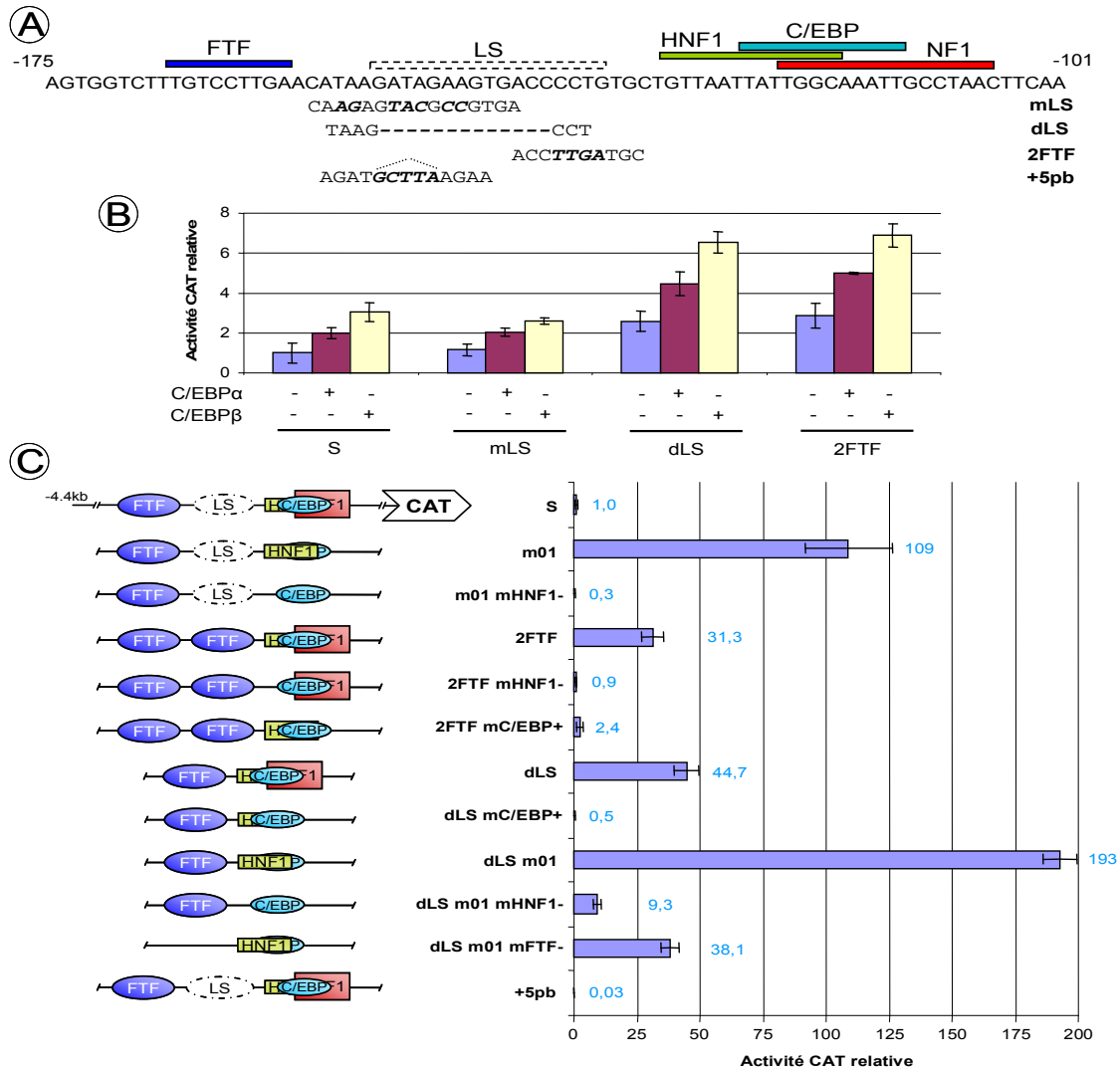


Figure 2-6 Importance de la région LS dans la régulation transcriptionnelle de l'*AFP*

A) Représentation du promoteur *AFP*. Les boîtes de couleur représentent les sites de liaison pour des facteurs de transcription alors que la boîte pointillée représente le segment LS. Les mutations introduites dans le promoteur *AFP* sont inscrites en gras sous la séquence et le nom de la mutation est inscrit à la droite de celle-ci. Les traits pointillés indiquent une délétion de 10 paires de base. B) Transfections transitoires dans les cellules HepG2 des différents vecteurs mutants de la région LS avec cotransfection de C/EBP α ou C/EBP β . L'activité CAT obtenue pour le vecteur de type sauvage a été ramenée à 1 comme valeur de référence. C) Transfections stables dans les cellules 7.6 avec le rapporteur 4.4AFP/CAT de type sauvage (S) ou muté dans la région de -175 à -100. Dans la représentation schématique des mutations, à gauche de l'histogramme, l'ordre de superposition des sites de liaison représente la liaison relative prédite de HNF1, NF1 et C/EBP. L'activité CAT obtenue pour le vecteur de type sauvage a été ramenée à 1 comme valeur de référence. Les résultats illustrés (en B et C) proviennent de la moyenne (\pm écart-type) d'au moins trois expériences indépendantes.

Les résultats de ces expériences permettent de constater trois choses. Premièrement, la délétion du segment LS (mutation dLS) ou l'ajout dans cette séquence d'un site consensus pour la protéine FTF (mutation 2FTF) mène à une forte augmentation de l'activité de base de ces constructions (se rapprochant du niveau de base observé pour la mutation m01). Deuxièmement, la création additionnelle d'un site consensus pour C/EBP (mutation mC/EBP+) ou d'une mutation nulle du site HNF1 (mutation mHNF1-) ramène le niveau de base de ces constructions à un niveau comparable au type sauvage (figure 2-6C). Troisièmement, l'ajout de 5 pb dans la région LS (mutation +5pb) élimine complètement l'activité transcriptionnelle de la région régulatrice de l'*AFP*. Ces résultats indiquent que le positionnement du site C/EBP par rapport au site FTF est critique pour le fonctionnement correct du locus *AFP*, eu égard particulièrement à l'utilisation de C/EBP plutôt que HNF1 à leurs sites chevauchants, dans la région de -112 à -130 du promoteur.

2.4 Discussion

La régulation du gène *AFP* au cours du développement hépatique est un phénomène étudié depuis plus de 30 ans par plusieurs équipes de recherche. Tous ces travaux ont mené à l'identification des principales régions responsables de la régulation particulière du gène. Parmi celles-ci, la région distale du promoteur *AFP* semble jouer un rôle primordial dans sa régulation développementale. Cependant, malgré une étude approfondie de cette région par diverses méthodes, aucun modèle de régulation convaincant n'a pu être retenu, jetant par le fait même un certain doute sur le fonctionnement de ce segment d'ADN. Ce chapitre a donc tenté d'améliorer notre compréhension du fonctionnement de cette région particulière du locus *AFP*.

J'ai donc décidé de privilégier des méthodes d'analyse *in vivo* afin d'identifier les sites fonctionnels importants pour la régulation transcriptionnelle du gène *AFP*. Les résultats obtenus avec les méthodes d'empreinte génomique *in vivo* et de ChIP me permettent aujourd'hui d'affirmer que les protéines de la famille C/EBP, particulièrement C/EBP α et C/EBP β , deux isoformes très importantes dans le développement hépatique et très abondantes dans le foie, occupent le segment d'ADN situé au niveau des sites chevauchants HNF1/NF1 lorsque le gène *AFP* est actif. Par ces mêmes résultats, je peux aussi exclure la liaison de la protéine HNF1 sur cette région (sur le locus endogène) dans des cellules d'hépatome, autant lorsque le gène est actif que lorsqu'il est réprimé. La séquence protégée *in vivo* de l'action de la DNase I ne permet pas en soi d'affirmer que ce sont vraiment les protéines C/EBP qui vont se lier à cette région d'ADN pour activer la transcription de l'*AFP*. Cependant, tous les résultats suivant ces expériences le confirment. Ainsi, les protéines de la famille C/EBP sont en mesure de se lier *in vitro* à une sonde couvrant cette région spécifique du promoteur *AFP* et une mutation y détruisant le site de liaison pour C/EBP, ne permet plus la liaison de ces protéines. De plus, en transfection transitoire, la surexpression de C/EBP mène à une activation d'un gène rapporteur placé sous le contrôle des séquences régulatrices sauvages de l'*AFP* alors que la mutation du site C/EBP du promoteur annule l'effet de la surexpression de ces protéines (figure 2-3). En outre, dans un système de transfusions stables, donc dans un contexte où les constructions plasmidiques sont introduites dans le génome de la cellule et mieux organisées sous forme de chromatine,

la mutation du site C/EBP du promoteur *AFP* mène à une diminution de la transcription du gène rapporteur ce qui appuie encore un rôle critique de ce site dans l'activité transcriptionnelle de cette région. Finalement, la présence des protéines C/EBP α et C/EBP β sur le promoteur *AFP* a été confirmée *in vivo* au niveau du gène endogène par des expériences de ChIP (figure 2-5).

Un autre point intéressant soulevé par les résultats de ce chapitre implique l'existence d'un lien étroit entre les sites C/EBP du promoteur et de la région amplificatrice EI du gène *AFP*. Ainsi, en mutant uniquement le site C/EBP du promoteur, on perd l'activation du gène rapporteur par la surexpression des protéines C/EBP et le même résultat est aussi obtenu par la mutation des trois sites C/EBP présents dans la région EI. Ces résultats viennent appuyer des expériences antérieures démontrant que la région promotrice du gène *AFP* dépend de la présence des régions amplificatrices, sans lesquelles elle ne peut activer la transcription (28). De plus, ils indiquent une fonction essentielle des sites C/EBP du promoteur et de l'amplificateur *AFP* dans l'activation du promoteur par la région amplificatrice du gène. Les protéines C/EBP présentes au promoteur *AFP* pourraient ainsi agir comme facteur « couplant » entre le promoteur et l'amplificateur *AFP*, comme il a aussi été suggéré pour FTF (249). Cette fonction pourrait être accomplie par des interactions directes entre les C/EBP ou par des interactions entre les C/EBP et un ou des mêmes cofacteurs.

Les résultats obtenus en surexprimant les protéines C/EBP α et C/EBP β en présence des régions régulatrices de l'*AFP* montrent un autre phénomène très intéressant : la surexpression de C/EBP β produit une plus forte activation du gène rapporteur que la surexpression de C/EBP α (figure 2-2). À l'inverse, le promoteur *ALB*, dont l'expression se poursuit lors de l'extinction du gène *AFP* pendant la différenciation hépatique est beaucoup plus fortement activé par C/EBP α que par C/EBP β (données non montrées). Comme C/EBP β est associé de près avec la croissance cellulaire ainsi que la tumorigenèse (162), il était tentant de spéculer que C/EBP β pouvait être responsable de l'activation du gène *AFP* au cours du développement hépatique et de la tumorigenèse; une induction de C/EBP α lors de la différenciation terminale des hépatocytes et de l'arrêt de croissance de ces cellules permettrait une plus grande induction du gène *ALB* et mènerait à la répression du gène

AFP. Cependant, les analyses effectuées par CHIP démontrent la présence équivalente de C/EBP α et C/EBP β sur le promoteur et l'amplificateur *AFP* lorsque celui-ci est actif, appuyant ainsi la fonctionnalité de ces deux isoformes dans l'activation du gène *AFP*. De plus, l'inactivation ciblée de C/EBP β chez la souris ne mène pas à l'absence de transcription de l'*AFP* (données non montrées, matériel obtenu du Dr M. Buck), suggérant que C/EBP α (ou un autre membre de la famille) peut remplacer C/EBP β dans cette fonction.

Un autre point soulevé par les empreintes génomiques *in vivo* concerne la protéine NF1, identifiée comme un répresseur du gène *AFP*. Ainsi, ces expériences ont permis d'observer la protection d'un segment d'ADN correspondant au site NF1 lorsque le gène *AFP* est réprimé dans un modèle d'hépatome. J'ai pu confirmer par CHIP la présence de cette protéine dans ces conditions sur le gène *AFP* endogène puisque les anticorps, dirigés contre NF1, testés dans ces expériences n'étaient pas efficaces. Je peux cependant exclure qu'une compétition entre NF1 et C/EBP opère au niveau du promoteur *AFP* dans la régulation de ce gène : premièrement, la mutation du site NF1 (qui empêche la liaison de NF1 mais pas de C/EBP) ne permet pas d'obtenir une persistance significative de l'expression hépatique d'un transgène sous le contrôle de cette région mutée (121); deuxièmement, la mutation de ce site au profit d'un site consensus pour C/EBP n'augmente pas l'expression d'un transgène dans les cellules d'hépatome (figure 2-3C). La répression de l'*AFP* serait donc plus probablement le résultat d'une perte de fonction de C/EBP dans ce contexte précis, qui permettrait à NF1 de lier son site devenu accessible et de bloquer la liaison de HNF1. Étant donné la provenance rénale possible de l'*AFP* dans les cas de persistance héréditaire, la conservation à travers les espèces du site NF1 pourrait alors refléter un rôle pour NF1 principalement dans le rein, pour antagoniser HNF1.

À propos de HNF1/NF1, plusieurs études antérieures à celle-ci ont été effectuées en ayant en tête qu'une compétition entre ces deux protéines servait de commutateur pour la régulation de la région distale du promoteur *AFP*. Dans cette optique, une mutation précise a été réalisée dans notre laboratoire, laquelle convertit le site HNF1 de cette région en un site HNF1 de plus haute affinité tout en détruisant le site NF1 chevauchant (mutation m01), sans que cette mutation n'affecte la régulation développementale (121). C'est dans ce

contexte m01 qu'avaient été effectuées des expériences visant à définir le rôle de la région LS dans la régulation du gène *AFP*, générant des résultats très intrigants (121). Premièrement, la modification de la séquence LS afin de créer un site consensus pour les récepteurs nucléaires FTF ou HNF4 entraîne un changement radical dans la régulation développementale d'un transgène : les deux constructions portant ces mutations sont très actives dans le foie de souris nouveau-nées mais aussi chez les souris adultes, contrairement à la construction ne possédant que la mutation m01. Deuxièmement, une autre construction, délétaée celle-là de 10 pb dans le segment LS, démontre aussi une persistance d'expression du transgène dans les souris adultes. Ces résultats ont donc suggéré que la région LS pouvait remplir une fonction cruciale dans la régulation de l'*AFP*. Mais, il faut noter encore une fois que les mutations de la région LS avaient été effectuées en combinaison avec la mutation augmentant l'affinité du site HNF1 alors que les travaux présentés dans ce chapitre démontrent *in vivo* la présence de C/EBP au détriment de HNF1 sur la région distale du promoteur *AFP*.

Malgré les effets marqués des mutations du segment LS, les expériences d'empreinte génomique *in vivo*, présentées à la figure 2-1, nous indiquent qu'aucune protéine n'est en contact avec ce segment puisque qu'il n'y a pas de région significativement protégée de l'action de la DNase I au niveau du segment LS, que ce soit en phase exponentielle ou stationnaire. De plus, les expériences de transfection transitoire ont démontré que la modification du segment LS n'affecte en rien l'activation du gène rapporteur en présence d'une surexpression des protéines C/EBP. Les expériences de transfection stable ont toutefois permis de mieux comprendre comment la modification du segment LS définit un contexte où soit C/EBP, soit HNF1 occupe le site adjacent, et modifie la fonctionnalité du promoteur. Ainsi, l'ajout d'un site FTF dans la région LS, ou une délétion de 10 pb de ce segment, semble favoriser l'utilisation de HNF1 au détriment de C/EBP puisque la destruction du site HNF1 de ces constructions, ou la conversion du site C/EBP en un site de très haute affinité, annule l'effet des modifications du segment LS. Par contre, la mutation forçant l'utilisation de HNF1 (mutation m01) conserve un haut niveau de transcription de ces constructions. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que la persistance d'expression des transgènes *AFP/CAT* modifiés dans la région LS est obtenue, en partie du moins, par l'exclusion de C/EBP du promoteur et son occupation par HNF1. Alors, comment l'ajout

d'un site FTF ou la délétion de 10 pb dans le segment LS entravent-ils l'action de C/EBP au profit de HNF1 au niveau du promoteur *AFP*?

Les modifications du segment LS ont une conséquence majeure sur la configuration du promoteur. Ainsi, la délétion de 10 pb (soit approximativement un tour d'hélice d'ADN) permet de rapprocher le site FTF distal du site HNF1/C/EBP tout en conservant la position rotationnelle relative de ces sites. Le même résultat est aussi obtenu par l'ajout d'un site de liaison dans la région LS. La plus courte distance séparant maintenant ces facteurs sur le promoteur *AFP* semble donc entraver la liaison de C/EBP sur son site en faveur de HNF1. L'activation conjointe du gène *AFP* par FTF et C/EBP nécessite donc un positionnement optimal des deux facteurs sur la région distale du promoteur. L'importance de la configuration native du promoteur *AFP* est renforcée par l'effet majeur obtenu par l'ajout de 5 pb dans le segment LS, modification qui perturbe le positionnement rotationnel des deux facteurs sur l'ADN et qui diminue radicalement l'activité de cette région.

De plus, comme les effets des modifications du segment LS surviennent majoritairement lorsque les transgènes sont intégrés dans le génome, cela suggère que ces effets, impliquant une entrave dans l'activité de C/EBP, dépendent de la structure nucléosomale présente sur le promoteur *AFP*. Cette structure semble d'ailleurs strictement régulée au cours du développement hépatique alors qu'un site hypersensible à la DNase I *in vitro* passe de la position centrée autour de -200 pb dans les foies de souris de 4 jours (qui expriment l'*AFP*) à une position centrée autour du site d'initiation de la transcription dans les foies de souris adultes (où le gène *AFP* est complètement réprimé) (77). Des expériences plus poussées effectuées avec la nucléase micrococcale, qui coupe l'ADN seulement entre les nucléosomes, permettraient d'obtenir avec une meilleure résolution le positionnement des nucléosomes sur cette région régulatrice pendant le développement hépatique et de vérifier si ceux-ci sont bel et bien positionnés précisément sur le promoteur *AFP* pour en moduler l'activité.

2.4.1 Perspectives pour la régulation développementale de l'*AFP*

L'identification d'un site C/EBP fonctionnel *in vivo* au niveau de la région distale du promoteur du gène *AFP*, une région critique pour la transcription de ce gène, soulève des

perspectives très intéressantes concernant la régulation développementale de l'*AFP*. Les protéines C/EBP α et C/EBP β occupent des fonctions importantes lors de la différenciation de plusieurs types de tissus, notamment les adipocytes, les cellules hématopoïétiques et les hépatocytes (revue dans (187)). Ces protéines ont aussi été associées avec les processus de prolifération cellulaire (revue dans (162)), un autre phénomène relié à la régulation de l'*AFP*. Les C/EBP peuvent être régulées de plusieurs façons, principalement par la production d'isoformes de longueurs variées ou par des modifications post-traductionnelles effectuées par différentes voies de signalisation cellulaire. Ainsi, le site C/EBP présent dans la région distale du promoteur du gène *AFP* pourrait permettre de réguler ce gène en réponse à de nombreux stimuli, notamment la prolifération et la différenciation hépatique. De plus, la présence de trois sites C/EBP dans la région EI du gène *AFP*, et leur importance dans l'activation du gène par les protéines de la famille C/EBP, soulignent le rôle de C/EBP partagé entre les régions promotrice et amplificatrices du gène *AFP*. La façon exacte par laquelle ces différentes régions communiquent entre elles pour mener à la régulation particulière de ce locus fait l'objet d'une étude plus poussée présentée dans les prochains chapitres de cette thèse. Cependant, il apparaît déjà plus que probable que C/EBP joue un rôle clé dans cette régulation.

Chapitre 3- Rôle de C/EBP et de ses corégulateurs dans la régulation onco-développementale du locus *AFP*

3.1 Introduction

Comme il en est fait état dans le chapitre 2 de cette thèse, le promoteur du gène *AFP* semble être très important pour la régulation développementale de l'*AFP*. Cependant, l'étude des facteurs de transcription se liant à cette région n'a pu apporter de solution définitive à ce problème. Mes travaux présentés au chapitre 2 ont pu démontrer l'occupation du segment -125 à -110 du promoteur *AFP* par les protéines de la famille C/EBP *in vivo*. Ces résultats ont suscité un grand intérêt de ma part puisqu'ils viennent contredire le dogme selon lequel HNF1 occupe ce segment pour mener à l'activation de la transcription de l'*AFP*. Cependant ces résultats ne me permettent pas d'identifier *a priori* le mécanisme de répression transcriptionnelle de l'*AFP* au cours du développement hépatique. Les principaux activateurs retrouvés au niveau du promoteur *AFP*, soit C/EBP, FTF et HNF1 sont tous exprimés à de bonnes concentrations dans le foie adulte et continuent tous d'activer des gènes importants pour la fonction hépatique. Alors comment un gène activé par ces facteurs de transcription peut être désactivé spécifiquement au cours du développement sans que leurs autres gènes cibles ne soient affectés demeure une question en suspens.

La présence de C/EBP au niveau du promoteur *AFP*, dont le domaine chromatinien semble très sensible aux changements développementaux (237), amène toutefois des perspectives fort intéressantes en ce qui a trait à ce mécanisme de régulation particulier. En effet, il a été démontré que cette famille de protéines occupe un rôle primordial dans la différenciation de plusieurs types cellulaires, dont les hépatocytes (revue dans (187)). Donc, est-ce que la régulation ciblée de cette famille de protéines permettrait d'expliquer la régulation spécifique de l'*AFP*, en particulier lors de la différenciation terminale des hépatocytes?

Les protéines de la famille C/EBP, particulièrement C/EBP α et C/EBP β , sont les cibles de plusieurs sentiers de signalisation cellulaire lors de la croissance et de la différenciation des différents tissus dans lesquels elles sont exprimées. Ainsi, un des premiers contrôles exercés sur ces protéines survient au niveau traductionnel alors que la protéine mTOR, impliquée dans la prolifération cellulaire, a été démontrée pour favoriser la traduction des petites isoformes de C/EBP par la stimulation des facteurs d'initiation de la traduction eIF2 et eIF4-E (27). Ces petites isoformes, produites à partir d'un codon d'initiation alternatif,

contiennent seulement la partie C-terminale de la protéine qui comprend le DBD et le domaine de dimérisation mais qui exclut les domaines d'activation N-terminaux. Ces petites isoformes vont donc agir comme dominants négatifs sur la transcription des gènes cibles de C/EBP (55, 171). En outre, les protéines C/EBP pleine longueur sont ciblées par plusieurs modifications post-traductionnelles, soit principalement la phosphorylation, l'acétylation et la sumoylation, sous l'action de plusieurs voies de signalisation intracellulaires, dont la voie des MAPK (89, 181, 182, 227, 245). Ces modifications vont mener à des changements d'interactions entre les protéines C/EBP et certains cofacteurs importants pour l'activité transcriptionnelle de ces protéines. Ainsi, une voie de signalisation impliquant les protéines de la famille Ras cible C/EBP β , ce qui provoque un échange de sa liaison à un complexe Mediator inactif, comprenant la sous-unité CDK8, pour un complexe Mediator actif, comprenant la sous-unité CRSP70 (153). Enfin, l'activité des protéines C/EBP est aussi régulée par la présence ou l'absence d'autres protéines pouvant interagir avec elles. Par exemple, la protéine du rétinoblastome (pRB), associée à l'arrêt de la prolifération cellulaire et la différenciation terminale des cellules, peut s'associer avec les protéines C/EBP et en stimuler l'activité transcriptionnelle sur certains gènes cibles (35, 100).

La présomption que les protéines de la famille C/EBP jouent un rôle prépondérant dans la régulation développementale de l'*AFP* est très forte, mais la façon dont ces protéines peuvent moduler la transcription de l'*AFP* est encore inconnue. En effet, en plus du site C/EBP identifié au niveau du promoteur, la présence de plusieurs autres sites C/EBP potentiels a été rapportée dans les régions amplificatrices EI, EII et EIII de l'*AFP* (18, 76, 82, 135, 228). Si la complexité du locus est bien établie en ce qui a trait au nombre de régions régulatrices et à leur interaction fonctionnelle, peu de groupes se sont penchés sur l'étude *in vivo* de ces régions et sur la façon dont celles-ci sont coordonnées au cours du développement hépatique ou tout simplement lorsque le gène est actif. Les études réalisées pour la caractérisation de ces régions ont été essentiellement effectuées par des méthodes *in vitro*, sans que leur signification sur la régulation de l'*AFP* ait été complètement résolue. De plus, certaines régions sont encore aujourd'hui peu caractérisées en ce qui a trait aux facteurs de transcription pouvant s'y lier, comme c'est le cas particulièrement pour la région EII. Et le fait que les régions amplificatrices démontrent de l'activité dans le foie

mature de souris transgéniques (28, 186) ne signifie pas nécessairement qu'elles n'ont aucun rôle important à jouer dans la régulation spatio-temporelle du locus *AFP*. Le phénomène de régionalisation (expression péricentrolobulaire) observé pour ces régions amplificatrices (186) est également très intrigant et personne n'a été en mesure de l'expliquer jusqu'à maintenant.

Cette deuxième partie de résultats de ma thèse visait donc, dans un premier temps, à localiser précisément les sites de recrutement des protéines C/EBP sur l'ensemble des régions régulatrices du gène *AFP* afin de mieux cerner leur rôle précis dans l'activité du locus. Deuxièmement, j'ai examiné comment l'activité des protéines C/EBP et de certains de ces coactivateurs pourrait être modulée dans une lignée modèle d'hépatome et au cours du développement hépatique pour réguler la transcription de l'*AFP*.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Culture cellulaire et animaux

Les cellules de la lignée 7.6 (variant sous-cloné de la lignée d'hépatome de rat Morris 7777) ont été cultivées dans du milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Gibco), faible en glucose et supplémenté de 10% de sérum fœtal bovin (FBS, Wisent), de 100 U/ml de pénicilline et de 100 µg/ml de streptomycine (Gibco-BRL). Pour la condition de faible densité, les cellules 7.6 ont été étalées à 1×10^4 cellules/cm² alors que pour la condition de haute densité, les cellules 7.6 ont été étalées à 1×10^5 cellules/cm². Les cellules ont par la suite été cultivées pendant 40 heures avant d'être analysées. Des rats Sprague-Dawley, obtenus de Charles River Laboratories (Saint-Constant, Qc), ont été utilisés pour les expériences de ChIP.

3.2.2 Immunobuvardage de type Western et gel de retardement

La préparation des extraits nucléaires a été effectuée tel qu'il a été décrit à la section 2.2.6 de cette thèse. Pour les immunobuvardages de type Western, 15 µg de protéines d'extrait nucléaire ont été fractionnés par SDS-PAGE (10%) et transférés sur membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été colorées au rouge de Ponceau pour s'assurer d'une quantité égale de protéine dans chaque puits avant d'être hybridées avec les anticorps appropriés, soit DL426 (C/EBP α) ou SC-150x (C/EBP β). La détection des protéines s'est

faite par chemiluminescence à l'aide d'un second anticorps couplé à la « Horseradish Peroxidase » (HrP) et révélée avec la trousse de détection « Western Lightning Chemiluminescence Reagents » (Perkin Elmer Life Science). Les gels de retardement ont été réalisés avec 3 µg de protéines d'extrait nucléaire et une sonde double brin couvrant la région -125 à -112 du promoteur AFP de rat selon le protocole décrit précédemment (18).

3.2.3 Immunoprécipitation de chromatine

Les expériences de ChIP sur les cellules 7.6 ont été réalisées tel que décrit à la section 2.2.7 de cette thèse avec une seule modification : la réaction de fixation est laissée pendant 10 minutes (pour détecter les facteurs de transcription) ou 20 minutes (pour détecter les cofacteurs) à la température de la pièce avant d'être titrée avec de la glycine à 125 mM. Les anticorps utilisés pour les ChIP sont : C/EBP α (sc-9314x), C/EBP β (sc-150x), pol II (sc-9001x), HNF1 α (sc-6547x), p300 (sc-585x), CBP (sc-369x), TRAP220/MED1 (sc-5334x), HNF4 α (sc-6556x) et IgG contrôle (sc-2027), tous de Santa Cruz Biotechnology. Les ChIP sur les foies de rat ont été réalisés tel que décrit à la section 2.2.7 et selon les spécifications suivantes : les foies de rats Sprague-Dawley (au moins 3 rats de portée différente par groupe) ont été prélevés et combinés sur glace pour ensuite être cisailés, mélangés à 5 volumes de PBS et passés 10 fois dans une aiguille 18g à l'aide d'une seringue. Le formaldéhyde a ensuite été ajouté à une concentration finale de 1,1% et la réaction poursuivie pendant 15 minutes avec agitation à la température de la pièce avant d'être titrée avec de la glycine à 125 mM. Après 5 minutes d'incubation supplémentaire avec agitation à la température de la pièce, les échantillons ont été centrifugés, resuspendus dans 30 ml de PBS et les cellules ont été désaggrégées à l'aide d'un homogénéisateur douce (10 coups) avant d'être recentrifugées et congelées à -80°C. Les ChIP ont été réalisés sur au moins deux expériences indépendantes. Les amorces utilisées pour les ChIP ont été choisies pour amplifier des fragments de 100 à 150 pb et sont inscrites dans le tableau 3-1.

Tableau 3-1 Liste des amorces utilisées pour les immunoprécipitations de chromatine

Spécificité	Région	Brin	Séquence des amorces (5'-3')
7.6 / Foie	-6,63	+	CTACAGCCAGGTGATTAG
		-	ATTCCTCGAATCTGATGTC
7.6 / Foie	-6,02	+	CTATATCGATGTTCTAGTGTACC
		-	CCACACAGGAACAAAGTAA
7.6 / Foie	-5,09	+	TACCAGAAGAGCGTGAG
		-	GAAACACAGCATCATCTTTACA
7.6 / Foie	-4,16	+	GGAAGATTCGAGGATTTATGG
		-	CACGGTTTGTGTGCTGA
7.6 / Foie	-2,88	+	GATGTGGTCTCAGTCAGTA
		-	GTAGAACTCAACAGTTGGG
7.6	-2,43	+	TGAGCAACAGCCCGT
		-	CCAAAGCATGTGATCAGAAC
Foie	-2,43	+	GTTTGCAGTTGGTGTTAGA
		-	TCAGAAAGGTGCACAGG
7.6	-1,87	+	CAAGTGTTGAGACAGGACCCA
		-	ATGCAAACGATTGACCA
Foie	-1,25	+	GAAACACACACAGTAAGGCCT
		-	CCCTTGCAATCTAGAAAGT
7.6	-0,10	+	TTGGAAGAGTTTAGTTGGCA
		-	ACAGTGGTAGAAGCCGGA
Foie	-0,10	+	TGGAAGAGTTTAGTTGGCG
		-	ACAGTGGTAGAAGCCGGA
7.6 / Foie	+0,10	+	CAACCATGAAGTGGAGC
		-	CAAAGCATCTTACCTATTCCAA
7.6	+0,60	+	GTGCTAAGTCTGCAACTGA
		-	TGTTAGGAACCACCTGT
Foie	+0,60	+	GTGCTAAGTCTGCAACTGA
		-	GATTCCAAGTGGGAAAGCAA

3.2.4 ARN, ADNc et PCR quantitatif

L'ARN des cellules 7.6 a été isolé à l'aide de la trousse « RNeasy Plus mini » (Qiagen). Pour la synthèse d'ADNc, 3 µg d'ARN ont été utilisés avec des amorces oligo dT de la trousse « Superscript First-Strand cDNA Synthesis » (Invitrogen), conformément au protocole du fabricant. Les réactions de PCR en temps réel ont été effectuées sur un appareil LightCycler (Roche) en utilisant le réactif SYBRGreen (Invitrogen) dans un volume final de 10 µl. Les amorces spécifiques ont été choisies à l'aide du logiciel

LightCycler Probe Design Software version 2.0 (Roche) et sont inscrites dans le tableau 3-2. Après un premier cycle de 2 minutes à 50°C et 2 minutes à 95°C, les échantillons ont été amplifiés avec 45 cycles de 5 secondes à 94°C, 10 secondes à 55°C et 10 secondes à 72°C, suivi d'une courbe de dénaturation. Les données ont été normalisées au contenu en ARNm de GAPDH pour chaque échantillon selon la méthode $\Delta\Delta CP$, en tenant compte du coefficient d'efficacité d'amplification de chaque couple d'amorces, déterminé préalablement selon une courbe standard effectuée sur des dilutions séquentielles d'un même échantillon. La spécificité des réactions d'amplification a été déterminée en vérifiant la taille du produit par électrophorèse sur gel d'agarose 2% et par l'analyse des courbes de dénaturation de chaque réaction d'amplification.

