

gen 20103488

30596

1995

283

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE I**

Option: Biologie cellulaire

**présentée par
Jean-Pierre BOSSU**

pour obtenir le titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

Sujet de la thèse:

**Régulation transcriptionnelle de l'expression du gène
de l'apolipoprotéine A-II humaine par son premier intron,**

et

étude du facteur de transcription HNF-4 humain



Soutenue le 5 Décembre 1995 devant le jury composé de:

Professeur J. P. Bohin	Président
Docteur M. Collyn d'Hooghe	Rapporteur
Docteur P. Cardot	Rapporteur
Professeur P. Delannoy	Examineur
Professeur J. C. Fruchart	Examineur
Docteur B. Laine	Examineur

**Ce travail a été réalisé dans le Service de Recherche
sur les Lipoprotéines et l'Athérosclérose (SERLIA),
Unité INSERM 325 à l'Institut Pasteur de Lille,
(Directeur, Professeur Jean-Charles FRUCHART)
sous la direction scientifique du
Docteur Bernard LAINE**

Je tiens à remercier les membres de mon jury:

Monsieur le Docteur Bernard Laine.

Vous avez guidé mes premiers pas dans la recherche. J'ai toujours pu apprécier vos compétences scientifiques. La confiance que vous m'avez témoigné m'a beaucoup aidé. Trouvez dans ce travail l'expression de mon profond respect.

Madame le Docteur Maud Collyn d'Hooghe et Monsieur le Docteur Philippe Cardot.

Je vous adresse mes plus vifs remerciements pour avoir accepté la lourde tâche de rapporteurs et pour avoir jugé ce travail avec bienveillance.

Monsieur le Professeur Jean-Pierre Bohin.

Je vous remercie vivement d'avoir accepté de présider ce jury. Je souhaiterais que cette thèse soit pour vous un témoignage de ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur Philippe Delannoy.

Je suis heureux de vous compter parmi les membres de ce jury. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Jean-Charles Fruchart.

Vous m'avez accueilli au SERLIA. Malgré toutes vos occupations, vous avez accepté de participer à ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma sincère gratitude.

Je voudrais spécialement témoigner ma profonde gratitude au **Docteur François Chartier** qui a pris une part déterminante pour initier ce travail. Je le remercie pour ses conseils et pour la grande disponibilité dont il a toujours fait preuve tout au long de ces études.

L'aboutissement de ce travail me donne également l'occasion de témoigner ma profonde reconnaissance à tous les membres du Laboratoire de Biologie des Régulations chez les Eucaryotes dirigé par le **Professeur Johan Auwerx** et le **Docteur Bart Staels** qui m'ont également prodigué des conseils avisés.

Je remercie plus particulièrement Marie-Joelle Dupire, Christelle Massénat, Delphine Caillet, Kristina Shonjaans, Eve Clément, Ngoc Vu-Dac et Régis Saladin pour leur sympathie et leur aide.

SOMMAIRE

PREMIERE PARTIE:
ETUDE DE L'INTRON I DE L'APOLIPOPROTEINE A-II HUMAINE

INTRODUCTION	p14
ETAT DES CONNAISSANCES	p17
I- Les lipoprotéines de haute densité (HDL)	p18
A- Structure des HDL	p19
1- Les lipides	p19
2- Les protéines	p19
B- Fonction des HDL	p19
1- Le transport inverse du cholestérol	p20
2- Le mécanisme de l'efflux de cholestérol	p21
a- L'accepteur primaire impliqué dans le mécanisme de l'efflux	p21
b- La translocation du cholestérol cellulaire	p22
c- Caractérisation du récepteur aux HDL	p23
II- Les apolipoprotéines des HDL	p24
A- L'apolipoprotéine A-I	p24
1- Structure de la protéine	p24
2- Synthèse et sécrétion	p24
3- Structure du gène de l'apoA-I humaine	p25
4- Rôle de l'apoA-I	p25
a- Etudes <i>in vitro</i>	p25
α - Rôle de l'apoA-I dans l'efflux de cholestérol cellulaire	p25
β - Activation de la LCAT	p25
b- Etudes <i>in vivo</i>	p26
α - Utilisation des souris transgéniques	p26
β - Utilisation des souris déficientes (knock out) pour le gène de l'apoA-I	p27

B- L'apolipoprotéine A-II	p27
1- Structure de la protéine	p28
2- Synthèse et sécrétion	p28
3- Rôle de l'apoA-II	p30
a- Etudes <i>in vitro</i>	p30
b- Etudes <i>in vivo</i> réalisées sur des souris transgéniques	p31
4- Régulation de la synthèse	p32
a- Régulation nutritionnelle	p32
α - Lipides	p32
β - Hydrates de carbone	p33
χ - Alcool	p33
δ - Jeûne	p33
b- Régulation hormonale	p33
α - Les hormones thyroïdiennes	p33
β - Les hormones stéroïdiennes	p34
β -1- Les stéroïdes anabolisants	p34
β -2- Les stéroïdes sexuels	p34
c- Les médicaments hypolipémiants	p34
α - Les fibrates	p34
β - Médicaments n'appartenant pas à la catégorie des fibrates	p35
d- Régulation au cours du développement	p36
 III- Le gène de l'apolipoprotéine A-II	 p36
 A- Caractéristiques du gène	 p36
1- Structure	p36
2- Localisation chromosomique	p37
 B- Régulation de l'expression de l'apolipoprotéine A-II humaine	 p37
1- Eléments du promoteur impliqués dans la transcription hépatique basale	p38
2- Facteurs de transcription impliqués dans la transcription hépatique basale	p39

IV- Eléments de régulation contenus dans les introns de différents gènes:

régulation de l'expression des gènes par les introns	p42
A- Gènes codant pour des protéines autres que les apolipoprotéines	p43
1- Collagène II de rat	p43
2- Protéine de matrice de cartilage de poulet	p43
3- Platelet Derived Growth Factor bêta humain (PDGFb humain)	p43
4- Gène HLA-DRA humain (Human Leucocyte Antigen - sous région DR - spécificité A)	p43
5- Gène de la chaîne kappa des immunoglobulines	p43
6- Collagène a 1-IV de souris	p44
7- Purine nucléoside phosphorylase humaine (PNP)	p44
8- Sous-unité C3 de la prostatéine du rat	p44
9- Thymidilate synthase de souris	p44
10- b-3 tubuline de drosophile	p45
11- Protéine ribosomale de levure	p45
12- Very low density apolipoprotein A-II de poulet	p45
B- Gènes codant pour des apolipoprotéines	p45
1- Apolipoprotéine E humaine	p46
2- Apolipoprotéine A-I de singe	p46
3- Apolipoprotéine B humaine	p46
V- La répression de la transcription des gènes chez les Eucaryotes	p48
A- L'initiation de la transcription	p48
B- Régulation de la transcription	p49
1- Eléments cis-régulateurs	p50
a- Les promoteurs	p50
b- Les enhancers et les silencers	p50
2- Les facteurs de transcription	p51
3- Les protéines auxiliaires	p52

C- Les mécanismes de la répression de la transcription des gènes	p53
1- Degré de compaction de la chromatine	p53
2- Méthylation du génome	p54
3- Molécules répressives	p54
3.1- Les répresseurs passifs et leur mode d'action	p55
a- Compétition	p55
b- Titration	p55
c- Modification des propriétés d'activation transcriptionnelle	p56
3.2- Les répresseurs actifs	p56
a- Description	p56
b- Les mécanismes de la répression transcriptionnelle active	p57
α - inhibition de l'assemblage du complexe de préinitiation	p57
β - coopération entre répresseurs actifs et facteurs inhibiteurs	p57
χ - interaction physique entre activateurs et répresseurs actifs	p58
δ - modifications de la chromatine par les répresseurs actifs	p58
D- Sensibilité de la répression transcriptionnelle par rapport à la position du site d'initiation de la transcription	p58
E- Conclusion	p59
 RESULTATS EXPERIMENTAUX	p59
 I- Objectifs du travail	p62
 A- Rôle de l'intron I dans la spécificité tissulaire	p62
1- Etude de l'activité de l'intron I sur son propre promoteur et le promoteur de la thymidine kinase	p62
2- Etude de la contribution de l'activité de l'intron à:	p62
a- la spécificité hépatique et intestinale de l'expression de l'apoA-II	p62
b- la spécificité de l'expression de l'apoA-II dans les cellules HepG2 et Caco-2	p63
c- la répression du gène de l'apoA-II durant les premières étapes de la vie	p63

B- Etude de la structure de l'intron I	p63
1- Détermination des régions de l'intron fixant les protéines nucléaires responsables de son effet	p63
2- Etude de la contribution de chaque région de fixation à l'activité de l'intron	p63
3- Etude des protéines nucléaires se fixant sur chaque région	p64
4- Identification des motifs nucléotidiques responsables de la fixation des protéines nucléaires sur chaque site et impliqués dans leur activité	p64
Articles	p64
- article I	
- article II	
- article III	
II- Résultats	p65
A- Nature et particularités de l'activité de l'intron I	p65
B- Spécificité tissulaire de l'activité de l'intron I	p65
1- L'activité de l'intron ne contribue pas à la spécificité hépatique et intestinale de l'expression de l'apoA-II	p65
2- L'intron ne participe pas à la spécificité tissulaire de l'expression de l'apoA-II	p65
3- L'activité répressive de l'intron ne contribue pas à l'extinction du gène de l'apoA-II durant la vie fœtale et embryonnaire	p66
C- Caractérisation des éléments de régulation négatifs situés à l'intérieur de l'intron I de l'apoA-II humaine	p66
1- Etude de l'activité des deux premiers sites	p66
2- Etude des activités nucléaires se fixant sur les éléments régulateurs NRE I et NRE II	p67
D- Caractéristiques physico-chimiques des complexes nucléoprotéiques formés avec les NRE	p67
E- Conclusion tirée des résultats des paragraphes C-1, C-2, D	p68

F- Identification des séquences impliquées dans l'activité des éléments NRE I et NRE II	p68
III- Conclusion générale	p68
DISCUSSION	p69
I- Particularités de l'intron I	p70
II- Les facteurs de transcription se fixant sur l'intron I	p71
III- Etude du troisième site de l'intron I	p75
A- Clonage du site III	p75
B- Etude des protéines nucléaires se liant au site III	p76
1- Etude de la spécificité cellulaire des protéines nucléaires se fixant sur le site III	p76
2- Caractérisation physico-chimique du complexe nucléoprotéique 6	p77
3- Recherche de similitudes entre le site III et des éléments de régulation ou des séquences consensus reconnues par divers facteurs de transcription	p77
C- Etude des caractéristiques fonctionnelles du site III	p79
IV- Conclusions: intérêts de l'étude de l'intron I du gène de l'apolipoprotéine A-II humaine	p81

DEUXIEME PARTIE: ETUDE DU FACTEUR HNF-4 HUMAIN

ETAT DES CONNAISSANCES	p84
I- Fonctions, importance	p85
A- Le facteur HNF-4 joue un rôle primordial au cours de l'embryogenèse	p85
B- HNF-4 est un facteur déterminant de la différenciation des cellules hépatiques	p85
C- HNF-4 contrôle l'expression d'une grande variété de gènes	p86
D- Structures et isoformes du facteur HNF-4 de rat et de souris	p88
II- Intérêts de l'étude de HNF-4 chez l'homme	p88
Article	p89
RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION	p90
I- Clonage et étude de la séquence protéique de HNF-4	p91
II- Etude de la fixation de l'isoforme $\alpha 2$ de HNF-4 à l'ADN	p92
III- Etude de l'activité régulatrice de l'isoforme $\alpha 2$ de HNF-4	p92
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p94

ABREVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique
ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire
apo: apolipoprotéine
ARNm: acide ribonucléique messenger
bp: paire de bases
CAT: chloramphénicol acyl transférase
CETP: protéine de transfert des esters de cholestérol
Da: dalton
DMPC: dimyristoyl phosphatidylcholine
DNaseI: déoxyribonucléase I
HDL: lipoprotéine de haute densité
HL: lipase hépatique
kb: kilopaire de bases
kDa: kilodalton
LCAT: lécithine cholestérol acyl transférase
LDL: lipoprotéine de basse densité
Lp: particules lipoprotéiques
PKC: protéine kinase C
SDS: sodium dodécyl sulfate
VLDL: lipoprotéine de très basse densité

PREMIERE PARTIE:
ETUDE DE L'INTRON I DE
L'APOLIPOPROTEINE A-II HUMAINE

INTRODUCTION

Les complications liées à l'athérosclérose ont une fréquence si importante qu'elles font des maladies cardio-vasculaires la première cause de mortalité dans les pays industrialisés. Une des priorités actuelles de la médecine préventive en Europe est donc la réduction de l'incidence de ces maladies. De vastes études épidémiologiques ont permis de mettre en évidence les principaux facteurs de risque et types de localisation de l'athérosclérose. Parmi les facteurs de risque, les désordres du métabolisme lipidique (dyslipoprotéïnémies) jouent un rôle central.

Triglycérides et cholestérol sont transportés dans le flux sanguin au niveau d'édifices complexes que sont les lipoprotéines. Le métabolisme de ces lipoprotéines peut être visualisé comme un ensemble de mécanismes biologiques complexes dans lesquels interviennent un grand nombre de protéines, notamment les enzymes plasmatiques, les protéines de transfert de lipides, les récepteurs de lipoprotéines et les apolipoprotéines. Ces dernières jouent un rôle primordial dans la structure et le métabolisme des lipoprotéines, et, par conséquent participent activement au contrôle des taux sanguins de lipides. Tout changement dans leur structure qui pourrait modifier leur fonction ou la régulation de leur synthèse, peut conduire à une modification du profil plasmatique des lipoprotéines et contribuer de la sorte à la pathogenèse de l'athérosclérose.

L'athérosclérose se caractérise par une accumulation de cholestérol dans la paroi artérielle qui entraîne l'apparition d'une plaque d'athérome et une diminution de la lumière des artères, ce qui entrave la circulation sanguine. Jusqu'à une époque récente, l'athérosclérose était considérée comme l'une des multiples conséquences malheureuses, mais inévitables, du vieillissement. Des études réalisées au cours de ces deux dernières décennies ont clairement montré que ce point de vue était erroné. L'athérosclérose est maintenant envisagée comme une maladie plurifactorielle, les anomalies du métabolisme des lipoprotéines (dyslipoprotéïnémies) jouant un rôle majeur dans la genèse de cette maladie.

La mise en évidence par Vogel (1847) de la présence de cholestérol dans la plaque d'athérome marque le début de la compréhension du rôle que joue le cholestérol dans la genèse de l'athérosclérose. Une meilleure compréhension des structures et du métabolisme des lipoprotéines est donc indispensable pour une étude précise des mécanismes conduisant à l'athérosclérose.

Je me suis intéressé, pendant mon travail de thèse, à l'une de ces protéines, l'apolipoprotéine A-II (apoA-II). L'introduction de cet ouvrage sera donc consacrée à la description de l'apoA-II et de son gène, puis au rôle régulateur qu'exercent les introns sur l'expression des gènes. Je présenterai également les mécanismes régulant la transcription chez les Eucaryotes, d'une part pour comprendre dans quel contexte peuvent agir les introns et d'autre part pour présenter les mécanismes de répression de la transcription, les mécanismes de répression étant jusqu'à présent beaucoup moins bien documentés que les mécanismes d'activation.

ETAT DES CONNAISSANCES

Toutes les cellules animales ont besoin de cholestérol pour la biosynthèse de leurs membranes. Ce cholestérol provient de sources endogènes (biosynthèse) ou exogènes (alimentation). Dans le plasma, les lipoprotéines de basse densité (LDL) sont les principaux transporteurs de cholestérol. Elles apportent le cholestérol aux cellules périphériques (cellules non hépatiques) par l'intermédiaire d'endocytose dépendante du récepteur aux apoB et E (Brown et al., 1986). Ce même récepteur présent à la surface des hépatocytes permet la captation puis l'internalisation et la dégradation lysosomiale des LDL dans le foie (fig.1). Le cholestérol capté par le foie peut être sécrété dans la bile comme molécule de cholestérol ou transformé en acides biliaires. Les cellules périphériques ne sont pas capables de dégrader le cholestérol. Ainsi, la voie par laquelle ces cellules peuvent éliminer leur cholestérol excédentaire est essentielle. Ce processus par lequel le cholestérol excédentaire retourne des cellules périphériques vers le foie pour y être éliminé a été appelé "le transport inverse du cholestérol" (Miller, 1990). Les lipoprotéines de haute densité (HDL) y ont un rôle prépondérant (Miller, 1990).

I- Les lipoprotéines de haute densité (HDL)

On peut globalement considérer les lipoprotéines (**fig.2**) comme un noyau central constitué de lipides hydrophobes (triglycérides et esters de cholestérol) entouré de lipides polaires (cholestérol libre et phospholipides) et des apolipoprotéines. On a pu par des méthodes physico-chimiques déterminer plusieurs classes de lipoprotéines (**Tableau I**). La méthode la plus utilisée qui classe les lipoprotéines selon leur densité hydratée permet de distinguer:

- les chylomicrons de densité inférieure à 0.94: synthétisés par l'intestin et dont la fonction principale est le transport des triglycérides alimentaires.
- les very low density lipoprotein ou VLDL de densité comprise entre 0.94 et 1.006: synthétisées par le foie et l'intestin, elles assurent le transport des triglycérides endogènes.
- les low density lipoprotein ou LDL de densité comprise entre 1.006 et 1.063: elles découlent du catabolisme des VLDL et transportent la majeure partie du cholestérol plasmatique.
- les high density lipoprotein ou HDL de densité comprise entre 1.063 et 1.21: elles sont synthétisées surtout par le foie.

Ces lipoprotéines sont des associations moléculaires en perpétuel remaniement dans le flux sanguin, de sorte que leur composition est tout à moment le résultat d'un équilibre dynamique.

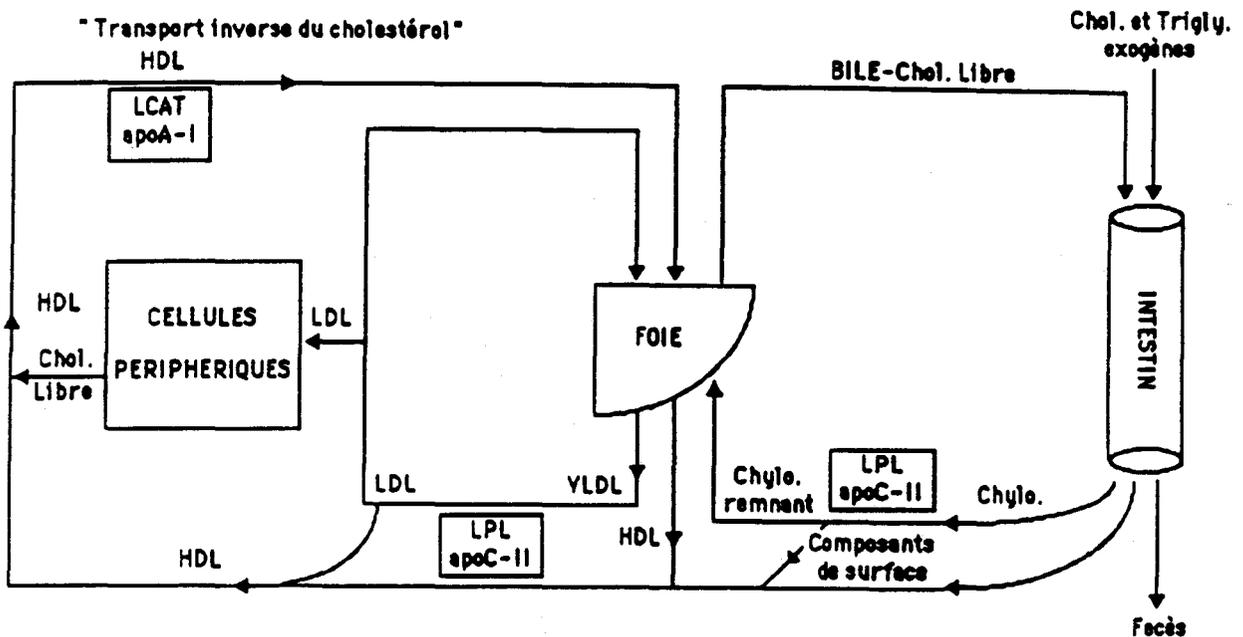


Figure 1:
 Evénements extra cellulaires du transport du cholestérol
 (d'après M. C. Phillips et al., 1987)

Le cholestérol exogène est délivré au foie par les chylomicrons (chylo.) après hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase (LPL). Le foie sécrète le cholestérol associé aux VLDL. Après cascade lipolytique, les LDL formées et une partie des VLDL délivrent le cholestérol aux cellules via le récepteur apoB/E. Les HDL sont formées dans le foie et s'enrichissent en composants (apolipoprotéines et phospholipides) libérés par la lipolyse des chylomicrons et des VLDL. Les HDL vont capturer le cholestérol en excès dans les cellules pour le ramener au foie, où il est dégradé.

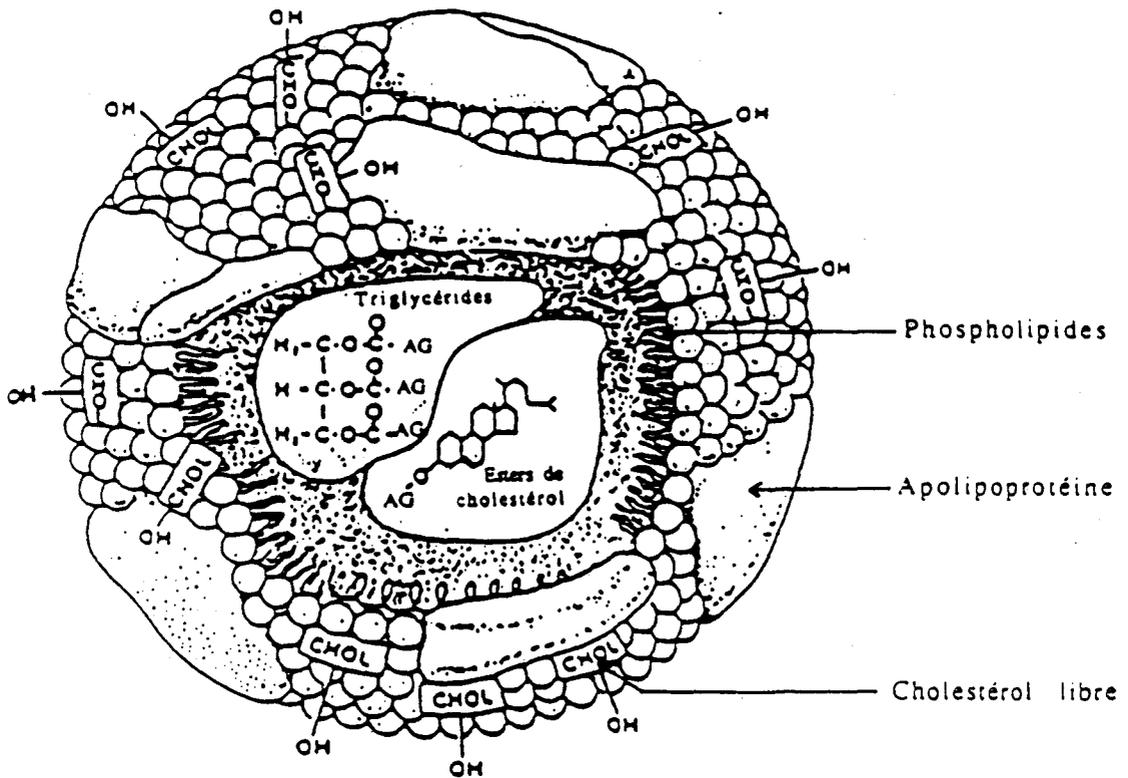


Figure 2:
Structure schématique d'une lipoprotéine

La surface est constituée principalement d'une couche de phospholipides et de noyaux d'esters de cholestérol et de triglycérides. Le cholestérol libre est d'avantage représenté à la surface que dans le noyau. Les apolipoprotéines se trouvent localisées à la surface.
AG: Acide Gras

Lipoprotéines	Sf	Densité (kg/l)	Diamètre (nm)	PM moyen	ME
Chylomicrons	> 400	< 0,94	10^2 - 10^3	$5 \cdot 10^9$	Origine
VLDL	20-400	0,94-1,006	30-70	$7,5 \cdot 10^6$	Pré-bêta
LDL	1	1,006-1,019	15-25	$2,5 \cdot 10^6$	Bêta
	2	1,019-1,063			
HDL	1	< 1,063	6-14	$3,9 \cdot 10^5$	Alpha
	2	1,063-1,125			
	3	1,125-1,21	4- 10	$1,9 \cdot 10^5$	

Tableau I:

Répartition des lipoprotéines en classes sur la base de leur densité hydratée et de leur mobilité électrophorétique.

CM: chylomicrons; Sf: vitesse de flottation en unités Svedberg (10^{-3} cm/ s/ dyne/g) à 26°C dans une solution de NaCl à 1.063 kg/l; PM: poids moléculaire, ME: mobilité électrophorétique sur agarose.

On peut cependant décrire une composition moyenne pour chaque type de lipoprotéine reflétant sa place et son rôle dans le métabolisme lipidique (**Tableau II**).

Les composants protéiques des lipoprotéines, les apolipoprotéines, ont pour fonction principale d'assurer le transport des lipides dans les compartiments intra- et extravasculaires. La plupart de ces protéines ont, de plus, acquis des fonctions spécialisées dans le métabolisme des lipoprotéines. Elles ont été classées, au fur et à mesure de leur découverte, selon une nomenclature A, B, C... et constituent une famille de plus d'une douzaine de membres (les principales étant: A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III et E) qui diffèrent par leur structure primaire et leur conformation et aussi par leurs rôles biologiques résumés dans le **Tableau III**.

A- Structure des HDL

Ces lipoprotéines sont les plus petites et les plus denses des lipoprotéines plasmatiques. Elles ont un diamètre compris entre 70 et 150 Å et des masses moléculaires de 170 à 400 kDa.

1- Les lipides: 48 à 53% de la masse des HDL est composée de lipides qui se décomposent en 25% de phospholipides, 14 à 18% d'esters de cholestérol.

2- Les protéines: la partie protéique des HDL est très complexe. Cependant, deux apolipoprotéines (apo) constituent 80 à 90% de la masse protéique totale: l'apoA-I et l'apoA-II. Il existe aussi d'autres protéines telles les apoA-IV, C, D, E, F, G, J, K, la LCAT (lécithine cholestérol acyl transférase) et les protéines de transfert de lipides.

Les HDL consistent principalement en deux fractions lipoprotéiniques contenant soit seulement l'apoA-I (A-I HDL) correspondant aux particules LpA-I soit l'apoA-I et l'apoA-II (A-I:A-II HDL) correspondant aux particules LpA-I:A-II. Les techniques d'immunoprécipitation ont permis de montrer que 90% des HDL contenaient à la fois l'apoA-I et l'apoA-II, alors que 10% ne contenaient que de l'apoA-I. Les particules LpA-I représentent donc une population minoritaire de lipoprotéines contenant l'apoA-I et non l'apoA-II.

B- Fonction des HDL

On a pu montrer que le niveau plasmatique des HDL est inversement corrélé au risque de maladies cardio-vasculaires, ce qui est corroboré par le fait que les HDL réalisent en partie l'épuration du cholestérol des tissus périphériques en le ramenant vers le foie en vue de son élimination ou de son excrétion biliaire. Cette voie biologique est, rappelons le, couramment

Lipoprotéines	Chylomicrons	VLDL	LDL	HDL
Protéines	1 - 2	10 - 15	20 - 24	45 - 50
Triglycérides	86 - 94	55 - 65	8 - 12	3 - 6
Cholestérol	0,5 - 1	4 - 8	5 - 10	3 - 5
C. estérifié	1-3	16-22	45-50	15-20
Phospholipides	3 - 8	12 - 18	20 - 25	20 - 30
Glucides	?	≤ 1	= 1	3 - 4
Apolipoprotéines	B-48 C-I, C-II, C-III A-I, A-II, A-IV E	B-100, B-48 C-I, C-II, C-III E A-IV?	B-100 C-I, C-II, C-III E	A-I, A-II, A-IV C-I, C-II, C-III D E (+LCAT)

Tableau II:

**Composition des principales lipoprotéines plasmatiques humaines
(en pourcentage de poids sec)**

Apolipoprotéines	Fonctions
A-I	activateur de la LCAT ligand pour le "récepteur" HDL activateur du transport inverse du cholestérol détermine la structure et le taux des HDL (transgénèse: Rubin et al., 1991a et Goder-Novoselsky et al., 1992)
A-II	ligand pour le "récepteur" HDL atténuateur du transport inverse du cholestérol détermine la taille des particules HDL (transgénèse: Schultz et al., 1992) sa synthèse détermine le taux de A-I:A-II (HDL) et de A-I (HDL)
B-100	synthèse et sécrétion des VLDL, structure des LDL ligand du récepteur apoB/E (récepteur LDL)
B-48	synthèse et transport des chylomicrons et des VLDL
C-I	activateur de la LCAT inhibe la liaison des lipoprotéines contenant l'apoE aux récepteurs E et B/E sa surexpression induit une hypertriglycéridémie (transgénèse: Simonet et al., 1991)
C-II	activateur de la LPL inhibe la liaison des lipoprotéines contenant l'apoE aux récepteurs E et B/E sa surexpression induit une hypertriglycéridémie
C-III	inhibiteur de la LPL inhibe la liaison des lipoprotéines contenant l'apoE aux récepteurs B/E seulement sa surexpression induit une hypertriglycéridémie (transgénèse: Ito et al., 1991)
D	rôle possible dans le métabolisme des esters de cholestérol
E	permet la fixation des particules résiduelles formées lors du métabolisme des chylomicrons et des VLDL sur les récepteurs hépatiques apoE et apoB/E son absence produit une athérosclérose précoce (destruction du gène chez la souris: Plump et al., 1992 et Zhang et al., 1992)

Tableau III:

Fonction des principales apolipoprotéines

désignée sous le nom de transport inverse du cholestérol. L'existence d'un récepteur HDL, dont les ligands seraient les apoA-I, A-II et A-IV est en discussion.