Tableau 3-2 Amorces utilisées pour les qPCR effectués sur l'ADNc

ADNc	Brin	Séquence des amorces (5'-3')
GAPDH	+	TGCCACTCAGAAGACTGTGG
	-	TTCAGCTCTGGGATGACCTT
AFP	+	CGATGGAGTGCCTACAGGAT
	-	TTAAACCTTCCGGTTTGTCG
C/EBP α	+	GCCAAGAAGTCGGTGGATAA
	-	CACTGGTCAACTCCAACACCT
C/EBP β	+	GACTTCCTTTCCGACCT
	-	GAGGCTCACGTAACCGTA
FTF	+	AGCCATGTCTCAGGTGATCC
	-	CCCGATTAGGAAAGTGACCA
HNF1	+	GGCAAAGATGGTCAAGTCGT
	-	GAATTGCTGAGCCACCTCTC

3.3 Résultats

3.3.1 Identification *in vivo* des domaines de liaison de C/EBP dans les régions amplificatrices du gène *AFP*

J'ai détecté précédemment la présence des protéines C/EBP sur la région EI ainsi que sur la région distale du promoteur *AFP*, régions qui sont conservées entre l'humain, le rat et la souris (18). L'analyse de la séquence des deux autres régions amplificatrices du locus *AFP*, les régions EII et EIII, permet d'y répertorier plusieurs sites de liaison potentiels pour C/EBP, dont plusieurs sont également conservés entre l'humain, le rat et la souris, ce qui suggère leur fonctionnalité (figure 3-1).

Région EII

	C/EBP	
Souris	GTCACATTGTACCTGGGAAGATTCAAGGATTTATGGAAAAAGTCAACAA--CAGGAGTCAGAGCAGCCGAAAAG-----CATGGAC	
Rat	GTCATGCTGCACCGGGAAAGATTGAGGATTTATGGAAAAGTCAACAGAGCAAGAAATGGAGCAGCCGAAAAGTATTTGCTGTGAAC	
Humain	TCCATGTTGCTTCTGAGTGGCTTACAGACTTATG-AAAAAGTAAACGGAATCAGAATTTACATCAAT-GCAAAAAGCATGCTGTGAAC	
	* * * * *	* * * * *
	C/EBP	C/EBP/HNF3
Souris	TCTGTACTTAGGACTGCGCTTTGAGCAATGGCACAGCAAG-CTTTAACCCTGTTTGCAGTCAGCACAAAACACTGTGGTTCAAAGCTCC	
Rat	TCTGTACTTAGGACTCAGCTTTGAGCAATAGCCCCGAAAGTTTTAGCACTGTTTGGGTGAGCACACAAAACCGTGGTCAAAGCTCC	
Humain	TCTGTACTTAGGACTAAACTTTGAGCAATAACACATATAG-ATTGAGGATTTGTTGCTGTTAGTATACAAAACCTGTGGTTCAAAGCTCC	
	***** * * * * *	***** * * * * *

Région EIII

	C/EBP	HNF3
Souris	GCTCGTTGCCCAATTGTCTCTGATCTCTTTAGTTTTCCTGTGTGGGGGAAAAAAAATAATTTTCTCCCTAAACACCAAGAT	
Rat	GCTCGTTGCTCAATTCGTCTCTGACCTTTTACTTTGTTCTGTTGGGGGAAGAAAAATAATTTTCTCTCTAAACACCAAGAT	
Humain	GATTGTTGCTCAATCTGAC--TGACTCCTTTGAATTTGTTCCCGTGTGGGAGGAGAAAAATAATGTTATTTTCTCCCTTTACAAA-	
	* * * * *	* * * * *
	C/EBP	
Souris	CCAAAGATAAAATTCCTTTGATGAAG-AAAACAGTCTTTTTTTTTCCCATTTTGATTTTCTTTGAGCAAAACATGGTCACAGCAA	
Rat	CCAAAGATAAAATTCCTTTGATGAGGGAACAGCCCTCTC---CCCATTTTGATTTTCTTTGAGCAAAACATGGTCACAGCAA	
Humain	CCAGGGACAAGATCCCTTTGATGAAGT-GAAATAGTCTCTTTTTTTATAAGTATAATAGCTTTTGGGGG-----CAGCAA	
	* * * * *	* * * * *
	HNF3	
Souris	GTGTGGAAGGCA----TTTCCCACTAAACAAA-AGAGGGAGAGTTGACA	
Rat	ACGGGGAGGTTAAAGGATTCGCCATTAACAAA-GGAGGGAGAGTTGACA	
Humain	ATGGGAAAGGTGAAGTCTTGTACTATTAAACAAATGGAGGGATAGTTTGT	
	* * * * *	* * * * *

Figure 3-1 Alignement des régions amplificatrices EII et EIII du locus *AFP*

L'alignement des séquences de souris, de rat et d'humain a été réalisé avec CLUSTALW. Les motifs de reconnaissance des facteurs de transcription sont basés sur la matrice TRANSFAC 6.0. Les nucléotides conservés entre les trois espèces sont indiqués par (*).

J'ai donc vérifié si les protéines C/EBP α et C/EBP β étaient recrutées *in vivo* sur ces régions lorsque le gène *AFP* est transcrit. En utilisant d'abord les cellules 7.6, exprimant l'AFP à de forts niveaux lorsque cultivées à faible densité, j'ai testé par CHIP si des fragments de chromatine correspondant aux régions amplificatrices *AFP* sont immunoprécipités sélectivement avec des anticorps dirigés contre C/EBP α et C/EBP β . La figure 3-2 montre clairement le recrutement spécifique de ces deux protéines principalement sur les régions amplificatrices EIII et EI, et dans une plus faible proportion sur la région EII, alors que des IgG contrôles ne donnent aucun enrichissement.

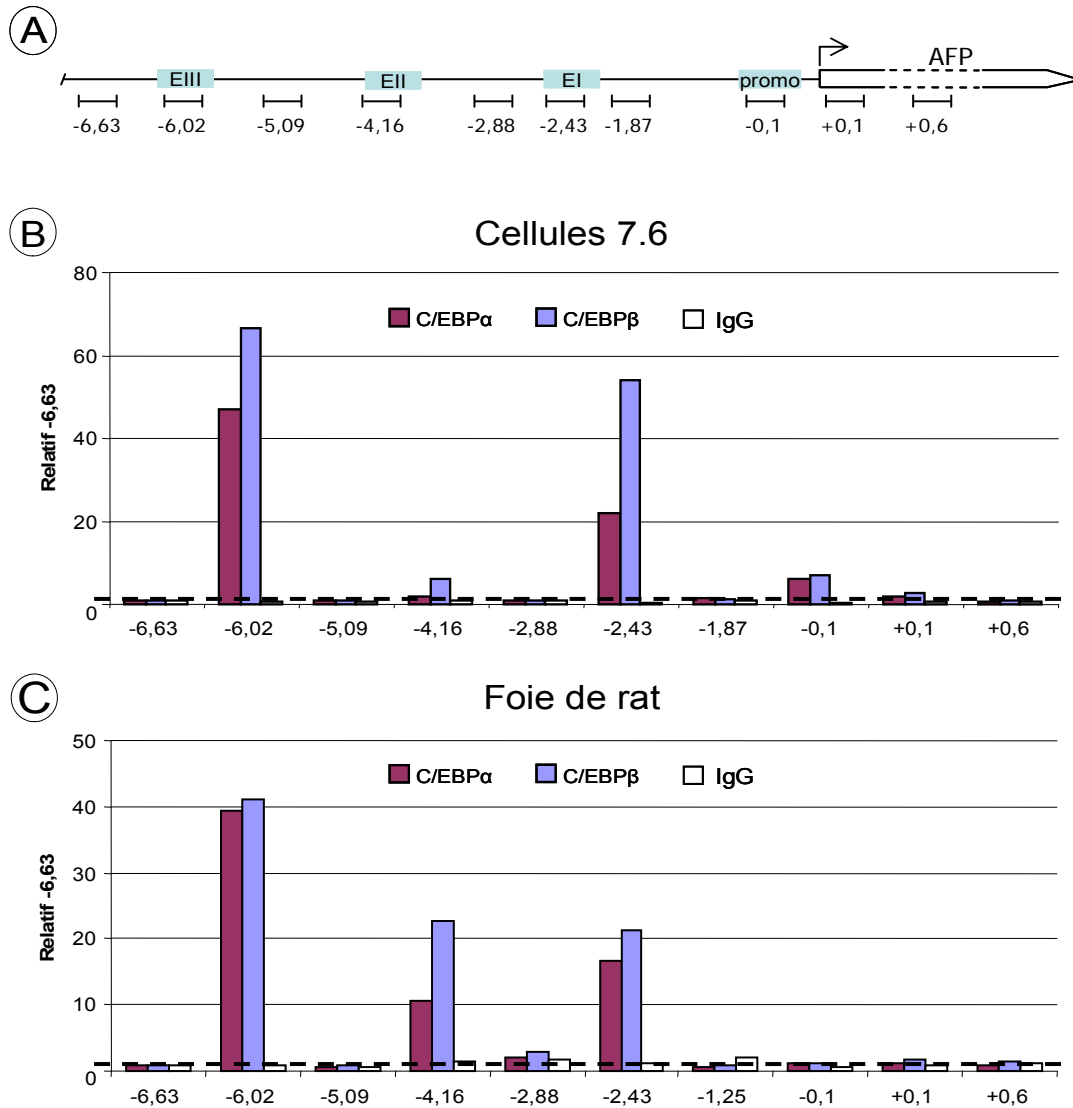


Figure 3-2 Recrutement de C/EBP α et C/EBP β aux régions amplificatrices du gène *AFP* *in vivo*

A) Représentation schématique des régions régulatrices du gène *AFP*. La position des différentes amorces utilisées pour les ChIP est inscrite sous celle-ci, en kilobases par rapport au site d'initiation de la transcription de l'*AFP*. B-C) ChIPs réalisés sur des cellules 7.6 cultivées à faible densité (B) et sur des foies de rats de 4 jours (C). Les traits pointillés représentent le bruit de fond obtenu pour chaque anticorps. Les enrichissements obtenus sont relativisés au signal obtenu à une région contrôle, soit la région -6.63. Chaque ChIP a été effectué au moins trois fois et les graphiques illustrent les résultats d'une expérience représentative.

Par la suite, j'ai vérifié ces résultats dans un modèle développemental, soit le foie de rat de 4 jours, qui exprime aussi l'*AFP* en grande quantité. Les résultats de ChIP obtenus dans le foie de rat sont sensiblement les mêmes que dans la lignée 7.6, alors que C/EBP α et

C/EBP β sont recrutés fortement sur les régions EI, EII et EIII du locus *AFP*. Ces résultats démontrent donc le recrutement spécifique de C/EBP *in vivo* sur les trois régions amplificatrices du gène *AFP* lorsque celui-ci est transcrit.

Une différence entre les ChIP sur le foie de rat et sur les cellules 7.6 est retrouvée au niveau du promoteur *AFP*, alors qu'aucun signal d'enrichissement significatif n'est retrouvé pour C/EBP α et C/EBP β dans le foie de rat. Ces résultats reflètent probablement une sensibilité réduite par des conditions de fixation sub-optimales ou une population cellulaire trop hétérogène dans l'expression de l'*AFP* pour les échantillons de foie, qui ne permettraient pas de détecter la région du promoteur. Cette interprétation est supportée par le fait qu'aucun signal d'enrichissement n'est obtenu dans le foie pour HNF1 et pol II, qui sont retrouvés sur le promoteur *AFP* dans les cellules 7.6 (données non montrées).

3.3.2 Fluctuations de C/EBP aux régions régulatrices de l'*AFP* dans la lignée 7.6

Afin de vérifier si le recrutement des protéines C/EBP était régulé dans les cellules 7.6, j'ai ensuite comparé les résultats de ChIP effectués sur des cellules 7.6 cultivées à haute densité, condition où le gène *AFP* est réprimé, avec les résultats obtenus précédemment sur des cellules 7.6 cultivées à faible densité, condition où celui-ci est transcrit. À la figure 3-3, on remarque qu'entre les conditions de haute et de basse densité, l'intensité du signal d'enrichissement obtenu pour C/EBP α et C/EBP β ne varie pratiquement pas sur la région amplificatrice, alors qu'on observe une diminution marquée de ces facteurs sur la région du promoteur. De plus, on remarque que HNF1 est aussi détecté spécifiquement au niveau du promoteur *AFP* lorsque le gène est transcrit alors que son signal n'est plus détectable sur cette région lorsque le gène est réprimé. La disparition des facteurs de transcription de la région du promoteur corrèle avec la forte diminution du recrutement de l'ARN polymérase II au site d'initiation de la transcription.

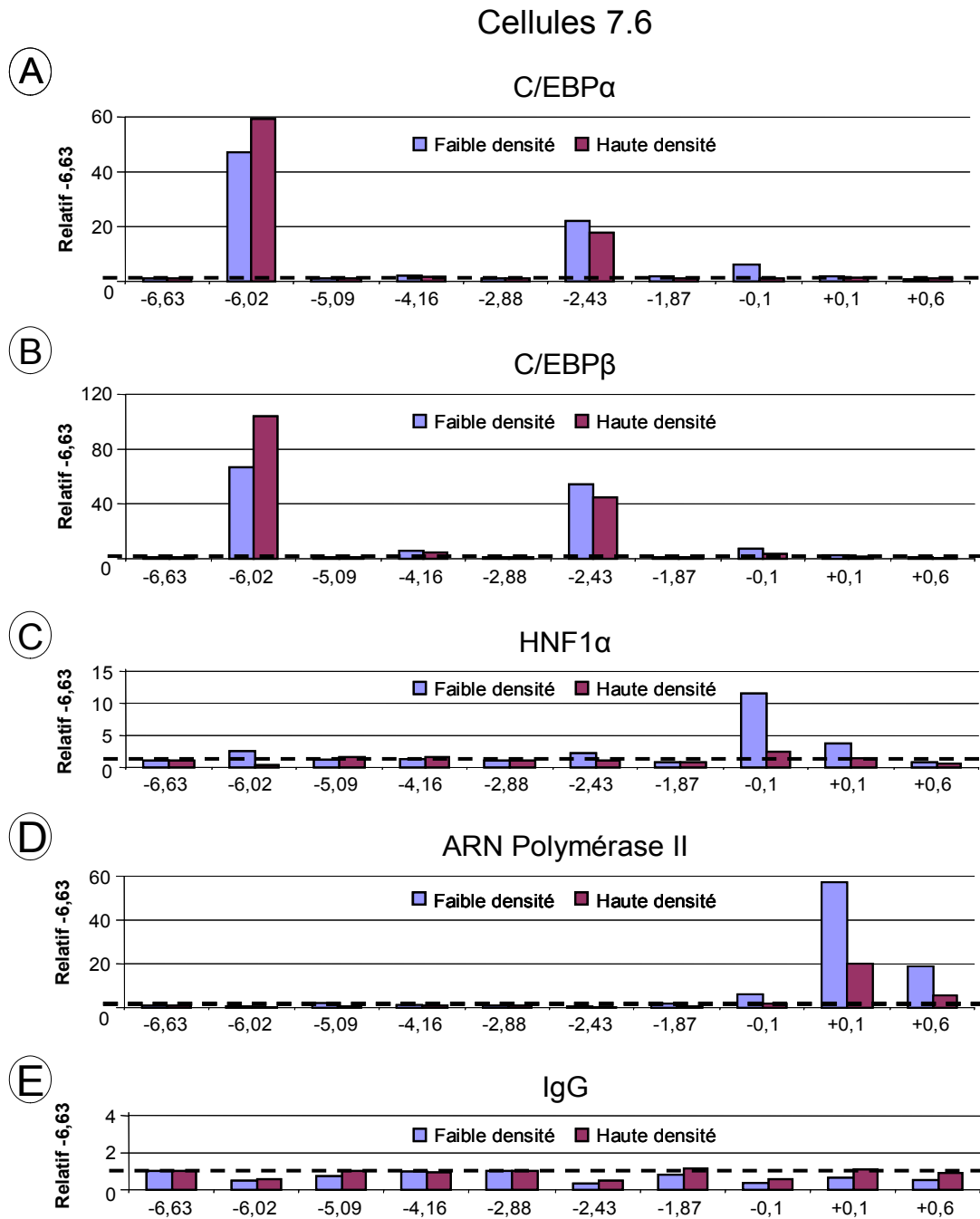


Figure 3-3 Analyse par ChIP du recrutement de C/EBP α , C/EBP β , HNF1 et pol II aux régions régulatrices *AFP* dans les cellules 7.6 cultivées à faible et haute densité

Les traits pointillés représentent le bruit de fond obtenu pour chaque anticorps. Les enrichissements obtenus sont relativisés au signal obtenu à une région contrôle, soit la région -6.63. Chaque ChIP a été effectué au moins trois fois et les graphiques illustrent les résultats d'une expérience représentative.

L'ensemble de ces résultats montre donc un désengagement marqué des activateurs du promoteur *AFP* lors de sa répression dans les cellules 7.6 en culture, ce qui concorde avec les résultats des empreintes génomiques *in vivo* obtenus au chapitre précédent. Ces résultats suggèrent donc que la désactivation sélective du promoteur est responsable de la répression du gène dans cette lignée cellulaire.

3.3.3 Fluctuations de C/EBP aux régions régulatrices du gène *AFP* lors des derniers stades du développement hépatique

L'étude des processus de régulation génique à l'aide de lignées cellulaires tumorales présente de nombreux avantages, entre autres sur le plan technique, mais comporte des limitations pour étudier les processus normaux comme les phénomènes développementaux, par exemple. J'ai donc complété les résultats obtenus sur les cellules 7.6 en culture à faible et haute densité par des ChIP effectués sur des foies de rats normaux. Le recrutement des protéines C/EBP au locus *AFP* a été étudié plus en détail sur des foies prélevés à différents stades tardifs du développement hépatique, période où le gène *AFP* se désactive. J'ai ainsi pu vérifier si le recrutement de C/EBP α et C/EBP β sur les régions amplificatrices *AFP* corrélait avec l'activité transcriptionnelle du locus.

La figure 3-4 montre un recrutement maximal de C/EBP α , tout comme C/EBP β , sur les régions EIII, EII et EI dans les foies de rat de 4 jours, qui transcrivent abondamment l'*AFP*. Le recrutement de ces deux facteurs diminue considérablement sur la région EI (-2,43) aux jours 10 et 15 pour devenir pratiquement indétectable au jour 21, lorsque le gène *AFP* est complètement réprimé. La perte de recrutement des C/EBP à la région EI corrèle donc avec la désactivation du locus *AFP* et avec la disparition du site DH de la région EI rapportée pendant le développement hépatique (237) et suggère que la désactivation de la région EI est impliquée dans cette répression. Alors que C/EBP α et C/EBP β cessent d'être détectés substantiellement sur la région EI, C/EBP β , et dans une moindre mesure C/EBP α , sont toujours détectés à des niveaux appréciables sur les régions EIII (-6,02) et EII (-4,16) lorsque l'*AFP* s'éteint, dans les foies de rats de 21 jours. Le recrutement différentiel des C/EBP au niveau de ces trois régions amplificatrices suggère que la liaison de ces protéines à leurs sites de la région EI est spécifiquement affectée lors de la différenciation terminale des hépatocytes.

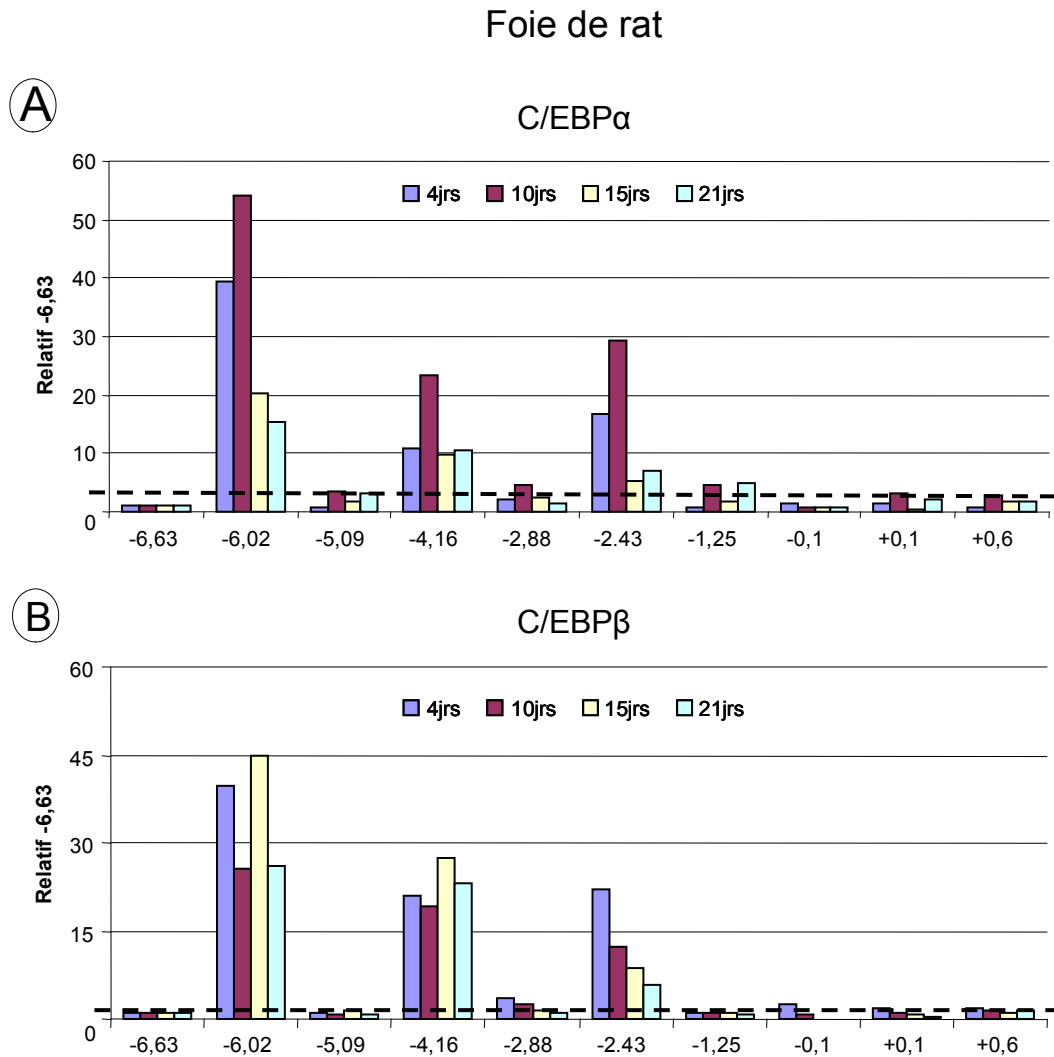


Figure 3-4 Analyse par ChIP du recrutement de C/EBP α et C/EBP β au locus *AFP* dans les stades tardifs du développement hépatique

ChIP sur des foies de rats de 4, 10, 15 et 21 jours. Les traits pointillés représentent le bruit de fond obtenu pour chaque anticorps. Les enrichissements obtenus sont relativisés au signal obtenu à une région contrôle, soit la région -6.63. Chaque ChIP a été effectué au moins trois fois et les graphiques illustrent les résultats d'une expérience représentative.

3.3.4 Les activateurs transcriptionnels liant le promoteur *AFP* ne fluctuent pas dans les cellules 7.6

Les résultats présentés au chapitre 2 de cette thèse ont suggéré une fonction cruciale du site C/EBP du promoteur *AFP* dans la régulation de ce gène. De plus, une désactivation marquée de cette région a été observée en ChIP lors du changement de l'état de croissance des cellules 7.6. On observe également dans les cellules 7.6 cultivées à haute densité la

disparition des protéines C/EBP spécifiquement de la région promotrice de l'*AFP*, alors qu'elles demeurent présentes sur les régions amplificatrices. J'ai donc étudié plus en détail si des changements pouvaient survenir au niveau des activateurs du promoteur *AFP* pour tenter d'en expliquer la désactivation.

Les petites isoformes de C/EBP (C/EBP α -p30 et C/EBP β -p20) agissent principalement comme dominants négatifs sur la transcription de leurs gènes cibles (55, 171). Dans les expériences de ChIP, les anticorps utilisés étaient dirigés contre la partie C-terminale de C/EBP α et C/EBP β , donc reconnaissaient autant les longues que les courtes isoformes de ces protéines. Une première hypothèse pouvant expliquer la répression de l'*AFP* serait l'augmentation des courtes isoformes de C/EBP lorsque les cellules 7.6 sont cultivées à haute densité. J'ai donc vérifié par immunobuvardages de type Western si les courtes isoformes de C/EBP étaient induites lors de la culture des cellules 7.6 à haute densité. La figure 3-5A montre qu'il n'y a aucun changement significatif des isoformes de C/EBP lorsque les cellules 7.6 sont cultivées à faible ou à haute densité.

Il a déjà été observé par d'autres laboratoires que les protéines C/EBP, sans qu'il n'y ait de changement dans la quantité totale de ces protéines, pouvaient avoir une capacité moindre à lier l'ADN *in vitro* (38, 68). Une deuxième hypothèse serait donc une diminution de la capacité des C/EBP de se lier spécifiquement à leur site de liaison au promoteur *AFP* lorsque les cellules 7.6 sont cultivées à haute densité. Des expériences de gels de retardement ont donc été réalisées avec des extraits nucléaires provenant des cellules 7.6 cultivées à faible densité et à haute densité et incubés avec une sonde marquée couvrant le site C/EBP du promoteur *AFP*. Ces expériences n'ont décelé aucun changement quantitatif ou qualitatif de la capacité de liaison des protéines C/EBP pour leur site lors de la répression de l'*AFP* pendant la croissance des cellules 7.6 (figure 3-5B). Ces résultats suggèrent donc que la régulation de la capacité de liaison à l'ADN des protéines C/EBP n'est pas impliquée dans la régulation de l'*AFP* dans ce modèle d'hépatome.

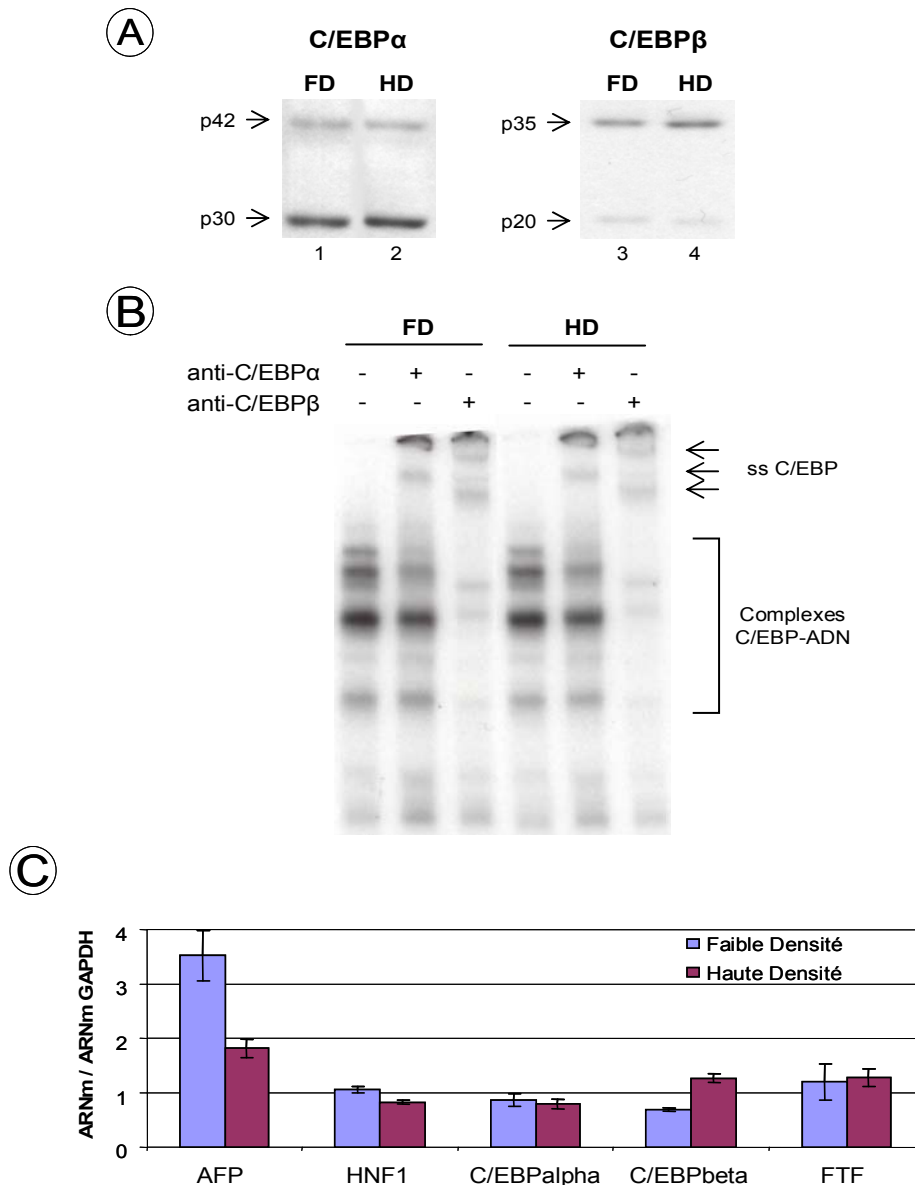


Figure 3-5 Caractérisation des activateurs du promoteur *AFP* dans les cellules 7.6

A) Immunobuvardages de type Western réalisés avec des extraits nucléaires de cellules 7.6 cultivées à faible (FD) et à haute densité (HD). Les flèches identifient les isoformes de C/EBP détectées dans les extraits avec le poids moléculaire correspondant. B) Gels de retardement réalisés avec des extraits nucléaires de cellules 7.6 cultivées à faible (FD) et à haute (HD) densité sur une sonde couvrant la région -125 à -112 du promoteur *AFP*. Les retards sur gel (ss) produits par l'ajout d'anticorps sont identifiés par des flèches alors que les complexes protéines-ADN sont identifiés par un crochet. C) Quantification des ARNm de l'*AFP* ainsi que de ces principaux activateurs dans les cellules 7.6 cultivées à faible et à haute densité. L'ARNm du gène GAPDH a été utilisé comme standard interne dans les réactions de qPCR. Les résultats illustrés en C proviennent de la moyenne (\pm écart-type) d'au moins trois expériences indépendantes.

Une troisième hypothèse est la diminution dans l'expression des autres facteurs responsables de l'activation du promoteur *AFP*, ce qui mènerait à une perte de fonction de cette région régulatrice. Donc, afin de déterminer si la répression de l'*AFP* lorsque les cellules 7.6 sont cultivées à haute densité coïncide avec une diminution de l'expression d'un ou l'autre des gènes activateurs du promoteur *AFP*, j'ai vérifié par PCR quantitatif s'il y avait une variation dans les ARNm des activateurs clés du promoteur *AFP*, soit HNF1, C/EBP α , C/EBP β et FTF. Comme il est illustré à la figure 3-5C, aucun des activateurs clés de l'*AFP* n'est réprimé pendant la croissance des cellules 7.6. La répression des gènes activateurs du promoteur *AFP* ne peut donc pas expliquer la répression du gène dans les cellules 7.6.

Aucune de ces pistes n'a donc pas permis d'identifier l'évènement moléculaire menant à la répression du gène *AFP* au cours de la croissance des cellules 7.6. Toutefois, des expériences de gels bidimensionnels (gels 2D) réalisées dans notre laboratoire ont permis de constater certains changements dans la migration des protéines C/EBP selon leur taille et leur point isoélectrique dans les conditions de culture des cellules 7.6 à faible et haute densité (Sylvie Roy, communication personnelle). Malgré que ces changements n'aient pu être identifiés avec précision, ces résultats suggèrent que des modifications post-traductionnelles de C/EBP pourraient être impliquées dans la régulation spécifique de l'*AFP* dans cette lignée d'hépatome, par exemple via des changements d'interactions protéiques.

3.3.5 CBP, p300 et Mediator sont recrutés et fluctuent sur les régions régulatrices du gène *AFP*

Ayant établi le rôle critique de C/EBP dans la régulation du gène *AFP* sans toutefois avoir des indications précises d'un changement quantitatif ou qualitatif de ces protéines permettant d'expliquer cette régulation, je me suis ensuite tourné vers l'étude des corégulateurs de ce locus. J'ai donc tenté d'identifier, parmi les coactivateurs connus de C/EBP, ceux qui sont recrutés sur le locus *AFP* lorsqu'il est transcrit pour vérifier si la perte de certains d'entre eux pourrait permettre d'expliquer la répression du gène dans les cellules 7.6.

Lors de CHIP sur les cellules 7.6 en phase exponentielle de croissance, on remarque la présence principalement sur les régions EIII et EI de deux cofacteurs à activité HAT, soit CBP et p300 (figure 3-6A et B). Ces cofacteurs généraux sont bien caractérisés et ont déjà été démontrés pour lier les protéines C/EBP (112), FTF (192) et HNF1 (214). Il est donc prévisible que ces cofacteurs soient recrutés au locus *AFP* lorsque celui-ci est transcrit.

La figure 3-6C montre la présence, également sur les régions EIII et EI mais aussi au niveau du site d'initiation de la transcription, d'un autre cofacteur, soit TRAP220/Med1, une sous-unité centrale du complexe Mediator. Mediator peut lui aussi interagir avec C/EBP (153) mais aussi avec la plupart des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires (2, 37, 141), dont FTF fait partie. Le recrutement de Mediator, autant sur les domaines de la région amplificatrice du gène *AFP* qu'au site d'initiation de la transcription, concorde avec sa fonction présumée consistant en la transmission des signaux provenant des amplificateurs vers la pol II.

Ces résultats nous montrent donc le recrutement des HAT CBP et p300 de même que Mediator au locus *AFP* lorsque le gène est transcrit, indiquant ainsi un rôle pour ces cofacteurs dans l'activation de la transcription du gène *AFP*.

Les données obtenues par CHIP sur les cellules 7.6 cultivées à haute densité permettent d'observer un phénomène potentiellement déterminant survenant lors de la répression du gène *AFP* dans ces cellules. Ainsi, le signal d'enrichissement observé pour les cofacteurs CBP et p300 diminue de façon marquée dans ces conditions sur les régions EIII et EI. Cela suggère que la perte de ces deux coactivateurs sur les régions régulatrices du gène *AFP* pourrait être la cause de la répression observée dans cette lignée d'hépatome en culture.

Cellules 7.6

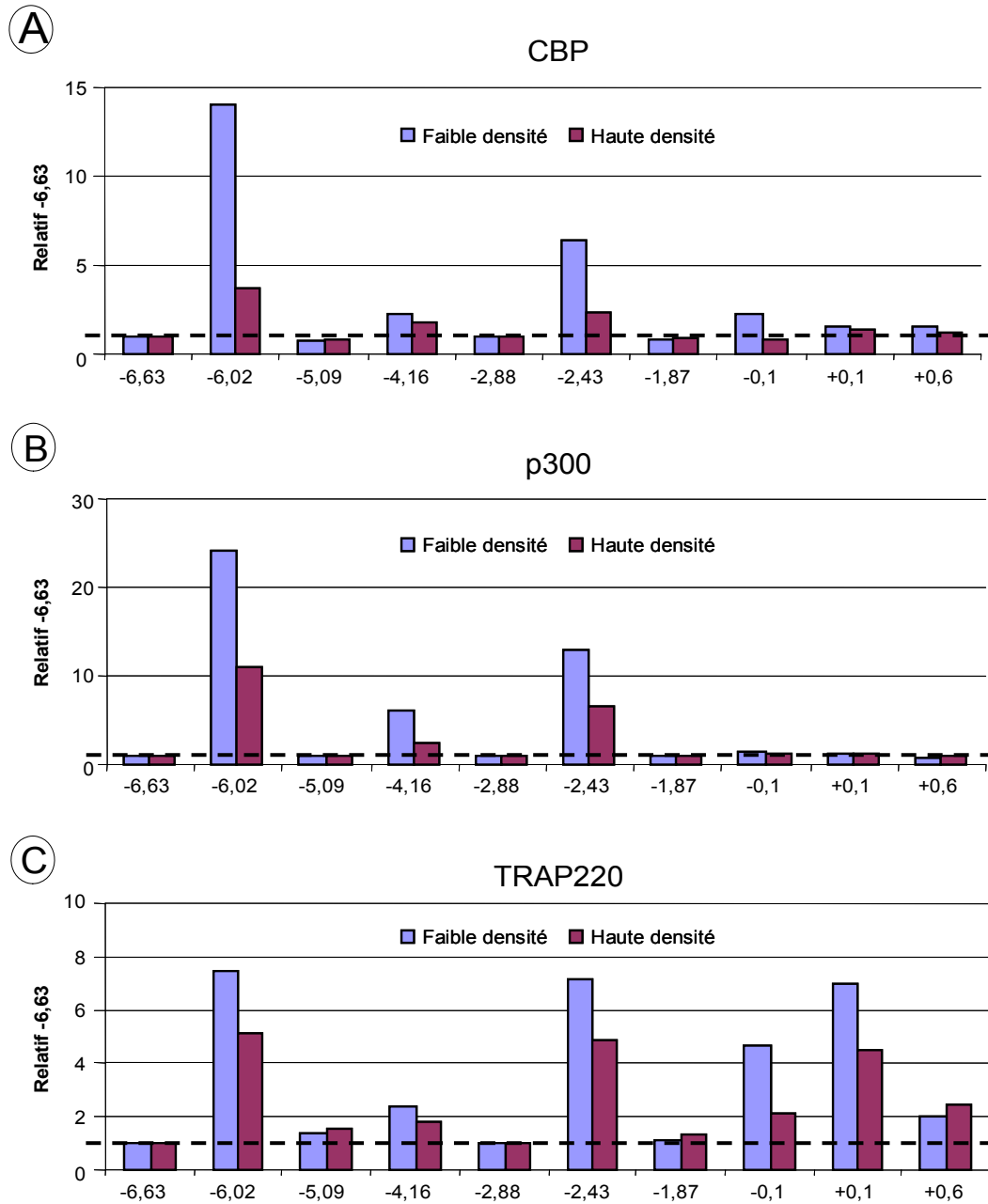


Figure 3-6 Analyse par CHIP du recrutement des coactivateurs CBP, p300 et TRAP220 aux régions régulatrices du gène *AFP* dans les cellules 7.6 cultivées à faible et à haute densité

Les traits pointillés représentent le bruit de fond obtenu pour chaque anticorps. Les enrichissements obtenus sont relativisés au signal obtenu à une région contrôle, soit la région -6.63. Chaque CHIP a été effectué au moins trois fois et les graphiques illustrent les résultats d'une expérience représentative.

3.3.6 HNF4 se lie aux régions régulatrices de l'*AFP* *in vivo*

L'inactivation de HNF4 dans des cellules ES induites à se différencier en endoderme viscéral, un tissu qui exprime normalement l'*AFP*, produit une très forte diminution de la quantité d'ARNm de l'*AFP* dans ces cellules (60). Vu la grande importance du gène HNF4 dans la différenciation hépatique et les effets de son inactivation sur la transcription du gène *AFP*, j'ai voulu vérifier si celui-ci était impliqué directement dans la régulation transcriptionnelle du gène *AFP*.

J'ai donc effectué des ChIP sur les cellules 7.6 pour vérifier si je pouvais détecter la présence de HNF4 sur les régions régulatrices du gène *AFP*. Comme illustré à la figure 3-7A, un signal d'enrichissement spécifique peut être observé sur les trois régions amplificatrices du gène *AFP* et ce, autant lorsque le gène est actif (à faible densité) que lorsqu'il est réprimé (à haute densité). Ces résultats démontrent donc la présence de HNF4 au niveau des régions régulatrices du gène *AFP* et suggèrent un rôle direct possible de ce récepteur nucléaire dans le contrôle de l'activité des régions amplificatrices de ce gène. Ces résultats ne permettent toutefois pas de savoir quel rôle cette protéine joue sur la transcription du gène *AFP*.

Ainsi, j'ai voulu vérifier les résultats obtenus dans les cellules 7.6 à l'aide d'expériences de ChIP réalisés sur du foie de rat normal, prélevé dans les derniers stades du développement. Les résultats obtenus dans ces expériences montrent des signaux d'enrichissement spécifiques pour HNF4 sur les régions EIII et EII, seulement dans les foies prélevés à partir du jour 10, alors qu'aucun recrutement de HNF4 n'est observé chez les rats de 4 jours (figure 3-7B). Le recrutement de HNF4 sur ces régions corrèle donc négativement avec la transcription du gène *AFP* lors du développement hépatique, ce qui suggère un effet possiblement négatif du récepteur nucléaire HNF4 sur ce locus.

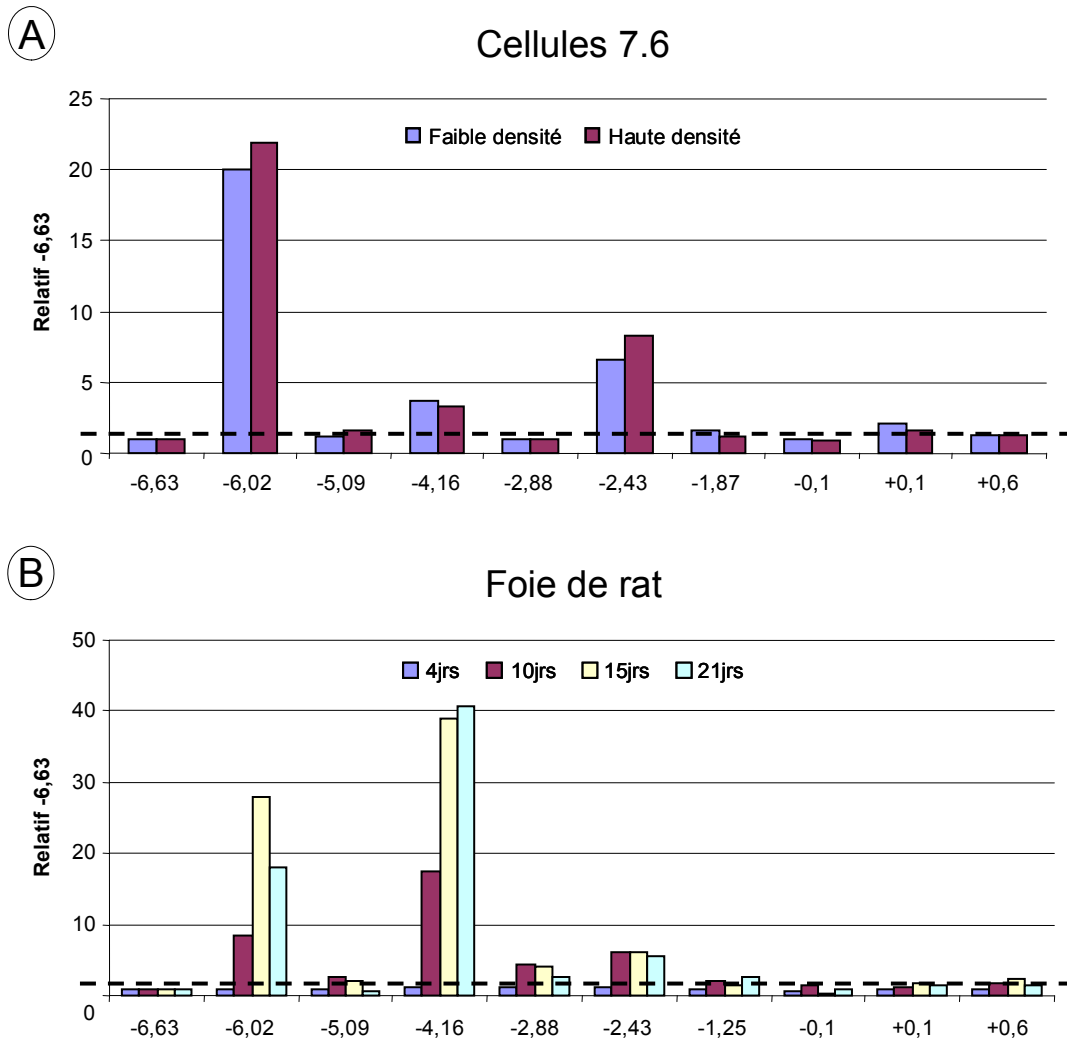


Figure 3-7 Analyse par CHIP du recrutement de HNF4 aux régions amplificatrices de l'*AFP* dans un modèle d'hépatome et dans le foie de rat normal

ChIP sur des cellules 7.6 cultivées à faible et à haute densité (A) et des foies de rats de 4, 10, 15 et 21 jours (B). Les traits pointillés représentent le bruit de fond obtenu pour chaque anticorps. Les enrichissements obtenus sont relativisés au signal obtenu à une région contrôle, soit la région -6.63. Chaque CHIP a été effectué au moins trois fois et les graphiques illustrés sont le résultat d'une expérience représentative.

3.4 Discussion

La répression développementale du locus *AFP* est un phénomène très spécifique parmi les membres de la famille *ALB*. Toutefois son mécanisme tarde toujours à être clairement résolu. Le locus *AFP* est composé d'au moins quatre régions régulatrices distinctes, soit trois régions amplificatrices et une région promotrice. Des sites de liaison pour C/EBP conservés entre les espèces ont été identifiés dans chacune de ces régions. La première partie de ce chapitre avait donc pour but d'identifier les domaines de recrutement des protéines C/EBP sur le locus *AFP*. Ainsi, en plus de la région promotrice, mes résultats ont confirmé la présence de C/EBP α et de C/EBP β sur les régions amplificatrices EI, EII et EIII dans deux modèles exprimant l'*AFP* à un niveau élevé, soit les cellules 7.6 et le foie de rat de 4 jours.

Étant donné le recrutement global de C/EBP au locus *AFP*, j'ai par la suite voulu déterminer de quelle façon ces protéines vont être impliquées dans l'activité transcriptionnelle du locus. Lors des expériences de CHIP dans les cellules 7.6 en conditions *AFP*-positive ou *AFP*-négative, il n'y a aucune fluctuation du recrutement de C/EBP sur les régions amplificatrices. Cependant, en condition *AFP*-négative, on ne retrouve aucun signal d'enrichissement significatif pour les protéines C/EBP sur la région du promoteur *AFP*. De plus, HNF1, un autre facteur se liant au promoteur *AFP*, cesse d'y être détecté dans ces mêmes conditions suggérant la perte d'activité spécifique du promoteur *AFP* dans les cellules 7.6. Les événements observés par CHIP dans les foies de rat aux stades tardifs du développement sont toutefois différents. Ainsi, les résultats obtenus dans ces conditions démontrent plutôt une diminution de la présence de C/EBP sur la région amplificatrice EI qui corrèle étroitement avec la répression de la transcription de l'*AFP* durant la différenciation terminale des hépatocytes. La désactivation de la région EI durant cette période corrèle aussi avec la perte des sites DH de la région EI et du promoteur *AFP* dans le foie de rats adultes, lorsque le gène est réprimé (237). Je n'ai toutefois pu examiner, par cette approche de CHIP, à quel moment la région promotrice se désactive, ce qui m'empêche de déterminer si c'est au promoteur ou à la région EI que se produit l'évènement initial menant à la répression de l'*AFP* au cours du développement hépatique. Par contre, mes résultats suggèrent que la perte d'activité de la région EI pourrait être la

cause directe de la répression développementale du gène *AFP*, des expériences supplémentaires étant toutefois requises afin de confirmer ceci.

Le promoteur semble jouer un rôle primordial dans la régulation transcriptionnelle du locus *AFP*. Étant donné le désengagement marqué des facteurs se liant à cette région dans les cellules 7.6 cultivées en condition AFP-négative, j'ai voulu préciser l'évènement permettant d'expliquer sa désactivation sélective. Cependant, l'étude des fluctuations des petites isoformes et de la capacité de liaison à l'ADN des protéines C/EBP ainsi que de l'expression des différents activateurs transcriptionnels du promoteur *AFP* n'a pas permis d'observer quoi que ce soit de significatif permettant d'expliquer la régulation du gène *AFP* dans ces cellules. D'autres mécanismes peuvent toutefois entrer en jeu pour réguler la transcription. Depuis quelque temps déjà, plusieurs groupes de recherche mettent en lumière l'implication majeure de différents corégulateurs dans la régulation de plusieurs processus cellulaires importants, notamment la différenciation cellulaire et le métabolisme énergétique (revues dans (66, 157)). Des régulateurs clés de l'*AFP*, soit les protéines de la famille C/EBP, interagissent avec plusieurs corégulateurs, dont CBP/p300 et le complexe Mediator (112, 152, 153). J'ai donc vérifié leur présence sur les régions régulatrices du gène *AFP* et s'il y avait une diminution de leur recrutement dans les cellules 7.6 cultivées en condition AFP-négative. Les expériences de CHIP montrent le recrutement spécifique des cofacteurs CBP, p300 et Mediator sur les régions amplificatrices de l'*AFP* lorsque celui-ci est actif. Toutefois, lorsque les cellules 7.6 sont cultivées à haute densité, on remarque une diminution marquée du recrutement de CBP et p300 aux régions amplificatrices du locus *AFP*, corrélant avec la répression du gène dans ces conditions de culture et suggérant un lien de cause à effet entre ces deux évènements. Malgré que tous ces corégulateurs sont retrouvés au niveau de la région amplificatrice de l'*AFP*, on ne peut détecter aucun de ceux-ci sur la région distale du promoteur ce qui confirme la spécificité du signal obtenu en CHIP, mais suggère aussi une spécificité d'action de ces corégulateurs qui ne pourraient être requis qu'aux régions amplificatrices de l'*AFP*. TRAP220, une sous-unité centrale du complexe Mediator, est le seul de ces coactivateurs qui se retrouve à la fois aux régions amplificatrices et au site d'initiation de la transcription. Ce résultat concorde avec la plupart des articles retrouvés dans la littérature selon lesquels le complexe Mediator occuperait un rôle central dans la communication entre les régions amplificatrices

et promotrices (117). De plus, ce complexe serait impliqué dans la ré-initiation de multiples rondes de transcription pour augmenter le taux de transcription d'un gène et cet effet serait obtenu par l'interaction de Mediator avec l'ARN polymérase II (2, 117). Le recrutement de Mediator au locus *AFP* pourrait ainsi permettre d'expliquer le fort taux de transcription observé pour le gène *AFP*.

Un point important soulevé par les expériences de ChIP est la fonction possiblement déterminante remplie par les régions amplificatrices du locus *AFP*. Ainsi, une perte de coactivateurs est observée sur la région EI dans les cellules 7.6 cultivées à haute densité alors qu'au cours du développement hépatique, ce sont les protéines C/EBP qui cessent d'être détectées sur région EI lors de la répression du gène *AFP*. Ces changements corrèlent avec une perte complète d'occupation des facteurs de transcription sur le promoteur *AFP*. Dans l'ensemble, ces résultats semblent indiquer que l'activité de la région promotrice du gène *AFP* dépend fortement de la région amplificatrice. Ceci implique que la perte d'activité des régions amplificatrices du gène *AFP* entraînerait immédiatement une perte de fonction de la région promotrice. Ce modèle suggère donc une fonction cruciale des régions amplificatrices pour permettre l'ouverture de la chromatine de la région promotrice et ainsi permettre à FTF et C/EBP de se lier à leurs sites.

La différenciation hépatique est effectuée grâce à la coopération de plusieurs facteurs de transcription qui vont établir un réseau transcriptionnel permettant la stabilité du phénotype hépatique (118, 166). Parmi ceux-ci se retrouve entre autres HNF4, un récepteur nucléaire présent sur les régions régulatrices d'environ 40% des gènes occupés par l'ARN polymérase II dans les hépatocytes (167). Les observations faites par un autre groupe de recherche utilisant des cellules ES inactivées pour le récepteur nucléaire HNF4 (60) m'ont permis de pousser un peu plus loin mes travaux sur la régulation transcriptionnelle du gène *AFP*. En cultivant ces cellules en suspension dans un milieu contrôlé, ils ont pu former des corps embryoides qui présentent un endoderme viscéral différencié, un tissu qui exprime normalement l'*AFP*. Ainsi, ces corps embryonnaires produits à partir de cellules ES inactivées pour HNF4 présentent une très forte diminution de la quantité d'ARNm de l'*AFP* produit, alors que les corps embryonnaires de type sauvage expriment fortement ce gène. Vu la grande importance du gène HNF4 au niveau de la différenciation hépatique et

les effets de son inactivation sur la transcription du gène *AFP*, j'ai donc vérifié par ChIP si HNF4 était recruté au niveau des régions régulatrices endogènes de l'*AFP*. Dans la lignée d'hépatome 7.6, on voit très clairement la présence de cette protéine sur les trois régions amplificatrices de l'*AFP* et ce, autant en condition AFP-positive qu'en condition AFP-négative. Le rôle de cette protéine sur la transcription de l'*AFP* n'est toutefois pas très clair puisque chez les souris inactivées pour *HNF4*, les hépatoblastes transcrivent l'*AFP* à des niveaux normaux (11, 176), ce qui tend à supporter un rôle indirect de HNF4 sur la transcription de l'*AFP*. J'ai donc vérifié par ChIP si HNF4 était retrouvé sur les régions régulatrices de l'*AFP* dans un modèle développemental, soit dans les foies de rats prélevés aux stades tardifs du développement hépatique, période où la transcription de l'*AFP* passe d'un niveau maximal à un niveau réprimé. Aucun signal d'enrichissement n'est observé pour HNF4 chez les rats de 4 jours alors que celui-ci est fortement enrichi sur les régions amplificatrices du gène *AFP* à partir du jour 10, ce qui corrèle avec la répression de l'*AFP*. Ces résultats seraient donc compatibles avec un rôle négatif de HNF4 sur la transcription de l'*AFP*.

Un article paru récemment souligne un rôle essentiel pour HNF4 dans la régionalisation de la transcription de plusieurs gènes métaboliques qui survient lors de la différenciation terminale du foie (218). Ce groupe de recherche a observé une perte de la régionalisation de certaines enzymes métaboliques, dont la glutamine synthetase (GS), chez des souris dont HNF4 a été inactivé de façon spécifique dans les hépatocytes. HNF4 recruterait vraisemblablement le corépresseur HDAC1 au niveau de la région amplificatrice de *GS* pour mener à sa répression dans la zone périportale du foie. Ainsi, la présence de HNF4 sur les régions amplificatrices du gène *AFP* pourrait être responsable de sa répression lors de la différenciation terminale des hépatocytes en inhibant leurs fonctions activatrices dans la région périportale du foie, comme dans le cas de *GS*. D'ailleurs, une activité régionalisée (péricentrale) dans le foie de souris transgéniques adultes a été rapportée pour les régions amplificatrices de l'*AFP*, en particulier la région EIII et EII, lorsque couplées à un promoteur hétérologue (186). La présence de HNF4 sur les amplificateurs du gène *AFP* dans une lignée cellulaire d'hépatome transcrivant celui-ci contraste avec le possible rôle de ce facteur dans la répression transcriptionnelle de l'*AFP* et me permet proposer que certaines fonctions de HNF4 pourraient être perdues dans les hépatomes. Par ailleurs, une

perte de fonction de HNF4 dans plusieurs lignées d'hépatome a déjà été observée (32). Ce phénomène serait provoqué par une forte diminution de l'expression de plusieurs des cofacteurs de HNF4 dans ces hépatomes, dont entre autres PGC1 α et SRC1 (143). Je crois donc que HNF4 pourrait contribuer à la répression de l'activité des régions amplificatrices du gène *AFP* dans la région périportale du foie lors de la différenciation terminale des hépatocytes; et que HNF4 ne serait plus en mesure de recruter les bons cofacteurs pour effectuer ce rôle dans les lignées d'hépatome.

Cependant, la régionalisation de l'activité des régions amplificatrices du gène *AFP* ne permet pas à elle seule d'expliquer le phénomène de régulation développementale de ce gène. En effet, ce phénomène ne se produit que dans une partie du foie alors que le gène *AFP* est réprimé complètement dans tous les hépatocytes quiescents. La régionalisation de l'activité des régions amplificatrices de l'*AFP* pourrait donc contribuer, de façon très mineure cependant, à la répression développementale du locus. Ainsi, il doit exister un mécanisme de répression transcriptionnelle plus global permettant d'éteindre le gène *AFP* lors de la différenciation hépatique. Les protéines de la famille C/EBP jouent un rôle bien établi au niveau de la différenciation et de la prolifération du tissu hépatique. Celles-ci constituent donc des candidats intéressants pouvant être ciblés lors de la régulation développementale de l'*AFP*. Certains mécanismes de régulation ciblant ces protéines semblent prometteurs quant à leur implication dans la régulation du gène *AFP*. Ainsi, un motif de contrôle de synergie a été identifié à l'intérieur de tous les membres de la famille C/EBP et ce motif serait modifié par l'ajout d'un groupement SUMO à cet endroit (110, 220). Cette modification inhiberait l'activité transcriptionnelle des protéines C/EBP dans un contexte où plusieurs sites C/EBP sont multimérisés, alors qu'elle n'aurait aucun effet en présence d'un site unique. Ce contexte ressemble beaucoup à la région amplificatrice EI du gène *AFP* qui contient trois sites C/EBP pratiquement côte à côte. Ainsi, la régulation développementale spécifique, parmi les membres de la famille albumine, du gène *AFP* pourrait s'effectuer par les protéines C/EBP se liant à la région EI du gène *AFP* en plusieurs endroits alors que ces protéines ne se lient qu'à des sites uniques sur les autres membres de la famille albumine. La sumoylation de ces protéines sur leur motif de contrôle de synergie pourrait ainsi entraîner une perte de leur activité transcriptionnelle spécifiquement sur la région EI du gène *AFP*, ce qui entraînerait sa répression complète.

Cette hypothèse n'a toutefois pas été vérifiée jusqu'à présent et pourrait faire l'objet d'une étude ultérieure.

3.4.1 Conclusion et perspectives

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre suggère que la régulation de l'activité de la région amplificatrice EI du locus *AFP*, par C/EBP ou ses coactivateurs, a un effet déterminant sur la régulation onco-développementale du gène. De plus, le rôle possible de HNF4 dans la régionalisation de l'activité des régions amplificatrices *AFP* suggère l'existence d'un mécanisme de régulation développemental complémentaire, mais très limité dans son action.

Malgré les réponses apportées par cette étude sur plusieurs questions essentielles concernant la régulation transcriptionnelle du gène *AFP*, certaines questions persistent. Premièrement, est-ce que C/EBP est le principal responsable du recrutement des cofacteurs identifiés sur les régions amplificatrices du gène *AFP*? La présence de ces facteurs de transcription sur toutes les régions régulatrices du gène *AFP* de même que la forte corrélation entre leur présence et celle des coactivateurs CBP et p300 tendent à suggérer ce lien. Deuxièmement, est-ce que des modifications des protéines C/EBP ont un effet sélectif important sur la transcription du gène *AFP* et si oui, quelles sont-elles et que font-elles? Troisièmement, de quelle façon HNF4 est-il recruté sur les régions amplificatrices du gène *AFP*? Plusieurs sites de liaison pour ce récepteur nucléaire ont été identifiés *in silico* autour de ces régions. Cependant le recrutement de HNF4 sur les régions amplificatrices du locus *AFP* coïncide fortement avec la présence des protéines C/EBP, ce qui pourrait suggérer un recrutement de HNF4 par interaction protéine-protéine avec C/EBP.

Chapitre 4- Étude du mécanisme de répression de l'*AFP* par les hormones glucocorticoïdes

4.1 Introduction

L'administration de dexaméthasone (Dex), une hormone GC synthétique, mène à la répression rapide et prématurée de la production d'AFP chez des rats nouveau-nés, accompagnée d'un arrêt de la prolifération des hépatocytes. Ces effets de la dexaméthasone, autant sur la production d'AFP que sur la prolifération cellulaire, sont toutefois perdus dans plusieurs cas d'hépatocarcinomes par un mécanisme encore inconnu. Ainsi, certaines lignées cellulaires d'hépatome comme les HepG2 et les Hep3B induisent plutôt la transcription de l'*AFP* lorsque traitées avec des hormones GC.

Des expériences effectuées antérieurement dans notre laboratoire ont démontré que la répression du gène *AFP* par les hormones GC se produit strictement au niveau transcriptionnel (84, 236). La cinétique de répression du gène *AFP* corrèle avec la cinétique de translocation nucléaire de GR (84), suggérant un phénomène de répression directe. De plus, cette répression semble nécessiter le DBD de GR sans toutefois dépendre de la liaison du récepteur à l'ADN (121), et ce, même si GR purifié lie fortement le promoteur *AFP* (85), suggérant que le mécanisme de répression nécessite une interaction protéine-protéine entre GR et un activateur essentiel à l'*AFP*.

Cette troisième partie de ma thèse avait pour but d'identifier la cible spécifique de GR sur les régions régulatrices de l'*AFP*. Les résultats à ce jour suggéraient que le promoteur du gène *AFP* était ciblé préférentiellement par GR. Premièrement, la répression de l'AFP coïncide avec la disparition d'un site hypersensible à la DNase I situé au niveau du promoteur du gène *AFP* (237). Deuxièmement, la région de -170 à -140 du promoteur *AFP*, comprenant le site de liaison pour FTF et la région LS, semble être impliquée puisque la mutation simultanée du site FTF et de LS mène à une certaine diminution de la réponse aux hormones GC dans des systèmes de transfections transitoires et stables (184). Troisièmement, une interaction a été montrée entre le DBD de GR et FTF, retrouvé spécifiquement au promoteur *AFP* (75). Par ailleurs, un site de liaison fonctionnel pour les protéines de la famille C/EBP a été identifié dans la région de -125 à -110 de ce locus (chapitre 2 de cette thèse). Les protéines de la famille C/EBP jouent un rôle important dans la prolifération et la différenciation de plusieurs tissus (revue dans (187)), processus influencés aussi par les hormones GC, et une interaction entre GR et les deux membres de

cette famille les plus abondants dans le foie, soit C/EBP α et C/EBP β , a été démontrée (22, 75, 200).