1- Le transport inverse du cholestérol

Chez l'homme, ce transport inverse peut se diviser en quatre grandes étapes intervenant au niveau du métabolisme des HDL: tout d'abord, le transfert (ou efflux) du cholestérol en excès des membranes des cellules des tissus périphériques vers les HDL, l'estérification de ce cholestérol par la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) au sein des HDL, le transfert d'une partie du cholestérol estérifié aux VLDL résiduelles et aux LDL et finalement sa captation au niveau hépatique.

La **figure 3** apporte une description du métabolisme général des HDL: les HDL sont essentiellement synthétisées et sécrétées par le foie et un peu par l'intestin. La particule initiale est une lipoprotéine discoïdale composée de phospholipides, d'apolipoprotéines (essentiellement du groupe A) et d'une faible quantité de cholestérol libre. La LCAT est associée à ces HDL naissantes et catalyse l'estérification du cholestérol. L'apoA-I est le cofacteur de cette réaction d'estérification. Les esters de cholestérol formés, non polaires, se déplacent vers l'intérieur hydrophobe de la double couche lipidique jusqu'à la formation d'une HDL sphérique (HDL3). La LCAT joue donc un rôle essentiel dans la maturation des HDL. Cela est d'ailleurs confirmé par des expériences où cette activité est inhibée (Hamilton et al., 1976) ou absente (Glomset et al., 1983). On observe alors une accumulation de ces particules discoïdales. Le cholestérol estérifié peut être transféré des HDL3 aux lipoprotéines de basse densité (chylomicrons, VLDL, LDL) qui ramènent le cholestérol estérifié vers le foie par une protéine de transfert, la CETP (cholesterol ester transfert protein). En échange, les HDL3 reçoivent des triglycérides, leur densité diminue et leur taille augmente, on les appelle alors HDL2. La lipase hépatique (HL) (Deckelbaum et al., 1986) va hydrolyser les triglycérides et les phospholipides à la surface des HDL2 qui diminuent de taille et reforment des HDL3. Les HDL2 peuvent aussi être captées directement par endocytose au niveau du foie où elles seront dégradées (Pittman et al., 1987). Les esters de cholestérol peuvent également être transférées des HDL2 au foie, sans nécessiter l'internalisation de ces particules lipoprotéiques (van Berkel et al., 1994). Le retour du cholestérol au foie est donc soit direct par captation des HDL2 ou du cholestérol estérifié à partir des HDL2, soit indirect après transfert du cholestérol aux lipoprotéines de basse densité. Nous voyons donc que les HDL jouent un rôle majeur dans le transport inverse du cholestérol.

Ce processus est donc une voie anti-athérogène par son potentiel à promouvoir l'efflux du

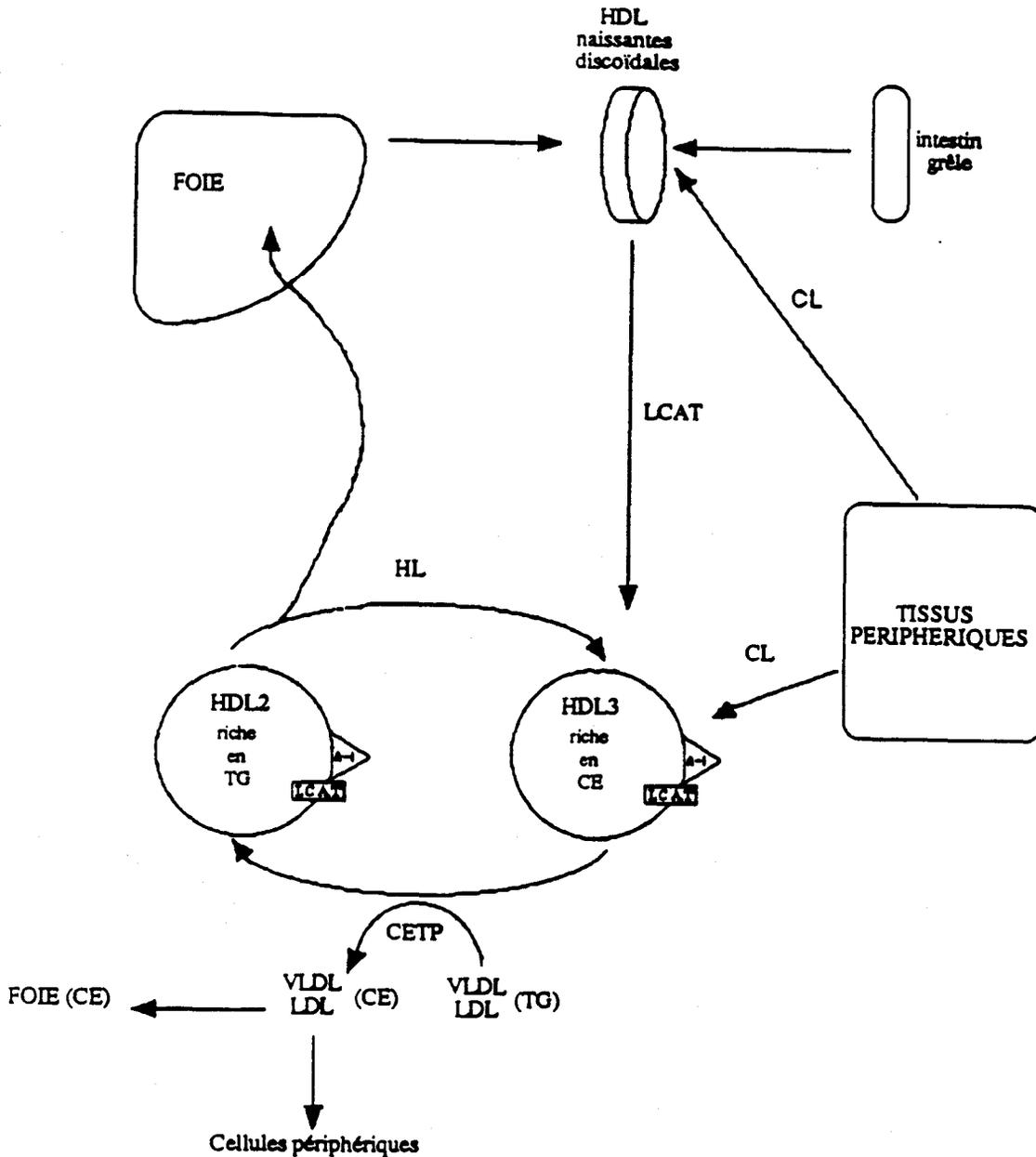


Figure 3:
Métabolisme général des HDL

Les HDL jouent ici un rôle majeur dans le transport du cholestérol des cellules périphériques vers le foie, ce qui est désigné sous le nom de transport inverse du cholestérol.

CE: esters de cholestérol

CL: cholestérol libre

CETP: Cholesterol Esters Tranfert Protein

HDL: High Density Lipoproteins

HL: Lipase Hépatique

LCAT: Lécithine Cholestérol Acyl Transférase

LDL: Low Density Lipoproteins

PL: phospholipide

TG: triglycéride

VLDL: Very Low Density Lipoproteins

cholestérol de la paroi artérielle et à conduire à l'élimination par le foie du cholestérol en excès, assurant ainsi l'homéostasie du cholestérol cellulaire. Etant donné l'importance de ce processus, nous nous sommes attachés à décrire dans le paragraphe qui suit la notion d'efflux de cholestérol.

2- Le mécanisme de l'efflux de cholestérol

a- L'accepteur primaire du cholestérol impliqué dans le mécanisme d'efflux

L'étude du mécanisme de l'efflux du cholestérol a permis de déterminer l'accepteur primaire du cholestérol impliqué dans ce mécanisme. De nombreuses variétés de protéines et de phospholipides ont été incubées avec des cellules d'origine différente pour connaître leur capacité à promouvoir un efflux de cholestérol. Les HDL (notamment les HDL3) se sont montrées les plus efficaces. De même, les reconstitutions de protéoliposomes contenant des phospholipides et certaines apolipoprotéines des HDL se sont révélées capables de provoquer l'efflux de cholestérol.

Ainsi, Fielding et Fielding (1981) ont montré que la capacité d'efflux d'un plasma est associée à une sous-fraction de HDL de mobilité électrophorétique pré-b, contenant la LCAT, l'apoD et l'apoA-I (Lp A-I). Les HDL de cette sous-fraction étaient les accepteurs primaires du cholestérol.

Depuis, d'autres études ont été réalisées sur des macrophages humains J774 (Mahlberg, 1990), sur des fibroblastes humains et murins (De Lamatre, 1986), montrant que les lipoprotéines contenant l'apoA-I sans l'apoA-II sont capables de promouvoir un efflux de cholestérol plus important que celles contenant l'apoA-II. Ces deux sous-fractions des HDL, les LpA-I et les LpA-I:A-II ne possèdent donc pas les mêmes propriétés vis-à-vis de l'efflux de cholestérol.

Par contre, aucune différence n'a été observée entre ces deux accepteurs pour les cultures d'hépatocytes de rat Fu5AH, de cellules musculaires aortiques de souris (Mahlberg, 1992) et d'hépatocytes humains HepG2 (De Lamatre, 1986).

Les études effectuées dans le laboratoire Serlia U325 INSERM, dirigé par Monsieur le Professeur Fruchart, sur la lignée de cellules adipocytaires Ob1771 montrent que les apoA-I, apoA-II et apoA-IV associées à des lipides (dimyristoyl phosphatidylcholine: DMPC) sont capables de se fixer sur les sites de liaison des HDL et seules les DMPC A-I et DMPC A-IV provoquent l'efflux de cholestérol (Barbaras et al., 1985). L'apoA-I dans la fraction HDL semblerait jouer un rôle d'agoniste et l'apoA-II d'antagoniste pour l'efflux de cholestérol sur ces cellules (Steinmetz et al., 1990).

Plus récemment, en utilisant des électrophorèses, la sous-fraction de HDL provoquant l'efflux a pu être isolée et caractérisée. Elle contient trois types de particules désignées LpA-I pré bêta1, LpA-I pré bêta2 et LpA-I pré bêta3, ne contenant pas d'apoA-II et ayant une mobilité pré bêta en gel d'agarose. La plus grosse de ces particules, la LpA-I pré bêta3 (325 kDA) contient également de la LCAT, de la CETP ainsi que de l'apoD. Des expériences d'incubation de plasma avec des fibroblastes chargés en 3H-cholestérol ont montré que: après une minute, 39% de la radioactivité se retrouvait associée aux LpA-I pré bêta1, après deux minutes d'incubation supplémentaires en présence de fibroblastes non marqués, la radioactivité se trouvait déplacée vers les LpA-I pré bêta2 et les alpha HDL (Castro et al., 1988). Schématiquement, l'efflux de cholestérol intracellulaire ferait intervenir (Francone et al., 1990) une première étape où les LpA-I pré bêta1 capteraient le cholestérol, suivie d'un transport vers les LpA-I pré bêta2 puis vers des sites d'estérifications par la LCAT: LpA-I pré bêta3 et alpha HDL.

b- La translocation du cholestérol cellulaire

Slotte et al. (Slotte et al., 1987) ont montré que dans un milieu riche en cholestérol et en absence de HDL, une grande partie de l'excès de cholestérol des cellules en culture s'accumule dans des compartiments intracellulaires. La majeure partie de cet excès de cholestérol est estérifié par l'Acyl Coenzyme A Acyl Transférase, et mise en réserve sous forme de gouttelettes lipidiques intracellulaires.

Lorsque des cellules chargées en cholestérol sont mises en présence de HDL3, il y a hydrolyse des esters de cholestérol par la Cholestérol Ester Hydrolase neutre, puis stimulation de l'efflux de cholestérol libre formé.

Deux modèles peuvent expliquer le mécanisme de l'efflux:

- une rétroendocytose: les HDL pourraient, après fixation, subir une internalisation dans des endosomes qui ne fusionneraient pas avec les lysosomes mais interagiraient avec des vésicules lipidiques contenant le cholestérol. Après le chargement en cholestérol, elles seraient excrétées et réaliseraient ainsi l'efflux. Un tel mécanisme a été décrit entre les HDL et les macrophages (Schmitz et al., 1985).
- Slotte et al. observent que la fixation des HDL sur un site récepteur protéique provoque la translocation du cholestérol du réticulum endoplasmique vers la membrane (Slotte et al., 1987). Le cholestérol alors devenu membranaire serait pris en charge par les HDL ou les particules acceptrices de l'environnement cellulaire. Ce processus de translocation impliquerait la participation de protéines kinases C (PKC) (Mendez et al., 1991).

Les études effectuées au laboratoire sur les adipocytes de la lignée Ob1771 montrent que l'incubation en présence de sphingosine, inhibiteur de PKC, inhibe l'efflux de stérols provoqué par les HDL. De plus, le diacylglycérol et les esters de phorbol qui activent la PKC stimulent la translocation du cholestérol du pool intracellulaire vers la membrane plasmique en absence de HDL (Theret et al., 1990). Il semble que la fixation de HDL3 provoque des signaux de transduction impliquant une PKC et d'autres kinases. Ces signaux conduisent à l'activation de la voie de translocation du cholestérol intracellulaire vers la membrane plasmique, probablement par l'intermédiaire de phosphorylations de protéines de transport.

Ce modèle d'efflux de cholestérol suppose l'implication de différentes protéines cellulaires spécifiques et en particulier un récepteur à la surface des cellules capable d'interagir de façon réversible avec les apolipoprotéines des HDL et permettant la transduction des signaux appropriés dans la cellule. Cette molécule "récepteur" de HDL pourrait avertir la cellule de la présence d'un accepteur exogène pour le cholestérol, et permettre à l'excès de cholestérol d'être transporté vers la membrane pour ensuite sortir de la cellule.

Ce mécanisme serait donc pour la cellule un des moyens pour ne pas accumuler de trop grandes quantités de cholestérol intracellulaire lorsque cette cellule internalise activement des lipoprotéines riches en stérols (LDL).

Néanmoins, Rothblat et Phillips défendent l'hypothèse d'un efflux sans l'intermédiaire d'un récepteur (Phillips et al., 1987; Johnson et al., 1991; Rothblat et al., 1992)). Dans le modèle qu'ils proposent, l'efflux serait dû à un mécanisme de diffusion aqueuse du cholestérol libre membranaire. Le cholestérol membranaire diffuserait dans la couche aqueuse périphérique de la cellule, où il pourrait être capté par les particules acceptrices

c- Caractérisation du récepteur aux HDL

Pour le phénomène de translocation du cholestérol, comme pour l'efflux proprement dit, deux hypothèses ont été proposées: le phénomène dépendrait soit d'un mécanisme de diffusion ou soit d'un récepteur. Dans la seconde hypothèse, une interaction directe entre HDL et cellules est nécessaire.

La plupart des tissus semblent posséder des sites de fixation aux HDL, sites distincts du récepteur LDL. De nombreuses études réalisées sur des extraits membranaires obtenus à partir de cellules en culture ou de tissus ont permis par "ligand blotting" d'identifier différentes protéines fixant les HDL ou les protéoliposomes reconstitués contenant une apolipoprotéine du groupe A (A-I, A-II et A-IV).

Plusieurs auteurs ont réalisé des purifications partielles ou totales des protéines majeures reconnues par les HDL, par une succession de différentes chromatographies: échangeuse d'ions, gel filtration et immunoaffinité.

D'après les études réalisées différents types cellulaires (fibroblastes, macrophages, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et adipocytes), les différents auteurs s'accordent sur les caractéristiques suivantes: le récepteur reconnaît spécifiquement les apolipoprotéines A-I, A-II et A-IV (Barbaras et al., 1987, Steinmetz et al., 1990), la fixation est indépendante du calcium et distincte du récepteur LDL. La fixation des HDL sur leur site récepteur est réversible soit par désorption de la membrane ou par rétroendocytose et peut être régulée par des hormones peptidiques (Oppenheimer et al., 1988). De plus, il a été observé une stimulation de la fixation par enrichissement des cellules en cholestérol (Savion et al., 1988). Il faut toutefois noter que l'existence de ce récepteur est encore controversée.

II- Les apolipoprotéines des HDL

A- L'apolipoprotéine A-I

L'apoA-I est quantitativement la principale apolipoprotéine des HDL. Elle est de ce fait l'apolipoprotéine la plus étudiée. Chez l'homme, sa concentration plasmatique est de 1 à 1.2g/l. Bien que principalement associée aux HDL (90%), on la retrouve également en très faible quantité dans les chylomicrons et les VLDL.

1- Structure de la protéine

Composée de 243 acides aminés, l'apoA-I mature humaine a une masse moléculaire de 28 kDa. Sa forme de sécrétion, la proapoA-I, possède un propeptide de 6 acides aminés en position N-terminale (Brewer et al., 1978) dont on n'a toujours pas élucidé la fonction, et ne représente que 4% de l'apoA-I circulante. Le séquençage de ses 243 acides aminés a permis de mettre en évidence des unités répétitives de 22 acides aminés qui forment des domaines alpha-hélicoïdaux.

2-Synthèse et sécrétion

L'apoA-I humaine est synthétisée par le foie et l'intestin (Einsenberg et al., 1984) sous forme d'un précurseur de 267 résidus: le préproapoA-I. Le segment prépeptidique composé de 18 acides aminés est clivé de façon cotraductionnelle (Docherty et al., 1982). Chez l'homme, l'apoA-I est sécrétée sous forme de proapoA-I dans le plasma. L'apoA-I mature est alors

libérée par l'action d'une enzyme de clivage métallo-dépendante qui serait sécrétée par le foie (Edelstein et al., 1988).

3- Structure du gène de l'apoA-I humaine

Le segment génomique s'étendant du premier au dernier exon de l'apoA-I humaine mesure 1.8 kb et se situe en 5' d'un cluster de gènes d'apolipoprotéines sur le chromosome 11q23 contenant de 5' en 3' les gènes de l'apoA-I, apoC-III et apoA-IV. La production de souris transgéniques pour l'apoA-I humaine avec un fragment comprenant 256 bp (paires de base) de la séquence 5' (promoteur de l'apoA-I) et 4kb (kilobases) de la séquence 3' est suffisante pour obtenir une expression spécifique du foie, mais plus des 10kb de la séquence flanquante 5' et des 4kb de la séquence flanquante en 3' sont insuffisants pour obtenir une expression intestinale du transgène humain d'apoA-I (Walsh et al., 1989; Rubin et al., 1991). D'autres analyses ont montré que la région de contrôle intestinale est située en aval du gène de l'apoA-I sur un segment couvrant 0.2 à 1.4 kb en amont du gène d'apoC-III adjacent (Walsh et al., 1993).

4- Rôle de l'apoA-I

De nombreuses études *in vitro* ont permis d'étudier les fonctions de cette apolipoprotéine. Par l'utilisation des techniques de transgénèse sur souris, ces fonctions ont pu être précisées, et d'autres ont pu être également découvertes.

a- Etudes *in vitro*

Nous rappellerons brièvement les principales fonctions de l'apoA-I qui interviennent à chaque étape du transport inverse du cholestérol que nous avons décrit précédemment.

α - Rôle de l'apoA-I dans l'efflux du cholestérol cellulaire

L'apoA-I intervient dans la reconnaissance des HDL par des récepteurs cellulaires (Fidge et Nestel, 1985). Les particules contenant l'apoA-I mais pas l'apoA-II (LpA-I) peuvent, par liaison avec des sites spécifiques, déclencher l'exocytose du cholestérol (Barbaras et al., 1985).

β - Activation de la LCAT

Outre son rôle dans l'efflux du cholestérol, l'apoA-I intervient dans le transport inverse du cholestérol par son effet activateur de la LCAT qui catalyse l'estérification du cholestérol des HDL, des VLDL et des LDL. Cette apolipoprotéine est donc un cofacteur de la LCAT

(Fielding et al., 1972) et cette activité stimulante serait liée aux segments amphipathiques en hélice α contenus dans cette apolipoprotéine. En effet, il a été montré que des peptides synthétiques de 22 acides aminés possédant cette même structure amphipathique sont également capables d'activer la LCAT (Yokohama et al., 1980). Une étude plus précise a montré que la région N-terminale de cette apolipoprotéine et la région proche de la Lys107 paraissent impliquées dans l'activation (Jonas et al., 1989, Jonas et al., 1991). Ceci fut confirmée par l'équipe de Curtiss (Banka et al., 1990) qui, utilisant des anticorps monoclonaux inhibant l'activité LCAT, situe la région impliquée entre les résidus 96-111. De plus, des études utilisant des peptides mimant une hélice α -amphiphile de l'apoA-I, ont permis de mettre en évidence l'importance de cette structure dans l'effet activateur (Anantharamaiah et al., 1990). De récents travaux réalisés par mutagenèse dirigée sur le gène de l'apoA-I (Minnich et al., 1992) suggèrent de plus que différents domaines de l'apoA-I sont requis dans l'activation de la LCAT.

b- Etudes *in vivo*

α - Utilisation des souris transgéniques

Il a été établi que les HDL A-I jouent un rôle crucial dans la protection contre l'athérosclérose. Des animaux transgéniques exprimant l'apoA-I humaine ont été produits (Walsh et al., 1989). Dans les souris et les rats transgéniques, la surexpression de l'apoA-I entraîne une augmentation sélective des niveaux d'HDL-cholestérol. Ceci est compatible avec les études réalisées sur des souris transgéniques pour l'apoA-I humaine (Rubin et al., 1991 a) montrant que le niveau d'HDL-cholestérol est corrélé avec le niveau d'apoA-I.

Ces animaux ont permis de montrer des effets directs anti-athérogènes des HDL (**fig.4**): la surexpression du gène de l'apoA-I résulte en une protection totale contre le développement des lésions athéromateuses (Rubin et al., 1991 b; Schultz et al., 1993; Schultz et Rubin., 1994).

Outre l'effet sur le niveau d'HDL-cholestérol, on a pu observer que l'expression de l'apoA-I humaine dans ces souris résulte aussi en une diminution du niveau d'apoA-I murine, de telle façon que les souris transgéniques aient 80 à 90% d'apoA-I plasmatique humaine.

Une autre conséquence est le changement des propriétés physiques des HDL. L'utilisation de souris transgéniques montre que la structure de l'apoA-I est un déterminant important de la distribution de la taille des particules HDL. Les HDL de souris sont normalement réparties en une population de particules de taille d'un diamètre moyen de 10 nm. Les souris transgéniques

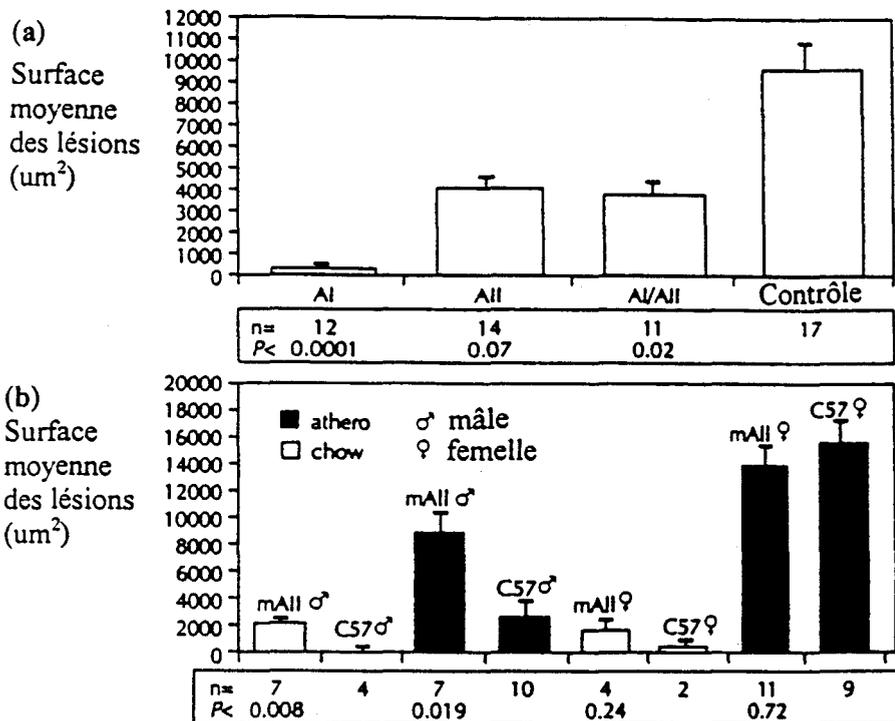


Figure 4 :

Etude de l'athérogénèse au niveau de l'aorte de souris transgéniques pour l'apoA-I et l'apoA-II humaines et murines et de souris de contrôle (C57BL/6) (d'après Schultz et Rubin, 1994)

(a) La surface moyenne des lésions athéromateuses de souris transgéniques pour l'apoA-I, l'apoA-II, l'apoA-I et l'apoA-II humaines a été quantifiée dans des souris femelles ayant suivi un régime athérogénique riche en graisses de beurre de cacao et contenant 1.25% de cholestérol pendant 36 semaines (Schultz et al., 1993).

(b) La surface moyenne a été mesurée à partir de souris males ou femelles transgéniques pour l'apoA-II murine (mA-II) ayant subi soit un régime pauvre en graisses et en cholestérol (chow), un régime athérogénique pendant 16 à 24 semaines (Warden et al., 1993).

pour l'apoA-I humaine montrent deux populations de taille ayant des diamètres d'environ 10.3 nm et 8.8 nm, ce qui correspond respectivement à la distribution des particules HDL2 et HDL3 dans le plasma humain.

D'autre part, les souris transgéniques pour l'apoA-I humaine ont aussi été utilisées pour étudier la régulation au cours du développement du niveau d'apoA-I. Il a été montré que des facteurs post-transcriptionnels importants interviennent dans la régulation du niveau plasmatique d'apoA-I et que les augmentations parallèles observées au cours du développement de la concentration en apoA-I et en HDL plasmatiques sont associées à des augmentations de la taille des particules (Golder-Novoselsky et al., 1992).

β- Utilisation des souris déficientes (knock out) pour le gène de l'apoA-I

Des souris dans lesquelles le gène murin d'apoA-I a été inactivé par recombinaison homologue au niveau des cellules souches embryonnaires ont été produites (Williamson et al., 1992; Plump et al., 1993). Ces souris présentent une réduction prononcée du niveau d'HDL plasmatiques, ce qui est concordant avec l'augmentation des HDL observée dans les animaux transgéniques ayant des niveaux d'apoA-I élevés. Les animaux homozygotes pour la déficience du gène de l'apoA-I n'ont, d'une part, pas d'apoA-I plasmatique, et d'autre part, présentent des concentrations du cholestérol plasmatique total et d'HDL-cholestérol réduites d'à peu près 70% et 80% respectivement par rapport au contrôle.

Il est surprenant d'observer que ces animaux homozygotes pour la déficience du gène apoA-I soumis à un régime athérogène n'apparaissent pas être sensibles à l'athérosclérose. D'ailleurs, ces résultats sont à mettre en parallèle avec des études faites chez l'homme qui suggèrent que des niveaux bas en HDL semblent prédisposer, mais ne sont pas liés étroitement à l'athérosclérose (Li et al., 1993).

La réduction importante des HDL chez ces animaux est concordante avec la réduction significative d'HDL observée chez des sujets humains ayant un manque d'apoA-I plasmatique résultant de mutations rares du gène de l'apoA-I, ce qui est en faveur du rôle de l'apoA-I comme le déterminant majeur du niveau d'HDL, une fois encore.

B- L'apolipoprotéine A-II

L'apoA-II est la seconde protéine majeure des HDL (25% de la masse). Chez l'homme, sa concentration plasmatique varie entre 0.3 et 0.5 g/l. Comme nous l'avons vu précédemment, cette apolipoprotéine rentre dans la composition de l'une des deux principales fractions des

HDL, les LpA-I:A-II qui contiennent à la fois l'apoA-I et l'apoA-II. De plus, des complexes mineurs Lp A-II:B ont été décrits (Alaupovic et al., 1993).

1- Structure de la protéine

L'apoA-II mature humaine se distingue de l'apoA-I par sa forme dimérique. Elle comporte en effet deux chaînes peptidiques de 77 résidus, liées par un pont disulfure entre les cystéines en position 6 (Brewer et al., 1972). Toutefois, cette forme dimérique n'a été observée que chez l'homme et les singes supérieurs (chimpanzé, gorille...) alors que chez les autres espèces, l'apoA-II circulante ne présente pas de liaison covalente interchaîne. Pourtant même chez ces espèces, il faut remarquer que cette apolipoprotéine présente une zone très hydrophobe pouvant conduire à un rassemblement de deux apoA-II. Par ailleurs, comme l'apoA-I, l'apoA-II possède une grande affinité pour les lipides grâce à sa structure en hélices amphiphiles (Mao et al., 1977). Cette affinité est d'ailleurs plus grande que celle de l'apoA-I puisque l'apoA-II peut déplacer l'apoA-I de la surface des HDL, une propriété qui pourrait d'ailleurs expliquer la différence des propriétés anti-athérogènes des particules HDL A-I et A-I:A-II (Lagocki et Scanu, 1980). De plus, l'hélicité de l'apoA-II augmente lorsque cette protéine se lie aux phospholipides, similairement à d'autres apolipoprotéines; le domaine de liaison aux lipides a d'ailleurs été localisé dans la région C-terminale et implique probablement les acides aminés 50-55.

2- Synthèse et sécrétion

Les analyses de la séquence protéique et du gène montrent que chez l'homme, l'apoA-II est synthétisée sous forme d'une préproapoA-II de 100 acides aminés par le foie (Hussain et Zannis, 1990). 18 résidus forment le peptide signal qui est clivé cotraductionnellement. L'apoA-II sécrétée à l'extérieur de la cellule comporte 82 résidus d'acides aminés et contient un prosegment N-terminal long de 5 résidus ayant la séquence Ala-Leu-Val-Arg-Arg qui est clivée dans le plasma par une thiol-protéase pour produire la forme plasmatique mature de 77 acides aminés. Chez les sujets sains, l'apoA-II sécrétée dans le plasma est liée aux particules HDL contenant l'apoA-I (LpA-I:A-II) (Cheung et al., 1988) mais le rapport A-I/A-II des particules varie selon la densité (Cheung et al., 1979).