Ces évidences suggéraient donc les protéines FTF et C/EBP, présents au promoteur *AFP*, comme candidats cibles les plus probants dans la répression de l'*AFP* par GR. J'ai ainsi tenté, dans un premier temps, d'évaluer si les sites de reconnaissance pour ces protéines dans les régions régulatrices de l'*AFP* étaient nécessaires à l'effet des hormones GC. Ensuite, j'ai vérifié sur le gène *AFP* endogène, par ChIP, si et à quel endroit GR est recruté après l'ajout de dexaméthasone, avec quelle cinétique et quels sont les effets de GR sur les autres régulateurs de ce gène.

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Culture cellulaire

Les cellules des lignées Hep3B, HepG2 et 7.6 (variant sous-cloné de la lignée d'hépatome de rat Morris 7777) ont été cultivées dans du milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Gibco), faible en glucose et supplémenté de 10% de sérum fœtal bovin (FBS, Wisent), de 100 U/ml de pénicilline et de 100 mg/ml de streptomycine (Gibco-BRL).

4.2.2 Mutagenèse dirigée

Les différents mutants des régions régulatrices de l'*AFP* ont été construits à partir du vecteur AFP/CAT, qui contient la région 5' flanquante de l'*AFP* allant de -4400 à +5 pb placée en amont du gène rapporteur CAT (73). Les mutations ont été introduites à l'intérieur des régions régulatrices de l'*AFP* à l'aide du « QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit » selon le protocole « Pfu turbo DNA polymerase » (Stratagene) tel que décrit à la section 2.2.2.

4.2.3 Transfections

Les cellules Hep3B ont été étalées à 1 million de cellules par pétri de 10 cm de diamètre et transfectées le lendemain en utilisant le précipité de phosphate de calcium avec 5 μ g de plasmide rapporteur AFP/CAT, 2.5 μ g de pRSV-LacZ comme contrôle interne d'efficacité de transfection et 10 μ g de pRSV-GR. Lors des traitements aux hormones GC, la Dex a été ajoutée à une concentration finale de 1 μ M le lendemain de la transfection. Les cellules ont

été récoltées 48 heures après transfection et leur activité CAT a été mesurée. Une quantité égale d'unités β -galactosidase a été utilisée pour chaque extrait afin de normaliser les résultats CAT à l'efficacité de transfection. Les transfusions ont été effectuées au moins trois fois avec trois préparations différentes de plasmides. Pour l'étude des mutants de GR, les transfusions transitoires dans les cellules HepG2 ont été effectuées avec le réactif GeneJuice (Novagen) et 300 ng des différents vecteurs d'expression pour GR. La quantité totale de chaque plasmide a été ajustée à 1 μ g à l'aide d'un vecteur vide (SK+). Les transfusions transitoires dans les cellules 7.6 ont été effectuées avec le réactif FuGENE HD (Roche) avec 2 μ g des différents vecteurs d'expression pour GR. La Dex a été ajoutée à une concentration finale de 1 μ M le lendemain de la transfection et les cellules ont été récoltées 48 heures plus tard pour en extraire l'ARN. Les vecteurs d'expression pour GR ont été obtenus des docteurs MV Govindan (GR de type sauvage), Vincent Giguère (GR Δ DBD) et Ronald M. Evans (GR GTG3A).

4.2.4 Immunoprécipitation de chromatine

Les expériences de ChIP ont été réalisées tel que décrit dans le chapitre 3. Les cellules 7.6 ont été étalées à 1×10^4 cellules/cm² et cultivées pendant 40 heures, avec ou sans Dex (10 nM) ajoutée pour différentes périodes de temps, avant d'être fixées au formaldéhyde. L'anticorps contre GR (sc-1004x) de Santa Cruz Biotechnology, a été utilisé pour les ChIP. Les amorces utilisées pour la détection du promoteur *ALB* (région -0,1 kb) et de l'amplificateur du gène *TAT* (région -2,5 kb) sont les suivantes : TAT1 5'-TCTCTTCTCAGTGGTCTCTATCA-3', TAT2 5'-GCAGAGATTGGTAAACCT-3', ALB1 5'-GTAGGAACCAATGAAATGAAAGG-3' et ALB2 5'-AGGAAAGGTGGTCTGTGTGC-3'. Les ChIP ont été réalisés sur au moins deux expériences indépendantes. Les autres anticorps ainsi que les amorces utilisées pour la quantification des ChIP sur les différentes régions de l'*AFP* ont été décrits précédemment dans le chapitre 3 de cette thèse.

4.2.5 ARN, ADNc et PCR quantitatif

L'ARN des cellules 7.6 a été isolé à l'aide de la trousse « RNeasy Plus mini » (Qiagen). Pour la synthèse d'ADNc, 3 μ g d'ARN ont été utilisés avec des amorces oligo dT de la trousse « Superscript First-Strand cDNA Synthesis » (Invitrogen), conformément au

protocole du fabricant. Les réactions de PCR en temps réel ont été effectuées avec un appareil LightCycler (Roche) en utilisant le réactif SYBRGreen (Invitrogen) dans un volume final de 10 μ l. Les amorces spécifiques ont été choisies à l'aide du logiciel LightCycler Probe Design Software version 2.0 (Roche) et sont inscrites dans le tableau 4-1. Après un premier cycle de 2 minutes à 50°C et 2 minutes à 95°C, les échantillons ont été amplifiés avec 45 cycles de 5 secondes à 94°C, 10 secondes à 55°C et 10 secondes à 72°C, suivi d'un cycle de dénaturation. Les données ont été normalisées au contenu en ARNm de GAPDH pour chaque échantillon selon la méthode $\Delta\Delta$ CP, en tenant compte du coefficient d'efficacité d'amplification de chaque couple d'amorces, déterminé préalablement selon une courbe standard effectuée sur des dilutions séquentielles d'un même échantillon. La spécificité des réactions d'amplification a été déterminée en vérifiant la taille du produit par électrophorèse sur gel d'agarose 2% et par l'analyse des courbes de dénaturation de chaque réaction d'amplification.

Tableau 4-1 Amorces utilisées pour les qPCR effectués sur l'ADNc

ADNc	Brin	Séquence des amorces (5'-3')
GAPDH humain	+	GACAACAGCCTCAAGAT
	-	ATGAGTCCTTCCACGAT
GAPDH rat	+	TGCCACTCAGAAGACTGTGG
	-	TTCAGCTCTGGGATGACCTT
AFP humain	+	AAATGCGTTTCTCGTTGCTT
	-	GCCACAGGCCAATAGTTTGT
AFP rat	+	CGATGGAGTGCCTACAGGAT
	-	TTAAACCTTCCGGTTTGTCTG

4.3 Résultats

4.3.1 La mutation des sites C/EBP et FTF du promoteur et de la région EI de l'AFP n'empêche pas la répression par les hormones glucocorticoïdes en transfections transitoires

Un rôle essentiel dans la transcription de l'AFP a été démontré pour les protéines C/EBP et FTF au cours d'études précédentes, incluant les chapitres 2 et 3 de cette thèse. Comme la répression du gène *AFP* par les hormones GC semble être un phénomène direct et qu'il a aussi été mis en évidence que FTF ainsi que C/EBP α et C/EBP β interagissent avec GR, j'ai voulu vérifier si la mutation des sites de liaison connus pour ces facteurs de transcription

dans les régions régulatrices de l'*AFP* pouvait empêcher la répression par les hormones GC. Pour ce faire, les sites de liaison pour les protéines C/EBP caractérisés au niveau de la région EI ainsi que le site FTF et le site C/EBP du promoteur ont été mutés de façon séquentielle et ces constructions plasmidiques ont été soumises en transfection à un traitement avec la Dex pour 24 heures. La mutation de ces sites, en particulier ceux de la région EI, diminue fortement l'activité de base du vecteur de type sauvage. Ces mutations ont donc été effectuées sur un vecteur comportant la mutation ponctuelle m01 (G119A et G120A, voir figure 2-3), mutation qui introduit au promoteur *AFP* un site de haute affinité pour les protéines HNF1 et qui détruit le site de liaison pour la protéine NF1, un répresseur de l'*AFP*.

La figure 4-1B montre que la mutation m01 augmente de beaucoup le niveau de base du gène rapporteur par rapport au vecteur de type sauvage alors qu'il est toujours réprimé dans une même proportion par l'ajout de Dex, ce qui fait de ce vecteur un outil adéquat pour étudier l'effet d'autres mutations sur la répression par la Dex. On observe que la mutation subséquente des sites C/EBP, autant de la région EI que du promoteur *AFP*, n'empêche pas les constructions *AFP/CAT* d'être réprimées par la Dex dans une même proportion que le vecteur de type sauvage. De plus, la mutation additionnelle du site FTF ne permet pas non plus d'éliminer la répression. Ces résultats suggèrent donc que l'effet négatif des hormones GC dans ce système ne cible pas, du moins uniquement, les protéines C/EBP ou FTF de la région EI et du promoteur *AFP*.

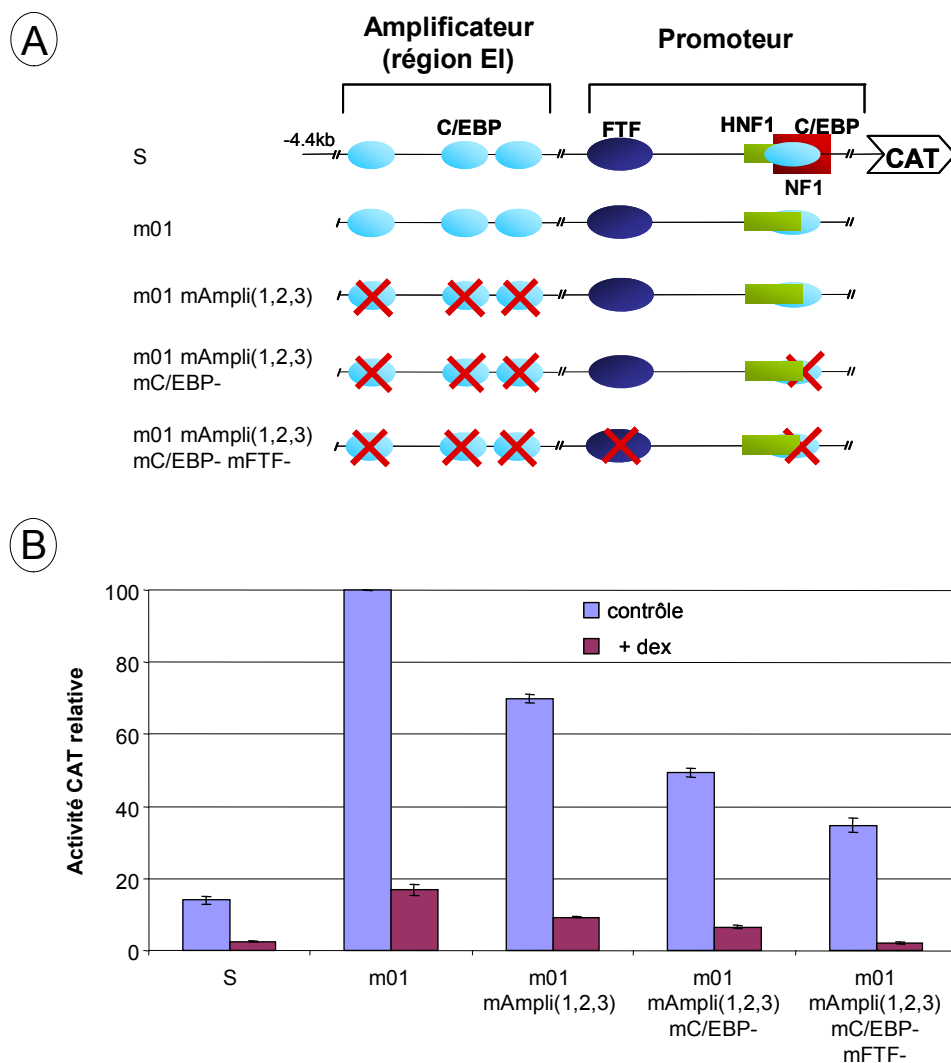


Figure 4-1 Effet de la mutation des sites C/EBP et FTF des régions régulatrices de l'*AFP* sur la répression par la Dex en transfections transitoires

A) Représentation des constructions *AFP/CAT* utilisées en B. Les boîtes de couleur représentent les sites de liaison pour des facteurs de transcription alors qu'un X rouge identifie les sites détruits par mutation. B) Transfections transitoires des cellules Hep3B avec les constructions *AFP/CAT* co-transfectées avec 10 μ g de pRSV-GR en présence de Dex. L'activité CAT des cellules transfectées avec le vecteur m01 et non traitées à la Dex a été ramenée à 100 comme valeur de référence. Les résultats illustrés proviennent de la moyenne (\pm écart-type) de deux expériences.

4.3.2 GR est recruté aux régions amplificatrices de l'*AFP* *in vivo*

Comme les résultats de transfection ne permettent pas d'identifier la région cible de GR au locus *AFP*, j'ai voulu vérifier si je pouvais observer des changements au niveau des régions régulatrices endogènes de l'*AFP* à l'aide de ChIP. J'ai utilisé comme modèle le variant 7.6

de la lignée cellulaire d'hépatome de rat Morris 7777. Ce variant sous-cloné dans notre laboratoire a été sélectionné pour sa grande concentration de GR et parce que l'*AFP* y est rapidement et fortement réprimée par l'ajout d'hormones GC au milieu de culture (85). J'ai donc analysé par CHIP les cellules 7.6 traitées ou non à la Dex, pour une période de temps allant jusqu'à 8 heures, afin de vérifier d'abord s'il y avait recrutement de GR sur les régions régulatrices de l'*AFP* et à quel(s) endroit(s).

La figure 4-2B montre un signal d'enrichissement pour GR très intense au niveau de la région EIII de même qu'un signal d'enrichissement, plus faible mais constant d'une expérience à l'autre, pour GR au niveau de la région EI et ce, seulement après traitement à la Dex. Le recrutement de GR corrèle aussi étroitement avec une diminution du recrutement de l'ARN polymérase II au site d'initiation de la transcription de l'*AFP* et sur sa région codante proximale (figure 4-2C). GR est détecté aux deux régions amplificatrices dès les premières heures de traitement à la Dex ce qui corrobore un effet rapide et direct de GR dans la répression de l'*AFP* par les hormones GC. La répression transcriptionnelle de l'*AFP* par les hormones GC semble donc résulter du recrutement de GR sur ses régions amplificatrices EIII et EI, ce qui mène à une diminution du recrutement de l'ARN polymérase II.

4.3.3 Le recrutement de GR n'entraîne pas la disparition des facteurs de transcription des régions amplificatrices de l'*AFP* *in vivo*

J'ai par la suite vérifié si le recrutement de GR sur les régions amplificatrices du gène *AFP* affectait les facteurs de transcription détectés sur ces régions à l'état basal, soit C/EBP α , C/EBP β et HNF4 (voir chapitre 3). Lors de CHIP contre ces facteurs, le signal d'enrichissement obtenu pour les protéines C/EBP et HNF4 diminue quelque peu sur les régions amplificatrices, surtout la région EI, dès la première heure suivant l'ajout de Dex, mais le signal se stabilise ou réaugmente par la suite (figure 4-3). Comme il persiste encore un signal très fort pour les protéines C/EBP ou HNF4, cela nous suggère que ce n'est pas une perte de ces protéines aux régions amplificatrices qui est la cause de la répression de l'*AFP*. Par contre, le signal obtenu pour C/EBP β au niveau du promoteur *AFP* disparaît après traitement à la Dex. Ceci concorde avec les résultats obtenus précédemment chez des

rats nouveau-nés montrant la disparition rapide d'un site DH au niveau du promoteur après traitement à la Dex (237).

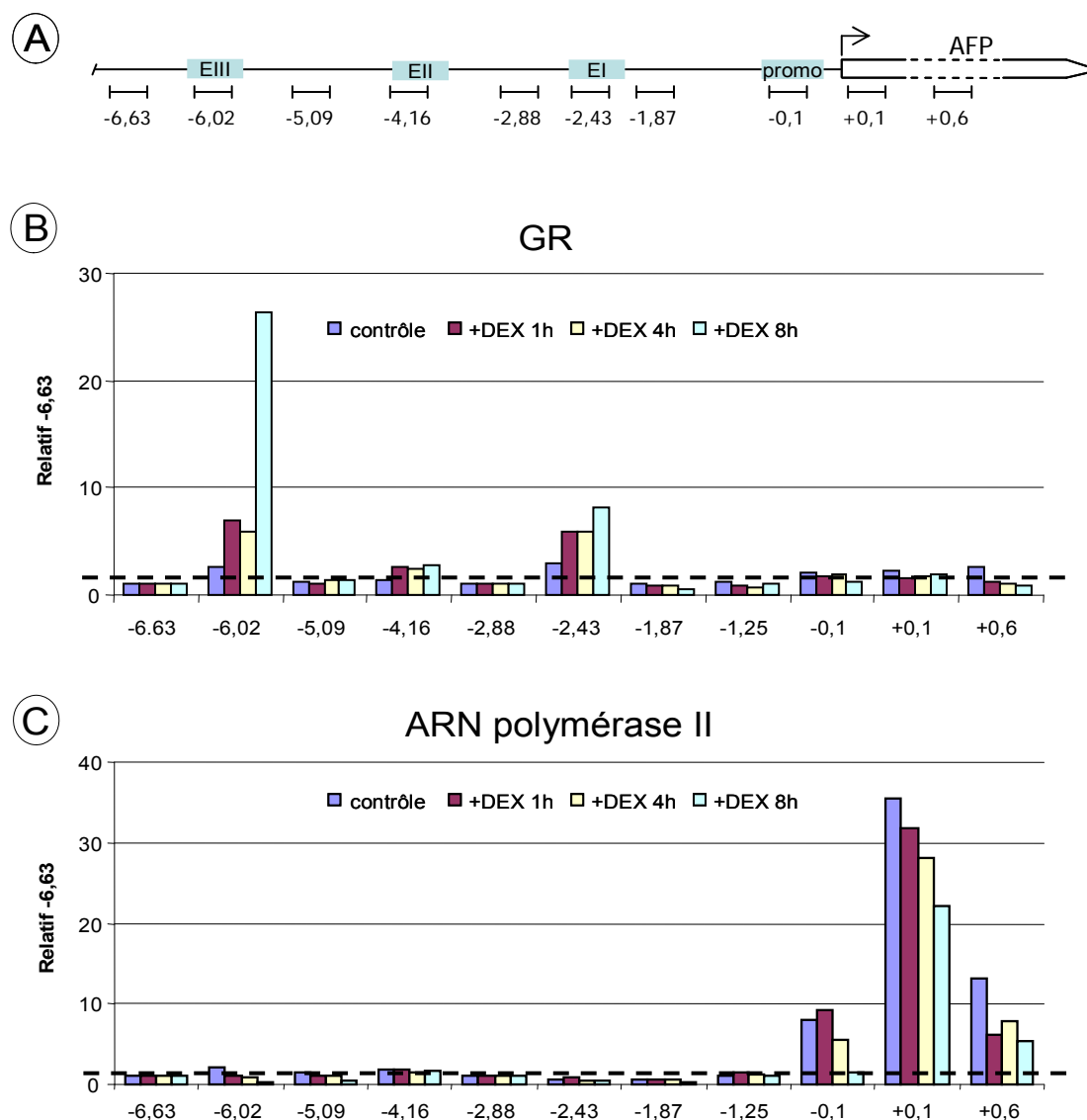


Figure 4-2 GR est recruté aux régions amplificatrices de l'*AFP* *in vivo*

A) Représentation schématique des régions régulatrices du gène *AFP*. La position des différentes amorces utilisées pour les ChIP est inscrite sous celle-ci, en kilobases par rapport au site d'initiation de la transcription de l'*AFP*. B) et C) ChIP réalisés sur des cellules 7.6 traitées ou non avec de la Dex pour les périodes de temps indiquées. Les traits pointillés représentent le bruit de fond obtenu pour chaque anticorps. Les enrichissements obtenus sont relativisés au signal obtenu à une région contrôle, soit la région -6.63. Chaque ChIP a été effectué au moins trois fois et les graphiques illustrent les résultats d'une expérience représentative.

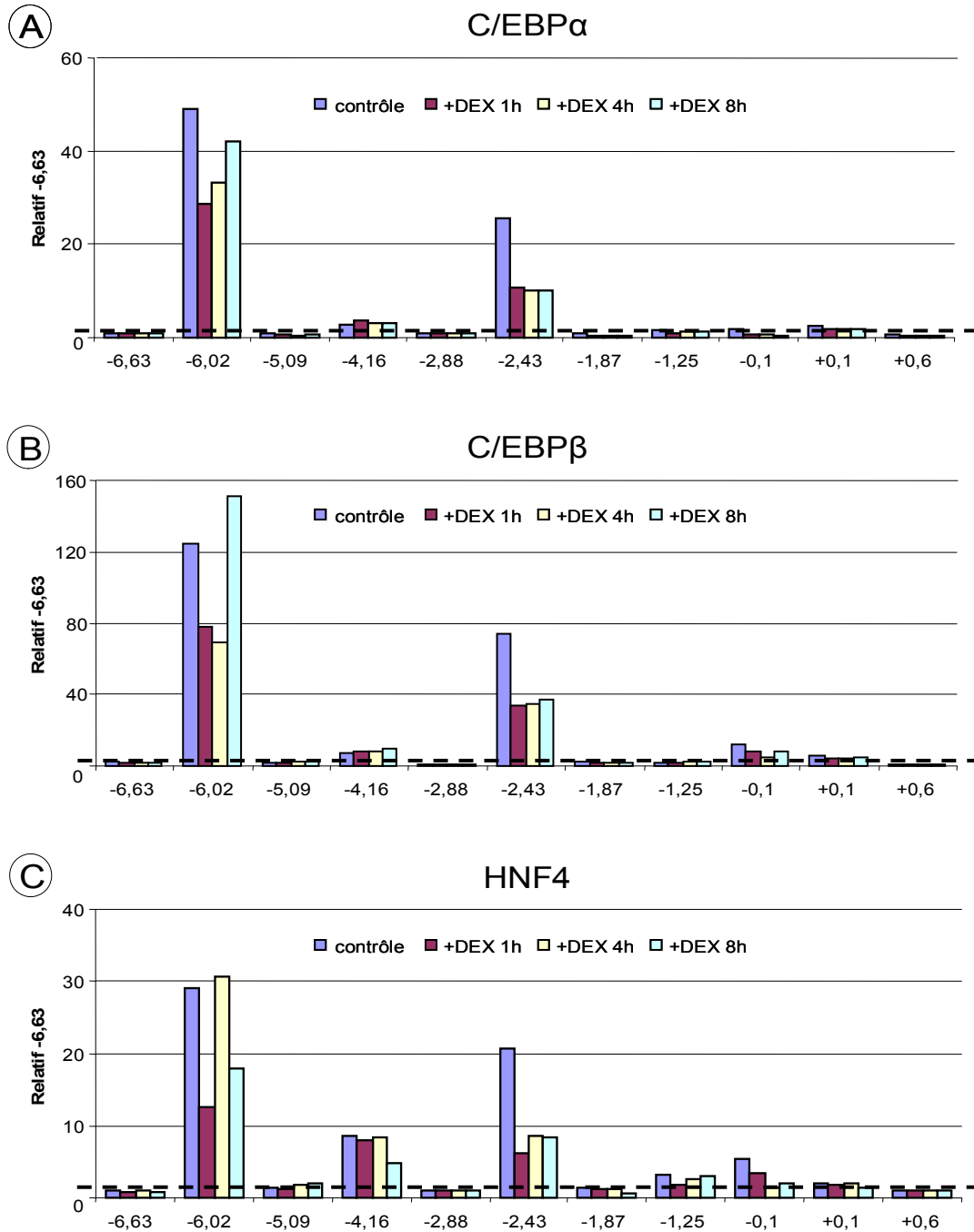


Figure 4-3 Analyse par ChIP du recrutement des protéines C/EBP α , C/EBP β et HNF4 aux régions régulatrices du gène *AFP* lors du traitement des cellules 7.6 avec la Dex

Les traits pointillés représentent le bruit de fond obtenu pour chaque anticorps. Les enrichissements obtenus sont relativisés au signal obtenu à une région contrôle, soit la région -6.63. Chaque ChIP a été effectué au moins trois fois et les graphiques illustrent les résultats d'une expérience représentative.

4.3.4 Diminution des cofacteurs sur les régions régulatrices de l'*AFP* *in vivo* lors du recrutement de GR

Au chapitre 3, j'ai identifié 3 coactivateurs présents sur les régions régulatrices du gène *AFP* lorsque celui-ci est activement transcrit, soit CBP, p300 et TRAP220. J'ai donc également vérifié par ChIP si ces cofacteurs étaient affectés lors du recrutement de GR. Ainsi, la figure 4-4 permet de constater que le signal d'enrichissement obtenu pour CBP, p300 et TRAP220 diminue fortement au niveau de la région EI et ce, dès la première heure de traitement à la Dex. La région EIII, où GR est également recruté, semble moins affectée alors que les cofacteurs continuent d'y être détectés pendant les premières heures. Le recrutement de TRAP220 au site d'initiation de la transcription du gène *AFP* diminue aussi suite au recrutement de GR.

Afin de vérifier si le phénomène observé en ChIP provenait d'un effet général de la Dex sur les cellules 7.6, j'ai étudié le recrutement de GR, C/EBP, HNF4, CBP, p300, TRAP220 et pol II sur deux autres gènes contrôles, soit celui de l'albumine, qui n'est pas modulé par le traitement aux hormones GC, et celui de la tyrosine amino-transférase (*TAT*), qui est fortement activé par le même traitement (figure 4-5). Cette analyse par ChIP permet de faire état de quatre points importants : premièrement, la répression transcriptionnelle suite au traitement à la Dex est sélective au gène *AFP* puisque le recrutement de la pol II au promoteur *ALB* ne change pas et il augmente sur *TAT*; deuxièmement, le recrutement de GR est aussi spécifique aux gènes *AFP* et *TAT* puisqu'il n'est pas détecté sur le promoteur *ALB*; troisièmement, le recrutement des protéines C/EBP est induit fortement sur l'amplificateur *TAT* après traitement à la Dex alors qu'il ne change pas ou peu au locus *AFP*; enfin, les cofacteurs CBP, p300 et TRAP220 voient tous leur recrutement augmenter fortement à l'amplificateur *TAT* après Dex alors qu'il diminue au locus *AFP*. Tous ces résultats indiquent un blocage sélectif du recrutement de cofacteurs au locus *AFP* suite à la liaison de GR aux régions amplificatrices du gène *AFP*.

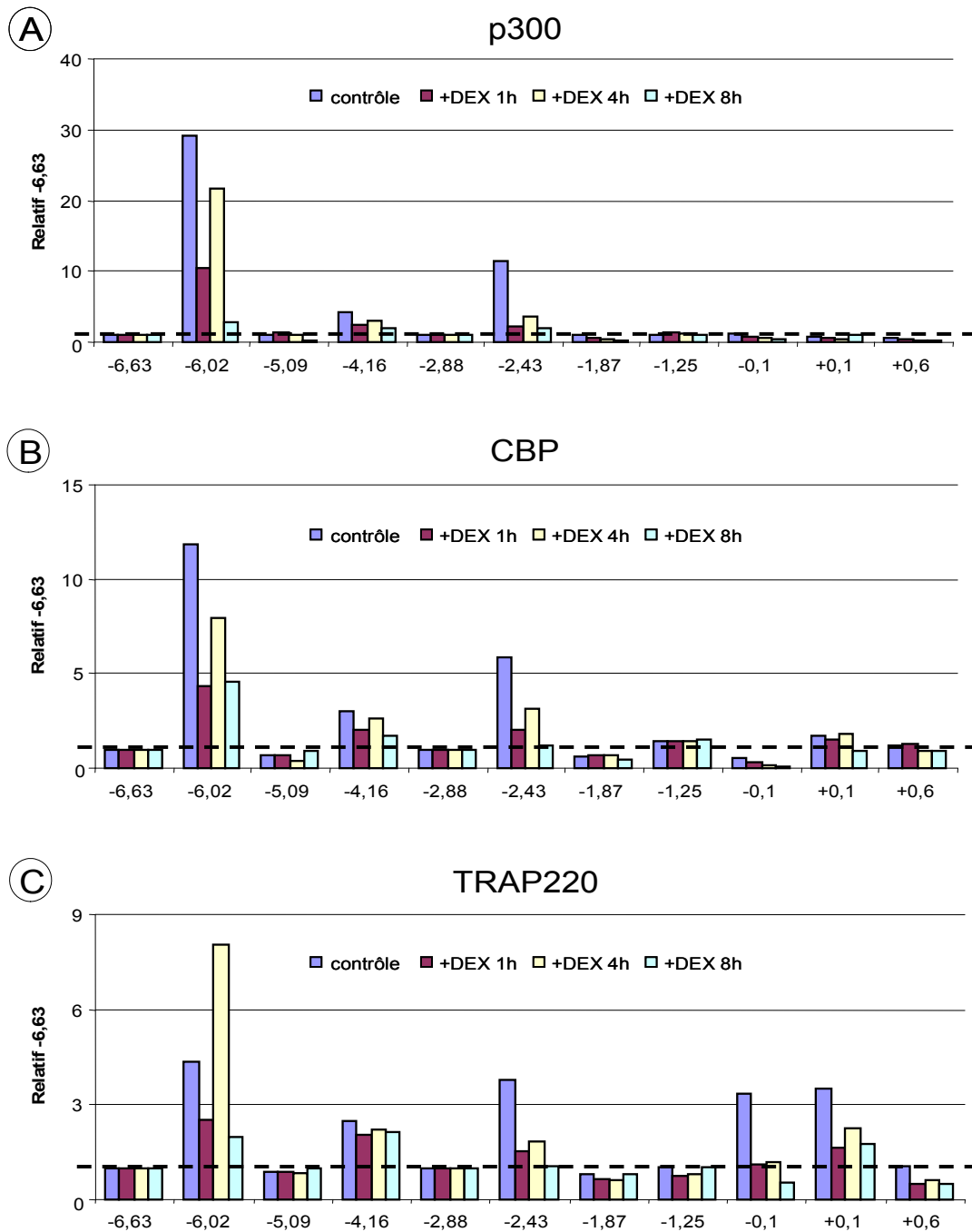


Figure 4-4 Analyse par ChIP du recrutement des protéines CBP, p300 et TRAP220 aux régions régulatrices du gène *AFP* lors du traitement des cellules 7.6 avec la Dex

Les traits pointillés représentent le bruit de fond obtenu pour chaque anticorps. Les enrichissements obtenus sont relativisés au signal obtenu à une région contrôle, soit la région -6.63. Chaque ChIP a été effectué au moins trois fois et les graphiques illustrent les résultats d'une expérience représentative.

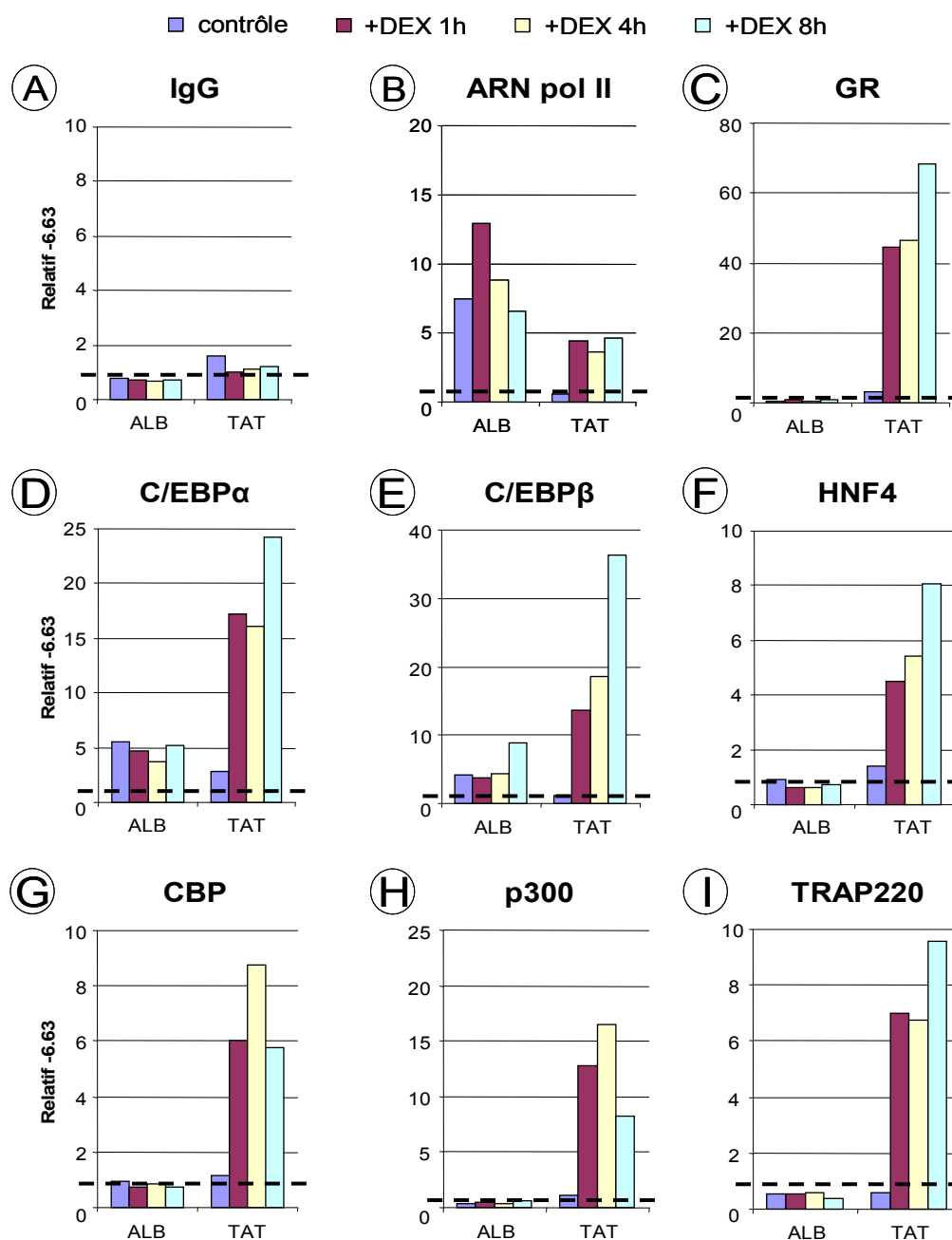


Figure 4-5 Analyse par ChIP du recrutement des facteurs régulateurs du gène *AFP* au promoteur *ALB* et à l'amplificateur *TAT* lors du traitement des cellules 7.6 avec la Dex

Les traits pointillés représentent le bruit de fond obtenu pour chaque anticorps. Les enrichissements obtenus sont relativisés au signal obtenu à une région contrôle, soit la région -6.63. Chaque ChIP a été effectué au moins trois fois et les graphiques illustrent les résultats d'une expérience représentative.

4.3.5 Le DBD de GR est requis pour son action sur le gène *AFP in vivo*

Des travaux effectués précédemment dans notre laboratoire ont mené à la conclusion que la répression de l'*AFP* par les hormones GC nécessite le DBD de GR sans nécessiter sa liaison à l'ADN (121). Ces résultats ont été obtenus en utilisant, en plus d'un vecteur exprimant un GR de type sauvage, deux vecteurs exprimant un GR modifié. La première modification, retrouvée dans le vecteur GTG3A, consiste en une mutation du DBD qui change la spécificité de GR pour sa liaison à l'ADN. Ainsi, ce mutant ne se lie plus aux GRE mais plutôt les éléments de réponse aux estrogènes (238). La seconde modification, retrouvée dans le vecteur GR Δ DBD, crée une délétion du DBD (acides aminés 248-290), ce qui produit un GR qui ne se lie plus à aucune séquence d'ADN. À la lumière des résultats présentés à la section 4.3.2, les travaux réalisés antérieurement présentent une importante lacune. En effet, dans cette étude, l'effet des différents mutants de GR a été testé en transfections transitoires sur une construction *AFP/CAT* ne couvrant pas la région EIII. Étant donné que GR est fortement recruté à la région EIII pendant sa répression par les hormones GC et qu'un GRE potentiel a déjà été identifié dans cette région (82), j'ai voulu vérifier si l'action de GR au locus *AFP* endogène nécessite son DBD. Pour ce faire, j'ai surexprimé des protéines GR de type sauvage ou modifiées (mutation GTG3A ou Δ DBD) dans des lignées cellulaires d'hépatome sensibles ou résistantes à l'action des hormones GC, soit les cellules 7.6 dans le premier cas et les cellules HepG2 dans le second cas. J'ai mesuré l'effet de ces surexpressions sur le gène *AFP* endogène, par la quantité totale d'ARNm *AFP* suite au traitement à la Dex.

Le traitement à la Dex de cellules sensibles à l'action des hormones GC, soit les cellules 7.6, réprime fortement la transcription du gène *AFP* endogène (figure 4-6A). La transfection de ces cellules avec un vecteur produisant une protéine GR de type sauvage accentue cette répression. Lorsqu'on introduit dans ces mêmes cellules un GR modifié (GTG3A ou Δ DBD), on remarque une interférence avec le taux de répression normal du gène *AFP* en présence de Dex. Ces différences ne peuvent être expliquées par une différence d'expression des différents GR transfectés puisque les niveaux d'expression des différents GR transfectés sont équivalents et correspondent à une augmentation d'environ 3 fois de l'ARNm total de GR (données non montrées). Ces résultats suggèrent donc que la répression du gène *AFP in vivo* nécessite le DBD de GR. L'effet moins significatif du

mutant GTG3A suggère toutefois que la liaison de ce dernier sur un GRE n'est pas essentielle; cependant elle pourrait être requise pour la répression maximale du gène en réponse aux hormones GC.

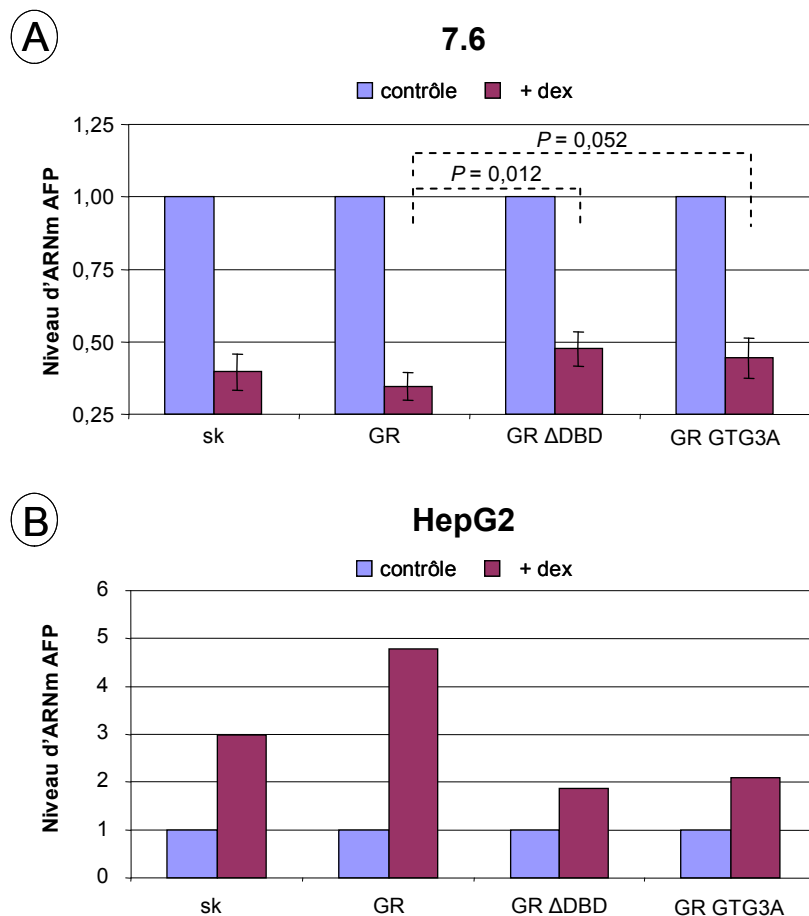


Figure 4-6- La répression du gène *AFP* requiert le DBD de GR *in vivo*

Transfections transitoires des cellules 7.6 (A) et HepG2 (B) avec un vecteur contrôle (sk) ou différents vecteurs d'expression pour GR de type sauvage (GR) ou muté (GR ΔDBD, GR GTG3A). La quantification des ARNm de l'*AFP* a été effectuée en utilisant l'ARNm de *GAPDH* comme contrôle interne dans les réactions de qPCR. Le niveau d'ARNm *AFP* des cellules contrôles a été ramené à 1 comme valeur de référence. Les résultats illustrés en A proviennent de la moyenne (\pm écart-type) de quatres expériences indépendantes. Les valeurs *P* ont été obtenues par un test *t* de Student.

Le même type d'expérience effectuée dans une lignée cellulaire résistante à l'action AFP-suppressive des hormones GC, soit les cellules HepG2, donne des résultats complémentaires. Ainsi lorsque ces cellules sont transfectées ou non avec un vecteur codant pour la protéine GR de type sauvage, la transcription gène *AFP* endogène est induite

de 3 à 5 fois (figure 4-6B). Cependant, l'introduction dans ces cellules d'un GR délété de son DBD ou du mutant GTG3A interfère avec l'effet activateur de la Dex sur le gène *AFP* endogène. Cela suggère donc que l'effet des hormones GC sur le gène *AFP* dans cette lignée cellulaire nécessite la liaison de GR à l'ADN. Vu l'effet positif des hormones GC sur la transcription du gène *AFP* dans les cellules HepG2, il est possible que dans ce contexte GR exerce son action de façon indirecte, par exemple par l'induction d'un facteur ayant un effet positif sur la transcription du gène *AFP*.

4.4 Discussion

Les études réalisées jusqu'à présent indiquaient que la régulation de l'*AFP* par les hormones GC s'effectue au niveau transcriptionnel et implique le DBD de GR, non pas par ses fonctions de liaison à l'ADN mais par son interaction avec un ou des activateurs de l'*AFP*, ce qui conduirait à un masquage ou une perte des fonctions activatrices et à la répression transcriptionnelle du gène *AFP* (84, 121, 236). De plus, quelques évidences suggéraient un effet des hormones GC ciblant préférentiellement la région promotrice du gène *AFP* (18, 237). D'abord, le site DH correspondant au promoteur *AFP* est le seul qui se ferme suite à un traitement à la Dex. Ensuite, des expériences de transfection semblaient indiquer que la région distale du promoteur *AFP* était impliquée dans la répression (18, 121). Le récepteur nucléaire FTF se lie à cette région critique et interagit avec le DBD de GR, faisant de FTF une cible potentielle de GR (18, 73, 75). De plus, l'observation au chapitre 2 du recrutement des protéines de la famille C/EBP sur la région distale du promoteur *AFP*, ainsi que l'interaction documentée entre ces protéines et GR (22, 75), introduisent une autre cible potentielle de GR dans la répression transcriptionnelle du gène *AFP*.

Dans un système de transfection transitoire, les résultats du présent chapitre montrent que la mutation de tous les sites C/EBP et FTF conservés au niveau du promoteur et de la région EI de l'*AFP* ne permet pas d'éliminer la répression du gène rapporteur observée lors d'un traitement à la Dex. Les transfections transitoires ne permettant pas de recréer l'environnement chromatinien endogène qui peut être essentiel à la régulation normale du gène *AFP*, j'ai effectué des CHIP afin d'étudier les effets des hormones GC sur le gène *AFP* endogène. J'ai ainsi pu observer le recrutement rapide de GR principalement aux régions EIII et EI du gène *AFP* et ce, dès la première heure de traitement. Ce recrutement de GR semble stable puisqu'il y persiste pour une période allant au moins jusqu'à 8 heures après l'ajout de Dex et qu'il corrèle étroitement avec la diminution du recrutement de l'ARN polymérase II au site d'initiation de la transcription de même que sur la région codante proximale du gène *AFP*, appuyant ainsi l'effet rapide et direct de GR sur la transcription du gène *AFP*.

Par la suite, j'ai vérifié l'impact que produit le recrutement de GR sur la région amplificatrice du gène *AFP*. Par ChIP, j'ai pu démontrer que le recrutement des principaux facteurs de transcription connus pour lier cette région, soit C/EBP α , C/EBP β et HNF4, n'est pas très affecté par le recrutement de GR. Le seul changement important survient plutôt au niveau du promoteur *AFP* où le recrutement de l'ARN polymérase II et de C/EBP diminue rapidement. Ces résultats suggèrent donc que l'effet premier de GR sur le locus *AFP* n'est pas de compétitionner avec un facteur de transcription essentiel à l'activation du gène *AFP*, comme c'est le cas sur d'autres gènes ciblés par GR (150). Par contre, la désactivation du promoteur *AFP* suit étroitement le recrutement de GR sur les régions amplificatrices : alors quel serait donc le mécanisme de répression du gène *AFP*?

J'ai identifié, au chapitre 3, trois corégulateurs qui semblent être importants pour la transcription de l'*AFP* puisque leur présence sur le locus corrèle avec l'état actif du gène. J'ai donc vérifié la présence de ces trois corégulateurs, soit CBP, p300 et TRAP220, au niveau des régions régulatrices de l'*AFP* pendant la répression de ce gène par GR. Ainsi, j'ai pu observer qu'une diminution du recrutement de ces trois cofacteurs, principalement au niveau de la région EI, suit le recrutement de GR aux régions EIII et EI. La diminution du signal d'enrichissement observé pour CBP, p300 et TRAP220 n'est pas due à un effet négatif global de la Dex sur les cellules 7.6 puisqu'on retrouve ces cofacteurs nouvellement recrutés sur la région amplificatrice du gène *TAT*, activé par GR dans ces conditions.

Le recrutement de GR sur les régions amplificatrices du gène *AFP* coïncide avec la présence des protéines de la famille C/EBP. L'interaction déjà documentée entre GR et les protéines C/EBP ainsi que leur conservation sélective sur la région EI suggèrent fortement la possibilité que les protéines C/EBP soient ciblées directement par GR lors de traitements à la Dex. Selon cette observation, le recrutement de GR surviendrait vraisemblablement par l'intermédiaire d'interactions protéine-protéine entre GR et les complexes C/EBP présents sur la région EI et EIII. En conséquence, la présence de GR sur ces régions amplificatrices mènerait à un blocage du recrutement des coactivateurs importants pour la transcription de l'*AFP* par un mécanisme qui nous est encore inconnu. La perte des coactivateurs sur la région amplificatrice entraînerait une perte d'activité de ce segment qui serait alors

incapable de maintenir la région du promoteur permissive à l'activation, menant à l'arrêt de la transcription du gène.

La présence d'un GRE dans la région EIII de l'*AFP* a déjà été rapportée, sans toutefois que la fonctionnalité et l'importance de ce site ne soit explorée (82). Des expériences réalisées précédemment dans notre laboratoire ont démontré la nécessité du DBD de GR dans la répression de l'*AFP* en suggérant toutefois que ce phénomène n'impliquait pas la liaison à l'ADN de GR (121). Cependant, le vecteur utilisé dans ces expériences couvrait le promoteur et les régions EI et EII de l'*AFP*, mais excluait la région EIII, sur laquelle le recrutement de GR *in vivo* semble se faire de façon prédominante. De plus, la destruction dans ce vecteur des sites C/EBP de la région EI (où GR est aussi recruté *in vivo*) n'empêche pas la répression par GR en transfection transitoire. J'ai donc vérifié si la répression du gène *AFP* par GR *in vivo* s'effectuait réellement de façon indépendante à la liaison à l'ADN de ce dernier en reprenant les expériences effectuées antérieurement mais en observant le gène *AFP* endogène cette fois-ci. J'ai donc regardé l'effet des modifications du DBD de GR sur la quantité d'ARNm *AFP* produit par les cellules 7.6 traitées avec la Dex. Quoique encore préliminaires, les résultats ainsi obtenus permettent de constater que la répression du gène *AFP* endogène nécessite réellement le DBD de GR, alors que la capacité de liaison de ce dernier à un GRE pourrait être requis pour mener à la répression maximale du gène *AFP in vivo*. Ces résultats ont cependant été obtenus dans une lignée cellulaire d'hépatome exprimant GR en grande quantité. Les effets observés lors de la surexpression des mutants de GR sont donc moins marqués que si ces expériences avaient été réalisées dans des cellules n'exprimant pas GR. La confirmation de ces résultats dans une telle lignée cellulaire serait donc préférable avant de conclure sur ce point.

Les résultats de surexpression des différents mutants de GR dans la lignée cellulaire HepG2, résistante à l'action *AFP*-suppressive des hormones GC, se sont avérés intéressants. Dans cette lignée cellulaire, l'introduction d'un vecteur exprimant un GR de type sauvage, donc fonctionnel, ne permet pas de réprimer le locus *AFP* endogène. Ces résultats suggèrent donc que l'absence de répression du gène *AFP* dans ces cellules n'est pas due à la présence de mutations dans la séquence codante de GR produisant une protéine non fonctionnelle. Le phénomène de résistance des hépatomes à l'action *AFP*-suppressive

des hormones GC doit donc survenir à un autre niveau, impliquant possiblement des partenaires de GR dans ce type de régulation.

Ces derniers travaux soulignent aussi un point très important relativement à l'interprétation des résultats de transfections transitoires. Ainsi, les travaux réalisés au début de ce chapitre sur les régions du locus *AFP* impliquées dans la répression transcriptionnelle du gène *AFP* par la Dex ont été effectués en surexprimant GR en grande quantité dans une lignée d'hépatome résistante à l'action *AFP*-suppressive des hormones GC, soit les cellules HepG2. Or, on peut constater que dans un système de transfection transitoire, on arrive à réprimer un rapporteur *AFP/CAT*, alors que le gène endogène n'y est pas réprimé. De plus, cette répression est observée malgré l'exclusion de la région EIII et la mutation des sites C/EBP de la région EI dans le vecteur utilisé au cours de ces expériences. Ces deux régions étant les principaux éléments de recrutement de GR au locus *AFP in vivo*, il semble évident que les données obtenues dans ce système ne sont pas représentatives du contexte endogène. Donc, malgré la facilité d'usage des méthodes de transfections transitoires utilisant la surexpression de protéines avec un gène rapporteur, les résultats obtenus de cette façon demandent une interprétation très prudente.

Bref, les résultats présentés dans ce chapitre ont permis d'établir le recrutement de GR, en présence de Dex, aux régions amplificatrices EI et EIII du locus *AFP*. Ce recrutement est accompagné d'une diminution des coactivateurs de ces régions et d'une diminution rapide du recrutement de l'ARN polymérase II au promoteur *AFP*. Le recrutement de GR s'effectuerait vraisemblablement par l'intermédiaire d'une interaction protéine-protéine avec les protéines de la famille C/EBP, toutefois son recrutement par interaction DBD/GRE n'est pas encore exclu et demande une étude plus approfondie.

Quoique très informatifs sur le recrutement de GR au niveau du locus *AFP*, ces travaux soulèvent quelques questions supplémentaires. Premièrement, de quelle façon GR va-t-il bloquer le recrutement des coactivateurs sur la région amplificatrice de l'*AFP*? Il existe deux hypothèses principales pouvant expliquer ce phénomène. Le recrutement de GR sur les protéines C/EBP pourrait entraver la liaison des coactivateurs recrutés par C/EBP; ou le recrutement de corépresseurs par GR pourrait causer un effet négatif sur le recrutement des coactivateurs par les facteurs de transcription présents à proximité. La répression du locus

AFP est toutefois très intrigante puisque le gène *TAT*, fortement induit par GR après traitement à la Dex, est activé par une région amplificatrice où se lie le même type de facteurs de transcription que la région EIII du gène *AFP*, soit un site GRE à côté de sites C/EBP et HNF3. Deuxièmement, si GR nécessite le recrutement de corépresseurs précis afin de réprimer le gène *AFP*, quels sont-ils? Un candidat possible est le corépresseur SMRT, qui interagit avec C/EBP β sur le gène *GSTA2* après avoir été recruté par GR, ce qui mène à la répression du gène (109). Troisièmement, de quelle façon les hépatomes résistent-ils à l'action AFP-suppressive des hormones GC? Une mutation a été identifiée dans une lignée d'hépatome à l'intérieur de GR qui empêche ce dernier d'activer C/EBP α pour mener à un arrêt de la prolifération (188). Cependant la surexpression d'un GR de type sauvage dans une lignée résistante à l'action AFP-suppressive des hormones GC ne permet pas de réprimer l'*AFP*, confirmant ainsi l'existence de mécanismes alternatifs pouvant conférer une résistance à ces hormones. Une meilleure compréhension du mécanisme de répression de l'*AFP* par GR permettrait assurément d'en savoir plus sur le phénomène de résistance aux hormones GC. Des expériences devront donc être effectuées afin de répondre à ces interrogations.

Chapitre 5- Discussion générale

Le gène *AFP* constitue un excellent modèle de régulation lié aux mécanismes de différenciation cellulaire puisque celui-ci est exprimé uniquement pendant la vie foetale de l'organisme ainsi que dans certains cas de HCC, associés à la réexpression de fonctions hépatiques immatures. De plus, la résistance des HCC à l'action AFP-suppressive et anti-proliférative des hormones GC constitue un autre modèle intéressant permettant d'identifier les différents mécanismes de différenciation cellulaire qui peuvent être déréglés dans les cancers hépatiques.

Plusieurs études antérieures suggéraient un rôle crucial de la région distale du promoteur *AFP* dans la régulation développementale et hormonale du locus, sans en identifier toutefois le mécanisme. Plusieurs sites de reconnaissance pour des facteurs de transcription ont été rapportés dans cette région. Cette étude a donc été initiée afin de préciser l'identité des facteurs de transcription se liant à cette région pour permettre de répondre à la question suivante: comment la région distale du promoteur *AFP* est-elle organisée pour répondre aux stimuli développementaux? De plus, le recrutement de régulateurs transcriptionnels sur les régions amplificatrices était encore largement inexploré et pouvait constituer un point de contrôle important pour la régulation du locus *AFP*. L'utilisation conjointe des méthodes d'empreintes génomiques *in vivo*, de ChIP et de transfections au cours de cette étude a permis de mieux analyser l'organisation des régions amplificatrices et promotrices *AFP* dans leur condition native. Les résultats présentés dans cette thèse permettent ainsi de générer de nouvelles pistes concernant la régulation de ce locus et ouvrent la voie à plusieurs perspectives fort intéressantes.

5.1 Organisation du promoteur du gène *AFP*

Les travaux présentés au chapitre 2 ont permis de mieux comprendre la régulation transcriptionnelle du gène *AFP* en précisant davantage l'organisation et le fonctionnement de la région distale de son promoteur. Dans un premier temps, ces travaux me permettent maintenant d'affirmer que les protéines de la famille C/EBP vont lier la région distale du promoteur (autour de la région -120) pour mener à l'activation de la transcription du gène *AFP* et ce, corrigeant la littérature abondante soutenant la présence essentielle de HNF1 au niveau de cette séquence. De plus, ces travaux suggèrent la présence sur cette même région des protéines de la famille NF1, identifiées comme des répresseurs de l'*AFP*, lorsque le

gène est réprimé. Malgré l'occupation exclusive de cette région par les protéines C/EBP et NF1, les expériences de transfections stables réalisées au chapitre 2 suggèrent qu'il n'y a pas de compétition entre ces deux protéines pour la régulation transcriptionnelle du gène *AFP*. Cette conclusion est appuyée par des résultats obtenus précédemment dans notre laboratoire qui montrent qu'un transgène dont le site NF1 a été détruit est réprimé au cours du développement dans le foie de souris adultes (121).

Dans un deuxième temps, nos résultats suggèrent une absence de facteurs de transcription sur la séquence LS, située entre les sites C/EBP et FTF. Ces résultats interpellent fortement les effets majeurs des mutations ou délétions de ce segment d'ADN sur l'activité des régions régulatrices du gène *AFP* au cours du développement hépatique. Des expériences de transfection stable ont subséquemment permis d'établir un effet négatif marqué de ces modifications de la région LS sur la régulation de l'*AFP* par les protéines C/EBP. Ainsi, la région LS, quoique étant dépourvue de sites de liaison fonctionnels pour des facteurs de transcription, aurait un impact sur la régulation de l'*AFP* en favorisant le positionnement précis et l'usage des sites C/EBP et FTF de la région distale du promoteur.

Ensuite, mes travaux ont permis d'améliorer encore davantage notre compréhension de la régulation du locus *AFP* par les protéines de la famille C/EBP. La présence de sites de liaison pour les protéines C/EBP au niveau des régions amplificatrices du gène *AFP*, en plus de la région promotrice, semblait indiquer une action plus globale de ces protéines sur la régulation de l'*AFP*. Des expériences de transfection transitoire avec des rapporteurs *AFP/CAT* mutés dans le site C/EBP du promoteur, mais aussi dans les trois sites retrouvés à la région amplificatrice EI, ont permis de constater que la stimulation du promoteur *AFP* par les protéines de la famille C/EBP nécessite autant les sites C/EBP de la région amplificatrice EI que de la région promotrice. Cela indique donc que le site C/EBP du promoteur est nécessaire au couplage entre les fonctions activatrices des régions amplificatrices et de la région promotrice, fonction aussi décrite par un autre groupe pour le site FTF du promoteur *AFP* (249), et d'autre part que l'activité du promoteur *AFP* nécessite bien la présence des régions amplificatrices (87). Dans l'ensemble, ces résultats montrent la faible activité du promoteur *AFP* et renforce l'idée que son activité dépend absolument des régions amplificatrices. La présence de nucléosomes positionnés précisément autour de la

région promotrice *AFP* pourrait possiblement contribuer à ce phénomène. De plus, ces résultats soulignent l'importance de la région distale du promoteur *AFP* dans la régulation transcriptionnelle du gène *AFP* en favorisant son activation par les régions amplificatrices.

Ces travaux s'avèrent fondamentaux pour la compréhension de la régulation transcriptionnelle du gène *AFP* et permettent d'expliquer certaines observations réalisées au fil des ans par plusieurs groupes de recherche. D'abord, le recrutement au locus *AFP* des protéines C/EBP, ciblées par de multiples voies de signalisation cellulaire, suggère qu'elles puissent constituer des effecteurs majeurs des différents stimuli modulant le gène *AFP*. Notamment, des motifs de réponse à la voie de signalisation PKC ont été identifiés sur C/EBP α et sur C/EBP β dont certains sont conservés entre les membres de la famille, alors que la transcription du gène *AFP* est modulée par l'activation de cette voie (196). De plus, la répression transcriptionnelle du gène *AFP* observée lors de l'activation de la voie Ras (147, 160) pourrait également impliquer les protéines C/EBP puisqu'elles sont ciblées par cette voie de signalisation (14, 210, 217). Les changements de phosphorylation sur tyrosine au cours du développement hépatique corrélant avec la transcription de l'*AFP* (108), de même que l'implication de la voie Ras dans les derniers stades de la différenciation hépatique (145) renforcent l'idée que les protéines C/EBP pourraient être ciblées par une signalisation développementale pour réguler l'*AFP*. La modification de ces résidus des protéines C/EBP module leur activité transcriptionnelle, ce qui renforce l'idée que ces protéines puissent être principalement ciblées dans la régulation de l'*AFP* (14, 233, 234). En outre, la répression du gène *AFP* observée lors de la surexpression des protéines de la famille p53 peut aussi être expliquée par une interaction avec les protéines C/EBP, comme il a été démontré dans le cas du gène *ALB* (115).

Ensuite, le concept de faiblesse intrinsèque du promoteur *AFP*, abordé au cours de cette thèse, permettrait aussi d'expliquer les résultats obtenus chez des souris portant un transgène modifié dans la région LS. Dans un premier temps, il semble que ces modifications de la région LS empêcheraient C/EBP de se lier au promoteur *AFP* et favoriseraient la liaison de HNF1 à cet endroit. Dans un deuxième temps, la juxtaposition d'un site de liaison pour un récepteur nucléaire (soit FTF ou HNF4) immédiatement en amont du site HNF1 permettrait une forte activité de ce promoteur, probablement en

favorisant leur interaction avec HNF1. Enfin, ces modifications couplées à la destruction du site NF1 empêcheraient une compétition entre NF1 et HNF1, permettant au transgène de conserver une activité élevée dans le foie adulte (121). Dans l'ensemble, tous ces éléments permettraient d'obtenir un promoteur beaucoup plus fort que le promoteur de type sauvage en changeant tout simplement l'occupation de la région distale du promoteur *AFP*. Ceci résulterait donc en un promoteur qui peut demeurer actif dans le foie des souris adultes, même lors d'une perte d'activité des régions amplificatrices. Ce dernier énoncé est encore une fois appuyé par les résultats obtenus chez les souris transgéniques. En effet, tous les transgènes analysés au cours de ces expériences, quoique présentant une expression qui persiste chez les souris adultes, voient leur expression diminuer de dix fois lors de la différenciation hépatique, reflétant possiblement la diminution d'activité de la région amplificatrice à ce moment (121). Ces résultats suggèrent donc encore une fois un rôle majeur de la partie distale du promoteur *AFP* dans la régulation transcriptionnelle du gène.

5.2 Implication des régions amplificatrices dans la régulation du gène *AFP*

L'organisation du locus *AFP* est très complexe. Constitué d'un promoteur et de trois régions amplificatrices, il comporte des sites de liaison pour plusieurs types de facteurs de transcription, entre autres FTF, C/EBP, HNF1 et HNF3, qui sont tous enrichis au foie. Aucun de ces facteurs ne semble toutefois être régulé de façon similaire à l'*AFP* au cours de la différenciation hépatique et ils occupent tous des rôles importants au niveau du foie adulte (203, 204). Le mécanisme de régulation développementale du gène *AFP* demeurant inconnu à ce jour, j'ai analysé de façon plus approfondie sa région amplificatrice pour vérifier de quelle façon elle est régulée au cours de la différenciation hépatique. Cette thèse a ainsi permis de mettre en évidence le rôle possible de deux protéines très intéressantes, soit C/EBP et HNF4, dans la régulation développementale du gène *AFP* par la région amplificatrice.

5.2.1 Rôle des protéines C/EBP dans la régulation du gène *AFP*

Des sites de liaison pour les protéines C/EBP ont été répertoriés dans toutes les régions régulatrices du gène *AFP*. Le lien étroit qui associe ces protéines avec la différenciation de plusieurs types de tissus fait d'elles des candidats très intéressants afin de permettre

d'expliquer la régulation développementale de l'*AFP*. Ainsi, les expériences présentées au chapitre 3 ont démontré la présence des protéines C/EBP α et C/EBP β sur les trois régions amplificatrices du gène *AFP*, dans un modèle d'hépatome en culture et dans le foie de rats de 4 jours, qui transcrivent abondamment l'*AFP*. Un phénomène très intéressant se produit au locus *AFP* lors des stades tardifs de différenciation hépatique. Par CHIP, on observe une disparition progressive des protéines C/EBP de la région amplificatrice EI, aux environs du jour 10, qui corrèle étroitement avec la désactivation transcriptionnelle du locus. La disparition de C/EBP de la région EI est très sélective puisqu'on peut toujours observer un signal pour ces protéines aux régions EII et EIII du locus *AFP*. La régulation sélective de l'activité de la région EI pourrait donc jouer un rôle dans la régulation développementale du gène *AFP*. Un résultat complémentaire est aussi obtenu dans les cellules 7.6. Ainsi, malgré que le recrutement des protéines C/EBP sur les régions amplificatrices ne diminue pas dans les conditions de culture AFP-négatives, la répression du locus *AFP* coïncide avec une diminution marquée du recrutement des coactivateurs sur ces régions, en particulier CBP/p300. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent donc que la désactivation des fonctions amplificatrices du locus *AFP* pourrait être un évènement précoce lors de sa répression dans diverses conditions.