L'existence d'isoprotéines mineures de l'apoA-II, sans doute les produits de modifications post-traductionnelles, a été rapportée récemment. Des études ont permis de préciser les sites de synthèse de l'apoA-II humaine et la relation entre la forme mature de l'apoA-II et les formes

équivalentes dans le plasma (Hussain et Zannis, 1990). Des expériences de pulse-chase sur culture d'hépatome humain HepG2 suivies d'électrophorèses bidimensionnelles des isoprotéines d'apoA-II marquées ont permis de montrer, outre le fait que l'apoA-II humaine est synthétisée quasi exclusivement par le foie, que l'apoA-II subit un ensemble complexe de modifications intra- et extracellulaires (Lopez et al., 1994). Une modification précoce entraîne la perte de deux charges positives. La protéine est ensuite glycosylée avec des chaînes de carbohydrates en O contenant deux ou quatre acides sialiques. Les nombreuses isoformes d'apoA-II générées seront converties en formes plasmatiques par protéolyse intra- et extracellulaire du prosegment et par une cyclisation N-terminale de la glutamine +1 aussi bien que par désialylation extracellulaire, protéolyse du prosegment et cyclisation de la glutamine N-terminale (Hussain et Zannis, 1990).

Cet ensemble de modifications complexes a été confirmé récemment, et en particulier l'importance de la glutamine +1 dans le processus de maturation prouvée par sa substitution en leucine +1 entraînant un empêchement de la cyclisation N-terminale et l'inhibition du clivage du propeptide (Lopez et al., 1994).

L'apoA-II est aussi synthétisée par l'intestin, mais à des niveaux très inférieurs à ceux observés au niveau du foie (Hussain et Zannis, 1990), voire quasi-inexistants selon l'espèce. La distribution de l'ARNm de l'apoA-II a été analysée à partir de lignées cellulaires, de tissus d'origines foetaux ou adultes (Hussain et Zannis, 1990). Celui-ci est présent dans le foie foetal humain; par contre, les ARN isolés d'intestin foetal humain renferment moins de 0.5% du pool d'ARNm d'apoA-II trouvés dans le foie. Il est même indétectable dans l'intestin du singe adulte *Cynomolgus*. Les cultures d'intestin foetal humain et adulte de ce singe ne montrent aucune synthèse d'apoA-II. Ces données sont un peu différentes des mesures de l'expression intestinale de l'apoA-II humaine effectuées antérieurement montrant que l'ARNm de l'apoA-II représente 0.2% du pool d'ARNm traduit par les cellules épithéliales du jejunum adulte (Gordon et al., 1983). La différence est probablement liée à l'imprécision des méthodes de dosage utilisées à cette époque.

Au niveau de nombreux tissus adultes, cet ARNm est indétectable. Ceux-ci incluent les surrénales, le cerveau, la rate, les ovaires, les poumons, les reins, le coeur, le thymus, le pancréas, les muscles. Il en est de même pour certaines lignées cellulaires dont les cultures de monocytes-macrophages humains, les cellules de la lignée de macrophage U937, les fibroblastes de peau humaine en culture (Hussain et Zannis, 1990).

En définitive, en considérant les différences de masse et de taille entre le foie et l'intestin, les quantités relatives d'ARNm d'apoA-II dans ces deux tissus, il peut être conclu que la contribution de l'intestin au pool plasmatique d'apoA-II est négligeable.

3- Rôle de l'apoA-II

Le rôle de l'apoA-II est resté longtemps inconnu. Certaines études préliminaires *in vitro* lui ont conféré un rôle dans le métabolisme du cholestérol. L'utilisation récente des souris transgéniques a permis d'apporter des renseignements importants et complémentaires sur ses fonctions.

a- Etudes *in vitro*

L'apoA-II a une activité modulatrice de la lipase hépatique (Jahn et al., 1983, Schmitz et Williamson, 1991). De plus, son action modulatrice pourrait également intervenir sur l'action de la LCAT, puisque des liposomes contenant l'apoA-II n'activent que très faiblement la LCAT et affectent l'activation par des liposomes/apoA-I de cette même enzyme (Chen et al., 1988; Jonas et al., 1984). D'autres fonctions ont été proposées mais nécessitent une confirmation: par exemple, l'apo A-II activerait la triglycéride lipase hépatique (Jahn et al., 1983) et elle serait un ligand de la protéine membranaire qui lierait les HDL et correspondrait au "récepteur HDL".

Nous rappellerons que l'apoA-II semblerait jouer un rôle d'antagoniste pour l'efflux de cholestérol (Steinmetz et Barbaras, 1990). Certains auteurs (Barbaras et al., 1987), ont pu montré que des liposomes contenant l'apoA-II ou des particules contenant les apoA-I et apoA-II ne provoquent pas l'efflux de cholestérol cellulaire alors que les liposomes contenant l'apoA-I sans l'apoA-II en étaient capables (Steinmetz et al., 1990). Ces travaux réalisés sur des adipocytes de souris en lignée Ob1777 indiqueraient là aussi un rôle régulateur de l'apoA-II dans l'efflux de cholestérol.

Cette différence entre les particules LpA-I et LpA-I:A-II a également été observée récemment sur des cellules endothéliales par Metelskaya et al. (Metelskaya et al., 1995). Seules les LpA-I provoquent une translocation du cholestérol intracellulaire, les deux types de particules pouvant capter le cholestérol membranaire. D'autres études ont permis d'observer ce type de différence sur la capacité des HDL à capter le cholestérol à partir de cellules d'hépatome de rat Fu5AH, en remplaçant graduellement l'apoA-I par l'apoA-II dans les HDL3 isolées par ultracentrifugation, ce qui engendre la diminution de l'efflux du cholestérol (Lagrost et al., 1995).

Ces résultats ont été contestés par d'autres auteurs qui, sur d'autres types cellulaires, n'observent pas ces différences entre les particules contenant l'apoA-I seule et les particules contenant les apoA-I et apoA-II (Johnson et al., 1991). Cependant, le rôle de l'apoA-II sur le transport inverse a été conforté par les résultats obtenus *in vivo*.

b- Etudes *in vivo* réalisées avec des souris transgéniques

De récents travaux fondés sur l'utilisation de souris transgéniques étayaient la thèse de l'existence de différences fonctionnelles et structurales entre les particules LpA-I et LpA-I:A-II. Il a été prouvé récemment que la composition protéique des HDL et en particulier leur contenu en apoA-II est une cause déterminante de l'athérogenèse (Schultz et al., 1993). En effet, une augmentation du développement des lésions athéromateuses (**fig.4**) est observée chez des souris transgéniques surexprimant l'apoA-II de souris par rapport aux souris normales, ou avec des souris transgéniques surexprimant soit l'apoA-II humaine seule, soit l'apoA-I et l'apoA-II humaines par rapport aux souris surexprimant seulement l'apoA-I humaine (Warden et al., 1993; Schultz et al., 1993). De plus, il a été montré que le sérum des souris transgéniques pour l'apoA-I et l'apoA-II humaines est moins efficace que celui des souris transgéniques pour l'apoA-I humaine lors de l'efflux de cholestérol à partir de cellules Fu5AH (Castro et al., 1994). Ces résultats concordent donc avec les études *in vitro* décrites précédemment suggérant que l'efficacité des particules HDL à promouvoir l'efflux de cholestérol est inversement corrélée à leur contenu en apoA-II (Barbaras et al., 1987; Steinmetz et al., 1990; Metelskaya et al., 1995; Lagrost et al., 1995).

Les effets de la surexpression de l'apoA-II humaine ou murine dans les souris transgéniques sur la structure et la concentration des HDL ont été aussi étudiés. La surexpression de l'apoA-II humaine n'augmente pas la concentration en HDL ou ne diminue pas la concentration plasmatique en apoA-I ou apoA-II murines à l'opposé de ce qui a été observé chez les souris surexprimant l'apoA-I humaine. L'effet primaire de la surexpression de l'apoA-II humaine est l'apparition de particules HDL de petites tailles composées uniquement d'apoA-II humaine. Les HDL des souris transgéniques pour l'apoA-I et l'apoA-II humaines montrent une distribution unique de leur taille par rapport aux souris transgéniques pour l'apoA-I ou l'apoA-II et contiennent des particules avec ces deux apolipoprotéines humaines.

Ces résultats obtenus chez la souris indiquent que l'apoA-II humaine participe à la détermination de la taille des HDL (Schultz et al., 1992). Le même résultat est retrouvé chez les souris transgéniques pour l'apoA-II murine.

D'autre part, la surexpression de l'apoA-II de souris aboutit à une augmentation de deux fois de la concentration d'HDL et à peu près à une augmentation de 25% du diamètre moyen des HDL. Elle aboutit aussi à une diminution du niveau d'apoA-I associé avec les HDL, suggérant que l'apoA-II peut déplacer l'apoA-I des HDL. Enfin, ces mêmes souris transgéniques montrent aussi une augmentation de deux à quatre fois du niveau des VLDL et des LDL-cholestérol plasmatiques, suggérant des interactions nouvelles entre les classes de lipoprotéines plasmatiques (Hedrick et al., 1993).

En conclusion, l'apoA-II semble atténuer l'effet protecteur des HDL contre l'athérosclérose. Il est donc d'un intérêt capital de comprendre la régulation de l'expression du gène de l'apoA-II.

4- Régulation de la synthèse

La production des apolipoprotéines par le foie et l'intestin peut être modifiée par les conditions physiologiques, nutritionnelles, hormonales ou au cours du développement, mais aussi sous l'influence de médicaments.

a- Régulation nutritionnelle

α- Lipides

Il est bien connu que le métabolisme des lipoprotéines et de leurs constituants est affecté par l'apport quantitatif et qualitatif de lipides. Pour l'apoA-II, il a été observé au niveau du foie de sujets soumis à un régime athérogénique (15% de beurre de cacao, 1.25% de cholestérol, 0.5% d'acide cholique) une répression du niveau de son ARNm (Le Boeuf et al., 1990). Toutefois, chez des patients sains et souffrant d'une hypertriglycéridémie endogène, aucun changement du niveau d'apoA-II plasmatique n'est observé lorsqu'ils sont soumis à un régime alimentaire riche en graisses composé de 40% de carbohydrates, 45% de graisses et 15% de protéines (Liu et al., 1990).

Par contre, un dérivé de l'acide arachidonique, l'acide 5, 8, 11, 14-éicosatétraynoïque, augmente fortement la transcription hépatique du gène de l'apoA-II de rat, alors que l'acide linoléique et l'acide tétradécylthioacétique n'affecte pas l'activité du promoteur de l'apoA-II humaine (Vu-Dac et al., 1995).

β- Hydrates de carbone

Les glucides alimentaires simples (glucose, fructose, saccharose) influencent le métabolisme des lipides et des lipoprotéines. En particulier, certains hydrates de carbone (fructose, saccharose) provoquent une hypertriglycémie par rapport au glucose ou à l'amidon, cet effet étant parfois transitoire (Grundy et Denke, 1990). Les changements induits par les hydrates de carbone concernent également les taux plasmatiques des apolipoprotéines. Ainsi, chez des patients sains ou souffrant d'une hypertriglycémie endogène, soumis à un régime alimentaire riche en hydrates de carbone constitué de 80% de hydrates de carbone, 5% de graisses et 15% de protéines, il a été observé une augmentation du niveau d'apoA-II plasmatique (Liu et al., 1990).

χ- Alcool

L'absorption de doses modérées d'alcool par des volontaires en parfaite santé induit une augmentation du niveau d'apoA-II plasmatique en phase post-prandiale. Le jour suivant l'absorption, l'effet a disparu (Veenstra et al., 1990).

δ- Jeûne

L'hépatocyte s'adapte à un état de jeûne en modifiant plusieurs étapes impliquées dans la synthèse des triglycérides, la sécrétion des VLDL et le métabolisme des HDL. Il a été montré qu'un régime pauvre en calories provoque chez des femmes obèses une diminution du niveau d'apoA-II plasmatique (Shoji et al., 1992).

b- Régulation hormonale

Différentes hormones sont capables de modifier le métabolisme des lipides et des lipoprotéines en modulant l'expression des gènes des apolipoprotéines. C'est le cas des hormones à récepteurs nucléaires comme les hormones thyroïdiennes et les hormones stéroïdiennes, et des hormones du métabolisme lipidoglycémique à récepteurs membranaires comme l'insuline et le glucagon. La synthèse de l'apoA-II est soumise à diverses influences hormonales:

α- Les hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes régulent l'expression de nombreux gènes et en conséquence influencent la synthèse protéique. Les hormones thyroïdiennes moduleront la production, la conversion et la clairance des lipoprotéines. Les effets des hormones thyroïdiennes sur le

métabolisme des lipides pourraient être expliqués par leur action sur la régulation des protéines impliquées dans la synthèse et le métabolisme des lipoprotéines (Staels et al., 1990). En ce qui concerne l'apoA-II, l'administration de l'hormone thyroïdienne T4 chez le rat induit une diminution de son taux d'ARNm dans le foie. A l'inverse, l'hypothyroïdie consécutive à l'administration de n-propylthiouracile provoque une élévation de ce taux (Staels et al., 1990).

β- Les hormones stéroïdiennes

β-1- Les stéroïdes anabolisants

Le traitement avec les corticostéroïdes provoque des modifications profondes du profil lipidique et protéique du sérum pouvant augmenter le risque d'athérosclérose. Ces hormones semblent agir à la fois sur la synthèse et la clairance des lipoprotéines plasmatiques.

Parmi ces modifications, il a été observé que ces hormones provoquent une diminution du niveau d'apoA-II, et ceci seulement au niveau de la sous-fraction HDL3 du sérum humain, ainsi qu'une réduction du rapport apoA-I/apoA-II dans les sous-fractions HDL2 et HDL3 (Baldo et al., 1990).

β-2- Les stéroïdes sexuels

L'existence d'une différence liée au sexe dans la prévalence du risque cardio-vasculaire est bien connue ainsi que les modifications du métabolisme lipidique lors d'hormonothérapie dans le cadre de la contraception ou lors de l'apport d'oestrogènes pour pallier les conséquences de la ménopause. Des études récentes montrent une diminution du risque cardio-vasculaire sous oestrogénothérapie lors de la ménopause. Divers travaux ont évalué l'effet des hormones sexuelles sur l'expression des gènes des apolipoprotéines, et en ce qui nous concerne, sur l'expression du gène de l'apoA-II. Ainsi, chez la femme, après la ménopause, le traitement avec le 17 α -éthynyl oestradiol induit une augmentation du niveau d'apoA-II (Applebaum-Bowden et al., 1989). De même, les études métaboliques effectuées chez des babouins ovariectomisés et hystérectomisés suggèrent que l'oestrogène et une autre hormone sexuelle, la progestérone, augmentent la production d'apoA-II (Kushwaha et al., 1990).

c- Les médicaments hypolipidémiants

α- Les fibrates

Les médicaments hypolipidémiants de la classe thérapeutique des fibrates appartiennent à un groupe de produits chimiques appelé proliférateurs de peroxysomes. Ce groupe contient

également des acides gras et certains herbicides. Chez l'homme, les fibrates induisent des diminutions très nettes des taux plasmatiques de triglycérides, et sont donc utilisés en première intention dans les hyperlipidémies mixtes (type IIb) caractérisées par une augmentation simultanée du cholestérol et des triglycérides.

Les effets des fibrates conduisent à des modifications de la composition des lipoprotéines, et en particulier modifient les taux plasmatiques des apolipoprotéines. Afin de déterminer le mécanisme moléculaire d'action de ces produits, des études ont été menées chez le rat, et ont montré que les fibrates influencent l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines d'une manière tissu-spécifique (Staels et al., 1992 a,b,c). En ce qui concerne l'apoA-II, l'administration de fénofibrate chez le rat induit une diminution du taux de son ARNm au niveau hépatique (Staels et al., 1992 b). Le taux plasmatique de l'apoA-II diminue également chez le rat traité au fénofibrate.

Cependant, des résultats différents ont été observés chez l'homme. En effet, le fénofibrate augmente la concentration plasmatique et la production hépatique de l'apoA-II humaine (Vu-Dac et al., 1995). Les mêmes auteurs ont montré que cet effet est dû à l'induction de l'expression du gène de l'apoA-II au niveau transcriptionnel dans l'hépatocyte sous l'action de fibrates tel le fénofibrate, le ciprofibrate et l'acide pirixinique (Wy-14643). Ils ont également montré que cet effet est médié par la liaison du récepteur nucléaire PPAR (peroxysome proliferator-activated receptor) à un élément de réponse PPRE (peroxysome proliferator responsive element) localisé dans le site J appartenant à l'ensemble des quatorze éléments de régulation du promoteur de l'apoA-II humaine (voir ci-dessous).

β- Médicaments n'appartenant pas à la catégorie des fibrates

Les effets de deux drogues, la pravastatine et de la cholestyramine ont été étudiés chez des patients présentant l'un des critères suivants: l'hyperlipoprotéïnémie de type IIA, des antécédents de maladies coronariennes, ou certains symptômes apparents, tel le xanthome tendineux. La pravastatine est un inhibiteur de la 3-hydroxy-3 methylglutaryl-coenzyme A (HMG CoA) réductase qui est l'enzyme clé de la synthèse du cholestérol; la cholestyramine est une drogue capable de séquestrer les acides biliaires au niveau du foie. Il a été observé que l'administration de ces drogues induit une légère diminution du niveau d'apoA-II plasmatique (Bard et al., 1990)

d- Régulation au cours du développement

L'expression du gène de l'apoA-II est soumise à une régulation au cours du développement. Ainsi, il a été montré que l'expression de l'apoA-II au niveau du foie de rat est fortement réprimée avant la naissance et augmente dramatiquement entre le vingtième et le trentième jour après la naissance (Staels et al., 1989).

III- Le gène de l'apolipoprotéine A-II

En tant que membre d'une famille de gènes, le gène de l'apoA-II possède un certain nombre de traits communs aux gènes d'autres apolipoprotéines, et il est donc susceptible d'être régulé par des mécanismes semblables. Nous situerons en premier lieu le gène de l'apoA-II au sein de sa famille, puis nous envisagerons les connaissances précédemment acquises sur la régulation de son expression.

A- Caractéristiques du gène

L'ADNc (ADN complémentaire) du gène de l'apoA-II humaine a été cloné et séquencé (Knott et al., 1984; Sharpe et al., 1984).

1- Structure

Le gène de l'apoA-II, comme les gènes des autres apolipoprotéines, excepté ceux codant l'apoB et l'apoD, présentent une organisation structurale commune composée de quatre exons et trois introns (Li et al., 1988). Les introns ont des localisations semblables: l'intron I interrompt la région 5' non traduite du gène; l'intron II interrompt la région codante avant le site d'action de l'enzyme de clivage du peptide signal et l'intron III interrompt la partie du gène codant pour la protéine mature (**fig.5**). Plus précisément pour le gène de l'apoA-II, les introns I, II, III ont respectivement pour limite les nucléotides +38 à +206, +283 à +575 et +709 à +1103. La longueur des trois premiers exons est très semblable entre les différents gènes et les différences dans la longueur totale des messagers proviennent principalement de la longueur de l'exon IV. Pour l'apoA-II, les exons I, II, III, IV ont respectivement pour limite les nucléotides +1 à +37, +207 à +282, +576 à +708 et +1104 à +1334.

Ces similarités de structure entre apolipoprotéines se retrouvent dans plusieurs espèces de mammifères (homme, rat, souris, chien, lapin) et suggèrent l'existence d'un gène ancestral commun, chaque gène d'apolipoprotéine ayant évolué à travers des duplications géniques totales ou partielles.

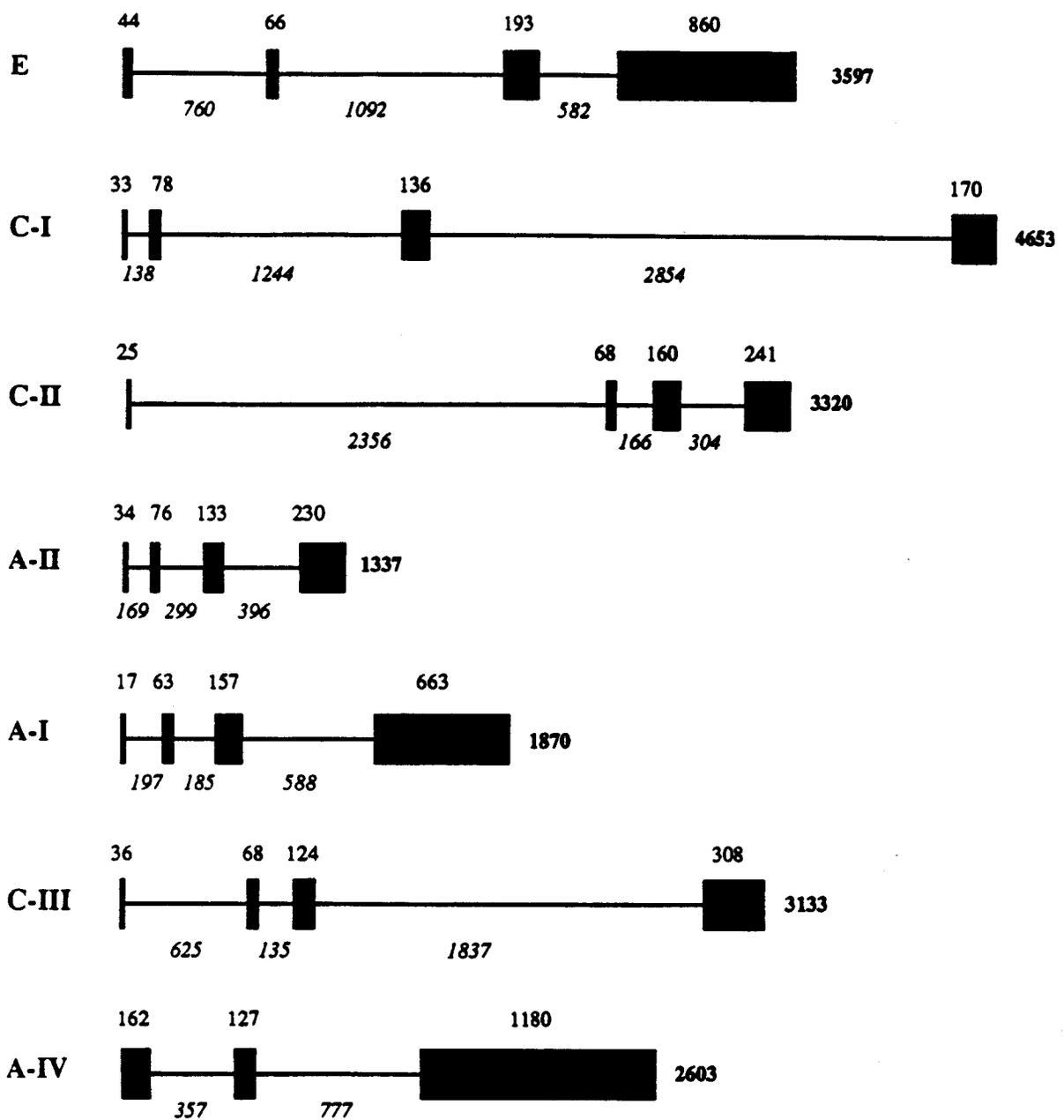


Figure 5:
Structure de sept gènes d'apolipoprotéines humaines
(d'après Lauer et al., 1988)

Les boîtes noires représentent les exons et les nombres au-dessus leur longueur en nucléotides. Les nombres en italique représentent la longueur des introns. La longueur totale de chaque gène est indiquée en gras.

En plus de leur organisation structurale commune, les gènes des apolipoprotéines présentent dans leur région codante des homologies de séquence au niveau d'éléments conservés au cours de l'évolution à partir du gène ancestral. Le minigène ancestral aurait donné naissance à deux exons. Chacun des exons aurait ensuite évolué par amplification d'unités répétées codant pour des peptides à propriétés amphiphiles. Des divergences de séquence au niveau de ces répétitions sont à l'origine des fonctions des différentes apolipoprotéines. Cependant, la conservation du profil amphiphile a permis à tous les membres de la famille de conserver leurs propriétés de liaison aux lipides (Li et al., 1988).

2- Localisation chromosomique

Le gène de l'apoA-II humaine est localisé sur le chromosome 1 (**Tableau IV**) et est isolé des autres gènes d'apolipoprotéines qui se trouvent, pour la plupart, localisés en groupe sur certains chromosomes. C'est le cas en particulier pour l'apoA-IV, l'apoC-III et l'apoA-I associés sur le bras long du chromosome 11 chez l'homme (Karathanasis, 1985), ou des gènes de l'apoC-II, l'apoE-III et l'apoC-I localisés sur le chromosome 19.

B- Régulation de l'expression de l'apolipoprotéine A-II humaine

Les gènes d'apolipoprotéines sont transcrits dans de nombreux tissus (**Tableau IV**), sauf ceux des apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV et C qui ont tous une expression tissu-spécifique.

Dans le cas des apo-C et de l'apoA-II, le foie constitue la principale source de synthèse. Les autres gènes sont exprimés à des degrés variables dans le foie. Par exemple, l'apoA-I provient pour moitié environ du foie, l'autre moitié provenant de l'intestin. Les bases moléculaires de l'expression intestinale sont peu connues. Ces gènes sont donc un modèle de choix pour l'étude des interactions entre facteurs de transcription conduisant à une régulation différentielle de leur expression dans les tissus.

La connaissance de ces mécanismes est nécessaire, étant donné le rôle central joué par les apolipoprotéines dans le transport et le métabolisme des lipides et aussi l'association avec les maladies cardio-vasculaires. En particulier, la connaissance du contrôle de l'expression de l'apoA-I et de l'apoA-II est déterminante, puisque ces protéines sont les principales composantes des HDL, dont, nous le rappelons, la concentration apparaît inversement corrélée au risque de maladies cardio-coronariennes.

De plus, nous avons expliqué précédemment que l'apoA-II atténue l'effet protecteur des HDL

Apolipoprotéines	Sites de synthèse	Chromosome
A-I	intestin > foie, testicules, rein, coeur, estomac, glandes surrénales	11
A-IV	intestin >>> foie	11
C-III	foie > intestin	11
C-I	foie >>> intestin	19
C-II	foie >> intestin	19
E	foie, glandes surrénales > rein, testicules > intestin, cerveau, rate, coeur, estomac, pancréas > muscle, poumon	19
B	B-100 foie B-48 intestin	2
A-II	foie >>> intestin	1

Tableau IV:

Abondance relative des ARN messagers et localisation chromosomique des gènes des principales apolipoprotéines humaines (d'après Lenich et al., 1988; Eggerman et al., 1991).

contre le développement de l'athérosclérose. Ainsi, dans le cadre de recherche visant à améliorer la thérapeutique de ces maladies représentant une cause de mortalité précoce dans les pays industrialisés, il apparaît fondamental de déterminer les mécanismes gouvernant l'expression du gène humain de l'apoA-II et la régulation de sa synthèse. En effet, la connaissance de ces mécanismes permettra de trouver des moyens pour diminuer l'expression de l'apoA-II. L'expression tissu-spécifique stricte de ce gène en fait également un bon modèle d'étude des mécanismes contrôlant l'expression d'un gène exprimé uniquement dans le foie.

1- Eléments du promoteur impliqués dans la transcription hépatique basale du gène de l'apoA-II humaine

Il est connu que la régulation tissu-spécifique et développementale des gènes est contrôlée par des combinaisons uniques de facteurs trans spécifiques reconnaissant les éléments cis des gènes. Des séquences d'ADN associées à de nombreux gènes ont été identifiées comme responsables du contrôle de la transcription spatiale et temporelle, et ont été localisées dans la région du promoteur, les exons, les introns et jusqu'à plus de 50 kb en aval du site d'initiation de la transcription. Ces séquences ont une action orientation-indépendante ou dépendante, et la majorité de ces cis-éléments ont été identifiés sur des gènes d'Eucaryotes supérieurs dont l'expression semble limitée à un seul type cellulaire principalement.

En ce qui concerne l'apoA-II, les analyses de délétion et de footprint du promoteur de l'apoA-II entre les nucléotides -911 à +29 ont permis d'identifier un ensemble d'éléments de régulation, dont trois éléments proximaux, cinq éléments médians et six éléments distaux, qui contrôlent la transcription hépatique et intestinale dans les cellules HepG2 (hépatome humain) et Caco-2 (carcinome du colon humain qui présente des caractéristiques des cellules intestinales) (**fig.6a**). Des études ont déjà montré que les niveaux d'ARNm d'apoA-II dans l'intestin représentent 0.5% de celui observé dans le foie. Aussi, l'obtention d'un niveau élevé de transcription avec la région -911 à +29 dans la lignée Caco-2 (similaire à celui obtenu avec la lignée HepG2) montre que des éléments de régulation négatifs existeraient au delà de cette région et seraient capables de supprimer la transcription intestinale. Il est également probable que les cellules Caco-2 soient privées des facteurs de régulation négatifs qui sont normalement présents dans la cellule intestinale (Chambaz et al., 1991). Enfin, il est également possible que la structure chromatinienne ou la méthylation de l'ADN dans les cellules intestinales répriment la transcription.

Les éléments de régulation de ce promoteur et de son enhancer ont été décrits en détail par Chambaz, Cardot et leurs collaborateurs (Chambaz et al., 1991; Cardot et al., 1991; Cardot et al., 1993; Cardot et al., 1994). La région distale contient les éléments N à I répartis entre les nucléotides -903 à -680, et elle est indispensable à l'expression cellule-spécifique du gène de l'apoA-II (Shelley et Baralle, 1987; Chambaz et al., 1991). Ces éléments N à I exercent une activité enhancer dans les cellules hépatiques lorsqu'ils sont placés devant le promoteur minimal de l'apoA-II. La délétion de l'élément N réduit dramatiquement la transcription hépatique et intestinale. Néanmoins, l'élément N seul n'est pas suffisant pour activer la transcription (Chambaz et al., 1991).

La région médiane localisée entre les nucléotides -573 à -255 contient les éléments de régulation H à D et a un effet moindre sur la transcription du gène de l'apoA-II dans les deux types cellulaires.

La région proximale contient les éléments C à A entre les nucléotides -126 à -33 et exerce un effet notable sur la transcription dans les deux lignées cellulaires.