Les protéines C/EBP continuent d'activer la transcription de plusieurs de leurs gènes cibles lors de la différenciation terminale des hépatocytes. Si les protéines C/EBP sont responsables de la régulation développementale du gène *AFP*, de quelle façon pourraient-elles conférer un patron d'expression spécifique à ce gène au cours du développement hépatique sans avoir le même effet sur leurs autres gènes cibles? La régulation des processus transcriptionnels est très dépendante du contexte génomique. Cela soulève donc la possibilité qu'une modification des protéines C/EBP en réponse à divers stimuli permettrait la régulation sélective d'un sous-groupe de gènes cibles, dont l'*AFP*. Ce type de phénomène a déjà été observé pour les protéines de la famille C/EBP par un autre groupe de recherche étudiant le gène *ALB*. Ils ont montré que ce gène est activé par les protéines C/EBP au cours du développement hépatique et que cette activation dépend du recrutement par celles-ci de SWI/SNF, un complexe impliqué dans le remodelage de la chromatine (96). De plus, la perturbation de la formation du complexe SWI/SNF par l'inactivation ciblée chez la souris d'une sous-unité centrale de ce complexe, soit le gène *SNF5*, n'entraîne pas

de changements dans la transcription du gène *AFP* (80). Cela suggère donc que le complexe SWI/SNF, malgré son recrutement par les protéines C/EBP, régule sélectivement la transcription du gène *ALB*. De plus, la modification de deux motifs distincts de C/EBP α a été impliquée dans la régulation sélective de gènes impliqués dans la lipogenèse et la gluconéogenèse (177). Il semble donc plausible que ce type de phénomène prenne part à la régulation spécifique du gène *AFP*. Par ailleurs, les fluctuations observées dans les cellules 7.6 au niveau du recrutement des coactivateurs CBP et p300 sur le locus *AFP* pourraient être expliquées par une modulation de l'activité des protéines C/EBP. La régulation de l'interaction entre C/EBP et ses cofacteurs CBP et p300 constitue donc un processus très intéressant qui pourrait permettre de réguler sélectivement la transcription du gène *AFP*. D'ailleurs, plusieurs processus de différenciation impliquant les protéines de la famille C/EBP semblent cibler ce type d'interactions avec, par exemple, pRB (100), SWI/SNF (156), TIF2 (197), HDAC1 (253, 267), CDK4 et CDK6 (95, 243, 244).

La relation étroite qui semble exister entre les régions amplificatrices et promotrices du gène *AFP* nous amène à nous poser une question fondamentale : comment ces régions vont-elles interagir pour mener à l'activation et à la désactivation du gène *AFP*? Il existe deux principaux mécanismes permettant d'expliquer l'effet activateur des régions amplificatrices d'un gène. Premièrement, une interaction stable pourrait survenir entre les régions amplificatrices et promotrices du gène *AFP* et ce sur de très longues distances, ce qui entraînerait la formation de boucles chromatiniennes. Ces boucles permettraient aux régions régulatrices de se retrouver à proximité les unes des autres, ce qui faciliterait le recrutement des coactivateurs et de la machinerie transcriptionnelle. La formation de ces boucles résulterait d'interactions entre les différents activateurs ou coactivateurs présents sur les régions promotrices et amplificatrices de ce gène. Ainsi, au locus *AFP*, une boucle pourrait être formée, par exemple, par des interactions entre les protéines de la famille C/EBP, qui sont présentes sur toutes les régions amplificatrices de ce gène, et le récepteur nucléaire FTF, qui est présent sur le promoteur du gène. Comme FTF et C/EBP interagissent avec le cofacteur CBP/p300 (65, 112), cette boucle pourrait aussi survenir par l'intermédiaire d'interaction entre ces facteurs. Un autre groupe a récemment rapporté la formation de ces boucles au locus *AFP* par des expériences de ChIP (104). Pour ma part, je n'ai pu démontrer leur présence et ce, même en utilisant des temps de fixation plus long

dans nos expériences de ChIP pour tenter de fixer ces gros complexes. L'interaction physique entre le promoteur *AFP* et ses régions amplificatrices est donc encore incertaine et demande une étude plus approfondie.

Deuxièmement, les régions amplificatrices d'un gène pourraient aussi servir à recruter différents coactivateurs qui vont être responsables de l'ouverture globale de la chromatine sur tout le locus. Ceci faciliterait la liaison des facteurs de transcription sur tout le locus, jusqu'au niveau de la région promotrice du gène, permettant ainsi la formation du PIC. Les régions amplificatrices du gène *AFP* recrutent toutes des cofacteurs possédant une activité HAT, soit CBP/p300, ce qui mènerait à l'acétylation globale du locus *AFP* et à l'ouverture du promoteur, rendant ainsi cette région compétente à l'activation de la transcription du gène. Quelques observations tendent à appuyer ce type d'action des régions amplificatrices du gène *AFP*. L'incapacité du promoteur *AFP* de fonctionner seul, sans régions amplificatrices, combinée à la présence probable d'une contrainte nucléosomale importante sur cette région et à l'absence de détection, jusqu'à présent, de coactivateurs sur le promoteur du gène *AFP* par ChIP, pointent toutes vers ce modèle de régulation.

Aucune preuve concrète n'a toutefois pu confirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses dans le cadre de cette thèse et le mode de communication entre les régions amplificatrices et la région promotrices du gène *AFP* reste encore à être clarifié afin de mieux comprendre le fonctionnement de ce locus.

5.2.2 Rôle possible du récepteur nucléaire HNF4 dans la régulation du gène *AFP*

Au chapitre 3, j'ai démontré par des expériences de ChIP l'occupation des régions régulatrices du gène *AFP* par le récepteur nucléaire HNF4. Celui-ci est retrouvé sur ces régions dans la lignée d'hépatome 7.6 et dans le foie de rats adultes. HNF4 est une protéine très importante au niveau du développement hépatique, surtout en ce qui a trait à la régulation du caractère épithélial des hépatocytes (11). De plus, il semble impliqué au niveau de la régionalisation de l'expression de certains gènes lors de la différenciation hépatique terminale (218). Ainsi, il mène au recrutement du corépresseur HDAC1 sur la région amplificatrice du gène *GS* spécifiquement dans la région périportale du foie pour mener à sa répression alors que son expression dans la zone péricentrale n'est pas affectée.

L'identification de HNF4 sur les régions amplificatrices de l'*AFP* amène des perspectives très intéressantes en ce qui a trait à la régulation développementale de l'*AFP* de même qu'à sa réexpression dans les HCC. Ainsi il a déjà été rapporté dans la littérature que les régions amplificatrices de l'*AFP*, en particulier la région EIII, présentent une activité qui se retrouve régionalisée lors de la différenciation terminale des hépatocytes (186). L'activité de ces régions amplificatrices est observée uniquement dans les régions péricentrales du foie différencié, comme c'est le cas pour le gène *GS*. L'analogie entre ces deux gènes me permet donc de proposer un mécanisme similaire de régulation pour le gène *AFP*, impliquant la liaison de HNF4 au niveau de ces régions régulatrices pour provoquer la régionalisation de leur activité au cours du développement hépatique et ainsi contribuer en partie à la répression développementale du gène.

Dans un même ordre d'idées, quelques groupes rapportent une perturbation de la fonction de HNF4 dans plusieurs lignées d'hépatomes (32, 143). Cette perte de fonction est causée dans certains cas par la sous-expression de plusieurs cofacteurs importants pour l'activité transcriptionnelle de HNF4 sur certains gènes hépatiques différenciés, en particulier des coactivateurs *PGC1 α* et *SRC1*. De plus, il est à noter que l'interaction entre HNF4 et certains de ses corégulateurs peut être modulée par la phosphorylation de celui-ci, comme c'est le cas notamment pour le coactivateur *PC4* (86). D'ailleurs, une étude récente rapporte une augmentation marquée de la phosphorylation de HNF4 au cours de la différenciation des cellules HepaRG, une lignée de progéniteurs hépatiques, en hépatocytes d'apparence morphologique et fonctionnelle mature (175). Ainsi, le phénomène de perte de fonction de HNF4 pourrait résulter d'une incapacité de HNF4 à recruter certains de ses corégulateurs ou d'une absence dans les hépatomes de ces corégulateurs. Donc, la présence de HNF4 sur les régions amplificatrices du gène *AFP* dans une lignée cellulaire d'hépatome exprimant fortement ce gène pourrait refléter une perte de fonction de HNF4 dans ces cellules, et par le fait même une absence de répression des fonctions amplificatrices du locus *AFP*.

5.3 Répression transcriptionnelle du gène *AFP* par GR

Malgré l'effet rapide et spécifique des hormones GC sur la transcription du gène *AFP*, le mécanisme en cause tout comme le phénomène de résistance des hépatomes à ces hormones sont encore inconnus. Les données obtenues jusqu'à présent suggéraient que la

région distale du promoteur *AFP* était ciblée directement par GR lors de traitements à la Dex. De plus, l'identification d'un site de liaison pour les protéines C/EBP précisément dans cette région du promoteur *AFP* a mis en lumière une nouvelle cible potentielle intéressante de GR. Les travaux présentés au chapitre 4 visaient donc à mieux cerner les régions régulatrices ciblées par GR pour tenter d'en comprendre davantage sur le mécanisme de répression du gène *AFP* de même que sur le phénomène de résistance des hépatomes à l'action AFP-suppressive des hormones GC.

J'ai démontré par des expériences de ChIP que GR est recruté rapidement et sélectivement sur les régions amplificatrices EI et EIII du locus *AFP* lors du traitement des cellules 7.6 avec de la Dex. De plus, on peut observer une désactivation rapide et complète du promoteur *AFP* en réponse aux hormones GC, qui corrèle avec la cinétique de recrutement de GR sur les régions amplificatrices du gène *AFP*. Le mécanisme de répression du gène *AFP* par les hormones GC n'impliquerait pas une interférence de GR avec la liaison des facteurs de transcription sur les régions amplificatrices puisque ceux-ci y demeurent liés. Le recrutement de GR interférerait plutôt avec le recrutement de certains cofacteurs qui semblent essentiels à la transcription du gène *AFP*, soit CBP et p300. Ce blocage du recrutement des cofacteurs est sélectif au locus *AFP* et semble affecter particulièrement l'activité du promoteur *AFP* puisque le recrutement de l'ARN polymérase II et de C/EBP sur cette région diminue dès les premières heures de traitement des cellules à la Dex. Ces résultats suggèrent encore une fois un rôle essentiel des régions amplificatrices dans l'activité transcriptionnelle du promoteur *AFP*, comme il en est discuté à la section 5.3.1. Ce phénomène de répression transcriptionnelle requiert *in vivo* le DBD de GR et pourrait nécessiter sa liaison à un GRE pour causer une répression maximale. Donc, le GRE identifié au niveau de la région amplificatrice EIII pourrait permettre le recrutement de GR à cet endroit. Ces résultats suggèrent donc que la répression du gène *AFP* passe principalement par deux phénomènes importants, soit d'abord la liaison directe de GR à l'ADN de la région EIII et ensuite, l'interaction entre GR et un activateur de la région EI. Les seuls candidats connus à se retrouver sur la région EI du gène *AFP* sont les protéines de la famille C/EBP. Étant donné l'interaction déjà documentée entre cette famille de protéines et le DBD de GR (22), les protéines C/EBP sont des cibles très plausibles dans la répression du gène *AFP* par GR. La fonctionnalité d'une interaction DBD/GRE dans la

région EIII reste toutefois à être confirmée de façon plus convaincante dans d'autres lignées cellulaires.

Je n'ai pu identifier le mécanisme impliqué dans le phénomène de résistance des hépatomes à l'action AFP-suppressive des hormones GC. Cependant, je peux affirmer, à la lumière de mes résultats, que ce phénomène n'implique pas, dans la lignée cellulaire étudiée, des mutations dans la protéine GR endogène puisque la réexpression d'un GR fonctionnel dans une lignée d'hépatome résistante ne permet pas de retrouver une réponse négative du gène *AFP* après traitement à la Dex. La résistance des hépatomes proviendrait donc possiblement de l'absence de certains des corépresseurs de GR à l'intérieur de ces cellules. D'ailleurs la balance entre les coactivateurs et les corépresseurs dans la cellule semble avoir un impact important sur le résultat final du signal véhiculé par GR (247).

5.4 Modèles de régulation transcriptionnelle du gène AFP

Les résultats présentés tout au long de cette thèse me permettent d'élaborer un modèle de régulation développementale de même que hormonale du locus *AFP* permettant de mieux répondre aux questions concernant l'effet de ces différents stimuli sur la transcription du gène *AFP*.

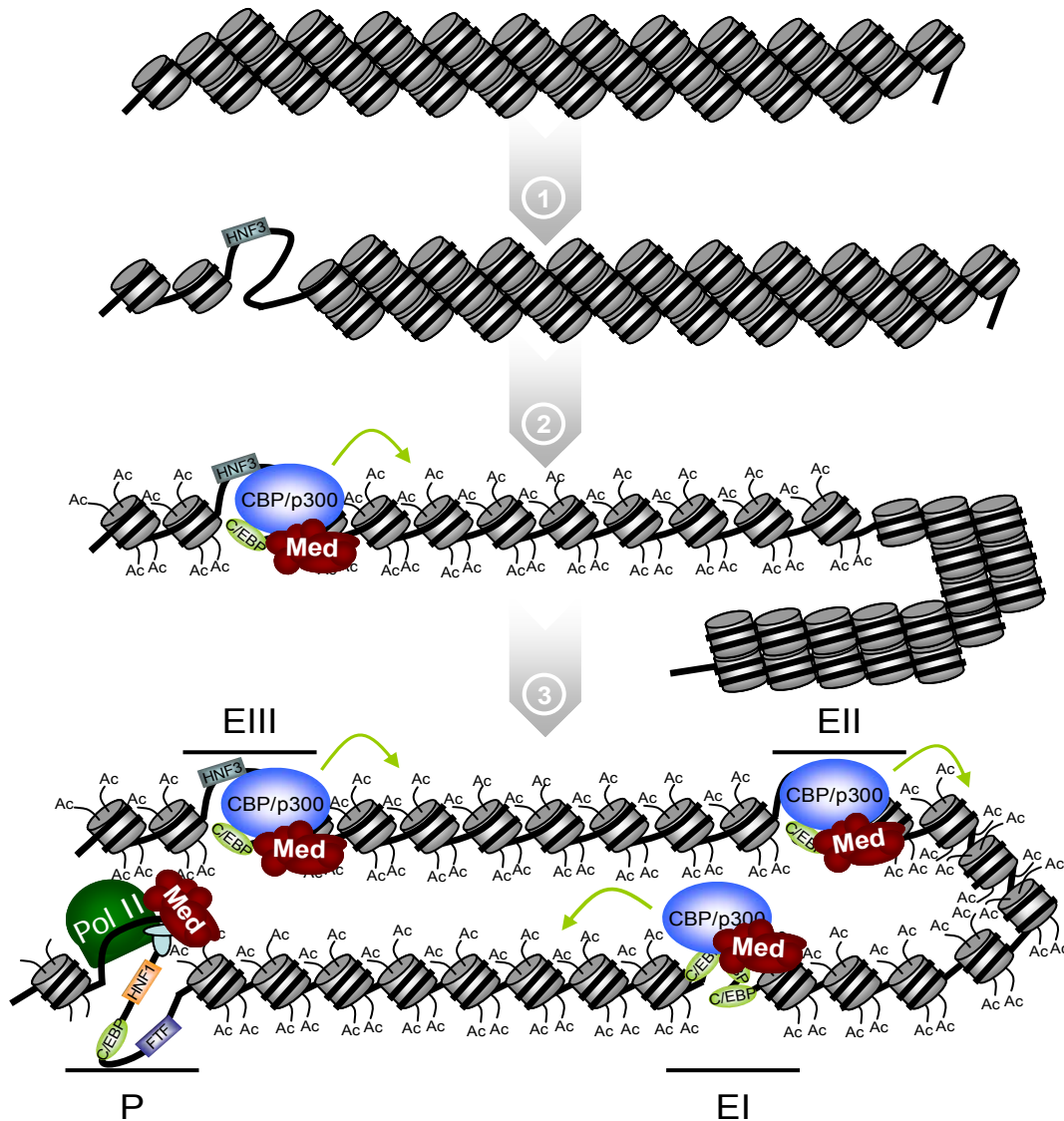


Figure 5-1 Modèle proposé pour l'ouverture du locus *AFP* au cours du développement hépatique

1) Dans l'endoderme, l'activation de HNF3 permet à celui-ci de se lier à son site présent dans la région EIII du locus *AFP*, ce qui induit une décompaction locale de la chromatine. 2) Cet événement permet, lors de l'induction de la différenciation hépatique, à C/EBP de se lier à son site adjacent à HNF3, ce qui mène au recrutement des cofacteurs CBP/p300 et Mediator, et à l'acétylation de la chromatine environnante. 3) Cette acétylation permet de relâcher la chromatine, ce qui rend accessible les sites de liaison de la région EII. C/EBP peut donc s'y lier à son site pour recruter ses cofacteurs et poursuivre la propagation de l'acétylation des histones, jusqu'à la région EI, où le même phénomène se produit. La transmission du signal jusqu'au promoteur permet aux sites de liaison de cette région de devenir accessible, ce qui permet encore une fois à ces facteurs de s'y lier et de recruter le PIC pour activer la transcription du gène *AFP*.

Ainsi, tel qu'illustré à la figure 5-1, l'ouverture du locus *AFP* serait amorcée au cours du développement hépatique par les protéines de la famille HNF3. La liaison de ces protéines à la région amplificatrice EIII permettrait de relâcher la structure chromatinienne à cet endroit, exposant ainsi des sites de liaison pour d'autres facteurs de transcription. Lors de l'induction de l'hépatogenèse, les protéines de la famille C/EBP pourraient se lier à leur site de liaison adjacent au site HNF3 et recruter des coactivateurs comme CBP/p300 pour mener à l'acétylation des histones présentes dans cette région. Cette acétylation engendrerait une ouverture progressive du locus *AFP* jusqu'à la région amplificatrice suivante, rendant cette région à son tour compétente pour lier des facteurs de transcription, permettant ainsi de poursuivre l'acétylation du locus. L'acétylation globale du locus *AFP* serait relayée par les régions amplificatrices jusqu'à la région promotrice du gène *AFP*, ce qui permettrait aux protéines FTF, C/EBP et HNF1 de se lier à leur site respectif du promoteur et d'en activer la transcription.

5.4.1 Régulation développementale

Lors de la différenciation terminale des hépatocytes, deux évènements surviendraient pour mener à la répression de la transcription du gène *AFP* (figure 5-2). Le principal mécanisme de répression ciblerait une ou plusieurs voies de signalisation particulières affectant l'activité transcriptionnelle des protéines C/EBP. La modulation des fonctions activatrices des protéines C/EBP pourrait s'opérer de deux façons distinctes mais menant à un résultat similaire. Dans un premier temps, des voies de signalisation liées à la différenciation et à l'arrêt de la prolifération des hépatocytes pourraient modifier de façon directe les protéines C/EBP en ajoutant par exemple des groupements phosphates ou acétyles sur différents résidus de ces protéines. Ces modifications entraîneraient un changement d'interaction entre les protéines C/EBP et leurs coactivateurs, produisant ainsi un effet sur leur activité transcriptionnelle. Dans un second temps, les voies de signalisation pourraient cibler spécifiquement un coactivateur des protéines C/EBP essentiel à l'ouverture de la chromatine du locus *AFP*, en diminuant sa quantité totale ou en le modifiant de façon post-traductionnelle. De cette façon, les régions régulatrices du gène *AFP* liant les protéines de la famille C/EBP, en particulier la région EI, perdraient complètement leurs fonctions activatrices, essentielles à l'activité du promoteur. Cela aurait donc pour effet d'empêcher

les facteurs de transcription retrouvés au niveau du promoteur de se lier à leurs sites, menant par le fait même à la répression du gène *AFP*.

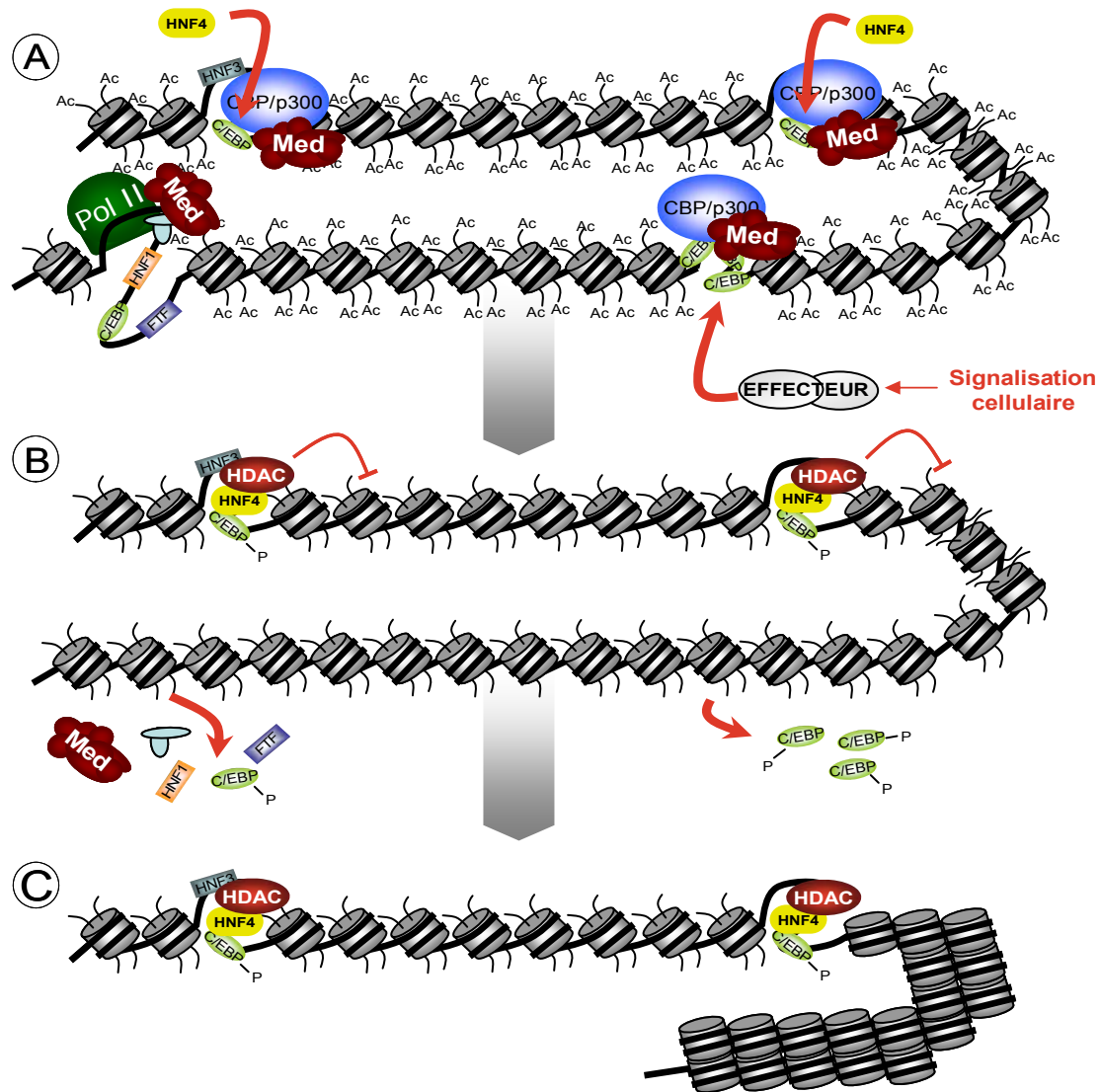


Figure 5-2 Mécanismes possibles de régulation développementale du locus *AFP*

A) Lors de la différenciation terminale des hépatocytes, deux principaux évènements se produiraient. Premièrement, une signalisation cellulaire viendrait ajouter une modification post-traductionnelle sur C/EBP dans toutes les cellules hépatiques. Deuxièmement, seulement dans les cellules périportales du foie, HNF4 viendrait se lier au niveau des régions amplificatrices du locus *AFP*. B) Ces deux évènements mènent à la perte de fonction de C/EBP sur la région EI et au recrutement de corépresseurs par HNF4 sur les régions EII et EIII. Ceci permet la désacétylation du locus et par le fait même la désactivation du promoteur *AFP*. C) La désactivation du locus se poursuit par la condensation de la chromatine de la région amplificatrice EI et du promoteur *AFP*.

Un autre phénomène se produisant au même moment viendrait compléter la répression du gène *AFP* mentionnée plus haut. Ainsi, lors de la régionalisation de certains gènes hépatiques, HNF4 se lierait, dans les cellules de la région périportale du foie, sur toutes les régions régulatrices du locus *AFP* encore actives par l'intermédiaire des protéines C/EBP. La présence de HNF4 permettrait le recrutement sur ces régions de certains corépresseurs, ce qui mènerait à une perte de l'activité des régions amplificatrices du gène *AFP* et par le fait même à une désacétylation globale du locus. Ceci aurait pour effet de rendre la région du promoteur dans une conformation plus compacte qui empêcherait les facteurs de transcription du promoteur de s'y lier et ainsi d'activer la transcription du gène *AFP*.

5.4.2 Régulation hormonale

Lors de la répression du gène *AFP* en réponse aux hormones GC, les régions amplificatrices, qui sont affectées lors de la répression développementale, seraient aussi ciblées spécifiquement par GR (voir figure 5-3). Le traitement à la Dex mènerait d'abord au recrutement rapide et sélectif de GR sur les régions amplificatrices EI et EIII du locus *AFP*. Ce recrutement s'effectuerait vraisemblablement par des interactions protéine-protéine entre GR et les complexes C/EBP présents sur la région EI et EIII, et dans une moindre mesure, possiblement par la liaison de GR sur un GRE présent dans la région EIII. La présence de GR sur les régions amplificatrices du gène *AFP* mènerait ensuite à un blocage du recrutement des coactivateurs importants pour la transcription de l'*AFP* par un mécanisme encore indéterminé, mais qui pourrait impliquer une compétition entre GR et les coactivateurs sur C/EBP. La perte des coactivateurs aux régions amplificatrices de l'*AFP* entraînerait une perte d'activité de ces régions qui seraient alors incapables de maintenir la région du promoteur permissive à l'activation, résultant en la répression de la transcription du gène. En ciblant les régions amplificatrices du locus *AFP*, qui semblent aussi ciblées lors de la différenciation hépatique, GR court-circuiterait la signalisation normale pour mener à un arrêt de la prolifération des hépatocytes ainsi qu'à un arrêt rapide de la transcription de l'*AFP*.

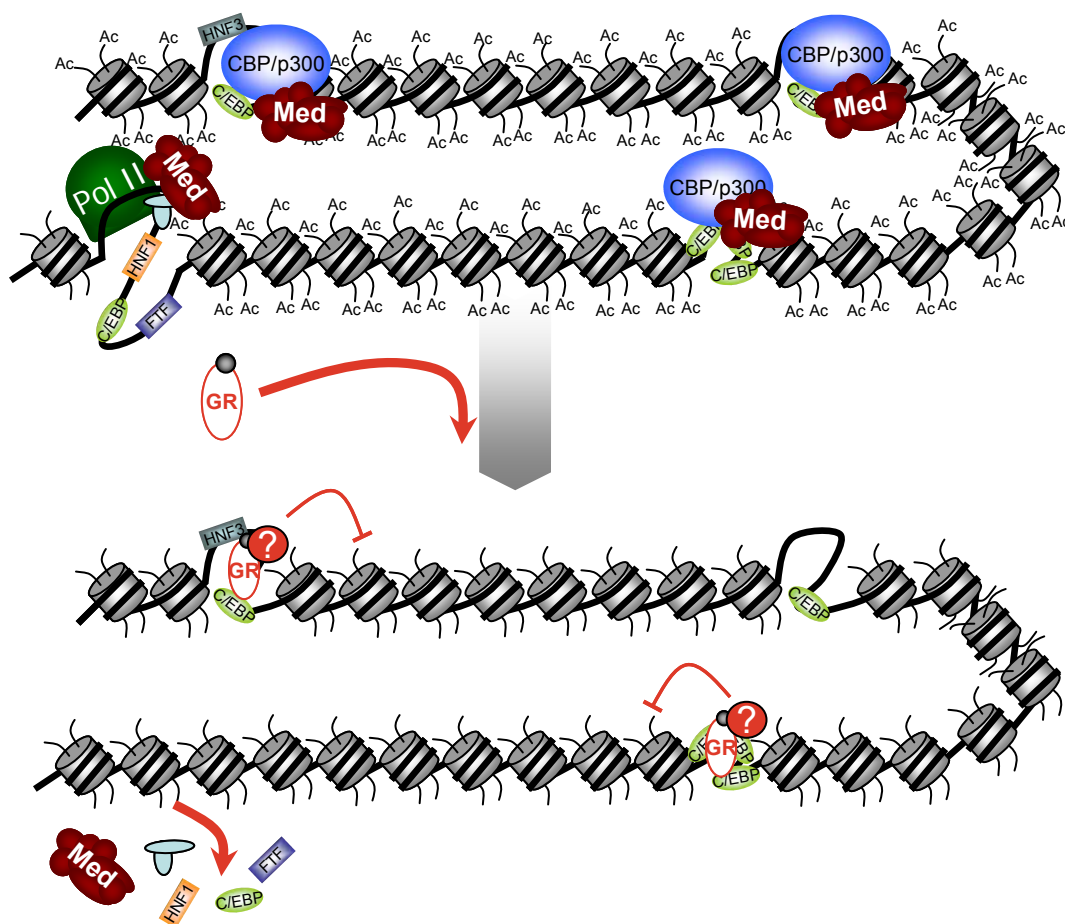


Figure 5-3 Mécanisme de répression hormonale du locus *AFP*

L'ajout d'hormones GC aux cellules permet la translocation de GR au noyau. Celui-ci va par la suite venir se lier aux régions EIII et EI du locus *AFP*, ce qui va empêcher le recrutement des coactivateurs importants pour l'activité du locus. Le recrutement de corépresseurs par GR pourrait par la suite faciliter la désacétylation du locus ce qui occasionnerait la désactivation du promoteur *AFP* et par le fait même, l'arrêt de la transcription du gène.

5.5 Perspectives

Afin d'être en mesure de produire un modèle plus complet concernant les différents mécanismes de régulation du gène *AFP*, il serait intéressant de poursuivre la caractérisation par CHIP des différentes protéines (principalement des corégulateurs) qui sont présentes sur les régions régulatrices du gène *AFP* lorsque celui-ci est actif. Ceci permettrait d'avoir une meilleure idée des différentes protéines pouvant moduler la transcription du gène. J'ai confirmé la présence d'une seule sous-unité du complexe Mediator au niveau du locus *AFP*. Ce complexe étant composé d'un très grand nombre de sous-unités ayant chacune un

rôle spécifique, l'identification des autres sous-unités de ce complexe prenant part à la régulation du gène *AFP* pourrait permettre d'en apprendre davantage sur la régulation spécifique de ce gène. De plus, il serait très intéressant d'identifier les différentes modifications post-traductionnelles présentes sur les histones distribuées sur le locus *AFP*, autant lorsque celui-ci est actif que lorsqu'il est réprimé. En portant une attention particulière au niveau d'acétylation et de méthylation de certains résidus des histones H3 et H4, on pourrait ainsi vérifier mon hypothèse impliquant un rôle pour les régions amplificatrices du gène *AFP* dans l'ouverture de la région promotrice par la propagation de modifications au niveau des histones du locus. Cela pourrait permettre également d'identifier certaines classes de cofacteurs jouant un rôle dans l'activation ou la répression du locus et étant potentiellement ciblées par une signalisation développementale.

Ensuite, afin de vérifier si une contrainte nucléosomale importante est présente au niveau du promoteur *AFP*, nous devrions d'abord vérifier la densité nucléosomale de cette région au cours du développement hépatique. À l'aide de ChIP contre les histones H3 et H4, on pourrait vérifier si la présence d'un nucléosome sur le promoteur *AFP* corrèle avec l'état transcriptionnel du locus. En outre, plusieurs modifications post-traductionnelles des protéines C/EBP ont été associées à leur effet différenciateur, notamment dans la différenciation adipocytaire (8, 29, 227, 253), un processus largement étudié. Malgré la forte présomption qu'un processus similaire touche le gène *AFP*, soit de façon positive ou négative, je n'ai toutefois pu démontrer l'existence de telles modifications des protéines C/EBP affectant spécifiquement la transcription du gène *AFP* au cours du développement hépatique. L'utilisation de mutants des protéines C/EBP sur des résidus modifiés post-traductionnellement pourrait permettre de répondre à cette question.

Malgré l'identification au cours de cette étude du récepteur nucléaire HNF4 sur les régions régulatrices du gène *AFP*, je ne sais pas avec certitude si cette protéine mène réellement à la répression du gène *AFP* lors de la différenciation terminale des hépatocytes. Le mécanisme par lequel HNF4 est recruté sur le locus *AFP*, que ce soit en se liant directement à l'ADN ou en interagissant avec les protéines C/EBP, est aussi inconnu. Donc, si HNF4 réprime réellement l'*AFP*, on devrait vérifier de quelle façon cette protéine produit son effet dans le foie normal afin de savoir qu'est-ce qui l'en empêche dans les hépatomes.

L'identification, par des expériences de ChIP, de cofacteurs de HNF4 sur les régions amplificatrices du gène *AFP* chez les rats adultes pourrait permettre d'en connaître davantage sur le rôle de HNF4 dans la régulation de l'*AFP*. De plus, la surexpression de ces corégulateurs dans la lignée d'hépatome 7.6, utilisée tout au long de cette thèse, et son effet sur l'expression du gène *AFP* endogène pourrait permettre de confirmer le modèle impliquant une perte de fonction de HNF4 dans la réexpression de l'*AFP* dans les tumeurs d'origine hépatique.

Une question fondamentale persiste toujours concernant le mécanisme exact de répression du gène *AFP* par les hormones GC. Ainsi, je n'ai toujours pas identifié de corépresseurs recrutés par GR et responsables de la répression du gène *AFP* lors d'un traitement à la Dex. Ces corépresseurs pourraient être impliqués dans la répression du locus en facilitant la désacétylation de ses nucléosomes. De plus, l'absence de ces protéines dans certaines lignées d'hépatome, comme c'est le cas pour HNF4, pourrait aussi être en mesure d'expliquer le phénomène de résistance des hépatomes aux effets des hormones GC.

Enfin, mes travaux mettent en lumière le rôle important des protéines C/EBP dans la régulation transcriptionnelle du gène *AFP* de même qu'un rôle possible du récepteur nucléaire HNF4 dans la restriction de l'activité des régions amplificatrices de ce gène. Ces facteurs de transcription sont impliqués directement dans l'établissement du phénotype hépatique, C/EBP étant responsable principalement de la transcription de plusieurs gènes métaboliques alors que HNF4 permet l'induction des caractères épithéliaux du foie mature. De plus, le gène *AFP* est aussi activé par FTF, un autre récepteur nucléaire jouant un rôle important dans le développement hépatique. Ceci vient donc renforcer le lien étroit qui existe entre le contrôle de la transcription du gène *AFP* et l'état de différenciation des cellules hépatiques. La pleine compréhension du fonctionnement de ces facteurs de transcription au cours du développement hépatique et de leur dérégulation dans la carcinogenèse permettrait d'élaborer plus efficacement des thérapies différenciatrices ciblant les tumeurs d'origine hépatique. On serait alors en mesure de manipuler ces facteurs de façon plus ciblée afin d'obtenir un impact plus important sur l'état malin des cellules tumorales et pousser celles-ci à revenir vers un état plus différencié. De plus, l'identification des corégulateurs ayant un effet majeur sur la transcription du gène *AFP*

permettrait de cibler des protéines supplémentaires pour obtenir un effet optimal. Des résultats très prometteurs ont d'ailleurs été obtenus avec différents inhibiteurs généraux des HDAC dans le traitement de différents types de cancers. Ainsi, une certaine efficacité de ces molécules a été établie pour ce qui est de leur effet différenciateur et anti-prolifératif sur les cellules tumorales (21).

5.6 Conclusion

L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse a permis de clarifier plusieurs aspects importants de la régulation transcriptionnelle du gène *AFP*. Ainsi, j'ai démontré que la régulation complexe du locus *AFP* implique probablement la liaison des protéines de la famille C/EBP sur trois régions amplificatrices et sur une région promotrice. L'activité des régions amplificatrices serait requise pour mener à l'ouverture globale de la chromatine sur tout le locus, activité particulièrement importante au niveau du promoteur du gène *AFP*, lequel semble présenter une activité intrinsèque très faible nécessaire à une régulation fine de la transcription du gène. La faiblesse relative du promoteur *AFP* semble conférée par un positionnement précis des sites de liaison pour les protéines FTF et C/EBP sur la région distale du promoteur, conférant à celui-ci une dépendance absolue aux régions amplificatrices du gène. Les régions amplificatrices du gène *AFP* occupent donc des fonctions très importantes dans la régulation de ce gène en permettant vraisemblablement de garder la chromatine du promoteur dans une conformation permissive pour la liaison de facteurs de transcription. Ainsi, plusieurs événements, notamment la répression développementale et hormonale du gène *AFP*, semblent cibler majoritairement l'activité de ces régions régulatrices. Tout indique que les protéines de la famille C/EBP servent d'intermédiaires clés dans la régulation de la transcription de l'*AFP* au cours du développement, de la répression par les hormones glucocorticoïdes et de la carcinogenèse.

Bibliographie

1. **Abelev, G. I., and N. L. Lazarevich.** 2006. Control of differentiation in progression of epithelial tumors. *Adv Cancer Res* **95**:61-113.
2. **Acevedo, M. L., and W. L. Kraus.** 2003. Mediator and p300/CBP-steroid receptor coactivator complexes have distinct roles, but function synergistically, during estrogen receptor alpha-dependent transcription with chromatin templates. *Mol Cell Biol* **23**:335-48.
3. **Akoulitchev, S., S. Chuikov, and D. Reinberg.** 2000. TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* **407**:102-6.
4. **Al-Hajj, M., M. W. Becker, M. Wicha, I. Weissman, and M. F. Clarke.** 2004. Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* **14**:43-7.
5. **Al-Hajj, M., and M. F. Clarke.** 2004. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* **23**:7274-82.
6. **Alison, M. R., and M. J. Lovell.** 2005. Liver cancer: the role of stem cells. *Cell Prolif* **38**:407-21.
7. **Ang, S. L., A. Wierda, D. Wong, K. A. Stevens, S. Cascio, J. Rossant, and K. S. Zaret.** 1993. The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins. *Development* **119**:1301-15.
8. **Aouadi, M., J. Jager, K. Laurent, T. Gonzalez, M. Cormont, B. Binetruy, Y. Le Marchand-Brustel, J. F. Tanti, and F. Bost.** 2007. p38MAP Kinase activity is required for human primary adipocyte differentiation. *FEBS Lett* **581**:5591-6.
9. **Arterburn, L. M., J. Zurlo, J. D. Yager, R. M. Overton, and A. H. Heifetz.** 1995. A morphological study of differentiated hepatocytes in vitro. *Hepatology* **22**:175-87.
10. **Bain, D. L., A. F. Heneghan, K. D. Connaghan-Jones, and M. T. Miura.** 2007. Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu Rev Physiol* **69**:201-20.
11. **Battle, M. A., G. Konopka, F. Parviz, A. L. Gaggl, C. Yang, F. M. Sladek, and S. A. Duncan.** 2006. Hepatocyte nuclear factor 4alpha orchestrates expression of cell adhesion proteins during the epithelial transformation of the developing liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:8419-24.
12. **Baumann, H., K. Paulsen, H. Kovacs, H. Berglund, A. P. Wright, J. A. Gustafsson, and T. Hard.** 1993. Refined solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Biochemistry* **32**:13463-71.
13. **Beato, M.** 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**:335-44.

14. **Behre, G., S. M. Singh, H. Liu, L. T. Bortolin, M. Christopeit, H. S. Radomska, J. Rangatia, W. Hiddemann, A. D. Friedman, and D. G. Tenen.** 2002. Ras signaling enhances the activity of C/EBP alpha to induce granulocytic differentiation by phosphorylation of serine 248. *J Biol Chem* **277**:26293-9.
15. **Belanger, L., P. Baril, M. Guertin, M. C. Gingras, H. Gourdeau, A. Anderson, D. Hamel, and J. M. Boucher.** 1983. Oncodevelopmental and hormonal regulation of alpha 1-fetoprotein gene expression. *Adv Enzyme Regul* **21**:73-99.
16. **Belanger, L., D. Hamel, L. Lachance, D. Dufour, M. Tremblay, and P. M. Gagnon.** 1975. Hormonal regulation of alpha1 foetoprotein. *Nature* **256**:657-9.
17. **Belanger, L., S. Roy, and D. Allard.** 1994. New albumin gene 3' adjacent to the alpha 1-fetoprotein locus. *J Biol Chem* **269**:5481-4.
18. **Bernier, D., H. Thomassin, D. Allard, M. Guertin, D. Hamel, M. Blaquiere, M. Beauchemin, H. LaRue, M. Estable-Puig, and L. Belanger.** 1993. Functional analysis of developmentally regulated chromatin-hypersensitive domains carrying the alpha 1-fetoprotein gene promoter and the albumin/alpha 1-fetoprotein intergenic enhancer. *Mol Cell Biol* **13**:1619-33.
19. **Bilodeau, S., S. Vallette-Kasic, Y. Gauthier, D. Figarella-Branger, T. Brue, F. Berthelet, A. Lacroix, D. Batista, C. Stratakis, J. Hanson, B. Meij, and J. Drouin.** 2006. Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease. *Genes Dev* **20**:2871-86.
20. **Bois-Joyeux, B., and J. L. Danan.** 1994. Members of the CAAT/enhancer-binding protein, hepatocyte nuclear factor-1 and nuclear factor-1 families can differentially modulate the activities of the rat alpha-fetoprotein promoter and enhancer. *Biochem J* **301 (Pt 1)**:49-55.
21. **Bolden, J. E., M. J. Peart, and R. W. Johnstone.** 2006. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **5**:769-84.
22. **Boruk, M., J. G. Savory, and R. J. Hache.** 1998. AF-2-dependent potentiation of CCAAT enhancer binding protein beta-mediated transcriptional activation by glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* **12**:1749-63.
23. **Bossard, P., C. E. McPherson, and K. S. Zaret.** 1997. In vivo footprinting with limiting amounts of embryo tissues: a role for C/EBP beta in early hepatic development. *Methods* **11**:180-8.
24. **Bossard, P., and K. S. Zaret.** 1998. GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development* **125**:4909-17.
25. **Buck, M., and M. Chojkier.** 2003. Signal transduction in the liver: C/EBPbeta modulates cell proliferation and survival. *Hepatology* **37**:731-8.

26. **Burgess-Beusse, B. L., and G. J. Darlington.** 1998. C/EBPalpha is critical for the neonatal acute-phase response to inflammation. *Mol Cell Biol* **18**:7269-77.
27. **Calkhoven, C. F., C. Muller, and A. Leutz.** 2000. Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression. *Genes Dev* **14**:1920-32.
28. **Camper, S. A., and S. M. Tilghman.** 1989. Postnatal repression of the alpha-fetoprotein gene is enhancer independent. *Genes Dev* **3**:537-46.
29. **Cesena, T. I., T. X. Cui, L. Subramanian, C. T. Fulton, J. A. Iniguez-Lluhi, R. P. Kwok, and J. Schwartz.** 2008. Acetylation and deacetylation regulate CCAAT/enhancer binding protein beta at K39 in mediating gene transcription. *Mol Cell Endocrinol* DOI: [10.1016/j.mce.2008.03.09](https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.03.09).
30. **Chan, H. M., and N. B. La Thangue.** 2001. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* **114**:2363-73.
31. **Chavez, S., and M. Beato.** 1997. Nucleosome-mediated synergism between transcription factors on the mouse mammary tumor virus promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:2885-90.
32. **Chaya, D., C. Fougere-Deschatrette, and M. C. Weiss.** 1997. Liver-enriched transcription factors uncoupled from expression of hepatic functions in hepatoma cell lines. *Mol Cell Biol* **17**:6311-20.
33. **Chaya, D., T. Hayamizu, M. Bustin, and K. S. Zaret.** 2001. Transcription factor FoxA (HNF3) on a nucleosome at an enhancer complex in liver chromatin. *J Biol Chem* **276**:44385-9.
34. **Chebotaev, D., A. Yemelyanov, and I. Budunova.** 2007. The mechanisms of tumor suppressor effect of glucocorticoid receptor in skin. *Mol Carcinog* **46**:732-40.
35. **Chen, P. L., D. J. Riley, Y. Chen, and W. H. Lee.** 1996. Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes Dev* **10**:2794-804.
36. **Chen, S. S., J. F. Chen, P. F. Johnson, V. Muppala, and Y. H. Lee.** 2000. C/EBPbeta, when expressed from the C/ebpalpha gene locus, can functionally replace C/EBPalpha in liver but not in adipose tissue. *Mol Cell Biol* **20**:7292-9.
37. **Chen, W., I. Rogatsky, and M. J. Garabedian.** 2006. MED14 and MED1 differentially regulate target-specific gene activation by the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* **20**:560-72.
38. **Cho, M. K., and S. G. Kim.** 2003. Hepatocyte growth factor activates CCAAT enhancer binding protein and cell replication via PI3-kinase pathway. *Hepatology* **37**:686-95.

39. **Cirillo, L. A., F. R. Lin, I. Cuesta, D. Friedman, M. Jarnik, and K. S. Zaret.** 2002. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell* **9**:279-89.
40. **Cirillo, L. A., and K. S. Zaret.** 1999. An early developmental transcription factor complex that is more stable on nucleosome core particles than on free DNA. *Mol Cell* **4**:961-9.
41. **Clark, K. L., E. D. Halay, E. Lai, and S. K. Burley.** 1993. Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* **364**:412-20.
42. **Clayton, D. F., A. L. Harrelson, and J. E. Darnell, Jr.** 1985. Dependence of liver-specific transcription on tissue organization. *Mol Cell Biol* **5**:2623-32.
43. **Clotman, F., V. J. Lannoy, M. Reber, S. Cereghini, D. Cassiman, P. Jacquemin, T. Roskams, G. G. Rousseau, and F. P. Lemaigre.** 2002. The oncut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. *Development* **129**:1819-28.
44. **Coffinier, C., D. Thepot, C. Babinet, M. Yaniv, and J. Barra.** 1999. Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. *Development* **126**:4785-94.
45. **Cole, T. J., J. A. Blendy, A. P. Monaghan, K. Krieglstein, W. Schmid, A. Aguzzi, G. Fantuzzi, E. Hummler, K. Unsicker, and G. Schutz.** 1995. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev* **9**:1608-21.
46. **Cole, T. J., J. A. Blendy, A. P. Monaghan, W. Schmid, A. Aguzzi, and G. Schutz.** 1995. Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development. *Steroids* **60**:93-6.
47. **Courtois, G., S. Baumhueter, and G. R. Crabtree.** 1988. Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:7937-41.
48. **Croniger, C., M. Trus, K. Lysek-Stupp, H. Cohen, Y. Liu, G. J. Darlington, V. Poli, R. W. Hanson, and L. Reshef.** 1997. Role of the isoforms of CCAAT/enhancer-binding protein in the initiation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription at birth. *J Biol Chem* **272**:26306-12.
49. **Crowe, A. J., L. Sang, K. K. Li, K. C. Lee, B. T. Spear, and M. C. Barton.** 1999. Hepatocyte nuclear factor 3 relieves chromatin-mediated repression of the alpha-fetoprotein gene. *J Biol Chem* **274**:25113-20.

50. **Cui, R., T. T. Nguyen, J. H. Taube, S. A. Stratton, M. H. Feuerman, and M. C. Barton.** 2005. Family members p53 and p73 act together in chromatin modification and direct repression of alpha-fetoprotein transcription. *J Biol Chem* **280**:39152-60.
51. **Darlington, G. J.** 1999. Molecular mechanisms of liver development and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* **11**:678-82.
52. **de la Cruz, X., S. Lois, S. Sanchez-Molina, and M. A. Martinez-Balbas.** 2005. Do protein motifs read the histone code? *Bioessays* **27**:164-75.
53. **de Ruijter, A. J., A. H. van Gennip, H. N. Caron, S. Kemp, and A. B. van Kuilenburg.** 2003. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**:737-49.
54. **del Castillo-Olivares, A., and G. Gil.** 2000. Role of FXR and FTF in bile acid-mediated suppression of cholesterol 7alpha-hydroxylase transcription. *Nucleic Acids Res* **28**:3587-93.
55. **Descombes, P., and U. Schibler.** 1991. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* **67**:569-79.
56. **Deutsch, G., J. Jung, M. Zheng, J. Lora, and K. S. Zaret.** 2001. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* **128**:871-81.
57. **Diehl, A. M.** 1998. Roles of CCAAT/enhancer-binding proteins in regulation of liver regenerative growth. *J Biol Chem* **273**:30843-6.
58. **Dokmanovic, M., and P. A. Marks.** 2005. Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem* **96**:293-304.
59. **Drouin, R., J. P. Therrien, M. Angers, and S. Ouellet.** 2001. In vivo DNA analysis. *Methods Mol Biol* **148**:175-219.
60. **Duncan, S. A., A. Nagy, and W. Chan.** 1997. Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos. *Development* **124**:279-87.
61. **Dvir, A., J. W. Conaway, and R. C. Conaway.** 2001. Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. *Curr Opin Genet Dev* **11**:209-14.
62. **Emerson, J. A., J. Vacher, L. A. Cirillo, S. M. Tilghman, and A. L. Tyner.** 1992. The zonal expression of alpha-fetoprotein transgenes in the livers of adult mice. *Dev Dyn* **195**:55-66.

63. **Engblom, D., J. W. Kornfeld, L. Schwake, F. Tronche, A. Reimann, H. Beug, L. Hennighausen, R. Moriggl, and G. Schutz.** 2007. Direct glucocorticoid receptor-Stat5 interaction in hepatocytes controls body size and maturation-related gene expression. *Genes Dev* **21**:1157-62.
64. **Fassler, R., and M. Meyer.** 1995. Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev* **9**:1896-908.
65. **Fayard, E., J. Auwerx, and K. Schoonjans.** 2004. LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends Cell Biol* **14**:250-60.
66. **Feige, J. N., and J. Auwerx.** 2007. Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. *Trends Cell Biol* **17**:292-301.
67. **Feuerman, M. H., R. Godbout, R. S. Ingram, and S. M. Tilghman.** 1989. Tissue-specific transcription of the mouse alpha-fetoprotein gene promoter is dependent on HNF-1. *Mol Cell Biol* **9**:4204-12.
68. **Foka, P., S. A. Irvine, F. Kockar, and D. P. Ramji.** 2003. Interleukin-6 represses the transcription of the CCAAT/enhancer binding protein-alpha gene in hepatoma cells by inhibiting its ability to autoactivate the proximal promoter region. *Nucleic Acids Res* **31**:6722-32.
69. **Freedman, L. P.** 1992. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev* **13**:129-45.
70. **Friedman, A. D., W. H. Landschulz, and S. L. McKnight.** 1989. CCAAT/enhancer binding protein activates the promoter of the serum albumin gene in cultured hepatoma cells. *Genes Dev* **3**:1314-22.
71. **Friedman, J. R., and K. H. Kaestner.** 2006. The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell Mol Life Sci* **63**:2317-28.
72. **Fry, C. J., and C. L. Peterson.** 2001. Chromatin remodeling enzymes: who's on first? *Curr Biol* **11**:R185-97.
73. **Galarneau, L., J. F. Pare, D. Allard, D. Hamel, L. Levesque, J. D. Tugwood, S. Green, and L. Belanger.** 1996. The alpha1-fetoprotein locus is activated by a nuclear receptor of the Drosophila FTZ-F1 family. *Mol Cell Biol* **16**:3853-65.
74. **Germain, L., M. J. Blouin, and N. Marceau.** 1988. Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, alpha-fetoprotein, albumin, and cell surface-exposed components. *Cancer Res* **48**:4909-18.

75. **Gilbert, S.** 2000. Expression différentielle du locus multigénique de l'alpha-fetoprotéine et contrôle transcriptionnel du virus de l'hépatite B par le facteur de transcription FetoproteinTranscription Factor (FTF). Thèse de doctorat. Université Laval, Québec.
76. **Godbout, R., R. S. Ingram, and S. M. Tilghman.** 1988. Fine-structure mapping of the three mouse alpha-fetoprotein gene enhancers. *Mol Cell Biol* **8**:1169-78.
77. **Godbout, R., and S. M. Tilghman.** 1988. Configuration of the alpha-fetoprotein regulatory domain during development. *Genes Dev* **2**:949-56.
78. **Grapin-Botton, A., and D. A. Melton.** 2000. Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends Genet* **16**:124-30.
79. **Green, S., V. Kumar, I. Theulaz, W. Wahli, and P. Chambon.** 1988. The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *Embo J* **7**:3037-44.
80. **Gresh, L., B. Bourachot, A. Reimann, B. Guigas, L. Fiette, S. Garbay, C. Muchardt, L. Hue, M. Pontoglio, M. Yaniv, and A. Klochendler-Yeivin.** 2005. The SWI/SNF chromatin-remodeling complex subunit SNF5 is essential for hepatocyte differentiation. *Embo J* **24**:3313-24.
81. **Gronostajski, R. M.** 2000. Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene* **249**:31-45.
82. **Group, E. R., N. Crawford, and J. Locker.** 1994. Characterization of the distal alpha-fetoprotein enhancer, a strong, long distance, liver-specific activator. *J Biol Chem* **269**:22178-87.
83. **Gualdi, R., P. Bossard, M. Zheng, Y. Hamada, J. R. Coleman, and K. S. Zaret.** 1996. Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev* **10**:1670-1682.
84. **Guertin, M., P. Baril, J. Bartkowiak, A. Anderson, and L. Belanger.** 1983. Rapid suppression of alpha 1-fetoprotein gene transcription by dexamethasone in developing rat liver. *Biochemistry* **22**:4296-302.
85. **Guertin, M., H. LaRue, D. Bernier, O. Wrange, M. Chevrette, M. C. Gingras, and L. Belanger.** 1988. Enhancer and promoter elements directing activation and glucocorticoid repression of the alpha 1-fetoprotein gene in hepatocytes. *Mol Cell Biol* **8**:1398-407.
86. **Guo, H., C. Gao, Z. Mi, J. Zhang, and P. C. Kuo.** 2007. Characterization of the PC4 binding domain and its interactions with HNF4alpha. *J Biochem* **141**:635-40.

87. **Hammer, R. E., R. Krumlauf, S. A. Camper, R. L. Brinster, and S. M. Tilghman.** 1987. Diversity of alpha-fetoprotein gene expression in mice is generated by a combination of separate enhancer elements. *Science* **235**:53-8.
88. **Hanahan, D., and R. A. Weinberg.** 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57-70.
89. **Hanlon, M., T. W. Sturgill, and L. Sealy.** 2001. ERK2- and p90(Rsk2)-dependent pathways regulate the CCAAT/enhancer-binding protein-beta interaction with serum response factor. *J Biol Chem* **276**:38449-56.
90. **Hatzis, P., and I. Talianidis.** 2002. Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Mol Cell* **10**:1467-77.
91. **Heck, S., M. Kullmann, A. Gast, H. Ponta, H. J. Rahmsdorf, P. Herrlich, and A. C. Cato.** 1994. A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *Embo J* **13**:4087-95.
92. **Heitzer, M. D., I. M. Wolf, E. R. Sanchez, S. F. Witchel, and D. B. DeFranco.** 2007. Glucocorticoid receptor physiology. *Rev Endocr Metab Disord* **8**:321-30.
93. **Hong, H., K. Kohli, M. J. Garabedian, and M. R. Stallcup.** 1997. GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol Cell Biol* **17**:2735-44.
94. **Hussain, S. Z., T. Sneddon, X. Tan, A. Micsenyi, G. K. Michalopoulos, and S. P. Monga.** 2004. Wnt impacts growth and differentiation in ex vivo liver development. *Exp Cell Res* **292**:157-69.
95. **Iakova, P., S. S. Awad, and N. A. Timchenko.** 2003. Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPalpha growth arrest. *Cell* **113**:495-506.
96. **Inayoshi, Y., K. Miyake, Y. Machida, H. Kaneoka, M. Terajima, T. Dohda, M. Takahashi, and S. Iijima.** 2006. Mammalian Chromatin Remodeling Complex SWI/SNF Is Essential for Enhanced Expression of the Albumin Gene during Liver Development. *J Biochem (Tokyo)* **139**:177-88.
97. **Innis, M. A., and D. L. Miller.** 1979. alpha-Fetoprotein gene expression. Control of alpha-fetoprotein mRNA levels in cultured rat hepatoma cells. *J Biol Chem* **254**:9148-54.
98. **Iwasaki, H., S. Mizuno, Y. Arinobu, H. Ozawa, Y. Mori, H. Shigematsu, K. Takatsu, D. G. Tenen, and K. Akashi.** 2006. The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. *Genes Dev* **20**:3010-21.

99. **Jenuwein, T., and C. D. Allis.** 2001. Translating the histone code. *Science* **293**:1074-80.
100. **Ji, Y., and G. P. Studzinski.** 2004. Retinoblastoma protein and CCAAT/enhancer-binding protein beta are required for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced monocytic differentiation of HL60 cells. *Cancer Res* **64**:370-7.
101. **Jiang, Y. W., P. Veschambre, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. W. Conaway, R. C. Conaway, and R. D. Kornberg.** 1998. Mammalian mediator of transcriptional regulation and its possible role as an end-point of signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:8538-43.
102. **Jose-Estanyol, M., and J. L. Danan.** 1988. A liver-specific factor and nuclear factor I bind to the rat alpha-fetoprotein promoter. *J Biol Chem* **263**:10865-71.
103. **Jung, J., M. Zheng, M. Goldfarb, and K. S. Zaret.** 1999. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* **284**:1998-2003.
104. **Kajiyama, Y., J. Tian, and J. Locker.** 2006. Characterization of distant enhancers and promoters in the albumin-alpha-fetoprotein locus during active and silenced expression. *J Biol Chem* **281**:30122-31.
105. **Kamiya, A., and F. J. Gonzalez.** 2004. TNF-alpha regulates mouse fetal hepatic maturation induced by oncostatin M and extracellular matrices. *Hepatology* **40**:527-36.
106. **Kamiya, A., T. Kinoshita, Y. Ito, T. Matsui, Y. Morikawa, E. Senba, K. Nakashima, T. Taga, K. Yoshida, T. Kishimoto, and A. Miyajima.** 1999. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *Embo J* **18**:2127-36.
107. **Kamiya, A., T. Kinoshita, and A. Miyajima.** 2001. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* **492**:90-4.
108. **Khamzina, L., and P. Borgeat.** 1998. Correlation of alpha-fetoprotein expression in normal hepatocytes during development with tyrosine phosphorylation and insulin receptor expression. *Mol Biol Cell* **9**:1093-105.
109. **Ki, S. H., I. J. Cho, D. W. Choi, and S. G. Kim.** 2005. Glucocorticoid receptor (GR)-associated SMRT binding to C/EBPbeta TAD and Nrf2 Neh4/5: role of SMRT recruited to GR in GSTA2 gene repression. *Mol Cell Biol* **25**:4150-65.
110. **Kim, J., C. A. Cantwell, P. F. Johnson, C. M. Pfarr, and S. C. Williams.** 2002. Transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding proteins is controlled by a conserved inhibitory domain that is a target for sumoylation. *J Biol Chem* **277**:38037-44.

111. **Kinoshita, T., T. Sekiguchi, M. J. Xu, Y. Ito, A. Kamiya, K. Tsuji, T. Nakahata, and A. Miyajima.** 1999. Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuates fetal liver hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:7265-70.
112. **Kovacs, K. A., M. Steinmann, P. J. Magistretti, O. Halfon, and J. R. Cardinaux.** 2003. CCAAT/enhancer-binding protein family members recruit the coactivator CREB-binding protein and trigger its phosphorylation. *J Biol Chem* **278**:36959-65.
113. **Krumlauf, R., R. E. Hammer, S. M. Tilghman, and R. L. Brinster.** 1985. Developmental regulation of alpha-fetoprotein genes in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **5**:1639-48.
114. **Krylova, I. N., E. P. Sablin, J. Moore, R. X. Xu, G. M. Waitt, J. A. MacKay, D. Juzumiene, J. M. Bynum, K. Madauss, V. Montana, L. Lebedeva, M. Suzawa, J. D. Williams, S. P. Williams, R. K. Guy, J. W. Thornton, R. J. Fletterick, T. M. Willson, and H. A. Ingraham.** 2005. Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell* **120**:343-55.
115. **Kubicka, S., F. Kuhnel, L. Zender, K. L. Rudolph, J. Plumpe, M. Manns, and C. Trautwein.** 1999. p53 represses CAAT enhancer-binding protein (C/EBP)-dependent transcription of the albumin gene. A molecular mechanism involved in viral liver infection with implications for hepatocarcinogenesis. *J Biol Chem* **274**:32137-44.
116. **Kumar, V., and P. Chambon.** 1988. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* **55**:145-56.
117. **Kuras, L., T. Borggreffe, and R. D. Kornberg.** 2003. Association of the Mediator complex with enhancers of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:13887-91.
118. **Kyrmizi, I., P. Hatzis, N. Katrakili, F. Tronche, F. J. Gonzalez, and I. Talianidis.** 2006. Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development. *Genes Dev* **20**:2293-305.
119. **Labelle-Dumais, C., M. Jacob-Wagner, J. F. Pare, L. Belanger, and D. Dufort.** 2006. Nuclear receptor NR5A2 is required for proper primitive streak morphogenesis. *Dev Dyn* **235**:3359-69.
120. **Lambert, J. R., and S. K. Nordeen.** 2003. CBP recruitment and histone acetylation in differential gene induction by glucocorticoids and progestins. *Mol Endocrinol* **17**:1085-94.
121. **Lamontagne, A.** 2001. Mécanisme moléculaire de la régulation des gènes de l'alpha1-foetoprotéine et de l'alpha-albumine durant le développement hépatique. Thèse de doctorat. Université Laval, Québec.