2- Facteurs de transcription impliqués dans la transcription hépatique basale

Les facteurs qui se lient aux régions régulatrices ont été identifiés par des expériences de liaison à l'ADN. Il est à noter que l'identification des activités nucléaires reconnaissant le promoteur de l'apoA-II a été rendue possible par la caractérisation d'activités qui se lient aux éléments régulateurs des promoteurs d'autres gènes, et par un progrès dans la purification et la caractérisation de nombreuses activités transcriptionnelles. Sur la base de ces informations, une variété d'oligonucléotides correspondants aux sites de liaison de facteurs connus ou aux éléments de régulation de gènes d'apolipoprotéines ou de gènes exprimés spécifiquement dans le foie ont été utilisés pour identifier ces facteurs par gel-retard.

Ces analyses montrent (**fig.6a**) que les éléments AB, K et L lient le facteur thermostable CIIIB1. Ce dernier a été purifié à partir d'extraits nucléaires hépatiques. Il a une masse moléculaire de 41 kDa, est connu pour se lier à la région -95 à -76 du promoteur de l'apoC-III et pour être un activateur de la transcription du gène apoCIII humain (Cardot et al., 1991; Ogami et al., 1990; Ogami et al., 1991). Les éléments AB et K lient aussi un facteur thermolabile désigné AIIAB1, et l'élément L lie les protéines C/EBP α et NFY qui reconnaissent le motif CCAAT (Cardot et al., 1991).

L'élément H lie le facteur hépatique déjà décrit, HNF1 (aussi appelé LFB1) (Frain et al., 1989).

L'élément I lie des activités apparentées à NF1. L'élément J fixe des récepteurs nucléaires qui

ont un rôle important dans la transcription des gènes des apolipoprotéines: le facteur HNF-4, un régulateur positif des gènes humains apoC-III, apoB, apoA-I et apoA-IV (Ladías et al., 1992; Mietus-Snyder et al., 1992; Metzger et al., 1993; Chang et al., 1993; Ochoa et al., 1994), le facteur PPAR qui active le promoteur de l'apoA-II (Vu-Dac et al., 1995) mais réprime les promoteurs des apoA-I (Vu-Dac et al., 1994) et C-III (Staels et al., 1995) et les facteurs ARP-1, Ear2 et Ear3 qui sont des régulateurs négatifs des gènes de l'apoCIII, de l'apoB et de l'apoA-I humaines (Ladías et al., 1992). L'élément J lie aussi les mêmes activités qui se fixent à l'élément D de l'apoA-I (-220 à -190) (l'élément D désigné ainsi d'après la nomenclature de Zannis correspond à l'élément A de la nomenclature de Karathanasis), AID1 α et AID2 qui sont des activités nucléaires hépatiques. La région J est également reconnue par les éléments L, C, D, G, AB et F lient tous l'activité C/EBP α , ainsi que des activités thermostables. Les éléments M, D, F lient de nouvelles activités encore non identifiées au niveau des promoteurs d'apolipoprotéine ou de gènes hépatiques, appelées AIIM1 et AIIM2 (présente dans le foie, absente de la lignée cellulaire Caco-2) pour l'élément M, AIID1, AIID2 et AIID4 pour l'élément D, AIIF2 pour l'élément F. L'élément N lie deux activités mineures (AIIN1 et AIIN2) et une activité majeure (AIIN3).

Les activités AIID1, AIID2 et AIID4 ont récemment été purifiées et caractérisées. Les travaux montrent que l'activité AIID2 est homologue à GABP, une protéine apparentée à Ets et consiste en trois protéines ayant des masses moléculaires comprises entre 54 et 63 kDA. Des analyses similaires montrent que l'activité AIID4 a une masse moléculaire de 130 kDA. L'activité AIID1 est capable, en plus de se lier à l'élément D de l'apoA-II, de se fixer sur l'élément régulateur C de l'apoCIII et jouerait probablement un rôle dans la régulation de la transcription de ces deux gènes. Les expériences montrent que les sites de liaison de AIID2 et AIID4 sont contigus sur D et que le site de liaison de AIID1 chevauche les deux sites précédents, ce qui suggère que les liaisons de AIID1 et de AIID2 ou de AIID1 et AIID4 seraient probablement exclusives, tandis que AIID2 et AIID4 se lieraient certainement en même temps (Cardot et al., 1994).

La contribution de certaines activités nucléaires à la transcription du gène de l'apoA-II a été étudiée par mutagenèse *ex vivo*.

Il a été montré que les substitutions nucléotidiques dans l'élément AB réduisent la transcription hépatique et intestinale respectivement à 60 et 36% du contrôle; les mutations dans le domaine L empêchant la fixation des activités se liant à la CCAAT box réduisent la transcription hépatique et intestinale à 30% du contrôle, ce qui indique l'importance de ces facteurs sur la

transcription; les délétions ou les substitutions nucléotidiques dans l'élément L et K réduisent la transcription dans les cellules hépatiques HepG2 respectivement à 25 et 20% du contrôle et dans les cellules intestinales Caco-2 respectivement à 8 et 4% du contrôle, ce qui montre que ces deux éléments jouent un rôle important dans la régulation; des substitutions nucléotidiques simultanées empêchant la liaison de l'activité CIIB1 sur les éléments AB, K et L réduisent la transcription hépatique et intestinale respectivement à 7 et 6% du contrôle. Les délétions et les substitutions nucléotidiques engendrées sur les éléments AB, K et L ainsi que leurs effets sont présentés dans la **figure 7**.

Il a été également observé que la délétion de l'élément D (construction 1 de la **figure 8**) ou les substitutions nucléotidiques dans l'élément D éliminant la liaison des activités AIID1 et/ou AIID4 mais pas celle de AIID2/GABP (construction 4 de la **figure 8**) augmentent la transcription dans les cellules HepG2 de 1.5 à 1.6 fois par rapport au site D sauvage (construction 2 de la **figure 8**). Ceci suggère que l'élément D occupé par les protéines AIID1 et/ou AIID4 (cas de la construction 3) se comporte comme un régulateur négatif par rapport à la construction où D est délété (construction 1) et que cet effet négatif est contrebalancé quand cet élément est occupé uniquement par le facteur AIID2/GABP (cas de la construction 4) (Cardot et al., 1994).

La délétion de l'élément H ou J réduit la transcription hépatique à 80% et 70% du contrôle respectivement. Celle de l'élément N réduit la transcription hépatique et intestinale à 7% et 18% du contrôle respectivement, prouvant ainsi le rôle décisif du site N.

Les premières études sur l'arrangement et les propriétés du promoteur de l'apoA-II ont suggéré que la spécificité de l'activité hépatique de ce promoteur serait contrôlée par des interactions synergiques et spécifiques de facteurs qui se lient aux régions régulatrices distales et proximales (Chambaz et al., 1991), ce qu'ont permis de préciser les travaux suivants. En effet, l'ensemble des expériences de délétion ou de substitution nucléotidique au niveau des éléments régulateurs et l'étude de l'activité du promoteur dans les cellules HepG2 et Caco-2 suggèrent que le facteur CIIB1 lié aux éléments AB, K, L, les activités nucléaires CCAAT box liées à L et l'activité AIIN3 liée à N interagissent entre eux de façon à moduler le niveau d'activation transcriptionnelle (**fig.6b**) (Cardot et al., 1993).

La connaissance du mécanisme précis conduisant à l'activation transcriptionnelle nécessitera l'isolement et la caractérisation de ces facteurs et l'analyse de leurs propriétés dans des systèmes de transcription *in vitro*.

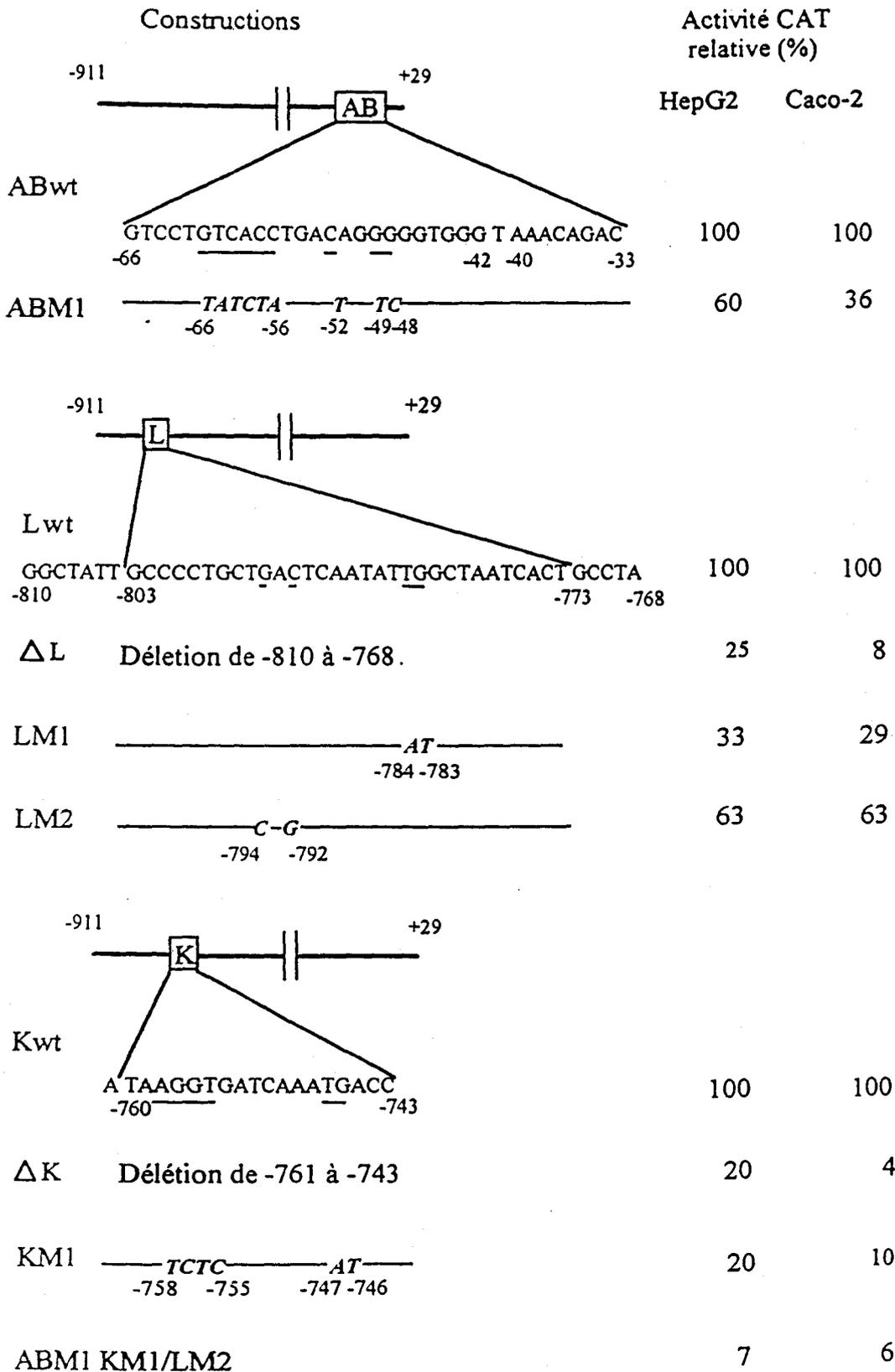


Figure 7: Effet des délétions et des substitutions nucléotidiques dans les éléments AIIAB, AIIK et AAIL du promoteur de l'apoA-II (-911/+29) sur la transcription du gène reporter CAT dans les cellules HepG2 et Caco-2 (d'après Cardot et al., 1991).

wt: séquence sauvage, M: séquence mutante; les nucléotides qui ont été substitués aux bases naturelles (soulignées au niveau des séquences sauvages) sont représentées en italique au niveau des séquences mutantes.

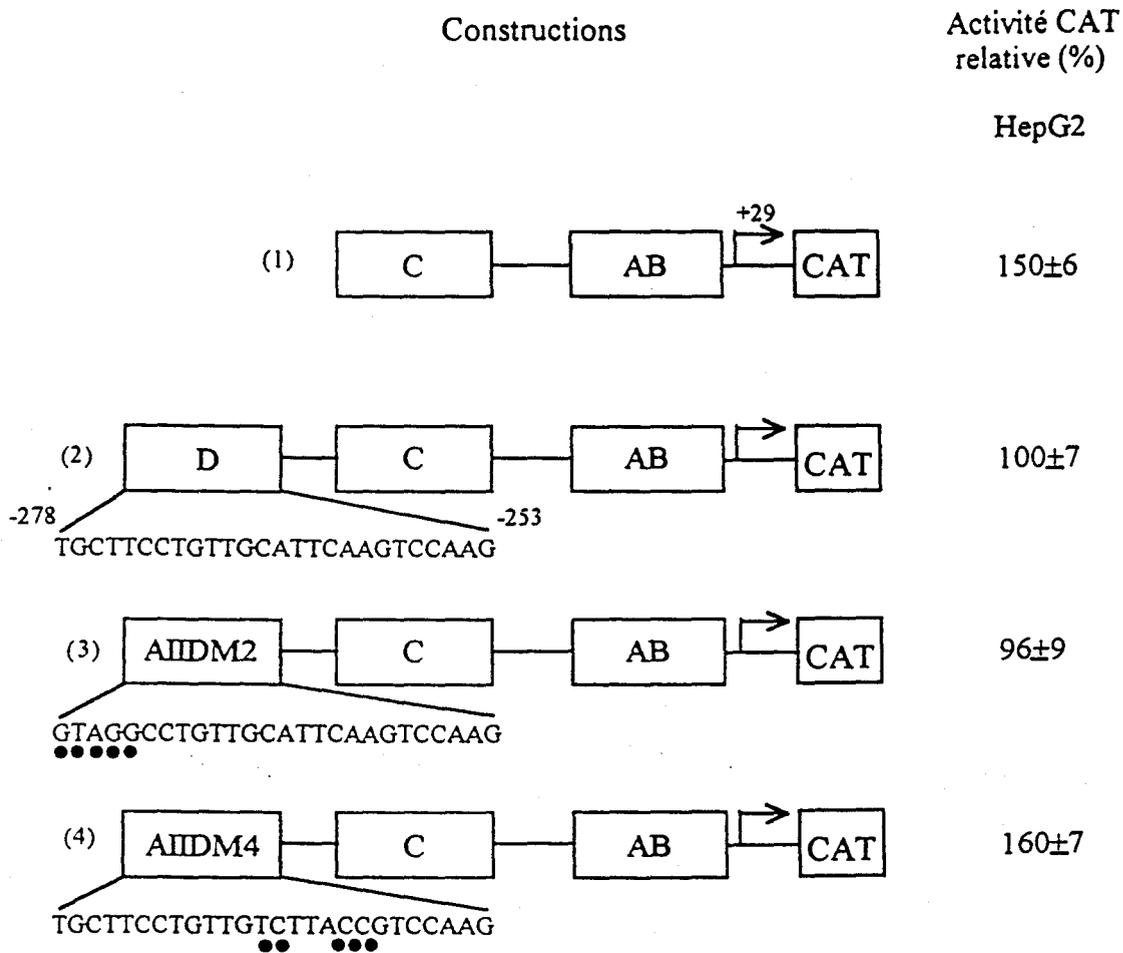


Figure 8:

Effet des substitutions nucléotidiques dans l'élément AIID du promoteur de l'apoA-II (-911/+29)

sur la transcription du gène reporter CAT dans les cellules HepG2 (d'après Cardot et al., 1994).

(1) : mutant de délétion du site D; (2) : construction de référence contenant le site D sauvage; (3) et (4): mutant de substitution du site D empêchant la fixation de AIID2/GABP pour AIIDM2 et de AIID1 et AIID4 pour AIIDM4. Les nucléotides soulignés d'un point noir représentent les bases mutantes.

En conclusion, ces études montrent que l'expression hépatique du gène de l'apoA-II est contrôlée par une combinaison de facteurs, et que l'importance de chaque facteur est déterminée par le contexte du promoteur. Il est à souligner que la multiplicité des éléments de régulation et des facteurs nucléaires participant à la régulation de ce gène est remarquable, et l'interaction de différents jeux de facteurs de transcription au niveau du promoteur conduit probablement à des niveaux différents de transcription. Pour cerner l'importance physiologique *in vivo* de ces éléments de régulation, il sera sans doute indispensable d'analyser la fonction de ces éléments dans des animaux transgéniques, ce qui permettra d'organiser ces nombreuses activités nucléaires sur le promoteur de l'apoA-II humaine.

Il est important de signaler que la complexité de la régulation du gène de l'apoA-II due aux multiples éléments en amont du site d'initiation de la transcription est encore augmentée par la présence d'éléments de régulation en aval de ce site, ce que montrent nos travaux expérimentaux.

Avant de présenter mon travail sur le rôle du premier intron de l'apoA-II humaine, nous décrivons des exemples d'éléments de régulation contenus dans les introns de différents gènes.

IV- Eléments de régulation contenus dans les introns de différents gènes: régulation de l'expression des gènes par les introns

Plus de cinquante travaux réalisés entre 1990 et 1993 mettent en évidence le rôle des introns dans la régulation des gènes dans divers systèmes cellulaires. Ces introns sont soit des activateurs de la transcription et ont un effet enhancer ou soit sont des inhibiteurs et ont un effet silencer. Ils ont tout ou partie des propriétés des séquences enhancers et silencers, c'est à dire, des effets indépendants de la distance et de l'orientation. Leur action est souvent tissu-spécifique. Ils peuvent intervenir à un moment précis de la différenciation de l'organisme. Les paragraphes suivants illustrent les capacités de la régulation des gènes par les introns sur quelques exemples qui montrent parfois une certaine complexité. Certains exemples de gènes cités codent pour des apolipoprotéines. L'ensemble des résultats a été obtenu par transfection transitoire sur des modèles cellulaires animaux ou dans la levure par transformation du gène de la protéine ribosomale de ce microorganisme, sauf pour l'intron II de l'apoB où ce type d'analyse a été complété par une étude en transgénèse.

A- Gènes codant pour des protéines autres que les apolipoprotéines

Les principales propriétés transcriptionnelles des introns de ces gènes sont présentées dans le Tableau V.

1- Collagène II de rat

L'étude des régions de régulation du gène de collagène II de rat montre que le promoteur et une séquence enhancer contenue par le premier intron de ce gène sont requises pour l'activation de la transcription dans des chondrocytes isolés d'embryon de poulet. Ces éléments ont une activité tissu-spécifique puisqu'ils n'ont pas d'activité dans les cellules qui ne synthétisent pas le collagène II (Savagner et al., 1990).

2- Protéine de matrice de cartilage de poulet

Un enhancer localisé dans le premier intron du gène de la protéine de matrice de cartilage de poulet exerce une stimulation chondrocyte-spécifique sur l'activité d'un promoteur hétérologue; ce même fragment a cependant un effet négatif dans les fibroblastes (Kiss et al., 1990).

3- Platelet Derived Growth Factor bêta humain (PDGF β humain)

L'intron I du gène PDGF β humain est un exemple complexe de régulation puisqu'il contient deux éléments ayant une activité enhancer orientation dépendante, l'un agissant spécifiquement dans les cellules de choriocarcinome JEG-3, et l'autre actif dans ces mêmes cellules et les cellules d'ostéocarcinome U2-OS; il renferme de plus un élément de régulation négatif spécifique des cellules U2-OS (Franklin et al., 1991).

4- Gène HLA-DRA humain (Human Leucocyte Antigen - sous région DR - spécificité A)

Un enhancer spécifique des cellules lymphoïdes localisé dans le premier intron du gène HLA-DRA humain permet une expression élevée de HLA-DRA dans les cellules B et T activées (Peterlin et al., 1991).

5- Gène de la chaîne kappa des immunoglobulines

Le facteur nucléaire NF-kappa B produit durant le processus d'inflammation est indispensable à la maturation des chaînes kappa des immunoglobulines. Il est présent dans divers types cellulaires. Cependant, la maturation se déroule uniquement dans les cellules B.

Cette spécificité est déterminée par des séquences de l'intron majeur du gène kappa: il éteint spécifiquement l'expression du gène dans les cellules non B et l'active dans les cellules B en fixant le facteur NF-kappa B (Pierce et al., 1991).

6- Collagène α 1-IV de souris

Un enhancer a également été localisé dans le premier intron du gène du collagène alpha1-IV de souris; les études dans des cellules F9 de tératocarcinome non différenciées ont montré qu'il contient deux régions régulatrices, dont l'une fixe un ou des facteurs de transcription requis pour la transcription des gènes des chaînes alpha1 et alpha2 du collagène IV (Burbelo et al., 1991).

7- Purine nucléoside phosphorylase humaine (PNP)

L'utilisation de minigènes PNP contenant tout ou partie des introns du gène de la purine nucléoside phosphorylase humaine montre, au niveau de cellules NIH 3T3 de souris, que l'expression du gène PNP dépend de la présence des séquences introniques et que le niveau d'expression de ce gène varie en fonction du nombre d'introns présents. L'effet important de l'intron I peut être expliqué par la présence d'un élément enhancer fonctionnant dans les deux orientations, en amont et en aval d'un gène chimérique (Jonsson et al., 1992).

8- Sous-unité C3 de la prostatéine du rat

L'intron I du gène de la sous-unité C3 de la prostatéine du rat régulé par les androgènes contient des séquences de contrôle potentiel cis-activatrices renfermant de nombreux palindromes partiels ressemblant à des éléments de réponse pour les récepteurs aux glucocorticoïdes et à la progestérone; une région de 0.5 kb de ce premier intron contient aussi deux séquences capables de fonctionner comme des éléments de réponse aux androgènes dans les cellules CV-1 (Tan et al., 1992).

9- Thymidylate synthase de souris

Le gène de la thymidylate synthase de souris est fortement exprimé dans les cellules en prolifération par rapport aux cellules quiescentes; les expériences de transfection réalisées dans les fibroblastes 3T6 de souris montrent que les introns I, II, V et VI contiennent des éléments de séquence nécessaires à l'expression normale de ce gène régulé par la croissance; ces séquences fonctionnent en coopération avec des éléments de régulation situés en aval de façon

à générer une expression normale et spécifique durant la phase S (Ash et al., 1993); elles sont aussi associées à des séquences importantes pour l'épissage, et les mêmes auteurs ont d'ailleurs mis en évidence, dans des fibroblastes de hamster chinois TS (-) V79, le rôle déterminant de la séquence donneur de splicing de ces introns pour leur activité (Korb et al., 1993).

10- β-3 tubuline de drosophile

Le premier intron du gène de la β-3 tubuline de drosophile contient des éléments de régulation hormone-dépendant positifs et négatifs qui peuvent agir dans les deux sens et indépendamment de leur position; les éléments négatifs qui répriment la transcription en l'absence de 2-OH ecdysone, une hormone stéroïde activant la transcription du gène de la bêta-3 tubuline, ont les caractéristiques d'un silencer (Bruhat et al., 1990).

11- Protéine ribosomale de levure

Il existe un mécanisme particulier de répression de la transcription pour le gène RPL32 de la protéine ribosomale de Levure: le transcrit de ce gène semble participer à un contrôle feedback du splicing de l'unique intron de ce gène dans la souche S 150-2B de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette autorégulation du splicing présente une analogie frappante avec l'autorégulation de la traduction des protéines ribosomales chez *Escherichia coli* (Dabeva et al., 1986).

12- Very low density apolipoprotein A-II de poulet

Le gène de la very low density apolipoprotein A-II de poulet est régulé de façon dose-dépendante par les oestrogènes dans les cellules LMH (Leghorn Strain M Hepatoma) en fonction du temps. Quatre régions régulatrices situées entre le motif TAATA en -26 et l'élément de réponse aux oestrogènes en -171 sont indispensables à la régulation de ce gène. De plus, l'intron I semble avoir une contribution importante dans cette régulation, comme sa présence active fortement l'expression oestrogène-dépendante. Deux régions distinctes de l'intron contribuent à cette régulation (Berkowitz et al., 1992).

B- Gènes codant pour des apolipoprotéines

Les principales propriétés transcriptionnelles des introns de ces gènes sont présentées dans le **Tableau VI**.

1- Apolipoprotéine E humaine

L'intron I du gène de l'apolipoprotéine E humaine contient un élément enhancer montrant une spécificité tissulaire partielle; une protéine "Sp1 like" serait impliquée dans l'activité de ce domaine régulateur (Paik et al., 1988). Cet élément enhancer apparaît être constitué de deux régions, l'une de ces régions a une action inhibitrice non tissu-spécifique dans les cellules HepG2 et HeLa, tandis que l'autre a une action inhibitrice seulement dans la lignée HeLa (Smith et al., 1988).

2- Apolipoprotéine A-I de singe

Il a été observé dans la lignée HepG2 une différence dans l'activité du promoteur du gène de l'apolipoprotéine A-I de singe provenant de deux espèces distinctes de primates, le singe vert d'Afrique et le singe Cynomolgus. La comparaison de la séquence du gène de l'apoA-I entre ces deux races de singe montre une variation portant essentiellement sur le premier intron, et les auteurs proposent que cet intron influence la transcription de l'apoA-I, toutefois sans pouvoir préciser le sens de la régulation (Sorci et al., 1991).

3- Apolipoprotéine B humaine

C'est le gène d'apolipoprotéine où l'intervention d'introns dans la régulation des gènes a été le mieux décrit, tant au niveau des séquences introniques qu'au niveau des facteurs nucléaires intervenant.

L'intron II de ce gène renferme un enhancer tissu-spécifique, actif dans les lignées HepG2 et Caco-2, et inactif dans la lignée CHO. Cet activateur renferme une région de 147 bp ayant une activité enhancer significative et contenant une seule fenêtre de footprint de 97 bp. Cette fenêtre renferme 4 sites distincts qui peuvent lier 9 protéines de foie. L'une d'entre-elles a été identifiée comme étant HNF1 et elle se lie avec une faible affinité à la moitié 5' d'un palyndrome de 20 bp localisé en 5' du footprint. Un site de liaison pour C/EBP ou une protéine apparentée a aussi été identifié dans le centre du footprint; il chevauche ou coïncide avec les sites de liaison de cinq autres protéines, et deux d'entre-elles semblent distinctes de la famille des protéines C/EBP. Il est à noter qu'un site de liaison pour un facteur nucléaire appelé protéine I a été localisé entre les sites de fixation pour HNF1 et C/EBP. Enfin, il a été montré que les 15 bp situés en 3' du footprint contiennent un site de fixation pour une autre protéine appelée protéine II. Aucun de ces sites pris individuellement n'est suffisant pour activer la transcription du promoteur de l'apoB humaine. HNF1 et C/EBP doivent agir en synergie avec

la protéine II pour activer la transcription de l'apoB humaine (Brooks et al., 1991; Brooks et al., 1992).

L'intron III du gène de l'apoB humaine renferme lui aussi un enhancer tissu-spécifique, actif dans HepG2 et Caco-2, inactif dans HeLa; cette activité a été localisée dans un segment de 155 bp, flanqué de deux sites hypersensibles à la DNase I. Les expériences de footprint ont mis en évidence 3 fenêtres à l'intérieur de ce segment; l'une d'entre-elles contient des sites de liaison potentiels pour trois facteurs nucléaires spécifiques du foie (C/EBP, TGT3, HNF-2). Les expériences suggèrent que cet enhancer agit par un mécanisme similaire à celui précédemment décrit pour l'enhancer du second intron, mécanisme qui impliquerait une interaction avec la machinerie basale de la transcription (Levy-Wilson et al., 1992).

L'utilisation de souris transgéniques a permis de montrer, à la différence de ce qui se passe dans les cellules en culture, que le promoteur de l'apoB seul est incapable d'activer la transcription et l'enhancer de l'intron II est nécessaire pour spécifier la transcription du gène de l'apoB dans le foie de ces souris, mais n'est pas utile pour la spécifier dans le petit intestin, ce qui suggère que cet enhancer contrôle *in vivo* la tissu-spécificité de l'expression de l'apoB (Brooks et al., 1994).

Il est intéressant de constater que les effets de cet enhancer mesurés *in vitro* et *in vivo* respectivement dans les cellules HepG2 et dans des hépatocytes peuvent être mis en parallèle. Par contre, il n'en est pas de même pour les cellules Caco-2 et le petit intestin des souris transgéniques.

L'enhancer de l'intron III a par contre un effet mineur sur l'activité du promoteur de l'apoB au niveau du foie de ces souris, on ne retrouve donc pas *in vivo* ce qui a été observé *in vitro* sur les cellules HepG2 (Brooks et al., 1994).

Les **Tableaux V et VI** résument ces quelques exemples et mettent clairement en évidence que les introns dotés d'un pouvoir régulateur sur la transcription sont dans la plupart des cas des activateurs (16 exemples d'activation pour 6 de répression). En définitive, il apparaît original et fondamental de découvrir de nouveaux introns ayant des capacités de répresseur de la transcription, notamment au niveau de gènes dont la surexpression entraînerait des complications médicales désastreuses s'ils n'étaient pas réprimés normalement.

Gènes	Cellules ou tissus	Intron	Effet de l'intron
Collagène II de rat	Chondrocytes d'embryon de poulet	I	+
Protéine de matrice de cartilage de poulet	Chondrocytes d'embryon de poulet	I	+
	Fibroblastes d'embryon de poulet		-
PDGF β humain	Choriocarcinome JEG-3	I: a+b+c a	+
	Choriocarcinome JEG-3 et Ostéocarcinome U2-OS	b	+
	Ostéocarcinome U2-OS	c	-
HLA-DRA humain	Cellules B et T activées	I	+
Chaines Kappa des immunoglobulines humaines	Cellules B	I	+
	Cellules non B		-
Collagène α 1(IV) de souris	Cellules F9 de tératocarcinome non différenciées	I	+
Purine nucléoside phosphorylase humaine	Cellules NIH3T3 (souris)	I	+
Sous-unité C3 de la prostatéine de rat	Cellules CV-1 (rein de singe vert d'Afrique)	I	+
Thymidylate synthétase de souris	Fibroblastes de souris 3T6	I, II, V, VI	+
β 3 tubuline de drosophile	Cellules Kc de drosophile	I: a+b a	+
		b	-
Protéine ribosomale de levure RPL32	Saccharomyces cerevisiae	unique	-
Very low density apolipoprotein A-II de poulet	Cellules LMH	I	+

Tableau V:

Régulation des gènes par les introns: gènes et cellules concernés, numérotation et effet de l'intron

+ : effet activateur, - : effet répresseur; a, b, c : différents éléments de régulation d'un même intron.