122. **Lane, M. D., Q. Q. Tang, and M. S. Jiang.** 1999. Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **266**:677-83.
123. **Lazarevich, N. L.** 2000. Molecular mechanisms of alpha-fetoprotein gene expression. *Biochemistry (Mosc)* **65**:117-33.
124. **Lee, C. S., J. R. Friedman, J. T. Fulmer, and K. H. Kaestner.** 2005. The initiation of liver development is dependent on Foxa transcription factors. *Nature* **435**:944-7.
125. **Lee, D. Y., J. J. Hayes, D. Pruss, and A. P. Wolffe.** 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* **72**:73-84.
126. **Lee, K. C., A. J. Crowe, and M. C. Barton.** 1999. p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression by specific DNA binding. *Mol Cell Biol* **19**:1279-88.
127. **Lee, Y. H., M. A. Magnuson, V. Muppala, and S. S. Chen.** 2003. Liver-specific reactivation of the inactivated Hnf-1alpha gene: elimination of liver dysfunction to establish a mouse MODY3 model. *Mol Cell Biol* **23**:923-32.
128. **Leuther, K. K., D. A. Bushnell, and R. D. Kornberg.** 1996. Two-dimensional crystallography of TFIIB- and IIE-RNA polymerase II complexes: implications for start site selection and initiation complex formation. *Cell* **85**:773-9.
129. **Libbrecht, L., V. Desmet, B. Van Damme, and T. Roskams.** 2000. The immunohistochemical phenotype of dysplastic foci in human liver: correlation with putative progenitor cells. *J Hepatol* **33**:76-84.
130. **Liden, J., F. Delaunay, I. Rafter, J. Gustafsson, and S. Okret.** 1997. A new function for the C-terminal zinc finger of the glucocorticoid receptor. Repression of RelA transactivation. *J Biol Chem* **272**:21467-72.
131. **Liu, H. K., S. Perrier, C. Lipina, D. Finlay, H. McLauchlan, C. J. Hastie, H. S. Hundal, and C. Sutherland.** 2006. Functional characterisation of the regulation of CAAT enhancer binding protein alpha by GSK-3 phosphorylation of threonines 222/226. *BMC Mol Biol* **7**:14.
132. **Lonard, D. M., and W. O'Malley B.** 2007. Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Mol Cell* **27**:691-700.
133. **Lonard, D. M., and B. W. O'Malley.** 2006. The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. *Cell* **125**:411-4.
134. **Lonard, D. M., and B. W. O'Malley.** 2005. Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends Biochem Sci* **30**:126-32.

135. **Long, L., J. N. Davidson, and B. T. Spear.** 2004. Striking differences between the mouse and the human alpha-fetoprotein enhancers. *Genomics* **83**:694-705.
136. **Lorch, Y., B. Maier-Davis, and R. D. Kornberg.** 2006. Chromatin remodeling by nucleosome disassembly in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:3090-3.
137. **Lorch, Y., M. Zhang, and R. D. Kornberg.** 1999. Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* **96**:389-92.
138. **Luecke, H. F., and K. R. Yamamoto.** 2005. The glucocorticoid receptor blocks P-TEFb recruitment by NFkappaB to effect promoter-specific transcriptional repression. *Genes Dev* **19**:1116-27.
139. **Luger, K., and T. J. Richmond.** 1998. The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev* **8**:140-6.
140. **Malik, S., and R. G. Roeder.** 2005. Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem Sci* **30**:256-63.
141. **Malik, S., A. E. Wallberg, Y. K. Kang, and R. G. Roeder.** 2002. TRAP/SMCC/mediator-dependent transcriptional activation from DNA and chromatin templates by orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *Mol Cell Biol* **22**:5626-37.
142. **Martens, C., S. Bilodeau, M. Maira, Y. Gauthier, and J. Drouin.** 2005. Protein-protein interactions and transcriptional antagonism between the subfamily of NGFI-B/Nur77 orphan nuclear receptors and glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* **19**:885-97.
143. **Martinez-Jimenez, C. P., M. J. Gomez-Lechon, J. V. Castell, and R. Jover.** 2006. Underexpressed coactivators PGC1alpha and SRC1 impair hepatocyte nuclear factor 4 alpha function and promote dedifferentiation in human hepatoma cells. *J Biol Chem* **281**:29840-9.
144. **Mataki, C., B. C. Magnier, S. M. Houten, J. S. Annicotte, C. Argmann, C. Thomas, H. Overmars, W. Kulik, D. Metzger, J. Auwerx, and K. Schoonjans.** 2007. Compromised intestinal lipid absorption in mice with a liver-specific deficiency of liver receptor homolog 1. *Mol Cell Biol* **27**:8330-9.
145. **Matsui, T., T. Kinoshita, Y. Morikawa, K. Tohya, M. Katsuki, Y. Ito, A. Kamiya, and A. Miyajima.** 2002. K-Ras mediates cytokine-induced formation of E-cadherin-based adherens junctions during liver development. *Embo J* **21**:1021-30.
146. **Matsumoto, K., H. Yoshitomi, J. Rossant, and K. S. Zaret.** 2001. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* **294**:559-63.

147. **Mazume, H., K. Nakata, D. Hida, K. Hamasaki, S. Tsuruta, K. Nakao, Y. Kato, and K. Eguchi.** 1999. Effect of simvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, on alpha-fetoprotein gene expression through interaction with the ras-mediated pathway. *J Hepatol* **30**:904-10.
148. **McVey, J. H., K. Michaelides, L. P. Hansen, M. Ferguson-Smith, S. Tilghman, R. Krumlauf, and E. G. Tuddenham.** 1993. A G-->A substitution in an HNF I binding site in the human alpha-fetoprotein gene is associated with hereditary persistence of alpha-fetoprotein (HPAFP). *Hum Mol Genet* **2**:379-84.
149. **Metivier, R., G. Reid, and F. Gannon.** 2006. Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression. *EMBO Rep* **7**:161-7.
150. **Meyer, T., J. Carlstedt-Duke, and D. B. Starr.** 1997. A weak TATA box is a prerequisite for glucocorticoid-dependent repression of the osteocalcin gene. *J Biol Chem* **272**:30709-14.
151. **Millonig, J. H., J. A. Emerson, J. M. Levrise, and S. M. Tilghman.** 1995. Molecular analysis of the distal enhancer of the mouse alpha-fetoprotein gene. *Mol Cell Biol* **15**:3848-56.
152. **Mink, S., B. Haenig, and K. H. Klempnauer.** 1997. Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta. *Mol Cell Biol* **17**:6609-17.
153. **Mo, X., E. Kowenz-Leutz, H. Xu, and A. Leutz.** 2004. Ras induces mediator complex exchange on C/EBP beta. *Mol Cell* **13**:241-50.
154. **Monga, S. P., H. K. Monga, X. Tan, K. Mule, P. Pediaditakis, and G. K. Michalopoulos.** 2003. Beta-catenin antisense studies in embryonic liver cultures: role in proliferation, apoptosis, and lineage specification. *Gastroenterology* **124**:202-16.
155. **Moreira, J. M., and S. Holmberg.** 1999. Transcriptional repression of the yeast CHA1 gene requires the chromatin-remodeling complex RSC. *Embo J* **18**:2836-44.
156. **Muller, C., C. F. Calkhoven, X. Sha, and A. Leutz.** 2004. The CCAAT enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha) requires a SWI/SNF complex for proliferation arrest. *J Biol Chem* **279**:7353-8.
157. **Musri, M. M., R. Gomis, and M. Parrizas.** 2007. Chromatin and chromatin-modifying proteins in adipogenesis. *Biochem Cell Biol* **85**:397-410.
158. **Nahon, J. L., A. Venetianer, and J. M. Sala-Trepat.** 1987. Specific sets of DNase I-hypersensitive sites are associated with the potential and overt expression of the rat albumin and alpha-fetoprotein genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:2135-9.

159. **Nakabayashi, H., T. Hashimoto, Y. Miyao, K. K. Tjong, J. Chan, and T. Tamaoki.** 1991. A position-dependent silencer plays a major role in repressing alpha-fetoprotein expression in human hepatoma. *Mol Cell Biol* **11**:5885-93.
160. **Nakao, K., D. Lawless, Y. Ohe, Y. Miyao, H. Nakabayashi, H. Kamiya, K. Miura, E. Ohtsuka, and T. Tamaoki.** 1990. c-Ha-ras down regulates the alpha-fetoprotein gene but not the albumin gene in human hepatoma cells. *Mol Cell Biol* **10**:1461-9.
161. **Narita, N., M. Bielinska, and D. B. Wilson.** 1997. Wild-type endoderm abrogates the ventral developmental defects associated with GATA-4 deficiency in the mouse. *Dev Biol* **189**:270-4.
162. **Nerlov, C.** 2007. The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends Cell Biol* **17**:318-24.
163. **Newton, R., and N. S. Holden.** 2007. Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor? *Mol Pharmacol* **72**:799-809.
164. **Nie, Z., Y. Xue, D. Yang, S. Zhou, B. J. Deroo, T. K. Archer, and W. Wang.** 2000. A specificity and targeting subunit of a human SWI/SNF family-related chromatin-remodeling complex. *Mol Cell Biol* **20**:8879-88.
165. **Nikolov, D. B., and S. K. Burley.** 1997. RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:15-22.
166. **Odom, D. T., R. D. Dowell, E. S. Jacobsen, L. Nekludova, P. A. Rolfe, T. W. Danford, D. K. Gifford, E. Fraenkel, G. I. Bell, and R. A. Young.** 2006. Core transcriptional regulatory circuitry in human hepatocytes. *Mol Syst Biol* **2**:2006 0017.
167. **Odom, D. T., N. Zizlsperger, D. B. Gordon, G. W. Bell, N. J. Rinaldi, H. L. Murray, T. L. Volkert, J. Schreiber, P. A. Rolfe, D. K. Gifford, E. Fraenkel, G. I. Bell, and R. A. Young.** 2004. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* **303**:1378-81.
168. **Olswang, Y., B. Blum, H. Cassuto, H. Cohen, Y. Biberman, R. W. Hanson, and L. Reshef.** 2003. Glucocorticoids repress transcription of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene in adipocytes by inhibiting its C/EBP-mediated activation. *J Biol Chem* **278**:12929-36.
169. **Opherk, C., F. Tronche, C. Kellendonk, D. Kohlmuller, A. Schulze, W. Schmid, and G. Schutz.** 2004. Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol Endocrinol* **18**:1346-53.

170. **Ortlund, E. A., Y. Lee, I. H. Solomon, J. M. Hager, R. Safi, Y. Choi, Z. Guan, A. Tripathy, C. R. Raetz, D. P. McDonnell, D. D. Moore, and M. R. Redinbo.** 2005. Modulation of human nuclear receptor LRH-1 activity by phospholipids and SHP. *Nat Struct Mol Biol* **12**:357-63.
171. **Ossipow, V., P. Descombes, and U. Schibler.** 1993. CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:8219-23.
172. **Papoutsis, M., J. Dudas, J. Becker, M. Tripodi, L. Opitz, G. Ramadori, and J. Wilting.** 2007. Gene regulation by homeobox transcription factor Prox1 in murine hepatoblasts. *Cell Tissue Res* **330**:209-20.
173. **Pare, J. F., D. Malenfant, C. Courtemanche, M. Jacob-Wagner, S. Roy, D. Allard, and L. Belanger.** 2004. The fetoprotein transcription factor (FTF) gene is essential to embryogenesis and cholesterol homeostasis and is regulated by a DR4 element. *J Biol Chem* **279**:21206-16.
174. **Pare, J. F., S. Roy, L. Galarneau, and L. Belanger.** 2001. The mouse fetoprotein transcription factor (FTF) gene promoter is regulated by three GATA elements with tandem E box and Nkx motifs, and FTF in turn activates the Hnf3beta, Hnf4alpha, and Hnf1alpha gene promoters. *J Biol Chem* **276**:13136-44.
175. **Parent, R., and L. Beretta.** 2008. Translational control plays a prominent role in the hepatocytic differentiation of HepaRG liver progenitor cells. *Genome Biol* **9**:R19.
176. **Parviz, F., C. Matullo, W. D. Garrison, L. Savatski, J. W. Adamson, G. Ning, K. H. Kaestner, J. M. Rossi, K. S. Zaret, and S. A. Duncan.** 2003. Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet* **34**:292-6.
177. **Pedersen, T. A., O. Bereshchenko, S. Garcia-Silva, O. Ermakova, E. Kurz, S. Mandrup, B. T. Porse, and C. Nerlov.** 2007. Distinct C/EBPalpha motifs regulate lipogenic and gluconeogenic gene expression in vivo. *Embo J* **26**:1081-93.
178. **Peterson, M. G., N. Tanese, B. F. Pugh, and R. Tjian.** 1990. Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding protein. *Science* **248**:1625-30.
179. **Phatnani, H. P., and A. L. Greenleaf.** 2006. Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* **20**:2922-36.
180. **Phuc Le, P., J. R. Friedman, J. Schug, J. E. Brestelli, J. B. Parker, I. M. Bochkis, and K. H. Kaestner.** 2005. Glucocorticoid receptor-dependent gene regulatory networks. *PLoS Genet* **1**:e16.

181. **Piwien-Pilipuk, G., O. MacDougald, and J. Schwartz.** 2002. Dual regulation of phosphorylation and dephosphorylation of C/EBPbeta modulate its transcriptional activation and DNA binding in response to growth hormone. *J Biol Chem* **277**:44557-65.
182. **Piwien Pilipuk, G., M. D. Galigniana, and J. Schwartz.** 2003. Subnuclear localization of C/EBP beta is regulated by growth hormone and dependent on MAPK. *J Biol Chem* **278**:35668-77.
183. **Pontoglio, M., J. Barra, M. Hadchouel, A. Doyen, C. Kress, J. P. Bach, C. Babinet, and M. Yaniv.** 1996. Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* **84**:575-85.
184. **Poulin, J.** 2002. Régulation développementale et hormonale du gène de l'alpha1-Foetoprotéine. Mémoire de maîtrise. Université Laval, Québec.
185. **Rabek, J. P., D. Y. Hsie, and J. Papaconstantinou.** 1992. Alpha-fetoprotein expression in fetal kidney cells does not require enhancers. *Biochim Biophys Acta* **1130**:317-25.
186. **Ramesh, T. M., A. W. Ellis, and B. T. Spear.** 1995. Individual mouse alpha-fetoprotein enhancer elements exhibit different patterns of tissue-specific and hepatic position-dependent activities. *Mol Cell Biol* **15**:4947-55.
187. **Ramji, D. P., and P. Foka.** 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* **365**:561-75.
188. **Ramos, R. A., W. J. Meilandt, E. C. Wang, and G. L. Firestone.** 1999. Dysfunctional glucocorticoid receptor with a single point mutation ablates the CCAAT/enhancer binding protein-dependent growth suppression response in a steroid-resistant rat hepatoma cell variant. *Faseb J* **13**:169-80.
189. **Ramos, R. A., Y. Nishio, A. C. Maiyar, K. E. Simon, C. C. Ridder, Y. Ge, and G. L. Firestone.** 1996. Glucocorticoid-stimulated CCAAT/enhancer-binding protein alpha expression is required for steroid-induced G1 cell cycle arrest of minimal-deviation rat hepatoma cells. *Mol Cell Biol* **16**:5288-301.
190. **Rehorn, K. P., H. Thelen, A. M. Michelson, and R. Reuter.** 1996. A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* **122**:4023-31.
191. **Reichardt, H. M., K. H. Kaestner, J. Tuckermann, O. Kretz, O. Wessely, R. Bock, P. Gass, W. Schmid, P. Herrlich, P. Angel, and G. Schutz.** 1998. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* **93**:531-41.
192. **Robert, N. M., Y. Miyamoto, H. Taniguchi, and R. S. Viger.** 2006. LRH-1/NR5A2 cooperates with GATA factors to regulate inhibin alpha-subunit promoter activity. *Mol Cell Endocrinol* **257-258**:65-74.

193. **Robinson-Rechavi, M., H. Escriba Garcia, and V. Laudet.** 2003. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci* **116**:585-6.
194. **Rogatsky, I., H. F. Luecke, D. C. Leitman, and K. R. Yamamoto.** 2002. Alternate surfaces of transcriptional coregulator GRIP1 function in different glucocorticoid receptor activation and repression contexts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:16701-6.
195. **Rogatsky, I., J. C. Wang, M. K. Derynck, D. F. Nonaka, D. B. Khodabakhsh, C. M. Haqq, B. D. Darimont, M. J. Garabedian, and K. R. Yamamoto.** 2003. Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:13845-50.
196. **Roncero, C., J. J. Ventura, A. Sanchez, B. Bois-Joyeux, M. L. Mesa, H. Thomassin, J. L. Danan, M. Benito, and I. Fabregat.** 1998. Phorbol esters down-regulate alpha-fetoprotein gene expression without affecting growth in fetal hepatocytes in primary culture. *Biochim Biophys Acta* **1402**:151-64.
197. **Rooney, J. W., and K. L. Calame.** 2001. TIF1beta functions as a coactivator for C/EBPbeta and is required for induced differentiation in the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev* **15**:3023-38.
198. **Roskams, T. A., L. Libbrecht, and V. J. Desmet.** 2003. Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis* **23**:385-96.
199. **Rossi, J. M., N. R. Dunn, B. L. Hogan, and K. S. Zaret.** 2001. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* **15**:1998-2009.
200. **Rudiger, J. J., M. Roth, M. P. Bihl, B. C. Cornelius, M. Johnson, R. Ziesche, and L. H. Block.** 2002. Interaction of C/EBPalpha and the glucocorticoid receptor in vivo and in nontransformed human cells. *Faseb J* **16**:177-84.
201. **Saltiel, A. R., and C. R. Kahn.** 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**:799-806.
202. **Schmidt, C., F. Bladt, S. Goedecke, V. Brinkmann, W. Zschiesche, M. Sharpe, E. Gherardi, and C. Birchmeier.** 1995. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* **373**:699-702.
203. **Schrem, H., J. Klempnauer, and J. Borlak.** 2002. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression. *Pharmacol Rev* **54**:129-58.

204. **Schrem, H., J. Klempnauer, and J. Borlak.** 2004. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: the C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis, and liver-specific gene regulation. *Pharmacol Rev* **56**:291-330.
205. **Seol, W., H. S. Choi, and D. D. Moore.** 1996. An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science* **272**:1336-9.
206. **Seol, W., B. Hanstein, M. Brown, and D. D. Moore.** 1998. Inhibition of estrogen receptor action by the orphan receptor SHP (short heterodimer partner). *Mol Endocrinol* **12**:1551-7.
207. **Sewack, G. F., T. W. Ellis, and U. Hansen.** 2001. Binding of TATA binding protein to a naturally positioned nucleosome is facilitated by histone acetylation. *Mol Cell Biol* **21**:1404-15.
208. **Shen, C. N., J. M. Slack, and D. Tosh.** 2000. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol* **2**:879-87.
209. **Shiojiri, N.** 1984. The origin of intrahepatic bile duct cells in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* **79**:25-39.
210. **Shuman, J. D., T. Sebastian, P. Kaldis, T. D. Copeland, S. Zhu, R. C. Smart, and P. F. Johnson.** 2004. Cell cycle-dependent phosphorylation of C/EBPbeta mediates oncogenic cooperativity between C/EBPbeta and H-RasV12. *Mol Cell Biol* **24**:7380-91.
211. **Sims, R. J., 3rd, S. Millhouse, C. F. Chen, B. A. Lewis, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. L. Manley, and D. Reinberg.** 2007. Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Mol Cell* **28**:665-76.
212. **Soriano, H. E., D. C. Kang, M. J. Finegold, M. J. Hicks, N. D. Wang, W. Harrison, and G. J. Darlington.** 1998. Lack of C/EBP alpha gene expression results in increased DNA synthesis and an increased frequency of immortalization of freshly isolated mice [correction of rat] hepatocytes. *Hepatology* **27**:392-401.
213. **Sosa-Pineda, B., J. T. Wigle, and G. Oliver.** 2000. Hepatocyte migration during liver development requires Prox1. *Nat Genet* **25**:254-5.
214. **Soutoglou, E., B. Viollet, M. Vaxillaire, M. Yaniv, M. Pontoglio, and I. Talianidis.** 2001. Transcription factor-dependent regulation of CBP and P/CAF histone acetyltransferase activity. *Embo J* **20**:1984-92.

215. **Spath, G. F., and M. C. Weiss.** 1998. Hepatocyte nuclear factor 4 provokes expression of epithelial marker genes, acting as a morphogen in dedifferentiated hepatoma cells. *J Cell Biol* **140**:935-46.
216. **Spiegelman, B. M., and R. Heinrich.** 2004. Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell* **119**:157-67.
217. **Spooner, C. J., T. Sebastian, J. D. Shuman, S. Durairaj, X. Guo, P. F. Johnson, and R. C. Schwartz.** 2007. C/EBPbeta serine 64, a phosphoacceptor site, has a critical role in LPS-induced IL-6 and MCP-1 transcription. *Cytokine* **37**:119-27.
218. **Stanulovic, V. S., I. Kyrmizi, M. Kruithof-de Julio, M. Hoogenkamp, J. L. Vermeulen, J. M. Ruijter, I. Talianidis, T. B. Hakvoort, and W. H. Lamers.** 2007. Hepatic HNF4alpha deficiency induces periportal expression of glutamine synthetase and other pericentral enzymes. *Hepatology* **45**:433-44.
219. **Stromstedt, P. E., L. Poellinger, J. A. Gustafsson, and J. Carlstedt-Duke.** 1991. The glucocorticoid receptor binds to a sequence overlapping the TATA box of the human osteocalcin promoter: a potential mechanism for negative regulation. *Mol Cell Biol* **11**:3379-83.
220. **Subramanian, L., M. D. Benson, and J. A. Iniguez-Lluhi.** 2003. A synergy control motif within the attenuator domain of CCAAT/enhancer-binding protein alpha inhibits transcriptional synergy through its PIASy-enhanced modification by SUMO-1 or SUMO-3. *J Biol Chem* **278**:9134-41.
221. **Taatjes, D. J., A. M. Naar, F. Andel, 3rd, E. Nogales, and R. Tjian.** 2002. Structure, function, and activator-induced conformations of the CRSP coactivator. *Science* **295**:1058-62.
222. **Taatjes, D. J., T. Schneider-Poetsch, and R. Tjian.** 2004. Distinct conformational states of nuclear receptor-bound CRSP-Med complexes. *Nat Struct Mol Biol* **11**:664-71.
223. **Taatjes, D. J., and R. Tjian.** 2004. Structure and function of CRSP/Med2; a promoter-selective transcriptional coactivator complex. *Mol Cell* **14**:675-83.
224. **Takagi, Y., G. Calero, H. Komori, J. A. Brown, A. H. Ehrensberger, A. Hudmon, F. Asturias, and R. D. Kornberg.** 2006. Head module control of mediator interactions. *Mol Cell* **23**:355-64.
225. **Takagi, Y., and R. D. Kornberg.** 2006. Mediator as a general transcription factor. *J Biol Chem* **281**:80-9.
226. **Takimoto, G. S., L. Tung, H. Abdel-Hafiz, M. G. Abel, C. A. Sartorius, J. K. Richer, B. M. Jacobsen, D. L. Bain, and K. B. Horwitz.** 2003. Functional properties of the N-terminal region of progesterone receptors and their mechanistic relationship to structure. *J Steroid Biochem Mol Biol* **85**:209-19.

227. **Tang, Q. Q., M. Gronborg, H. Huang, J. W. Kim, T. C. Otto, A. Pandey, and M. D. Lane.** 2005. Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:9766-71.
228. **Thomassin, H., D. Hamel, D. Bernier, M. Guertin, and L. Belanger.** 1992. Molecular cloning of two C/EBP-related proteins that bind to the promoter and the enhancer of the alpha 1-fetoprotein gene. Further analysis of C/EBP beta and C/EBP gamma. *Nucleic Acids Res* **20**:3091-8.
229. **Tilghman, S. M., and A. Belayew.** 1982. Transcriptional control of the murine albumin/alpha-fetoprotein locus during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**:5254-7.
230. **Timchenko, N. A., T. E. Harris, M. Wilde, T. A. Bilyeu, B. L. Burgess-Beusse, M. J. Finegold, and G. J. Darlington.** 1997. CCAAT/enhancer binding protein alpha regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. *Mol Cell Biol* **17**:7353-61.
231. **Tolhuis, B., R. J. Palstra, E. Splinter, F. Grosveld, and W. de Laat.** 2002. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol Cell* **10**:1453-65.
232. **Tomaru, Y., S. Kondo, M. Suzuki, and Y. Hayashizaki.** 2003. A comprehensive search for HNF-3alpha-regulated genes in mouse hepatoma cells by 60K cDNA microarray and chromatin immunoprecipitation/PCR analysis. *Biochem Biophys Res Commun* **310**:667-74.
233. **Trautwein, C., C. Caelles, P. van der Geer, T. Hunter, M. Karin, and M. Chojkier.** 1993. Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. *Nature* **364**:544-7.
234. **Trautwein, C., P. van der Geer, M. Karin, T. Hunter, and M. Chojkier.** 1994. Protein kinase A and C site-specific phosphorylations of LAP (NF-IL6) modulate its binding affinity to DNA recognition elements. *J Clin Invest* **93**:2554-61.
235. **Tse, C., T. Sera, A. P. Wolffe, and J. C. Hansen.** 1998. Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* **18**:4629-38.
236. **Turcotte, B., M. Guertin, M. Chevrette, and L. Belanger.** 1985. Rat alpha 1-fetoprotein messenger RNA: 5'-end sequence and glucocorticoid-suppressed liver transcription in an improved nuclear run-off assay. *Nucleic Acids Res* **13**:2387-98.
237. **Turcotte, B., M. Guertin, M. Chevrette, H. LaRue, and L. Belanger.** 1986. DNase I hypersensitivity and methylation of the 5'-flanking region of the alpha 1-fetoprotein gene during developmental and glucocorticoid-induced repression of its activity in rat liver. *Nucleic Acids Res* **14**:9827-41.

238. **Umesono, K., and R. M. Evans.** 1989. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* **57**:1139-46.
239. **Vacher, J., and S. M. Tilghman.** 1990. Dominant negative regulation of the mouse alpha-fetoprotein gene in adult liver. *Science* **250**:1732-5.
240. **Vegiopoulos, A., and S. Herzig.** 2007. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol* **275**:43-61.
241. **Vermeulen, M., W. Walter, X. Le Guezennec, J. Kim, R. S. Edayathumangalam, E. Lasonder, K. Luger, R. G. Roeder, C. Logie, S. L. Berger, and H. G. Stunnenberg.** 2006. A feed-forward repression mechanism anchors the Sin3/histone deacetylase and N-CoR/SMRT corepressors on chromatin. *Mol Cell Biol* **26**:5226-36.
242. **Wang, C., M. J. Powell, V. M. Popov, and R. G. Pestell.** 2008. Acetylation in nuclear receptor signaling and the role of sirtuins. *Mol Endocrinol* **22**:539-45.
243. **Wang, G. L., P. Iakova, M. Wilde, S. Awad, and N. A. Timchenko.** 2004. Liver tumors escape negative control of proliferation via PI3K/Akt-mediated block of C/EBP alpha growth inhibitory activity. *Genes Dev* **18**:912-25.
244. **Wang, G. L., X. Shi, E. Salisbury, Y. Sun, J. H. Albrecht, R. G. Smith, and N. A. Timchenko.** 2006. Cyclin D3 maintains growth-inhibitory activity of C/EBPalpha by stabilizing C/EBPalpha-cdk2 and C/EBPalpha-Brm complexes. *Mol Cell Biol* **26**:2570-82.
245. **Wang, J. M., C. Y. Ko, L. C. Chen, W. L. Wang, and W. C. Chang.** 2006. Functional role of NF-IL6beta and its sumoylation and acetylation modifications in promoter activation of cyclooxygenase 2 gene. *Nucleic Acids Res* **34**:217-31.
246. **Wang, N. D., M. J. Finegold, A. Bradley, C. N. Ou, S. V. Abdelsayed, M. D. Wilde, L. R. Taylor, D. R. Wilson, and G. J. Darlington.** 1995. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* **269**:1108-12.
247. **Wang, Q., J. A. Blackford, Jr., L. N. Song, Y. Huang, S. Cho, and S. S. Simons, Jr.** 2004. Equilibrium interactions of corepressors and coactivators with agonist and antagonist complexes of glucocorticoid receptors. *Mol Endocrinol* **18**:1376-95.
248. **Watt, A. J., W. D. Garrison, and S. A. Duncan.** 2003. HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology* **37**:1249-53.
249. **Wen, P., N. Crawford, and J. Locker.** 1993. A promoter-linked coupling region required for stimulation of alpha-fetoprotein transcription by distant enhancers. *Nucleic Acids Res* **21**:1911-8.

250. **Wen, P., E. R. Group, G. Buzard, N. Crawford, and J. Locker.** 1991. Enhancer, repressor, and promoter specificities combine to regulate the rat alpha-fetoprotein gene. *DNA Cell Biol* **10**:525-36.
251. **Westmacott, A., Z. D. Burke, G. Oliver, J. M. Slack, and D. Tosh.** 2006. C/EBPalpha and C/EBPbeta are markers of early liver development. *Int J Dev Biol* **50**:653-7.
252. **Wicha, M. S., S. Liu, and G. Dontu.** 2006. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* **66**:1883-90; discussion 1895-6.
253. **Wiper-Bergeron, N., H. A. Salem, J. J. Tomlinson, D. Wu, and R. J. Hache.** 2007. Glucocorticoid-stimulated preadipocyte differentiation is mediated through acetylation of C/EBPbeta by GCN5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:2703-8.
254. **Wiper-Bergeron, N., D. Wu, L. Pope, C. Schild-Poulter, and R. J. Hache.** 2003. Stimulation of preadipocyte differentiation by steroid through targeting of an HDAC1 complex. *Embo J* **22**:2135-45.
255. **Woychik, N. A., and M. Hampsey.** 2002. The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* **108**:453-63.
256. **Xu, W.** 2005. Nuclear receptor coactivators: the key to unlock chromatin. *Biochem Cell Biol* **83**:418-28.
257. **Yang-Yen, H. F., J. C. Chambard, Y. L. Sun, T. Smeal, T. J. Schmidt, J. Drouin, and M. Karin.** 1990. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* **62**:1205-15.
258. **Zaret, K. S.** 2000. Liver specification and early morphogenesis. *Mech Dev* **92**:83-8.
259. **Zaret, K. S.** 2002. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet* **3**:499-512.
260. **Zhang, D. E., X. Ge, J. P. Rabek, and J. Papaconstantinou.** 1991. Functional analysis of the trans-acting factor binding sites of the mouse alpha-fetoprotein proximal promoter by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **266**:21179-85.
261. **Zhang, D. E., P. R. Hoyt, and J. Papaconstantinou.** 1990. Localization of DNA protein-binding sites in the proximal and distal promoter regions of the mouse alpha-fetoprotein gene. *J Biol Chem* **265**:3382-91.
262. **Zhang, D. E., J. P. Rabek, C. C. Hsieh, C. Torres-Ramos, and J. Papaconstantinou.** 1992. Functional analysis of the mouse alpha-fetoprotein enhancers and their subfragments in primary mouse hepatocyte cultures. *J Biol Chem* **267**:10676-82.

263. **Zhang, H., and J. C. Reese.** 2007. Exposing the core promoter is sufficient to activate transcription and alter coactivator requirement at RNR3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:8833-8.
264. **Zhang, T., J.-H. Zhou, L.-W. Shi, R.-X. Zhu, and M.-B. Chen.** 2008. Molecular dynamics simulation study for LRH-1: Interaction with fragments of SHP and function of phospholipid ligand. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **70**:1527-1539.
265. **Zhao, R., and S. A. Duncan.** 2005. Embryonic development of the liver. *Hepatology* **41**:956-67.
266. **Zhao, R., A. J. Watt, J. Li, J. Luebke-Wheeler, E. E. Morrisey, and S. A. Duncan.** 2005. GATA6 is essential for embryonic development of the liver but dispensable for early heart formation. *Mol Cell Biol* **25**:2622-31.
267. **Zuo, Y., L. Qiang, and S. R. Farmer.** 2006. Activation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha expression by C/EBP beta during adipogenesis requires a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-associated repression of HDAC1 at the C/ebp alpha gene promoter. *J Biol Chem* **281**:7960-7.