Gènes	Cellules ou tissus	Intron	Effet de l'intron
Apolipoprotéine A-I de singe	Cellules HepG2	I	?
Apolipoprotéine E humaine	Cellules HepG2	I: a+b	+
	Cellules HepG2 et HeLa	a	+
	Cellules HeLa	b	-
Apolipoprotéine B humaine	Cellules HepG2, Caco-2	II	+
	Cellules HepG2, Caco-2	III	+

Tableau VI:

**Régulation des gènes codant pour les apolipoprotéines par les introns:
gènes et cellules concernés, numérotation et effet de l'intron**

+ : effet activateur, - : effet répresseur; a, b : différents éléments de régulation d'un même intron.

V- La répression de la transcription des gènes chez les Eucaryotes

La synthèse de l'ARNm est le premier niveau de contrôle dans la régulation de l'expression d'un gène. Les cellules répondent à des signaux intra- et extracellulaires en activant ou en inhibant certains gènes et en modulant le degré de transcription de gènes activés. Chez les Eucaryotes supérieurs, ces régulations transcriptionnelles s'intègrent dans un programme permettant de mettre en place au cours du développement et de la différenciation des structures et des fonctions spécialisées. Au cours de la vie adulte, ces fonctions sont maintenues et doivent répondre aux conditions de l'environnement.

La transcription peut être régulée à plusieurs niveaux et ces différents niveaux de régulation existent simultanément à tout moment et sont interdépendants. Ils sont à la base de la mise en place du phénotype cellulaire.

Avant de décrire les mécanismes de la répression de la transcription, nous ferons quelques rappels sur le mécanisme de l'activation de base de la transcription des gènes chez les Eucaryotes, afin de mieux comprendre ceux de la répression.

A- L'initiation de la transcription

Chez les Eucaryotes, l'initiation de la transcription des gènes codant pour les protéines (gènes de classe II) est effectuée par l'ARN polymérase II (pol II). Celle-ci réalisera la transcription de l'ADN en ARN à partir du site de démarrage de la transcription (site cap).

La présence de séquences d'ADN particulières (boite TATA), séquences initiateurs (Inr) et d'un certain nombre de facteurs protéiques généraux conditionne le positionnement correct de l'enzyme sur l'ADN, sans lequel elle ne peut fonctionner. Ces facteurs s'ordonnent sur l'ADN pour former un complexe de préinitiation de la transcription (Roeder, 1991).

La première étape de formation de ce complexe est la fixation du facteur TFIID sur la boite TATA. Ce facteur est en réalité un complexe multiprotéique. Il comprend un polypeptide ayant la capacité de reconnaître et lier l'ADN au niveau de la boite TATA, appelé TBP (pour "TATA binding protein"), et environ une dizaine de polypeptides nommés "TBP associated factors" ou TAFs. L'ensemble TBP/TAFs constitue TFIID. Le facteur TFIIA interagit avec TBP, stabilisant l'association TFIID/ADN. Puis intervient TFIIIB qui, en se positionnant au niveau du site cap, permet l'entrée de pol II dans le système. Cette dernière, associée à TFIIIF, peut alors se positionner correctement sur l'ADN. TFIIIE, TFIIH et TFIIJ se joignent à cet assemblage pour compléter le complexe (Zawel et Reinberg, 1992).

En présence d'énergie (ATP), pol II subit une translocation et commence à "lire" le gène. Ceci nécessite la présence de protéines associées à pol II ou RAPs (RNA polymerase associated proteins), dont font partie TFIIE et TFIIIF (Greenblatt, 1991).

Les gènes des apolipoprotéines possèdent tous une boîte TATA mais certains gènes, parmi lesquels de nombreux "housekeeping genes" qui sont exprimés constitutivement, n'en ont pas. Dans ce cas, pol II se met en place par des voies alternatives. Les éléments d'ADN impliqués sont des Inr, séquences riches en pyrimidines localisées au niveau du site cap. Elles sont la cible du facteur TFII-I qui recrute alors TFIID pour lui permettre de se lier à l'ADN. Le facteur TFIIA n'intervient pas dans ce contexte. Enfin, certains promoteurs disposent à la fois d'une boîte TATA et d'une séquence Inr. L'assemblage du complexe peut alors démarrer indifféremment à partir de TFIID ou de TFII-I (Roeder, 1991 et références incluses).

L'ensemble des facteurs dont nous avons décrit l'assemblage est de distribution ubiquitaire, utilisé par la plupart des gènes de classe II. L'ensemble des éléments sur lesquels ils interagissent constitue le noyau du promoteur, ou promoteur minimal. Ce noyau est capable à lui seul d'initier la transcription *in vitro*, mais *in vivo*, des interactions fonctionnelles sont nécessaires pour réguler son activité. Cette fonction est remplie par les éléments régulateurs localisés sur l'ADN (éléments cis) et par les facteurs de transcription (éléments trans) (voir paragraphe facteurs de transcription). Le lien entre ces éléments et le complexe de préinitiation de la transcription est effectué par les coactivateurs (voir paragraphe protéines auxiliaires). Ces derniers établissent des interactions protéine-protéine permettant de rapprocher physiquement le complexe de préinitiation de la transcription des éléments régulateurs situés en amont.

B- Régulation de la transcription

La transcription peut être régulée à plusieurs niveaux:

- par l'accessibilité de la région d'ADN à transcrire; nous développerons ce mode de régulation au niveau de la description des mécanismes de répression de la transcription.
- par l'existence sur l'ADN d'éléments cis (promoteurs, enhanceurs et silencers), cibles de facteurs nucléaires (**fig.9a**) dont la distribution cellulaire et tissulaire détermine non seulement le degré, mais aussi le lieu d'activation des gènes. Ces différents niveaux de régulation existent simultanément à tout moment et sont interdépendants. Ils sont à la base de la mise en place du phénotype cellulaire.

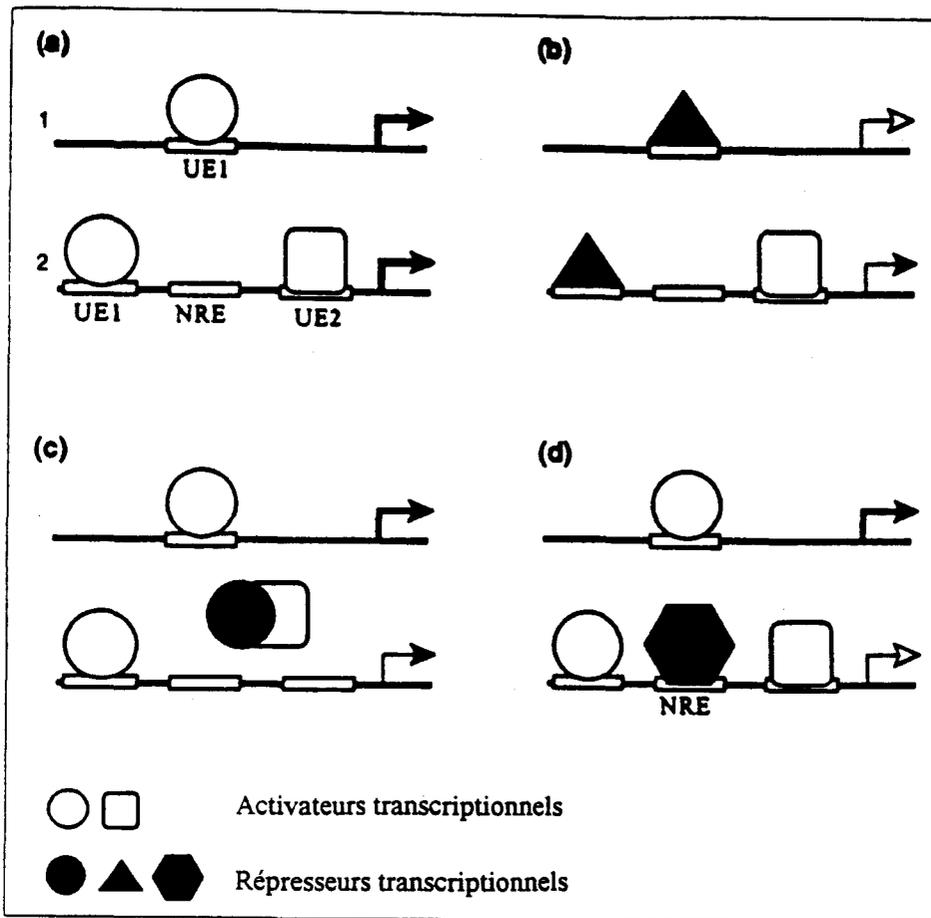


Figure 9:

Modèles de répression de la transcription: régulation de deux promoteurs hypothétiques simplifiés contenant un ou deux éléments positifs cis-régulateurs (UE1 et UE2) et un élément de régulation négatif (NRE)

(d'après Cowell, 1994)

(a) Pas de répression: la transcription est activée par des facteurs de transcription agissant positivement (cercles et carrés clairs) liés à UE1 et UE2, et la transcription des deux gènes est élevée (flèches grasses)

(b) Répression compétitive: les deux gènes sont réprimés par un répresseur (triangle noir) qui compétitionne pour la liaison à UE1. L'étendue de la répression dépend des proportions relatives de l'activateur et du répresseur en compétition, de leurs affinités relatives pour la liaison à UE1 et de la contribution des autres activateurs fixés sur les autres sites. Dans ce modèle, le gène 1 est réprimé plus fortement que le gène 2 car UE1 est le seul élément cis-régulateur important de son promoteur.

(c) Titration: le répresseur (cercle noir) forme un complexe protéine-protéine inactif avec l'activateur transcriptionnel qui se lie à UE2, résultant en la répression du gène 2. Le gène 1, où manque le site UE2, n'est pas affecté par la répression.

(d) Répression transcriptionnelle active: le gène 2 est sélectivement réprimé par un répresseur actif (hexagone noir) qui se lie au NRE de son promoteur. Le gène 1, où manque le site de liaison du répresseur, n'est pas affecté par la répression.

1- Éléments cis-régulateurs

Chez les Eucaryotes, un assortiment d'éléments régulateurs est réparti, à la fois en amont et en aval du site de démarrage de la transcription. Chaque gène, dans une cellule, possède une combinaison particulière d'éléments cis-régulateurs, positifs et négatifs, organisés de manière unique. Ces éléments localisés sur l'ADN peuvent être considérés comme composés de multiples éléments génétiques, ou modules. L'information régulatrice portée sur chaque module est ainsi reconnue par la machinerie transcriptionnelle, et conduit à la mise en place de profils de régulation transcriptionnelle propre à chaque gène (Dyran, 1989; Mitchell et Tjian, 1989).

a- Les promoteurs

Ils correspondent à un groupe de modules proches du site cap. Chaque module est composé de petits éléments de 7 à 20 bp d'ADN, contenant un ou plusieurs sites de fixation pour des protéines régulatrices. Au moins un des modules a pour fonction de positionner le complexe d'initiation de la transcription, c'est le rôle de la boîte TATA, par exemple, ou des Inr (voir paragraphe initiation). Cet ensemble constitue le noyau du promoteur, ou promoteur minimal.

Les modules situés en amont sont requis pour l'obtention d'une transcription régulée sélectivement. Ils permettent la transcription du gène à un niveau détectable, que ce soit en expériences d'expression transitoire sur des cellules en culture, dans un système de transcription reconstitué *in vitro*, ou dans des souris transgéniques.

Le plus souvent, ils sont localisés entre 30 et 200 bp en amont du site cap. Les promoteurs des gènes de classe II contiennent fréquemment des boîtes GC et CAAT, cibles de facteurs à distribution ubiquitaire (Sp1, NF-1, NFY). Des modules moins fréquents, mais largement répandus, portent des séquences régulatrices adaptées à chaque type de gène:

- séquences cibles de facteurs transcriptionnels dont la distribution tissulaire est réduite, pour des promoteurs tissu-spécifiques.
- ou impliquées dans la réponse à un signal cellulaire (hormone, stress, facteurs de croissance) dans le cas des promoteurs inductibles.

b- Les enhancers et les silenciers

Les enhancers et les silenciers sont organisés en modules de la même manière que les promoteurs, sur de courts segments d'ADN de 100 à 300 bp. Ils sont également la cible de facteurs ubiquitaires ou spécifiques, ces derniers générant des enhancers ou des silenciers tissu-spécifiques. A la différence des promoteurs, qui sont nécessaires à l'initiation d'une transcription fidèle et efficace, les enhancers et les silenciers agissent plutôt respectivement en

augmentant ou en diminuant le taux d'initiation de la transcription. Ils sont capables d'agir sur des promoteurs homologues ou hétérologues, indépendamment de leur orientation, de la distance et de la position du promoteur auquel ils sont liés. Ils peuvent fonctionner à distance éloignée de la région promotrice: l'enhancer du gène de l'albumine est situé 10 kb en amont du site d'initiation de la transcription (Pinkert et al., 1987). Ils sont parfois localisés en aval du site d'initiation de la transcription: nous avons vu précédemment que le gène de l'apoB humaine possède deux enhanceurs situés dans les deuxième et troisième introns.

Ces éléments peuvent être impliqués dans une régulation transcriptionnelle déterminant une tissu-spécificité ou dépendant d'un signal, tel un stress (choc thermique, etc....), des facteurs de croissance, des hormones ou des nutriments.

2- Les facteurs de transcription

Le phénotype d'une cellule est le résultat de l'expression spécifique de gènes qui sont régulés différemment en réponse à des signaux complexes lors du développement et émanant de l'environnement. Les patterns de régulation transcriptionnelle d'un gène ou d'un groupe de gènes sont déterminés en premier lieu par des interactions spécifiques entre l'ADN et les protéines qui ont lieu au niveau des régions de régulation, et plus spécifiquement sur les régions enhanceurs et silencers. Les protéines possédant cette fonction régulatrice sont appelées facteurs de transcription. Chez l'homme, il a été estimé que 10% de l'ensemble des gènes codent probablement pour des facteurs de transcription (Kingston et Green, 1994). D'ailleurs, un nombre élevé de facteurs a déjà été isolé et caractérisé (Faisst et Meyer, 1992). La comparaison de la séquence nucléique et protéique des facteurs connus a montré quelques homologies au niveau des différentes régions fonctionnelles de ces protéines et a révélé une structure modulaire. Les régions fonctionnelles d'un facteur de transcription comprennent les domaines de localisation nucléaire, de liaison à l'ADN, de dimérisation, de liaison du ligand et de transactivation (**Fig. 10**). Les chercheurs ont classé, selon les homologies rencontrées au niveau du domaine de liaison à l'ADN, les facteurs de transcription en plusieurs grandes familles parmi lesquelles on trouve la famille des protéines ayant un motif de liaison en hélice-coûde-hélice, en hélice-boucle-hélice, en doigt à zinc, en leucine zipper ou apparenté à celui du facteur Rel. Cependant, certains facteurs découverts récemment n'appartiennent à aucune de ces familles et restent non classés. Le facteur HNF-4 est un exemple de facteur à doigt de zinc dont on développera les propriétés en deuxième partie.



FONCTION

Liaison à l'ADN



Liaison au ligand



Dimérisation



Localisation nucléaire



Transactivation

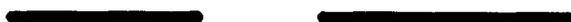


Figure 10:
 Organisation structurale et fonctionnelle des facteurs de transcription
 (d'après Wahli et Martinez, 1991)

Ils sont divisés en six régions A à F. La région la plus conservée (région C), impliquée dans la liaison à l'ADN, comporte deux doigts de zinc dans lesquels l'ion métallique est coordonné à deux paires de résidus cystéines. La dimérisation implique des interactions faibles entre les domaines C et fortes entre les domaines de liaison des ligands (E). La longueur des domaines A/B et F est variable entre les récepteurs, et la fonction du domaine F est encore inconnue.

La régulation des gènes implique une interaction spécifique entre le domaine de liaison à l'ADN et un élément de réponse spécifique, ce qui engendre selon le facteur, la transactivation ou la transrépression (voir paragraphe mécanismes de la répression de la transcription). Ce type d'interaction ne peut expliquer à lui seul la très grande spécificité requise pour réguler de complexes profils d'expression de gènes chez les Eucaryotes supérieurs. Néanmoins, l'existence de différents domaines fonctionnels sur un facteur de transcription ouvre un vaste champs de possibilités de régulations:

- compétition entre facteurs positifs et négatifs pour le même site de fixation à l'ADN, ce que nous détaillerons ci dessous.
- fixation mutuellement exclusive sur des sites chevauchants pouvant dépendre de l'affinité et de l'abondance des facteurs.
- formation d'homo- et d'hétérodimères à l'intérieur des familles de facteurs permettant de démultiplier les possibilités de régulation à partir d'un nombre plus restreint de protéines (modification de l'affinité ADN/protéine, reconnaissance de séquences d'ADN différentes, inactivation du domaine d'activation).
- interaction protéine-protéine: séquestration dans le cytoplasme, coopérativité de fixation sur des sites topologiquement proches, ou coopérativité d'activation, conduisant à une augmentation de chacun des effets pris séparément (synergie).
- liaison d'un ligand pouvant induire la liaison à l'ADN ou l'activation.
- modifications post-traductionnelles: phosphorylation (pouvant intervenir sur la localisation cellulaire des facteurs, la liaison à l'ADN, le domaine d'activation).

Le but de ces différentes interactions est qu'un facteur lié à l'ADN puisse interagir avec un ou plusieurs éléments de la machinerie transcriptionnelle, pour le rapprocher de l'ADN et/ou changer sa conformation sur l'ADN. Ces événements induisent, ou complètent, la formation du complexe de préinitiation de la transcription. Les facteurs permettront, en créant une organisation moléculaire optimale, la mise en place et le maintien d'un phénotype cellulaire, ainsi que la réponse rapide à un stimulus extracellulaire. En résumé, ils sont le support de la régulation transcriptionnelle.

3- Les protéines auxiliaires

La fonction principale du domaine d'activation est d'interagir directement ou indirectement avec d'autres composantes du complexe d'initiation de la transcription. Dans le cas du contact indirect, des protéines de pontage sont nécessaires pour la formation du complexe de

transcription qui transduit le signal d'activation. Selon la présence ou l'absence du domaine d'activation au niveau du facteur de transcription, on distingue deux formes différentes de protéines de pontage. Quand le facteur de transcription possède seulement une fonction de liaison à l'ADN, l'activité de pontage est appelée un adaptateur. Toutefois, lorsque le facteur de transcription possède également une fonction transactivatrice, la protéine de pontage est désignée sous le terme de coactivateur. Un troisième groupe de protéines auxiliaires existe: ce sont les protéines accessoires qui ne contactent pas directement les facteurs de transcription généraux, mais contribuent indirectement au potentiel de transactivation des molécules activatrices (Martin, 1991).

L'adaptateur, le coactivateur aussi bien que l'activateur lui-même (le facteur de transcription possédant la fonction transactivatrice) interagissent avec des composants de la machinerie d'initiation de la transcription. Ce complexe, que nous avons décrit précédemment, est constitué par l'assemblage des facteurs généraux de la transcription (TFIIA, B, D, E, F, H, I, J) et l'ARN polymérase II. TFIID est particulièrement intéressant puisque, rappelons-le, c'est un complexe de plusieurs sous-unités composé des protéines TBP et de nombreux facteurs TAFs, et on pense que des classes différentes d'activateurs interagissent directement avec des TAFs distincts (Tjian et Maniatis, 1994). D'autres constituants du complexe basal de la transcription, tel TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF et TFIIH sont des cibles potentiels pour les activateurs (Tjian et Maniatis, 1994).

Si ces protéines auxiliaires peuvent agir positivement sur la transcription (Hahn, 1993), il faut cependant savoir que certaines études ont montré que des quantités élevées de ces molécules diminuent les niveaux d'activation de la transcription. Ce phénomène est appelé le squelching (Drapkin et al., 1993).

C- Les mécanismes de la répression de la transcription des gènes

En plus des influences régulatrices précédemment décrites, existent de nombreux mécanismes de répression jouant, soit sur l'accessibilité de la région d'ADN à transcrire et dépendant du degré de compaction de la chromatine et de la méthylation du génome, soit faisant intervenir des molécules spécialisées dans la répression de la transcription.

1- Degré de compaction de la chromatine: les structures chromatiniennes très ordonnées sont inaccessibles à l'ARN polymérase II et aux facteurs de transcription, et sont partiellement rompues au voisinage des gènes transcrits (Dillon et Grosfeld, 1994; Svaren et Hörz, 1994;

Wolffe, 1994); cependant, le core nucléosomique est toujours un obstacle à la transcription: les nucléosomes inhibent l'initiation de la transcription lorsqu'ils se trouvent sur les séquences du promoteur, et une partie de la fonction de certains activateurs de la transcription est de déplacer ou remanier les nucléosomes au niveau des promoteurs.

L'exemple de l'enhancer de l'intron III du gène de l'apoB humaine, que nous venons de décrire précédemment illustre bien ce mode de répression de la transcription. Cet enhancer a un effet tissu-spécifique: il est actif dans les cellules HepG2, où l'apoB est exprimée, inactif dans les cellules Hela où l'apoB ne l'est pas (Levy-Wilson et al., 1992). Pour expliquer cette tissu-spécificité, il faut tenir compte du fait que la structure de la chromatine au niveau de l'intron III est différente entre les cellules HepG2 et les cellules HeLa, ce que montrent les expériences de digestion à la DNase I et à la nucléase micrococcalle. Les auteurs proposent, qu'au niveau des cellules HepG2, les nucléosomes occupent des positions définies sur l'intron III tout en laissant disponibles les sites de régulation qui interagissent avec les facteurs de transcription indispensables à l'effet activateur, et au niveau de certains petits segments d'ADN, un ou deux nucléosomes sont probablement absents ou retirés, si cela est nécessaire, afin de recevoir des facteurs additionnels. Par contre, l'arrangement des nucléosomes dans les cellules HeLa serait différent; là, les séquences d'ADN cibles des facteurs activateurs seraient masquées ou enfouies dans les nucléosomes, peut-être à la suite d'un remaniement de l'agencement des nucléosomes, ce qui aurait pour résultat de bloquer la liaison de ces facteurs de transcription et de diminuer la transcription du gène de l'apoB (Levy-Wilson et al., 1992).

2-Méthylation du génome: les gènes d'expression tissu-spécifique sont souvent hyperméthylés dans les tissus n'exprimant pas ces gènes, et hypométhylés dans les tissus les exprimant (Razin et Szyf, 1984; Eden et Cedar, 1994). Il y a donc une relation entre activité transcriptionnelle et degré de méthylation de l'ADN. Plus précisément chez les Vertébrés, une corrélation positive existe entre l'hypométhylation des paires GpG des séquences promotrices, les régions sensibles à la DNase I et la transcription (Gross et Garrard, 1988).

3-Molécules répressives: elles inhibent la transcription d'une manière plus spécifique et sont partagées en deux classes, passives et actives. Les répresseurs passifs diminuent l'activité d'un ou plusieurs facteurs de transcription activateurs par l'intermédiaire d'une compétition pour leur site de liaison à l'ADN par exemple; les répresseurs actifs possèdent par contre une activité répressive intrinsèque et inhibent l'initiation de la transcription directement.

3.1- Les répresseurs passifs et leur mode d'action

a- Compétition

Ils agissent par compétition avec les facteurs transactivateurs pour les sites de liaison à l'ADN ou par encombrement stérique entre les répresseurs et les facteurs de transactivation (**fig.9b**), ce qui est illustré par le cas de la répression de nombreux gènes par une GC box binding protéine qui ferait une compétition avec le facteur de transcription Sp1 (Kageyama et Pastan, 1989). Ces répresseurs agissent le plus souvent comme compétiteurs pour les sites de liaison à l'ADN spécifiques d'activateurs transcriptionnels. Cependant, il existe de nombreux cas où la répression résulte d'une compétition entre deux activateurs différents, et non entre un activateur et un répresseur. La répression par compétition est fréquente entre les facteurs de transcription de la famille des récepteurs nucléaires. Un exemple type est la suppression de l'induction par les oestrogènes du gène de la lactoferrine de souris, par le facteur de transcription COUP-TF (Li et al., 1993). COUP-TF et le récepteur aux oestrogènes en se fixant sur des éléments chevauchants du promoteur agissent certainement ensemble. Un autre exemple concerne la régulation de l'expression des gènes de l'apoA-I, de l'apoA-II, de l'apoB et de l'apoC-III humaines par le facteur ARP-1, jouant une fois de plus le rôle d'inhibiteur, et le facteur HNF-4 activateur, tous deux capables de se fixer sur les sites AIA, AIIJ, BA1 et C3B des promoteurs de ces gènes (Ladas et al., 1992).

b- Titration

Certains activateurs de la transcription sont réprimés par des protéines inhibitrices en formant des complexes protéiques qui diminuent l'affinité de l'activateur pour l'ADN (**fig. 9c**). Ainsi, parmi la famille b-Zip de facteurs de transcription qui existent sous forme d'homo et d'hétérodimères, la répression de la transcription est probablement due à la dimérisation d'un activateur avec des sous-unités "répressives" de protéines de cette famille n'ayant pas le domaine basique fonctionnel nécessaire à la liaison à l'ADN (Ron et Habener, 1992). Une autre illustration de ce mécanisme est l'inhibition de c-Jun par Jun B où il apparaît que l'inhibition soit due à la faible affinité de l'hétérodimère c-Jun-Jun B pour l'ADN (Den et Karin, 1993). Jun interfère aussi avec certains membres de la famille des récepteurs nucléaires, ce qu'illustre l'inhibition réciproque de l'activation de la transcription par les protéines AP1 et le récepteur aux glucocorticoïdes (GCR); c-Jun et c-fos répriment la transcription des gènes dépendant du GCR et inversement, le GCR réprime le gène de la collagénase qui est activé par AP1 (Bengal et al., 1992).

Cette répression mutuelle semble dûe à des interactions protéine-protéine directes entre les deux classes de facteurs, ces interactions impliquent le domaine de liaison à l'ADN de chaque protéine et ainsi les complexes protéiques résultant perdent de leur affinité pour leur site de liaison à l'ADN.

Une autre illustration de ce mode d'action est la séquestration dans le cytoplasme du facteur NF-kappaB par une protéine inhibitrice spécifique I-kappaB. L'interaction de NF-kappaB avec I-kappaB empêche la migration de NF-kappaB du cytoplasme vers le noyau, et ceci dans les cellules non B. Cependant, cette inhibition est levée d'une façon encore inconnue quand les cellules sont exposées à certains stimuli, ce qui permet à NF-kappaB de migrer dans le noyau où il peut se lier à son site de liaison spécifique sur les gènes qu'il contrôle et stimuler leur transcription (Baeurle et Baltimore, 1988a; Baeurle et Baltimore, 1988b).

c- Modification des propriétés d'activation transcriptionnelle

Les propriétés d'activation de la transcription, au même titre que les propriétés de liaison à l'ADN, peuvent être modifiées par des répresseurs de la transcription. Ce mode d'action est évoqué dans le système Gal4-Gal80 de *Saccharomyces cerevisiae*. Gal4 est un activateur de la transcription qui contrôle l'expression des gènes requis pour le métabolisme du galactose; Gal4 et Gal80, une autre protéine nucléaire, forment un complexe et en l'absence de l'inducteur galactose, Gal80 empêche l'activation de la transcription en perturbant l'activité activatrice de la transcription de Gal4 (Lue et al., 1987).

3.2- Les répresseurs actifs

a- Description

Certains répresseurs transcriptionnels répriment la transcription d'une manière directe plutôt que d'inhiber des activateurs spécifiques de la transcription (**fig. 9d**). Parmi ces répresseurs actifs, on trouve les régulateurs du développement de la Drosophile Kruppel (Kr), Even-Skipped (*eve*), engrailed (*en*) (Licht et al., 1990; Han et Manley, 1993; Jaynes et O'Farrell, 1991; Han et Manley, 1993), le facteur humain YY1 apparenté à Kruppel (Shi et al., 1991), le produit du gène de la tumeur de Wilms WT1 (Madden et al., 1993) et la protéine b-Zip humaine E4BP4 (Cowell et al., 1992). On trouve également le récepteur de l'hormone thyroïdienne qui réprime la transcription en l'absence de son ligand et v-ErbA, une forme virale transduite du récepteur de l'hormone thyroïdienne, qui est un répresseur actif constitutivement (Baniahmad et al., 1992).

Les facteurs de transcription sont constitués de différents domaines. Cette structure en domaines (ou modules) a permis aux chercheurs d'assembler des segments de protéines ou de domaines (**fig.10**) provenant de différents facteurs de transcription. Par cette approche, des séquences protéiques spécifiques qui peuvent soit activer ou réprimer la transcription ont été identifiées en les associant à un domaine de liaison à l'ADN hétérologue. Des domaines de répression transférables ont ainsi été trouvés dans différentes protéines dont WT1, eve, en, c-ErbA et v-ErbA qui sont toutes des répresseurs actifs. Les domaines répresseurs des répresseurs actifs ne présentent pas de similitude de séquence en acides aminés. Ces domaines sont cependant riches en résidus Ala, Gln et/ou Pro, sauf quelques exceptions. Comme les activateurs, les répresseurs actifs sont répartis en plusieurs classes structurales en fonction de leur domaine effecteur.

b- Les mécanismes de la répression transcriptionnelle active (fig.9d):

α - inhibition de l'assemblage du complexe de préinitiation

Le mécanisme de la répression active n'est pas complètement compris, mais certains répresseurs actifs peuvent inhiber la transcription basale (qui est la transcription en absence d'induction par des hormones, nutriments ou médicaments par exemple) en empêchant directement l'initiation de la transcription par des interférences avec l'assemblage du complexe de préinitiation.

β - coopération entre répresseurs actifs et facteurs inhibiteurs

Une autre indication vient de la découverte récente de facteurs inhibiteurs qui s'associent avec le facteur de transcription général TFIID. *In vitro*, ces facteurs réduisent le taux basal de la transcription et il a été proposé qu'une partie du rôle des activateurs de la transcription est de dominer ou de déplacer ces facteurs inhibiteurs. Les répresseurs actifs favoriseraient alors probablement la liaison de ces facteurs inhibiteurs à TFIID, ce qui aboutirait à la formation préférentielle de complexes d'initiation inactifs. A cet égard, il est à noter que l'un de ces facteurs inhibant TFIID, Dr1, contient une région d'homologie avec les protéines de Drosophile Kr, eve et en (Inostroza et al., 1992). Néanmoins, il manque encore des preuves montrant que tous les répresseurs actifs peuvent moduler la transcription basale. En effet, le facteur "engrailed" est incapable de réprimer un promoteur minimal constitué soit de l'élément d'initiation TdT provenant du promoteur Hsp70, soit de la séquence TATA E1b de l'Adenovirus (Han et Manley, 1993).

χ- interaction physique entre activateurs et répresseurs actifs

Un mécanisme alternatif pour expliquer la répression active de la transcription est l'anti-activation, par laquelle la répression résulte d'une inhibition de l'activité d'activation transcriptionnelle des facteurs de transcription liés au promoteur ou à l'enhancer. Cette inhibition pourrait résulter d'une interaction physique entre le répresseur et l'activateur, ce qui aboutirait à une fermeture des régions activatrices, comme cela est le cas pour la répression par Gal80 de l'activation par Gal4 de la transcription. Il se pourrait aussi que les répresseurs interagissent avec un facteur d'initiation, tel TFIID, de manière à permettre une transcription basale, mais aussi à empêcher l'activation par la fixation de facteurs sur les éléments cis d'un promoteur ou d'un enhancer.

δ- modifications de la chromatine par les répresseurs actifs

Un autre mécanisme possible de la répression active de la transcription implique des modifications de la chromatine dont nous avons vu l'importance dans la répression précédemment. L'activation de la transcription *in vivo* est connue pour impliquer la remise en place ou le remaniement du nucléosome (Workman et Buchman, 1993), et il est logique de supposer que les répresseurs actifs pourraient promouvoir des changements locaux de la chromatine résultant alors en une répression de la transcription.

En définitive, divers mécanismes d'action des répresseurs actifs ont été décrits, et il est probable que des répresseurs différents utilisent des stratégies de répression différentes *in vivo*.

D- Sensibilité à la position de la répression transcriptionnelle

Certains facteurs de transcription peuvent avoir des effets transcriptionnels différents sur des promoteurs différents ou à des positions différentes par rapport au site d'initiation de la transcription. Il existe des facteurs de transcription positifs pouvant agir en amont ou en aval, ou à des distances très grandes, alors que d'autres, comme Sp1, sont plus actifs s'ils sont situés à proximité du site d'initiation. En ce qui concerne les répresseurs de la transcription, des exemples typiques de l'effet de la position sont illustrés par les répresseurs actifs WT1 (Wang et al., 1993), YY1 (Shi et al., 1991) qui contiennent à la fois des potentiels activateur et répresseur, et l'effet prédominant de chacune de ces protéines dépend bien du contexte du promoteur. Il a même été observé pour la protéine Kr que sa concentration détermine son effet (Sauer et Jackle, 1993), ce qui correspond au mécanisme de squelching.

E- Conclusion

Il existe de nombreux modes de répression devant être pris en compte dans la compréhension de la régulation de la transcription. Néanmoins, il reste encore beaucoup d'inconnues sur les connaissances des mécanismes d'action des répresseurs actifs de la transcription. L'étude du pouvoir régulateur des introns sur l'expression des gènes, notamment ceux qui ont des propriétés silencer, peut probablement apporter des informations complémentaires sur la répression.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Les introns présents dans les gènes sont le plus souvent des séquences non codantes éliminées du précurseur de l'ARNm lors du processus d'épissage résultant en la formation du messager mature qui ne contient que les séquences codantes correspondant aux exons. Certains introns sont impliqués dans la synthèse d'ARNm multiples à partir du même gène par le mécanisme d'épissage alternatif.

Nous avons signalé dans la partie précédente que les introns participent à la régulation de nombreux gènes, et en particulier pour les gènes impliqués dans l'athérosclérose, les gènes des apolipoprotéines A-I, B, E. En ce qui concerne l'apoA-II, nous avons vu que l'expression de son gène est régulée de manière complexe par quatorze cis-éléments situés en amont du site d'initiation de la transcription. Nous avons pour notre part abordé la recherche d'autres éléments cis-régulateurs en 3' du site d'initiation de la transcription et nous avons mis en évidence un rôle du premier intron (intron I) du gène de l'apoA-II humaine dans la régulation de l'activité de son promoteur.

A mon arrivée au laboratoire, un fragment génomique recouvrant le gène complet de l'apoA-II avait été isolé d'une banque génomique humaine et cloné dans le vecteur CLA12. Mettant à profit la présence de sites de restriction permettant de cliver ce fragment précisément aux limites de l'intron, nous avons isolé:

- un fragment comprenant l'enhancer et le promoteur minimal (segment recouvrant la région -911 à +40) que nous avons appelé le promoteur et désigné par P.
- un fragment renfermant ce promoteur P flanqué de l'intron I du gène de l'apoA-II (-911 à +206) que nous avons nommé PI.
- un segment recouvrant l'intron I (+38 à +206).

L'isolement dans leur intégralité de ces trois fragments a été rendu possible par la présence de sites de restriction permettant le clivage de l'ADN précisément aux extrémités de l'intron et du promoteur. En effet, les sites HgaI et EarI permettent d'isoler le fragment +38 à +206 qui correspond à l'intron I. Les sites HindIII et HgaI permettent d'isoler le promoteur minimal précédé de l'enhancer (-911 à +40). Les sites HindIII et EarI permettent d'isoler ce promoteur P flanqué de l'intron (-911 à +206). Ces trois fragments ont été traités par le fragment Klenow de l'ADN polymérase I de *Escherichia coli* après coupures enzymatiques, ce qui explique pourquoi les limites de l'intron et du promoteur générées par la coupure par HgaI (+38 et +40) diffèrent de deux nucléotides.

I- Objectifs du travail

Les objectifs de mon travail ont été d'étudier, dans un premier temps, l'activité de l'intron, et dans un second temps, sa structure.

A- Rôle de l'intron I dans la spécificité tissulaire

1- Etude de l'activité de l'intron I sur son propre promoteur et sur le promoteur de la thymidine kinase

Les activités des fragments P (-911 à +40) et PI (-911 à +206) ont été comparées. L'effet observé, quand l'intron est dans sa position naturelle, peut être dû à une variation dans la transcription, le splicing, le processing, la stabilité de l'ARNm, l'efficacité de la traduction ou la combinaison de ces événements. Pour déterminer si l'intron a un effet purement transcriptionnel, son activité a été mesurée, après avoir été placé devant soit son propre promoteur, soit un promoteur hétérologue, le promoteur de la thymidine kinase (promoteur TK).

2- Etude de la contribution de l'activité de l'intron à:

a- la spécificité hépatique et intestinale de l'expression de l'apoA-II

Au début du travail, nous avons effectué notre étude sur les cellules HepG2. La première est un hépatome humain ayant un phénotype hépatique, la deuxième est un carcinome du colon humain qui présente des caractéristiques des cellules intestinales. Elles sont toutes deux utilisées par de nombreux auteurs pour l'étude de la régulation de diverses apolipoprotéines, y compris l'apoA-II. Puis, sachant que la synthèse de l'apoA-II chez l'homme est essentiellement hépatique et que l'intestin ne contribue que très peu au pool sanguin de la protéine (Hussain et Zannis, 1990), l'activité équivalente du promoteur (-911 à +29) dans les cellules HepG2 et Caco-2 (Chambaz et al., 1991) pourrait entre autre être due à l'existence au delà de la séquence -911/+29 d'un cis-élément où se fixent des facteurs de transcription réprimant l'expression de l'apoA-II dans les cellules intestinales. Comme il l'a été suggéré par Chambaz, l'activité enhancer de la construction -911/+29 dans la cellule Caco-2 pourrait aussi résulter de la non expression dans cette cellule de facteurs négatifs normalement exprimés dans les cellules intestinales. La comparaison de l'activité de l'intron dans les cellules HepG2 et Caco-2 devait permettre de savoir si ce cis-élément est situé dans l'intron. L'effet de l'intron étant équivalent dans les deux lignées (au moins quand il est en un exemplaire devant le promoteur TK) élimine cette hypothèse. Pour cette raison et compte tenu de l'expression négligeable de l'apoA-II dans l'intestin, nous avons poursuivi nos études seulement sur différentes lignées cellulaires d'hépatome humain HepG2, de rat Mc A-RH7777, Mc A-RH8994 et Fa32.

b- la spécificité de l'expression de l'apoA-II dans les cellules HepG2 et Caco-2

Chambaz et al. avaient montré que la spécificité de l'expression de l'apoA-II dans les cellules HepG2 et Caco-2 est assurée par l'enhancer distal (-911 à -680). Il était cependant important de tester la spécificité de l'activité de l'intron sur des cellules n'exprimant pas l'apoA-II. L'objectif était de voir si l'activité répressive de l'intron n'était pas plus forte dans ces cellules. Ainsi, à l'absence d'activité enhancer dans ces cellules s'ajouterait un effet répresseur plus fort pour éteindre l'expression du gène de l'apoA-II. L'activité de l'intron sur le promoteur TK a donc été étudiée dans des cellules qui n'expriment pas le gène de l'apoA-II pour tester si l'intron conservait son activité régulatrice. Les cellules utilisées sont les cellules de choriocarcinome JEG-3 et de rein de singe vert d'Afrique CV-1.

c- la répression du gène de l'apoA-II durant les premières étapes de la vie

La transcription du gène de l'apoA-II subit des modifications au cours de la vie. Chez le rat, l'expression de ce gène est très faible sinon inexistante avant la naissance et augmente considérablement au sevrage entre le vingtième et le trentième jour de la vie, et atteint un taux qui sera maintenu au cours de l'âge adulte (Staels et al., 1989). Pour déterminer si l'activité répressive de l'intron I contribue à l'extinction du gène de l'apoA-II durant la vie foetale et embryonnaire, l'activité de l'intron sur son propre promoteur a été comparée dans trois lignées cellulaires d'hépatome de rat Mc A-RH7777 et Mc A-RH8994 et Fa32 qui, sur la base de l'expression des gènes de l'alpha-foeto-protéine et de l'albumine, représentent respectivement le phénotype embryonnaire, fœtal et adulte .

B- Etude de la structure de l'intron I

1- Détermination des régions de l'intron fixant les protéines nucléaires responsables de son effet

La technique d'empreinte à la DNase I a permis de mettre en évidence ces régions de fixation.

2- Etude de la contribution de chaque région de fixation à l'activité de l'intron

Des oligonucléotides correspondant aux sites de fixation des protéines nucléaires ont été synthétisés chimiquement et clonés individuellement devant le promoteur TK pour déterminer s'ils sont des éléments régulateurs, ou en combinaison pour mettre en évidence d'éventuelles synergies.

3- Etude des protéines nucléaires se fixant sur chaque région

L'utilisation d'extraits nucléaires hépatiques et non hépatiques a permis de préciser, par la technique de gel-retard, le nombre et la spécificité des complexes ADN-protéines nucléaires. Les propriétés physico-chimiques de ces complexes ADN-protéines ont également été déterminées.

4- Identification des motifs nucléotidiques responsables de la fixation des protéines nucléaires sur chaque site et impliqués dans leur activité

La mutagenèse des sites de fixation par substitutions nucléotidiques, l'étude de la capacité de fixation des protéines sur les oligonucléotides synthétiques mutants et de l'activité de ces oligonucléotides sur le promoteur TK ont permis cette identification.

Les résultats obtenus à partir de ces études ont donné lieu à la rédaction des articles suivants:

- article I:

Jean-Pierre Bossu, François L. Chartier, Ngoc Vu-Dac, Jean-Charles Fruchart and Bernard Laine "Transcription of the human apolipoprotein A-II gene is down-regulated by the first intron of its gene" (1994) Biochem. Biophys. Res. Comm. 202: 822-829.

- article II:

François L. Chartier, Jean-Pierre Bossu, Ngoc Vu-Dac, Jean-Charles Fruchart and Bernard Laine "Involvement of intronic sequences in the transcriptional regulation of apolipoprotein B, E and A-II genes" (1995) German Journal of Gastroenterology Supplement 3: 1-2.

- article III:

Jean-Pierre Bossu, François L. Chartier, Jean-Charles Fruchart, Johan Auwerx, Bart Staels and Bernard Laine "Two regulatory elements of similar structure and placed in tandem account for the repressive activity of the human apolipoprotein A-II gene" (soumis pour publication).

ARTICLE I

TRANSCRIPTION OF THE HUMAN APOLIPOPROTEIN A-II IS DOWN-REGULATED BY THE FIRST INTRON OF ITS GENE

Jean-Pierre Bossu, François L. Chartier, Ngoc Vu-Dac, Jean-Charles Fruchart
and Bernard Laine

SERLIA et U. 325 INSERM, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Professeur Calmette, B.P. 245,
59019 Lille, France

Received May 10, 1994

Several reports indicate that apoA-II, the second most abundant HDL protein, plays a crucial role in modulating the anti-atherogenic behavior of HDL. Regulatory elements located 5' to the human apoA-II promoter have been previously described. In this paper we report that the first intron of the human apoA-II gene down-regulates its own promoter and the ubiquitous thymidine kinase promoter both in HepG2 and Caco-2 cells. The intron contains three sequences which bind nuclear proteins, thus demonstrating the presence of regulatory elements downstream of the transcription start site of the apoA-II gene. © 1994 Academic Press, Inc.

Apolipoproteins A-I and A-II (apo A-I and apoA-II) are the most abundant proteins of High Density Lipoproteins (HDL) the plasma levels of which are inversely correlated with the incidence of coronary artery disease. HDL consist mainly of two lipoprotein subfractions containing either only apo A-I [A-I HDL] or apo A-I and apo A-II [A-I/A-II HDL], (for reviews see (1,2)). Numerous data indicate that A-I HDL play a crucial role in the protection against atherosclerosis (for reviews see (2,3)). Furthermore, the protein composition of HDL and particularly their apo A-II content is an important determinant of atherogenesis. Indeed, the effects of overexpression of mouse or human apoA-II in transgenic mice on HDL structure, concentration and on atherogenesis have been investigated (4-7). Even if the effect on HDL concentration remains under debate, these studies indicate that apoA-II participates in determining HDL size and provide evidence that overexpression of apoA-II leads to an enhanced atherosclerotic lesion development which is consistent with certain in vitro studies on the apo A-II function (8).

Human apo A-II is synthesized mainly by the liver, and to a much lower extent by the intestine (2). This tissue specific expression is governed by an enhancer region which is located between nucleotides -903 and -680 of the human apo A-II gene and contains six regulatory elements (9-11). The promoter of the human apo A-II gene contains eight additional regulatory elements distributed in the proximal region -126/-33 and in the region -573/-255 which has a slight effect on the transcription of apo A-II. The functional importance of each regulatory elements has been determined, the maximum expression of the apoA-II gene requires the synergistic action of factors binding to the proximal and distal regulatory elements (12,13).

In addition to regulatory elements identified in the promoters of genes in general, regulatory elements have been found within intronic sequences of several genes (14-19). Apolipoproteins B and E contain tissue-specific regulatory elements in their second and first intron, respectively (20,21). In this paper we report that the first intron of apoA-II gene down-regulates apoA-II gene transcription in hepatic and intestinal cells.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid construction. Cloning methods were as in (22). Plasmids were purified twice on cesium chloride gradient. A 3 kb *Hind III*/*Hind III* fragment containing the entire apoA-II gene was obtained from a human genomic library (a gift from Professor Stehelin's laboratory). Fragments -911/+40 and -911/+206 excised by digestion with *Hind III*/*Hga I* and *Hind III*/*Ear I*, respectively, were blunted and cloned into the blunted *Xba I* site of pBLCAT5 plasmid (23) to generate the plasmids designated P and PI, respectively. Position +1 corresponds to the first base of the initiation start site of transcription. Fragment +38/+206 (intron I) obtained by digestion with *Hga I* and *Ear I* was imported into the reporter vector pBLCAT4 (24) containing the minimal thymidine kinase promoter (-105/+51), for transfection assays, and in reverse orientation into the pUC19 vector, for footprint assays. Control vectors were RSVBGAL and RSVCAT. Integrity and orientation of the constructions were controlled by sequencing (USB).

Cell culture and transient transfection assays. Human hepatoma HepG2 cells and human colon carcinoma Caco-2 cells were grown in Dulbecco modified Eagle medium (GIBCO) supplemented with 10% and 20% fetal calf serum, respectively. Cell transfection and CAT assays, performed with a constant amount of protein extracts, were as indicated in (11) except that 5 μ g and 10 μ g of CAT reporter plasmids were used per transfection in HepG2 and Caco-2 cells, respectively.

DNase I footprinting analysis. DNase I footprints were carried out as indicated in (25) except that the proteins (40 μ g) were complexed to DNA (3×10^5 cpm) in a final volume of 50 μ l, in the presence of 4 μ g of poly(dI-dC). Rat liver proteins were prepared as in (25). Labeling of DNA probes were as indicated in legends of Fig. 2 and 3.

RESULTS AND DISCUSSION

The first intron of the human apo A-II gene is a transcriptional silencer

The reporter plasmid pBLCAT5 containing either the apoA-II promoter alone (P) or the apoA-II promoter flanked by the first intron (PI) were transiently transfected in HepG2 and

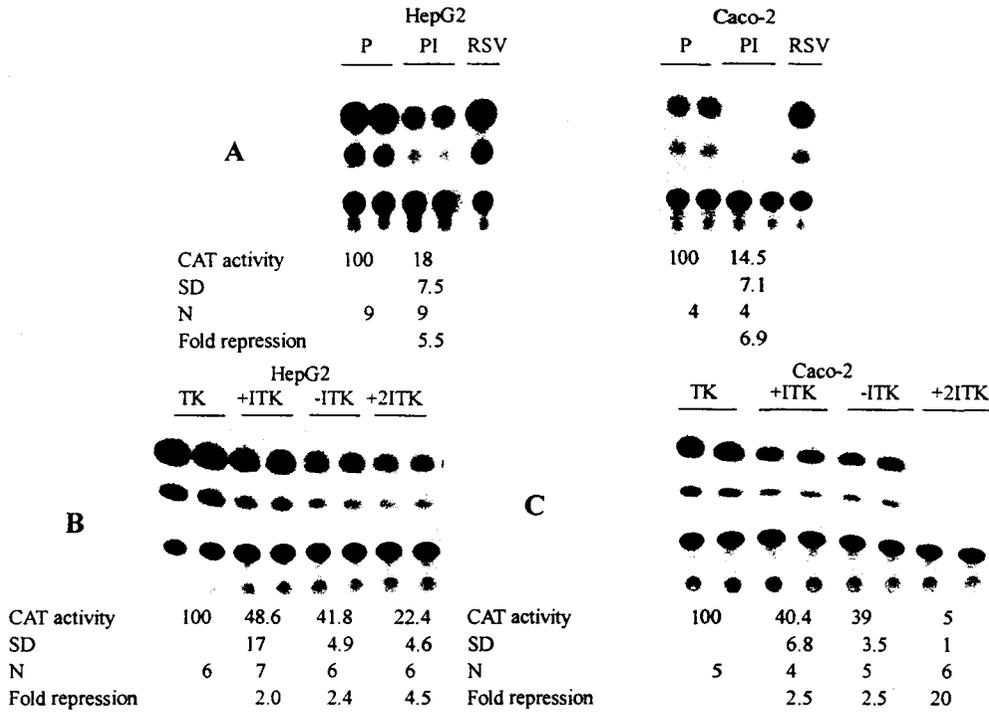


Figure 1. Silencer activity of the first intron of human apoA-II gene.

Autoradiographs representing chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assays performed with HepG2 and Caco-2 cells. P and PI represent the human apoA-II promoter alone (-911/+40) and flanked by the first intron (-911/+206), respectively. TK represents the thymidine kinase promoter and +ITK, -ITK and +2ITK represent the first intron in forward, in reverse and as a dimer in forward orientation in front of the thymidine kinase promoter, respectively. The CAT activities, which have been corrected for differences in transfection efficiencies determined by the β galactosidase activities, are expressed relative to those obtained with the apoA-II and thymidine kinase promoters, respectively. SD stands for standard deviation. N refers to the number of times the constructs were transfected.

Caco-2 cells. In both cell types, the expression of the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) reporter gene is reduced by about 6-fold using construction PI compared to construction P (Fig. 1A). The effect of the intron on the CAT reporter gene expression may be due to changes in transcription, mRNA splicing and processing, mRNA stability, translational efficiency or a combination of such events. One way to check that the observed decrease results from a transcriptional regulation and not from the above mentioned putative events is to clone the intron upstream of a promoter in such a way it can only affect transcription. We used the pBLCAT4 which contains the CAT reporter gene under the control of the thymidine kinase promoter (TK). HepG2 and Caco-2 cells were transiently transfected with constructs containing the intron either in forward orientation (+ITK), or in reverse orientation (-ITK) or a tandem

repeat of the intron in forward orientation (+2ITK). In HepG2 cells, in comparison to the control TK construct (Fig. 1B), the CAT activities of the constructs containing one copy of the intron in forward or reverse orientation are reduced to about 45 percent and that of the construction containing the tandem repeat of the intron is reduced to about 20 percent of the control TK activity. In Caco-2 cells these activities are reduced to 40 percent in the presence of one copy of the intron, regardless of its orientation, and to 5 percent in the presence of the tandem repeat (Fig. 1C). These results clearly indicate that the intron I of apo-AII gene down-regulates the transcriptional activity of the thymidine kinase promoter to the same extent in hepatic and intestinal cells, that the silencing activity is orientation independent and exhibits a cumulative effect on the promoter. Nevertheless one can note that once the intron I is in tandem upstream of the thymidine kinase promoter it is much more efficient in Caco-2 cells than in HepG2 cells. Cumulative effects of enhancers or silencers have already been reported (26). The first intron of the apoA-II gene corresponds to the definition of a silencer in terms of position and orientation.

Determination of nuclear protein-binding sites in the apoA-II intron I by DNase I footprint

The observation of the silencer activity of the first intron led us to determine the sites of interaction between DNA and nuclear proteins from rat liver by DNase I footprinting assays. Three separate footprints are observed in the coding and non-coding strands as shown in Fig.2 and Fig.3 respectively. The first protected sequence (footprint I) spans from nucleotides 54 to 77 on the coding strand and from nucleotides 60 to 73 on the non-coding strand and exhibits an enhanced DNase I cleavage site at position 60 on the coding strand. The second footprint (footprint II) extends from residue 121 to residue 136 on the coding strand and from residue 128 to the enhanced DNase I cleavage site at position 140 on the non-coding strand. On the coding strand, a highly hypersensitive site is observed at position 134 and nucleotide 127 remains unprotected. The third footprint (footprint III) comprises nucleotides 152 to 192 on the coding strand and nucleotides 149 to 192 on the non-coding strand. A highly enhanced DNase I

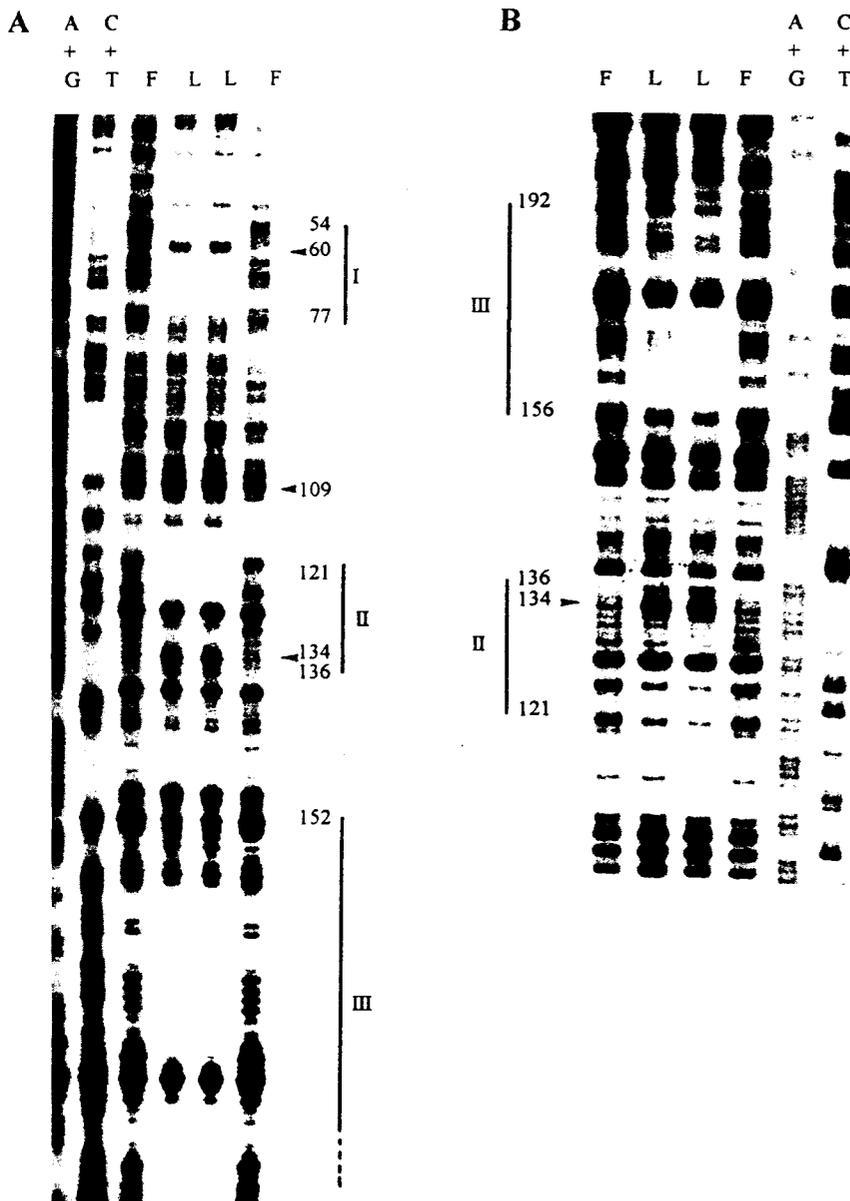


Figure 2. DNase I footprinting assays of the apoA-II intron I coding strand.

The coding strand of the intron I was labeled with the Klenow at the 3' end at Bam HI site of pUC19 in panel A and with the T4 kinase at the 5' end at Hind III site of pUC19 in panel B. G+A and C+T represent Maxam and Gilbert sequencing ladders. F and L represent free DNA and liver nuclear protein-DNA complexes, respectively. The Roman numerals designate the footprints with their boundaries designated in arabic numerals along the gene sequence. Arrow heads denote sites of enhanced DNase I cleavage.

cleavage site is found at position 175 on the non-coding strand while the protection is interrupted with a slight shift on the coding strand (positions 176 to 178). These protected sequences of the first intron of apo A-II gene do not exhibit sequence homology with regulatory

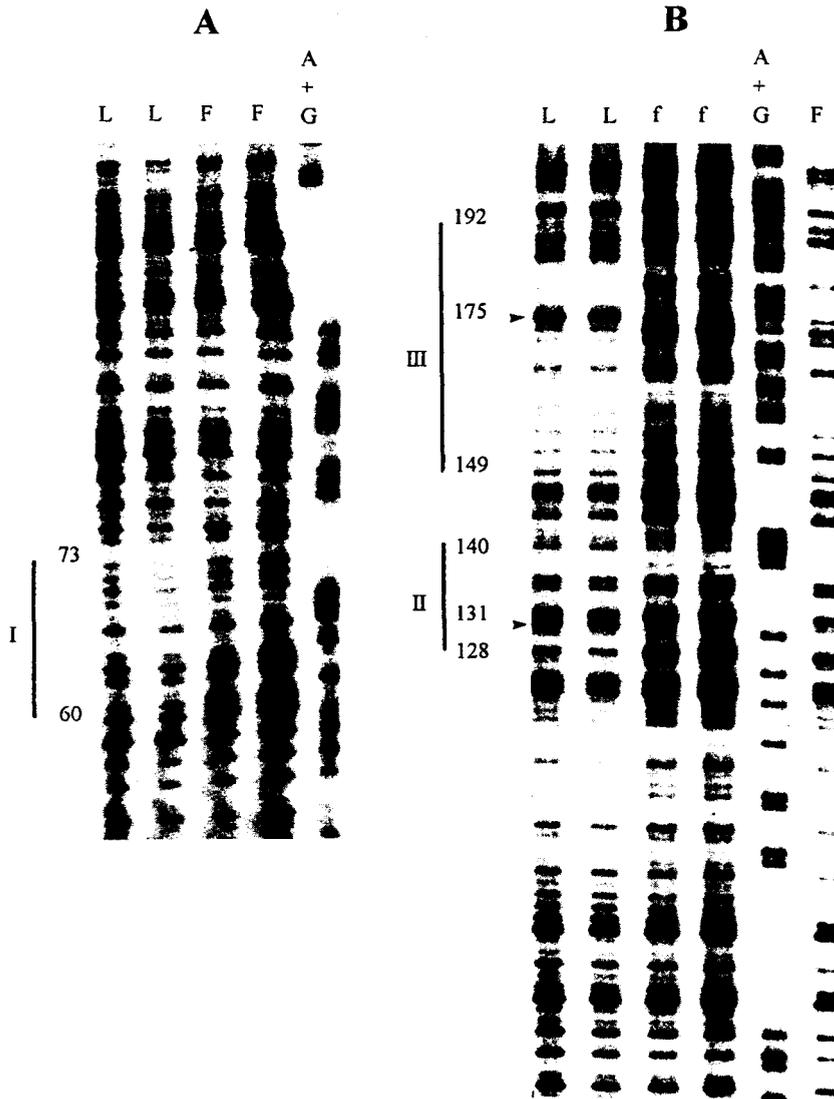


Figure 3. DNase I footprinting assays of the apoA-II intron I non-coding strand.

The non-coding strand of the intron I was labeled with the Klenow at the 3' end at Hind III site of pUC19 in panels A and B. All symbols are as in legend of Fig. 2. f corresponds to a higher amount of free DNA.

elements of apolipoproteins and particularly not with those characterized in the introns of apo B or apo E.

Since apo A-II plays a crucial role in modulating the anti-atherogenic behavior of HDL, it is important to study both regulation of apolipoprotein A-I and A-II genes. Our results provide

evidence to the existence of regulatory elements located downstream of the transcription start site of the human apoA-II gene. The silencing activity of the first intron of apo A-II is similar in hepatic or intestinal derived cells, thus suggesting that the intron alone cannot account for the much higher expression of human apo A-II gene in liver compared to intestine. On the other hand, the silencer activity of the intron seems to be specific to cells expressing apo A-II since no effect has been found using choriocarcinoma JEG-3 cells. Thus, it appears that this silencer activity does not participate in the tissue specificity of the apo A-II gene expression which is mainly governed by the enhancer located between nucleotides -903 and -680 (9-11). The data presented in this paper should be considered in studies aiming to protect against atherogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M.J. Dupire and E. Clement for their excellent technical assistance. The authors are indebted to Professor Stehelin's co-workers for providing the genomic library and for their skillful advise and to Drs P. Deneffe, B. Staels and A. Ochoa for valuable discussions. This work was supported by the INSERM, grants from the Institut Pasteur de Lille and from the Institut de Chimie Pharmaceutique (University of Lille II) and by a BioAvenir Program Project grant (to SERLIA) from Rhône Poulenc and the French Government (MRE and MICE).

REFERENCES

1. Karathanasis, S.K. (1992) In *Molecular genetics of coronary artery disease. Candidate genes and processes in atherosclerosis*. Monogr. Hum. Genet (A.J. Lusis, J.I. Rotter and R.S. Sparkes, Eds.), pp. 140-171. Karger, S., Basel.
2. Zannis, V.I., Kardassis, D., and Zanni, E.E. (1993) In *Advances in Human Genetics* (H. Harris and K. Hirschhorn, Eds.), pp. 145-319. Plenum Press, New York.
3. Breslow, J.L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8314-8318.
4. Warden, C.H., Hedrick, C.C., Qiao, J.-H., Castellani, L.W., and Lusis, A.J. (1993) *Science* 261, 469-472.
5. Hedrick, C.C., Castellani, L.W., Warden, C.H., Puppione, D.L., and Lusis, A.J. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 20676-20682.
6. Schultz, J.R., Gong, E.L., McCall, M.R., Nichols, A.V., Clift, S.M., and Rubin, E.M. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 21630-21636.
7. Schultz, J.R., Verstuyft, J.G., Gong, E.L., Nichols, A.V., and Rubin, E.M. (1993) *Nature* 365, 762-764.
8. Barbaras, R., Puchois, P., Fruchart, J.-C., and Ailhaud, G. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 63-69.
9. Shelley, C.S. and Baralle, F.E. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 3801-3821.
10. Lucero, M.A., Sanchez, D., Ochoa, A.R., Brunel, F., Cohen, G.N., Baralle, F.E., and Zakin, M.M. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 2283-2300.
11. Chambaz, J., Cardot, P., Pastier, D., Zannis, V.I., and Cladaras, C. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 11676-11685.
12. Cardot, P., Chambaz, J., Cladaras, C., and Zannis, V.I. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 24460-24470.
13. Cardot, P., Chambaz, J., Kardassis, D., Cladaras, C., and Zannis, V.I. (1993) *Biochemistry* 32, 9080-9093.
14. Jonsson, J.J., Foresman, M.D., Wilson, N., and McIvor, R.S. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20, 3191-3198.

15. Bruhat, A., Tourmente, S., Chapel, S., Sobrier, M.L., Couderc, J.L., and Dastugue, B. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18, 2861-2867.
16. Savagner, P., Miyashita, T., and Yamada, Y. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 6669-6674.
17. Berkowitz, E.A. and Evans, M.I. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 7134-7138.
18. Burbelo, P.D., Bruggeman, L.A., Gabriel, G.C., Klotman, P.E., and Yamada, Y. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 22297-22302.
19. Franklin, G.C., Donovan, M., Adam, G.I., Holmgren, L., Pfeifer Ohlsson, S., and Ohlsson, R. (1991) *EMBO J.* 10, 1365-1373.
20. Brooks, A.R., Blackhart, B.D., Haubold, K., and Levy Wilson, B. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 7848-7859.
21. Paik, Y.-K., Chang, D.J., and Reardon, C.A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 13340-13349.
22. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
23. Stein, B., Rahmsdorf, H.J., Steffen, A., Litfin, M., and Herrlich, P. (1989) *Mol. Cell Biol.* 9, 5169-5181.
24. Luckow, B. and Schütz, G. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 5490.
25. Brunel, F., Ochoa, A., Schaeffer, E., Boissier, F., Guillou, Y., Cereghini, S., Cohen, G.N., and Zakin, M.M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 10180-10185.
26. Widom, R.L., Ladas, J.A., Kouidou, S., and Karathanasis, S.K. (1991) *Mol. Cell Biol.* 11, 677-687.

ARTICLE II

Involvement of intronic sequences in the transcriptional regulation of apolipoprotein B, E and A-II genes

Chartier* F. L., Bossu* J. P., Vu-Dac, N., Fruchart, J. C. and Laine, B.

SERLIA et U. 325 INSERM, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Professeur Calmette, B.P. 245, 59019 Lille, France.

Introns are involved in qualitative changes in gene expression such as the synthesis of multiple messenger RNA species from a single gene by alternative splicing of its primary transcript. Introns can also have quantitative effects on gene expression. Indeed, regulatory elements have been found within intronic sequences of several genes. Mainly enhancers have been identified within the first and second introns (1-7), the expression of a gene can be directly related to the number of introns (8). In some cases, the intronic regulatory elements confer a tissue specific expression (9-11). In addition, it appears that introns can stimulate gene expression by a process that depends directly on the splicing reaction (12-14). In this paper we focus our attention on the role of introns in gene transcription of three human apolipoproteins: apoB, apoE and apoA-II.

On the basis of data obtained by transient transfections in cultured human liver-derived HepG2 cells and human intestine-derived Caco-2 cells, the promoter elements extending from -898 to +1 of the human apoB gene appear sufficient to direct its cell type-specific expression (15-17). In addition to these regulatory elements, other regulatory elements have been found in the second and third introns of apoB gene. In the second intron, a 147 bp region (+806 to +952) containing a 97 base pairs DNase I footprint exhibits a significant enhancer activity (18). This region contains functional binding sites for the transcriptional factors HNF-1 and C/EBP and for a nuclear protein called protein II which act synergistically to enhance transcription (19). Recently it has been shown that this enhancer element of the second intron is absolutely required to specify transcription by the apoB promoter in the liver of transgenic mice (20). Nevertheless, this enhancer is inefficient in the small intestine of these transgenic animals thus indicating that *in vivo* this intronic enhancer controls the tissue specificity of expression and that intestine and liver expressions are controlled by separate and distinct regulatory elements. In the third intron of human apo-B, a 155 bp fragment exhibits an enhancer activity, this fragment includes 3 DNase I footprints located between positions 1830 and 1930 (21). This latter enhancer appears less active than the second intron enhancer. Both enhancers operate by a mechanism in which the enhancer bound factors or their mediators interact with the basal transcription machinery rather than with the proximal promoter sequences. It has also been shown that the chromatin structure close to the third intron enhancer differs between transcriptionally active HepG2 cells and transcriptionally inactive HeLa cells.

As observed by transient transfection assays, the full expression of apoE promoter in HepG2 cells requires a region located in the first intron of its gene in addition to regulatory elements located

in the proximal upstream region (-360 to -80) (22, 23). This intron contains two sequences (+69 to +87 and +173 to +191) which bind nuclear proteins (22). These regions do not control the cell type specificity of expression of apoE gene. On the other hand transgenic mice methodologies indicate that high level expression of human apoE gene requires a sequence of 150 bp located 18 kb downstream of the apoE promoter (24, 25).

Human apoA-II is synthesized by the liver, and to a much lower extent by the intestine (26, 27). This cell type specific expression is governed by an enhancer region located between nucleotides -903 and -680 of the human apoA-II gene and containing six regulatory elements (28-30). The promoter of the human apoA-II gene contains eight additional regulatory elements distributed between nucleotides -573 and -33. The functional importance of each regulatory elements has been determined, and the maximum expression of the apoA-II gene requires the synergistic action of factors binding to proximal and distal regulatory elements (31, 32).

In our laboratory, we have shown that the activity of the human apoA-II promoter (-91 1/+29) decreases when the first intron of this gene is located either upstream or downstream of the promoter (figure 1).

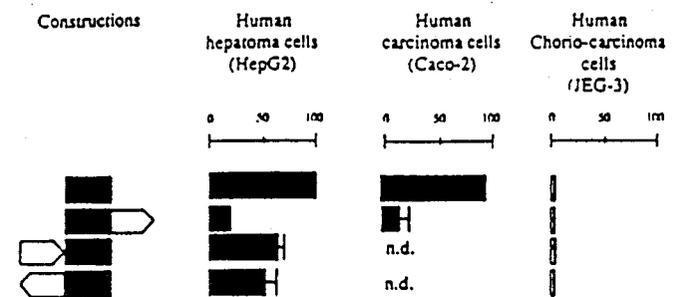


Fig. 1. Effect of the intron I of the human apo A-II gene on its own promoter. The activity of each construction is expressed by comparison with that of the apo A-II promoter (■). □ represents the apo A-II intron I. n.d. stands for not determined

This effect is observed in HepG2 and Caco-2 cells. The intensity of the effect of the intron varies with its position relative to the promoter. This may result from the presence of the enhancer (-903/-33) and may indicate either a distance dependency or an interference with some of its 14 regulatory elements. We cannot exclude that the stronger effect of the intron when it occupies its natural position could partly be due to changes in mRNA processing or stability, translational efficiency or a combination of such events. To avoid these putative events and to get insight onto the effect of the intron on a heterologous promoter, we cloned the intron upstream of the thymidine kinase promoter (TK).

The results in figure 2 clearly indicate that the intron I down-regulates the transcriptional activity of the thymidine kinase promo-

Address for correspondence: F. L. Chartier, M. D., SERLIA et U. 325 INSERM, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Professeur Calmette, B. P. 245, F-59019 Lille, France

* The first two authors equally contributed to this work

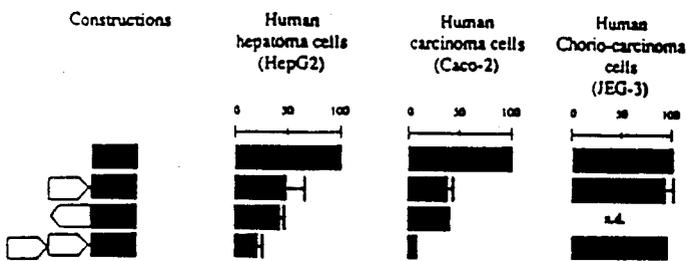


Fig. 2. Effect of the intron I of the human apo A-II gene on the thymidine kinase promoter. The activity of each construction is expressed by comparison with that of the apo A-II promoter (■). □ represents the apo A-II intron I. n.d. stands for not determined.

ter to the same extent in HepG2 and Caco-2 cells but not in the non-apoA-II expressing human choriocarcinoma cell line JEG-3. Thus, it appears that this silencer activity does not participate in the tissue specificity of the apoA-II gene expression. In addition, the silencing activity is orientation independent and exhibits a cumulative effect on the promoter. The first intron of the apoA-II gene is effective on its own promoter and on the thymidine kinase heterologous promoter and corresponds to the definition of a silencer in terms of position and orientation.

We determined three DNase I footprints in the coding and non-coding strands. These footprints encompass sequences +54/+77, +121/+140 and +149/+192. Each sequences which bind nuclear proteins and their combination have been cloned upstream of the thymidine kinase promoter. The determination of the activity of these constructions indicates that the three sequences behave as negative regulatory elements, two of them exhibit a cumulative effect. The proteins binding to sequences I and II and one of the protein binding to sequence III are encountered in rat liver and in HepG2 cells but not in JEG-3 cells. One protein binding to sequence III is specific of non apoA-II expressing cells JEG-3 and HeLa. In conclusion, our results provide evidences that as in apoB and E genes, intronic regulatory elements modulate the transcription of apoA-II gene.

References

- 1 Bruhat A, Tourmente S et al. Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional regulation of the beta 3 tubulin gene by 20-hydroxyecdysone in *Drosophila* Kc cells. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 2881-7
- 2 Kiss I, Bosze Z, Szabo P et al. Identification of positive and negative regulatory regions controlling expression of the cartilage matrix protein gene. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 2432-6
- 3 Savagner P, Miyashita T, Yamada Y. Two silencers regulate the tissue-specific expression of the collagen II gene. *J Biol Chem* 1990; 265: 6689-74
- 4 Burbelo PD, Bruggeman LA, Gabriel GC, Klotman PE, Yamada Y. Characterization of a cis-acting element required for efficient transcriptional activation of the collagen IV enhancer. *J Biol Chem* 1991; 266: 22297-302
- 5 Peterlin BM. Transcriptional regulation of HLA-DRA gene. *Res Immunol* 1991; 142: 393-9
- 6 Berkowitz EA, Evans MI. Functional analysis of regulatory regions upstream and in the first intron of the estrogen-responsive chicken very low density apolipoprotein II gene. *J Biol Chem* 1992; 267: 7134-8
- 7 Tan JA, Marschke KB, Ho KC, Perry ST, Wilson EM, French FS. Response elements of the androgen-regulated C3 gene. *J Biol Chem* 1992; 267: 4458-66
- 8 Jonsson JJ, Foresman MD, Wilson N, McIvor RS. Intron requirement for expression of the human purine nucleoside phosphorylase gene. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 3191-8
- 9 Ling X, Shenker R, Sakal D, Arnheim N. The mouse Eb meiotic recombination hot-spot contains a tissue-specific transcriptional enhancer. *Immunogenetics* 1993; 37: 331-8
- 10 Hinz U, Wolf A, Renkawitz Pohl R. Ultrabithorax is a regulator of beta 3 tubulin expression in the *Drosophila* visceral mesoderm. *Development* 1992; 116: 543-54
- 11 Franklin GC, Donovan M, Adam GI et al. Expression of the human PDGF-B gene is regulated by both positively and negatively acting cell type-specific regulatory ele-

- 12 Korb M, Ke Y, Johnson LF. Stimulation of gene expression by introns: conversion of an inhibitory intron to a stimulatory intron by alteration of the splice donor sequence. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 5901-8
- 13 Dabevas MD, Post-Beltrami MA, Warner JR. Autogenous regulation of splicing of the transcript of a yeast ribosomal protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 5854-7
- 14 Ash J, Ke Y, Korb MY, Johnson LF. Introns are essential for growth regulated expression of the mouse thymidylate synthase gene. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 1565-71
- 15 Paulweber B, Onasch MA, Nagy BP, Levy Wilson B. Similarities and differences in the function of regulatory elements at the 5' end of the human apolipoprotein B gene in cultured hepatoma (HepG2) and colon carcinoma (CaCo-2) cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 24148-60
- 16 Des HK, Leff T, Breslow JL. Cell type specific expression of the human apoB gene is controlled by two cis-acting regulatory regions. *J Biol Chem* 1988; 263: 11482-8
- 17 Kardassis D, Hadzopoulou Cladaras M et al. Characterization of the promoter elements required for hepatic and intestinal transcription of the human apoB gene: definition of the DNA-binding site of a tissue-specific transcriptional factor. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 2653-9
- 18 Brooks AR, Blackhart BD, Haubold K, Levy Wilson B. Characterization of tissue-specific enhancer elements in the second intron of the human apolipoprotein B gene. *J Biol Chem* 1991; 266: 7848-59
- 19 Brooks AR, Levy Wilson B. Hepatocyte nuclear factor 1 and C/EBP are essential for the activity of the human apolipoprotein B gene second-intron enhancer. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 1134-48
- 20 Brooks AR, Nagy BP, Taylor S, Simonet WS, Taylor JM, Levy Wilson B. Sequences containing the second intron enhancer are essential for transcription of the human apolipoprotein B gene in livers of transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2243-56
- 21 Levy Wilson B, Paulweber B, Nagy BP, Ludwig EH, Brooks AR. Nuclease-hypersensitive sites define a region with enhancer activity in the third intron of the human apolipoprotein B gene. *J Biol Chem* 1992; 267: 18735-43
- 22 Smith JD, Mellan A, Leff T, Breslow JL. Expression of the human apolipoprotein E gene is regulated by multiple positive and negative elements. *J Biol Chem* 1988; 263: 8300-8
- 23 Paik Y-K, Chang DJ, Reardon CA et al. Identification and characterization of transcriptional regulatory regions associated with expression of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem* 1988; 263: 13340-9
- 24 Simonet WS, Bucay N, Lauer SJ, Taylor JM. A far-downstream hepatocyte-specific control region directs expression of the linked human apolipoprotein E and C-I genes in transgenic mice. *J Biol Chem* 1993; 268: 8221-9
- 25 Breslow JL. Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 8314-8
- 26 Knott TJ, Wallace SC, Robertson ME et al. The human apolipoprotein A-II gene: structural organization and sites of expression. *Nucleic Acids Res* 1985; 13: 6387-98
- 27 Hussain MM, Zannis VI. Intracellular modification of human apolipoprotein A II (apo AII) and sites of apo AII mRNA synthesis: comparison of apo AII with apo CII and apo CIII isoforms. *Biochemistry* 1990; 29: 209-17
- 28 Shelley CS, Baralle FE. Dual tissue-specific expression of Apo AII is directed by an upstream enhancer. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 3801-21
- 29 Lucero MA, Sanchez D, Ochoa AR et al. Interaction of DNA binding proteins with the tissue-specific human apolipoprotein AII enhancer. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 2283-300
- 30 Chambaz J, Cardot P, Pastier D, Zannis VI, Cladaras C. Promoter elements and factors required for hepatic transcription of the human ApoA-II gene. *J Biol Chem* 1991; 266: 11678-85
- 31 Cardot P, Chambaz J, Cladaras C, Zannis VI. Regulation of the human ApoA-II gene by the synergistic action of factors binding to the proximal and distal regulatory elements. *J Biol Chem* 1991; 266: 24460-70
- 32 Cardot P, Chambaz J, Kardassis D, Cladaras C, Zannis VI. Factors participating in the liver-specific expression of the human apolipoprotein A-II gene and their significance for transcription. *Biochemistry* 1993; 32: 9080-93

ARTICLE III

**Two regulatory elements of similar structure and placed
in tandem account for the repressive activity of the first
intron of the human apolipoprotein A-II gene.**

**Jean-Pierre Bossu; François L. Chartier; Jean-Charles Fruchart; Johan Auwerx;
Bart Staels and Bernard Laine***

Laboratoire de Biologie des Régulations chez les Eucaryotes, U. 325 INSERM,
Département d'Athérosclérose, Institut Pasteur, Lille, France

*corresponding author: present address

Laboratoire de Biochimie Structurale, C.J.F. INSERM 9203

Faculté de Médecine

1, Place de Verdun

59 045 LILLE France

Fax: 33 20 62 68 68

SYNOPSIS: Recent reports indicate that apolipoprotein (apo) A-II, the second most abundant HDL protein, plays a crucial role in counteracting the beneficial effect of apo A-I against atherogenesis. Transcription of human apo A-II gene is controlled by an enhancer comprising 14 regulatory elements located upstream of its promoter whereas the first intron of this gene behaves as a silencer. This paper shows that two sequence elements account for the repressive activity of this intron and correspond to Negative Regulatory Elements termed NRE I and NRE II. Similarly to the activity of the entire intron I, the repressive activity of these elements is encountered in hepatic cells but not in non-hepatic cells studied here. Both NREs form nucleoprotein complexes of very similar physicochemical characteristics and bind the same or closely related proteins. Site-directed mutagenesis, transient transfection and gel shift analysis experiments indicate that both NREs exhibit similar structures, being composed of two sequence elements required for maximal activity and optimal binding of transcription factors. Therefore, two negative regulatory elements of similar structure and function, placed in tandem, account for the repressive activity of the first intron of the human apo A-II gene. These NRE do not exhibit structural similarity with known NRE of other genes.

Short title: Repressive elements of the human apo A-II intron I gene.

Abbreviations: CAT, chloramphenicol acetyltransferase; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; HDL, high density lipoproteins.

INTRODUCTION

Apolipoproteins A-I and A-II (apo A-I and apoA-II) are the most abundant proteins of High Density Lipoproteins (HDL), the plasma levels of which are inversely correlated with the incidence of coronary artery disease (CAD). HDL protect against CAD by removing cholesterol excess from peripheral tissues and transporting it to the liver, a process termed "reverse cholesterol transport". HDL are heterogeneous and consist mainly of two lipoprotein subfractions containing either only apo A-I [LpA-I] or apo A-I and apo A-II [LpA-I:A-II] (for reviews see [1,2]). Numerous data indicate that LpA-I plays a crucial role in the protection against atherosclerosis (for reviews see [2,3]). In fact, the protein composition of HDL and particularly their apo A-II content is an important marker for the anti-atherogenic properties of HDL. Some but not all clinical studies suggest that LpA-I:A-II is a less "antiatherogenic" lipoprotein particle than LpA-I [4,5] and naturally selected mouse strains with elevated apoA-II levels are prone to the development of atherosclerosis on an atherogenic diet [6]. Furthermore, increased atherosclerotic lesion development was observed either in transgenic mice overexpressing mouse apo A-II compared to normal mice or in transgenic mice overexpressing human apo A-I and apo A-II compared to those overexpressing only human apo A-I [7-10]. These results are consistent with several in vitro studies suggesting that the efficiency of Lp A-I particle in promoting cholesterol efflux is substantially greater than that of Lp A-I:A-II particle [11-14]. Since it has been shown that apo A-II production rate is a major factor determining the relative amounts of LpA-I and LpA-I:A-II in normolipidemic humans [15], it appears of great interest to elucidate the mechanisms regulating the expression of the apo A-II gene.

Human apo A-II is synthesized by the liver and to a much lower extent by the intestine [2]. This cell type specific expression is governed by a distal enhancer region located between nucleotides -903 and -680 of the human apo A-II gene and containing six regulatory elements [16-18]. The promoter of the human apo A-II gene contains eight additional regulatory elements distributed in the proximal region -126/-33 and in the median region -573/-255. The optimum expression of this promoter requires the synergistic action of factors binding to the proximal and distal regulatory elements [19-21]. We have recently shown that fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor [22]. In addition, the first intron of the human apo A-II gene which is located in the non-coding region 5' to the start methionine, behaves as a silencer on the thymidine kinase promoter and contains three sequence elements which bind nuclear proteins in DNAase I footprinting assays [23]. In this report, we show that two of these sequence elements correspond to negative regulatory elements of similar structure binding the same transcription factors.

MATERIALS AND METHODS

Oligonucleotides were synthesized on a Applied Biosystem apparatus 394-08 and were purified by electrophoresis on a 15 % polyacrylamide slab gel containing 8 M urea.

Plasmid construction. Cloning methods were as in [24]. Plasmids were purified twice on cesium chloride gradients. The human apo A-II basal promoter flanked by its enhancer (nucleotides -911 to +40, construct P) or flanked by both the enhancer and the first intron (nucleotides -911 to +206, construct P In) were cloned in the promoterless reporter vector pBLCAT5 [23]. The complete intron I subcloned in plasmid pUC19 was excised by Hind III/ Bam HI digestion, blunt-ended and imported upstream of the enhancer-basal promoter construction P which was opened and blunt-ended at the Hind III site, to generate the construct In P. The oligonucleotide corresponding to element I spans nucleotides +49 to +89 and is flanked

by a Hind III site at the 5' end and Sph I and Pst I sites at the 3' end, while the oligonucleotide corresponding to element II spans nucleotides +109 to +149 and is flanked by Sph I and Sal I sites at the 5' and 3' ends, respectively. Both oligonucleotides were cloned in the reporter vector pBLCAT4 [25] containing the minimal thymidine kinase promoter (-105 to +51) to generate plasmids I-TK and II-TK, respectively. To place elements I and II in tandem upstream of the thymidine kinase promoter (construct I-II-TK), the oligonucleotide corresponding to element II was imported in the plasmid I-TK previously digested with Sph I and Sal I enzymes. The mutated elements I and II were synthesized with Hind III and Sal I restriction sites at 5' and 3' ends, respectively, and were cloned directly into pBLCAT4 to generate Im1-TK, Im2-TK and so on. Transient transfection efficiency was controlled using plasmid RSV β GAL. Integrity and orientation of the constructions were controlled by sequencing (USB from Amersham or fmol sequencing system from Promega).

Cell culture and transient transfection assays. Human hepatoma HepG2 cells, human chorio-carcinoma JEG-3 cells and african green monkey kidney CV1 cells were grown in Dulbecco modified Eagle medium (GIBCO) supplemented with 10% fetal calf serum and containing 4.5 g/l glucose. Rat hepatoma Fa32 cells were grown in the same medium but containing 1 g/l glucose. Rat hepatoma Morris Mc A-RH7777 and Mc A-RH8994 cells were grown in Dulbecco modified Eagle medium containing 5% fetal calf serum and 20% horse serum (GIBCO) supplemented with 4.5 g/l glucose. Cell transfection and CAT assays, performed with a constant amount of protein extracts, were as indicated in [18] except that 5 μ g of CAT reporter plasmids were used per transfection in HepG2 cells. Rat hepatoma Morris Mc A-RH7777 and Mc A-RH8994 cells were transfected as described in [26].

Preparation of nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assays (EMSA). Nuclear extracts from rat liver were prepared as in [27]. For cultured cells, nuclei were prepared as described in [28] and crude nuclear extracts were prepared as described by Dignam [29]. Nuclear

extracts were dialyzed in 20 mM Hepes pH 7.9, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 20 % glycerol. All buffers contained 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 0.1 mg/ml each leupeptin, aprotinin and pepstatin.

Oligonucleotides were labelled with $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP using the Klenow fragment of DNA polymerase I. Nuclear extracts (4 μg) were incubated for 1h on ice in the dialysis buffer (final reaction volume 20 μl) in the presence of 3 μg of double stranded poly (dI dC) and 0.2 ng of labelled oligonucleotides. Alternatively, 25 to 200-fold molar excess of competitor oligonucleotides were added. Nucleoprotein complexes were resolved on a 5% polyacrylamide gel in 1x TAE (1 xTAE = 6.7mM Tris, 3.3 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 7.9)

RESULTS

1) Cell specificity of the activity of the human apo A-II intron I.

Our previous study of the activity of the human apo A-II gene intron I in the human hepatoma cell line HepG2 showed a silencer behaviour of this intron on the thymidine kinase promoter [23]. It is of interest to check the cell specificity of the activity of this intron. This activity was studied in two non-hepatic cell lines: the human chorio-carcinoma cell line JEG-3 and the african green monkey kidney cell line CV-1. As shown in Fig. 1 A, intron I has no effect on the activity of the thymidine kinase promoter in JEG-3 and CV-1 cells. So the repressive activity of this intron exhibits a cell-type specificity.

The silencer activity of apo A-II intron I was unambiguously demonstrated only on the heterologous thymidine kinase promoter and to ascertain that this intron can also down-regulate its own promoter, we checked its activity when placed upstream of the apo A-II enhancer-basal promoter (spanning nucleotides -911/+40) in the construct In P. Comparison of CAT activities driven by constructs P and In P shows that intron I acts on its own promoter at the

transcriptional level and can repress this promoter despite the presence of a very strong hepatic enhancer placed between nucleotides -903 and -680.

Since in rat, apo A-II gene expression is significantly down-regulated before weaning and then dramatically increases between days 20 and 30 [30], we checked next whether the silencer effect of the intron I is involved in the developmental regulation of apo A-II gene expression. Therefore, we compared the effects of intron I on the expression of the apo A-II gene in three rat hepatoma cell lines Fa32, Morris Mc A-RH7777 and Mc A-RH8994, which on the basis of the expression of alpha fetoprotein and albumin genes exhibit adult, embryonic and fetal phenotypes, respectively [31,32]. Consistently with these findings apo A-I messenger RNA is transcribed in all three cell lines whereas apo A-II mRNA is noticeably detectable only in the Fa32 cell line (Saladin R., Auwerx J. and Staels B., personal communication). As expected from the low expression of the endogenous apo A-II gene in Morris Mc A-RH7777 and Mc A-RH8994 cells, in transient transfections, apo A-II promoter driven CAT activity is 3 fold lower in both cell lines compared to Fa32 cell line, whereas the activity of the thymidine kinase promoter is similar in all three cell lines (data not shown). The silencer activity of the intron I is encountered in all three rat hepatic derived cell lines in a position independent manner on both the homologous and the heterologous thymidine kinase promoters (Fig. 1 B). However, the repression of the apo A-II promoter is not significantly higher in the cell lines exhibiting embryonic and fetal phenotypes (Morris Mc A-RH7777 and Mc A-RH8994 cells) than in the cell line with adult phenotype (Fa32 cells). Furthermore, the repression of the thymidine kinase promoter is lower in Morris Mc A-RH7777 and Mc A-RH8994 cells than in Fa32 cells, thereby indicating that intron I is not involved in the developmental regulation of apo A-II gene expression.

One can note that the decrease of activity of the thymidine kinase promoter by intron I is 3-fold higher in rat hepatoma Fa32 cells than in human hepatoma HepG2 cells and no cumulative

effect is observed in the former cells when the intron I is placed in tandem. Lack of cumulative effect can be explained by a more efficient silencer activity of this intron in Fa32 cells compared to HepG2 cells.

2) Characterisation of the negative elements of the apo A-II intron I.

The intron I sequence elements I and II, protected from DNAase I digestion by rat liver nuclear extracts [23], exhibit a similar repression on the thymidine kinase promoter (Fig. 2). Therefore these sequence elements correspond to negative regulatory elements termed NRE I and NRE II, respectively. Like the complete intron, the NRE I and NRE II are much more efficient in Fa32 cells than in HepG2 cells. A cumulative effect of these negative regulatory elements I and II is clearly observed in HepG2 cells whereas it is less pronounced in the rat cell line Fa32 again, probably due to the strong activity of intron I in this cell line.

Since the two negative regulatory elements NRE I and NRE II can account for the silencer activity of the intron, we analyzed by EMSA the nuclear proteins binding to these elements. As shown in Fig. 3, panels A and B lane 3, both NRE I and NRE II form two specific shifted bands with rat liver nuclear extracts: their formation was competitively prevented by unlabelled oligonucleotides corresponding to NRE I and NRE II, respectively but not by unlabelled irrelevant oligonucleotides (site A of human apo A-I (Fig. 6, lane 6) or sites J and M of human apo A-II gene (data not shown). When EMSA were performed with nuclear extracts from various cell lines, only nuclear extracts from rat liver and from cultured cells where the repressing activity of the intron was observed yielded these two specific complexes (Fig. 3). Indeed, different electrophoretic patterns are observed with JEG-3 and CV-1 nuclear extracts. Therefore, there is a good correlation between the cell specificity of the activity of these regulatory elements and the presence of nuclear proteins binding to these elements. One can note that Morris Mc A-RH8994 cell nuclear extracts give only a faint band of the fastest specific complex with both NRE I and NRE II probes (Fig. 3 A and B, lane 1). Similar electrophoretic

patterns were obtained between Morris Mc A-RH8994 cells (Fig. 3 A and B, lane 1) and Morris Mc A-RH7777 (data not shown). It is worth pointing out that the two specific shifted bands yielded with NRE I or with NRE II have identical electrophoretic mobilities, thus suggesting they correspond to complexes formed with the same proteins. This has been confirmed by mutual cross competition experiments as shown in Fig. 4.

3) Physico-chemical characteristics of the nucleo-protein complexes formed on negative regulatory elements NRE I and NRE II.

The DNA-binding characteristics of complexes formed with proteins binding to NRE I and NRE II were determined in EMSA by changing various components of the EMSA incubation mixture.

Complexes formed with elements I and II and nuclear proteins from rat liver are sensitive to the divalent cation chelator EDTA (Fig. 5 A and B, lanes 1 through 3). The complex stability is highly dependent on ionic strength, since complex formation is inhibited in the presence of 5 mM $MgCl_2$ (Fig. 5 A and B, lanes 5 and 6) or 110 mM NaCl (Fig. 5 A and B, lanes 9 and 10). In addition, the complexes formed with NRE I are highly thermolabile, since binding is destroyed when the incubation mixture is left at room temperature for 5 min before loading on the gel (Fig. 6 A, lane 8). An identical result has been obtained with NRE II (data not shown). Incubating increasing amounts of nuclear extracts with a constant amount of DNA probe corresponding to NRE I or NRE II leads to a simultaneous increase of both shifted bands (only results obtained with NRE I probe are presented in Fig. 6A, lanes 9 to 12).

Formation of two shifted bands with each one of the regulatory elements NRE I and NRE II is not dependent on disulfur bonds, since it is not affected by increasing molarity of DTT between 1 and 10 mM (data not shown). On the other hand, both shifted bands simultaneously disappeared in the presence of 1M urea (Fig. 6 A and B, lanes 1 to 4).

4) Identification of the sequences involved in the activity of the negative regulatory elements NRE I and NRE II.

In order to determine the sequences involved in the activity of the negative regulatory elements NRE I and NRE II, we took advantage that they bind the same proteins, therefore design of the mutations was conducted by analysis of sequence similarities between these regulatory elements and the positions of DNAase I hypersensitive sites previously detected by DNAase I footprinting assays [23]. Mutation in NRE I (see Table I) of either the GATGTGTG sequence (mutant Im1) or the TGGGC sequence (mutant Im2) results in a weaker binding of nuclear proteins, since these mutants compete less efficiently than the wild type NRE I (Fig. 7 A, lanes 1 to 4). Indeed at 50-fold molar excess, the efficiency of competition of mutants Im1 and Im2 (lanes 3 and 4) is about 80% that of the wild type NRE I (average values obtained with a PhosphoImager apparatus on three separate assays). On the other hand, simultaneous mutation of sequences GATGTGTG and TGGGC in mutant Im3 results in complete abolition of binding of nuclear proteins: this mutant does not compete for binding at 50-fold molar excess (Fig. 7 A, lane 5). Even at 150-fold molar excess, this latter mutant does not compete, whereas the above mentioned mutants completely inhibit the formation of the complexes (data not shown). As shown in Fig. 8, the efficiency of the mutants of NRE I to bind the nuclear proteins reflects their ability to repress the thymidine kinase promoter. Mutation of a single sequence in mutants Im1 and Im2 does not suppress the repressive effect of wild type NRE I, whereas simultaneous mutation of both sequences in mutant Im3 results in the loss of this repressive activity. Therefore, results obtained in CAT activity and in EMSA indicate that NRE I is composed of two sequences, the first one spanning from nucleotide +53 to the DNAase I hypersensitive site at position +60 and the second one from nucleotides +80 to +84 (Table I).

The sequence TGGGC, which is also present in NRE II at nucleotides +119 to +123, was mutated to yield mutant IIm1, and the sequence GATCTCCC placed on the complementary

strand and ending at the DNAase I hypersensitive site at nucleotide +131 [23], was mutated to yield mutant IIm3. In addition, this latter sequence is lacking in the truncated fragment corresponding to mutant IIm2 (see Table I). At 50-fold molar excess, mutants IIm1 and IIm2 compete about two-fold less efficiently than wild type NRE II (Fig. 7 B, lanes 3 and 4 compared to lane 2), a behaviour reminiscent to that observed with NRE I mutants (Fig. 7 A). On the other hand, mutant IIm3 does not compete the complexes formed on NRE II (Fig. 7 B, lane 5), even at 150-fold molar excess (data not shown). The transcriptional activity of mutants IIm1 and IIm3 are presented in Fig. 8: mutation of the TGGGC sequence only partially suppresses the repressive activity of NRE II, whereas mutant IIm3 has lost its repressive activity. Even if mutation of only one site in NRE II (mutant IIm3) is sufficient to suppress DNA binding and transcriptional repressing activities, data obtained with the other NRE II mutants indicate that, similarly to the NRE I, NRE II is constituted of two sequences. The results obtained with mutant IIm3 likely are due to the difference in distance and orientation between these sequences within NREs I and II: the sites are 19 bp apart in element I versus 8 bp in element II. In support to this hypothesis is the partial competition of complexes formed on NRE I by mutant IIm3 (Fig. 7 C, lane3), whereas this mutant does not compete at all for the complexes formed on NRE II.

DISCUSSION

The data in this paper demonstrate that the first intron of the human apo AII gene reduces the activity of its own promoter at the transcriptional level, even when placed upstream of the very strong enhancer spanning nucleotides -903/-680 in this gene. This extends our previous observations showing that this intron acts as a silencer on the thymidine kinase promoter [23]. Furthermore, we have localized the silencer activity of the first intron to the two sequences spanning over nucleotides +49 to +89 and +109 to +149, termed negative regulatory elements NRE I and NRE II, respectively. Our results also show that the silencer activity and the

nuclear proteins binding to these elements are encountered in hepatoma derived cells but not in human chorio-carcinoma JEG-3 cells nor in african green monkey kidney CV-1 cells.

NRE I and NRE II of the first intron i, exhibit the same repressive activity, ii, form complexes of identical electrophoretic mobility which are mutually cross competed by these elements and iii, form with nuclear proteins complexes of very similar physico-chemical properties, thus indicating that these regulatory elements bind the same or closely related proteins. In addition, our results show that both NRE I and NRE II comprise two sites which are required for optimal binding of nuclear proteins and for maximal repression of the thymidine kinase promoter. The site TGGGC is identical in both NREs, whereas the second site differs in sequence at its 3' end and in distance and orientation relative to the former site. Nevertheless, its 3' end coincides with a strong DNAase I hypersensitive site in both NREs [23]. In addition, all the mutants of NRE I exhibit the same competition behaviour both on complexes formed on NRE I and NRE II (data not shown). Therefore, despite the above mentioned differences, it appears that NRE I and NRE II correspond to elements of similar structure and function, placed in tandem in the first intron of human apo A-II gene.

The effect of EDTA on the stability of the nucleoprotein complexes suggests the presence of Zinc-fingers as DNA-binding motif in these proteins. However, these proteins correspond neither to protein Sp1 nor to nuclear hormone receptors such as ARP-1 or COUP-TF which are known to repress transcription of apolipoprotein genes [33-35]. Indeed, the complexes formed on NREs I and II are competed neither by an oligonucleotide corresponding to protein Sp1 binding site nor by oligonucleotides containing responsive elements of these orphan nuclear receptors [site A of the apo A-I gene (Fig. 6, lane 6 of panels A and B), or site J of apo A -II gene (data not shown)]. Since protein binding is completely abolished in the presence of a low molarity in urea (1M), the protein secondary and/or tertiary structure(s) is (are) highly affected by this denaturing agent and the integrity of these structures appears to be crucial for the binding

to DNA.

Although the thermolability of the nucleoprotein complexes hampered further investigation of the exact nature of the protein complexes forming the two shifted bands, from our results it can be excluded that the two shifted bands correspond to two complexes formed independently by binding of different proteins on each site of NRE I and NRE II, since they are simultaneously displaced by competition with the mutants bearing a single mutated site (mutants Im1, Im2, IIm1 and IIm2). We have observed that in several EMSA repeated under the same conditions and with the same nuclear extract preparation, the relative amounts of the two complexes vary from one experiment to the other (example given with NRE II in Fig. 4 and Fig. 7 B, lane 1). This finding excludes the possibility that the two shifted bands reflect either the formation of two complexes involving protein isoforms having the same DNA binding domain but different molecular sizes or the formation of two complexes differing by an accessory factor present only in the slower migrating complex. Indeed, in such cases, the amount of these putative isoforms or accessory factor is constant in a given preparation of nuclear extract and consequently the various complexes formed should remain unchanged. It is also unlikely that, despite the presence of protease inhibitors, a specific proteolysis occurs, since the lowest size complex is not systematically enhanced in a set of experiments. On the other hand, it is more likely that the two shifted bands reflect an equilibrium between protein multimeric forms, as observed with the prokaryotic DNA binding protein MC1 [36] or eukaryotic factors, such as the protein Sp1 [37] and the RZR nuclear receptor [38]. We can note that, in contrast to these proteins, the proteins bound to the negative regulatory elements of this intron do not cooperatively form their multimers, since the highest size complex is not favoured in the presence of increasing amounts of proteins (fig. 6A, lanes 9 to 12).

Multiple silencer elements exhibiting a cumulative effect and probably binding the same proteins have already been described in the chicken vimentin gene [39]. Silencers consisting of

several negative elements have also been found in several genes[40-42], but the NRE described in these and other genes are not constituted of two sites acting in synergy and presenting sequence similarity with NREs I and II in the apo AII intron I [21,39-50], thus indicating that these NRE have an original structure.

Substantial evidence indicates that the presence of apo A-II in lipoprotein particles counteracts the protective effect of apo A-I against atherosclerosis development. Furthermore, it has been recently shown that the rate of apo A-II production is a major factor determining the relative amounts of LpA-I and LpA-I:A-II HDL subclasses in normolipidemic humans [15], suggesting that reduction of apo A-II synthesis can improve the anti-atherogenic profile of HDL. The characterization of negative regulatory elements may therefore provide a means to down-regulate the apo A-II gene transcription in the liver, which may be of use to protect humans against atherogenesis.

Acknowledgments

We thank M.J. Dupire and C. Massenat for their excellent technical assistance. The authors are indebted to Dr. C. Dozier, S. Plaza, P. Cardot and A. Mahfoudi for valuable discussions. This work was supported by the INSERM, grants from the Institut Pasteur de Lille and from the Institut de Chimie Pharmaceutique (University of Lille II) and by a BioAvenir Program Project grant (to SERLIA) from Rhône Poulenc and the French Government (MRE and MICE).

Bibliography

- 1 Karathanasis, S. K. (1992) in *Molecular genetics of coronary artery disease. Candidate genes and processes in atherosclerosis*. Monogr. Hum. Genet. (Lusis, A. J., Rotter, J. I., and Sparkes, R. S. eds) pp. 140-171, Karger, S. Basel
- 2 Zannis, V. I., Kardassis, D., and Zanni, E. E. (1993) in *Advances in Human Genetics* (Harris, H. and Hirschhorn, K. eds) pp. 145-319, Plenum Press, New York
- 3 Breslow, J. L. (1993) *Circulation* **87**, III16-III21
- 4 Coste Burel, M., Mainard, F., Chivot, L., Auget, J. L., and Madec, Y. (1990) *Clin. Chem.* **36**, 1889-1891
- 5 Parra, H. J., Arveiler, D., Evans, A. E., Cambou, J. P., Amouyel, P., Bingham, A., McMaster, D., Schaffer, P., Douste Blazy, P., Luc, G., and et al (1992) *Arterioscler. Thromb.* **12**, 701-707
- 6 Mehrabian, M., Qiao, J. H., Hyman, R., Ruddle, D., Laughton, C., and Lusis, A. J. (1993) *Arterioscler. Thromb.* **13**, 1-10
- 7 Warden, C. H., Hedrick, C. C., Qiao, J. H., Castellani, L. W., and Lusis, A. J. (1993) *Science* **261**, 469-472
- 8 Hedrick, C. C., Castellani, L. W., Warden, C. H., Puppione, D. L., and Lusis, A. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 20676-20682
- 9 Schultz, J. R., Gong, E. L., McCall, M. R., Nichols, A. V., Clift, S. M., and Rubin, E. M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 21630-21636
- 10 Schultz, J. R., Verstuyft, J. G., Gong, E. L., Nichols, A. V., and Rubin, E. M. (1993) *Nature* **365**, 762-764
- 11 Barbaras, R., Puchois, P., Fruchart, J. C., and Ailhaud, G. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**, 63-69
- 12 Barbaras, R., Grimaldi, P., Negrel, R., and Ailhaud, G. (1986) *Biochem. Biophys. Acta* **888**, 143-156
- 13 De La Llera Moya, M., Atger, V., Paul, J. L., Fournier, N., Moatti, N., Giral, P., Friday, K. E., and Rothblat, G. (1994) *Arterioscler. Thromb.* **14**, 1056-1065
- 14 Lagrost, L., Dengremont, C., Athias, A., De Geitere, C., Fruchart, J. C., Lallemand, C., Gambert, P., and Castro, G. (1995) *J. Biol. Chem.* (in press)
- 15 Ikewaki, K., Zech, L. A., Kindt, M., Brewer, H. B. J., and Rader, D. J. (1995) *Arterioscler.*

Thromb. **15**, 306-312

16 Shelley, C. S. and Baralle, F. E. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 3801-3821

17 Lucero, M. A., Sanchez, D., Ochoa, A. R., Brunel, F., Cohen, G. N., Baralle, F. E., and Zakin, M. M. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 2283-2300

18 Chambaz, J., Cardot, P., Pastier, D., Zannis, V. I., and Cladaras, C. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 11676-11685

19 Cardot, P., Chambaz, J., Cladaras, C., and Zannis, V. I. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 24460-24470

20 Cardot, P., Chambaz, J., Kardassis, D., Cladaras, C., and Zannis, V. I. (1993) *Biochemistry* **32**, 9080-9093

21 Cardot, P., Pastier, D., Lacorte, J. M., Mangeney, M., Zannis, V. I., and Chambaz, J. (1994) *Biochemistry* **33**, 12139-12148

22 Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Kosykh, V., Dallongeville, J., Fruchart, J. C., Staels, B., and Auwerx, J. (1995) *J. Clin. Invest.* **96**, 741-750

23 Bossu, J. P., Chartier, F. L., Vu Dac, N., Fruchart, J. C., and Laine, B. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 822-829

24 Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

25 Luckow, B. and Schütz, G. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 5490

26 Gorman, C., Padmanabhan, R., and Howard, B. H. (1983) *Science* **222**, 551-553

27 Brunel, F., Ochoa, A., Schaeffer, E., Boissier, F., Guillou, Y., Cereghini, S., Cohen, G. N., and Zakin, M. M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 10180-10185

28 Spegelaere, P., van Hille, B., Spruyt, N., Faisst, S., Cornelis, J., and Rommelaere, J. (1991) *J. Virol.* **65**, 4919-4928

29 Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., and Roeder, R. G. (1983) *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475-1489

30 Staels, B., Auwerx, J., Chan, L., van Tol, A., Rosseneu, M., and Verhoeven, G. (1989) *J. Lipid Res.* **30**, 1137-1145

31 Becker, J. E., Nechaud, B., and Potter, V. R. (1976) *Onco-Developmental Gene Expression*, Academic Press, New York

- 32 Schulz, W. A., Crawford, N., and Locker, J. (1988) *Exp. Cell Res.* 433-447
- 33 Ladas, J. A. and Karathanasis, S. K. (1991) *Science* **251**, 561-565
- 34 Mietus Snyder, M., Sladek, F. M., Ginsburg, G. S., Kuo, C. F., Ladas, J. A., Darnell, J. E. J., and Karathanasis, S. K. (1992) *Mol. Cell Biol.* **12**, 1708-1718
- 35 Ladas, J. A., Hadzopoulou Cladaras, M., Kardassis, D., Cardot, P., Cheng, J., Zannis, V., and Cladaras, C. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 15849-15860
- 36 Culard, F., Laine, B., Sautiere, P., and Maurizot, J. C. (1993) *FEBS Lett.* **315**, 335-339
- 37 Pascal, E. and Tjian, R. (1991) *Gen. Dev.* **5**, 1646-1656
- 38 Carlberg, C., Hooft van Huijsduijnen, R., Staple, J. K., DeLamarter, J. F., and Becker-André, M. (1994) *Mol. Endocrinol.* **8**, 757-770
- 39 Garzon, R. and Zehner, Z. E. (1994) *Mol. Cell Biol.* **14**, 934-943
- 40 Imagawa, M., Osada, S., Okuda, A., and Muramatsu, M. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 5-10
- 41 Smith, J. D., Melian, A., Leff, T., and Breslow, J. L. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 8300-8308
- 42 van de Klundert, F. A. J. M., van Eldik, G. J., Pieper, F. R., Jansen, H. J., and Bloemendal, H. (1992) *Gene* **122**, 337-343
- 43 Baniahmad, A., Muller, M., Steiner, C., and Renkawitz, R. (1987) *EMBO J.* **6**, 2297-2303
- 44 Hadzopoulou-Cladaras, M. and Cardot, P. (1993) *Biochemistry* **32**, 9657-9667
- 45 O'Brien, R. M., Lucas, P. C., Forest, C. D., Magunuson, M. A., and Granner, D. K. (1990) *Science* **249**, 533-537
- 46 Takimoto, M., Quinn, J. P., Farina, A. R., Staudt, L. M., and Levens, D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 8992-8999
- 47 Hay, N. M., Takimoto, M., and Bishop, J. M. (1989) *Genes Dev.* **3**, 293-303
- 48 Salvetti, A., Lilienbaum, A., Li, Z., Paulin, D., and Gazzolo, L. (1993) *Mol. Cell Biol.* **13**, 89-97
- 49 Frenkel, B., Montecino, M., Stein, J. L., Lian, J. B., and Stein, G. S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10923-10927

50 Ye, J., Ghosh, P., Cippitelli, M., Subleski, J., Hardy, K. J., Ortaldo, J., and Young, H. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 25728-25734

Legends to figures:

Figure 1 Activity of the apo A-II first intron in various cell lines.

A, activity of the intron in the non-hepatic human chorio-carcinoma JEG-3 and green monkey kidney CV-1 cell lines. Previous results obtained with HepG2 cells[23] are given for comparison. Only the activity of the intron on the thymidine kinase promoter is shown since apo A-II promoter activity is not detectable in these non-hepatic cell lines.

B, activity of the intron in rat hepatoma cell lines exhibiting adult (Fa32), embryonic (Morris Mc A-RH7777) and fetal (Mc A-RH8994) phenotypes. The effect of the intron I when placed upstream of the enhancer-basal promoter of the apo A-II gene is also shown.

P, P In and In P represent the human apo A-II enhancer-basal promoter alone (-911/+40) and flanked by the first intron downstream and upstream, respectively. TK, In TK and 2 In TK represent the thymidine kinase promoter alone and flanked by the intron in monomer and dimer, respectively. CAT activities, determined and normalized for difference in transfection efficiencies, as indicated in Material and Methods, are expressed relative to those of apo A-II enhancer-basal promoter P and thymidine kinase promoter TK constructs. The results shown in the two panels are averages of at least three independent transfection experiments performed in duplicate with two different DNA preparations, with the standard deviations indicated by error bars.

Figure 2. Activity of the NRE I and NRE II on the thymidine kinase promoter.

The symbols TK and In TK are as in Fig. 1. I TK, II TK, and I-II TK represent the footprinted sequences I and II (corresponding to NRE I and NRE II, respectively) fused alone or together upstream of the thymidine kinase promoter, respectively. CAT activities, determined and normalized for difference in transfection efficiencies, as indicated in Material and Methods, are expressed relative to the activity of the thymidine kinase promoter. The results shown are

averages of at least three independent transfection experiments performed in duplicate with two different DNA preparations, with the standard deviations indicated by error bars.

Figure 3: The nuclear proteins binding to the negative regulatory elements NRE I and NRE II of the first intron of the human apo A-II exhibit a cell-type specificity.

The double stranded oligonucleotides corresponding to NRE I and NRE II (panels A and B, respectively) were end-labelled as indicated in the Methods section and used as probes in EMSA. Complexes were formed with the nuclear extracts from : 1, Morris Mc A-RH8994 cells; 2, rat hepatoma Fa32 cells; 3, rat liver; 4, human hepatoma HepG2 cells; 5, human chorio-carcinoma JEG-3 cells; 6, african green monkey kidney CV-1 cells. - and + stand for the absence and the presence of 100-fold molar excess of homologous unlabelled competitors (Comp.). The arrows indicate specific complexes.

Figure 4 : Negative regulatory elements NRE I and NRE II of the first intron bind the same proteins.

End-labelled double stranded oligonucleotides corresponding to NRE I and NRE II were complexed with 4 μ g of rat liver nuclear extracts. Cross competitions were performed with increasing amounts (indicated at the top of the figure) of unlabelled oligonucleotides corresponding to NRE I or NRE II.

Figure 5 : Physico-chemical DNA binding characteristics of complexes formed with negative regulatory elements NRE I and NRE II.

The labelled oligonucleotides corresponding to NRE I and NRE II (panels A and B, respectively) and rat liver nuclear extracts were incubated as indicated in the Methods section in the presence

of 0.5, 5 and 10 mM EDTA (lanes 1, 2, 3, respectively) or of 1, 5, 15 mM MgCl₂ (lanes 4, 5, 6, respectively) or of 50, 80, 110, 150 mM NaCl (lanes 7, 8, 9, 10, respectively).

Figure 6 : Physico-chemical DNA binding characteristics of complexes formed with negative regulatory elements NRE I and NRE II.

The labelled oligonucleotides corresponding to NRE I and NRE II (panels A and B, respectively) and rat liver nuclear extracts were incubated as indicated in the Methods section in the absence (lane 1) or the presence of 0.5, 1.0, 1.5 M urea (lanes 2, 3, 4, respectively). Complexes were incubated in the absence or the presence of 100-fold molar excess of unlabelled human apo A-I site A (positions -214 to -192) oligonucleotide (lanes 5 and 6, respectively). Thermolability of the complexes formed with NRE I oligonucleotide is shown in lanes 7 and 8 in panel A, where complexes were allowed to form on ice for one hour and either directly loaded or kept at room temperature for 5 minutes before loading, respectively. Effect of increasing amounts of rat liver nuclear extract (1µg, 2µg, 4µg and 6µg; lanes 9,10, 11, 12, respectively) on a constant amount of labelled oligonucleotide NRE I (0.2 µg). For thermolability and effect of increasing amounts of nuclear extract, similar results were obtained with negative regulatory element NRE II (data not shown).

Figure 7. Effects of mutations of negative regulatory elements NRE I and NRE II on their binding to nuclear proteins.

The labelled probes (indicated at the top of the panels) and rat liver nuclear extracts were incubated as indicated in Fig. 3 in the absence (-) or presence (+) of 50-fold molar excess (panels A and B) or 150-fold molar excess (panel C) of unlabelled oligonucleotides corresponding to mutants of NRE I and NRE II given in Table I and indicated at the top of the figure.

Figure 8. Effects of mutations of negative regulatory elements NRE I and NRE II on their activity.

The activity of mutants of NRE I and NRE II, given in Table I, was analyzed on the thymidine kinase promoter (TK). CAT activities, determined and normalized for difference in transfection efficiencies as indicated in Material and Methods are expressed relative to that of the thymidine kinase promoter. The results shown are averages of at least three independent transfection experiments performed in duplicate with two different DNA preparations, with the standard deviations indicated by error bars.

A

Constructs

**Human
hepatoma cells
(HepG2)**

**Human
chorio-carcinoma
cells
(JEG-3)**

**Green Monkey
kidney cells
(CV-1)**

Relative CAT activity

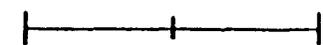
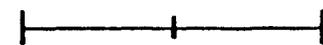
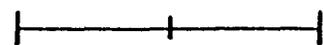
Relative CAT activity

Relative CAT activity

0 50 100

0 50 100

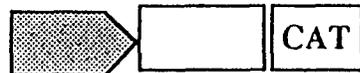
0 50 100



TK



In TK



2 In TK



Constructs

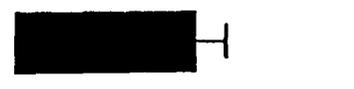
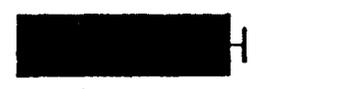
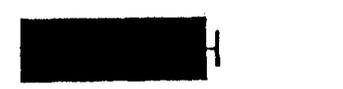
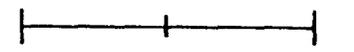
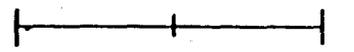
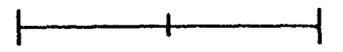
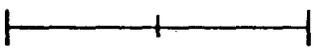
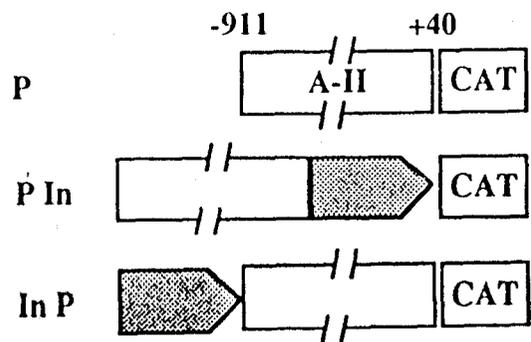
**Human
hepatoma cells
(HepG2)**

**Rat hepatoma
Fa32 cells**

**Rat hepatoma
7777 cells**

**Rat hepatoma
8994 cells**

Relative CAT activity
0 50 100

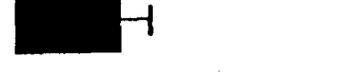
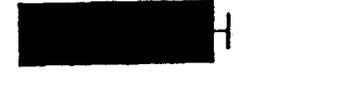
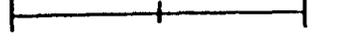
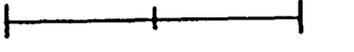
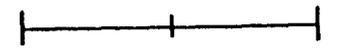
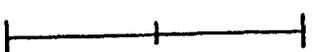


0 50 100

0 50 100

0 50 100

0 50 100



TK

In TK

In TK

CAT

CAT

CAT

Constructs

**Human
hepatoma cells
(HepG2)**

**Rat
hepatoma cells
(Fa32)**

Relative CAT activity

Relative CAT activity

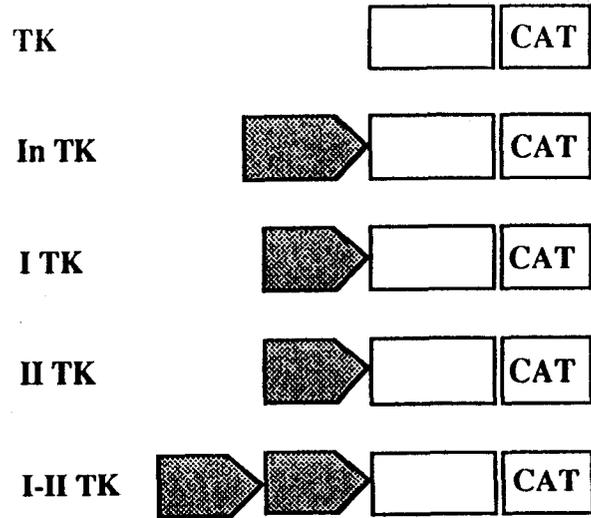
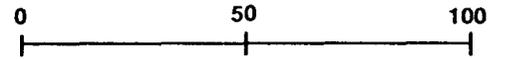
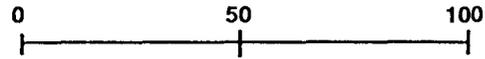
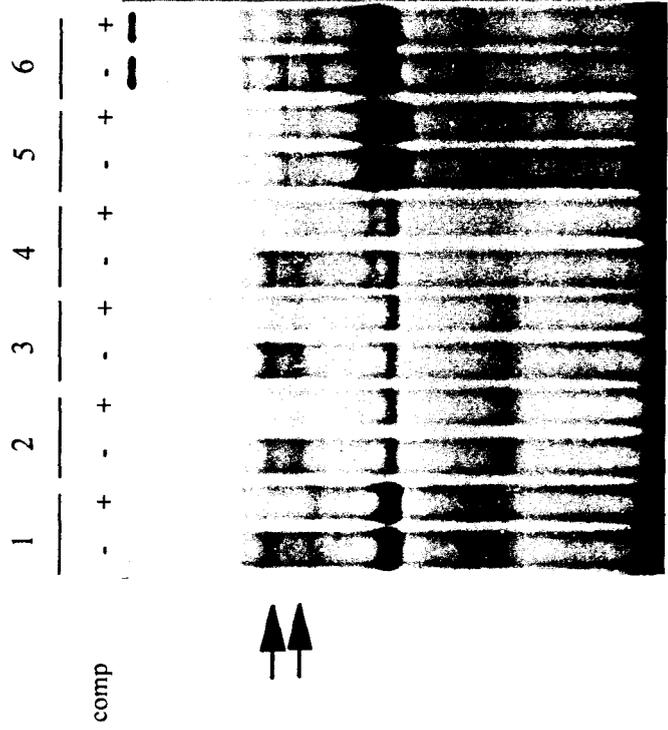


Table 1 : Oligonucleotides corresponding to negative regulatory elements NRE-I and NRE-II of the human α -II intron I gene and their mutants.

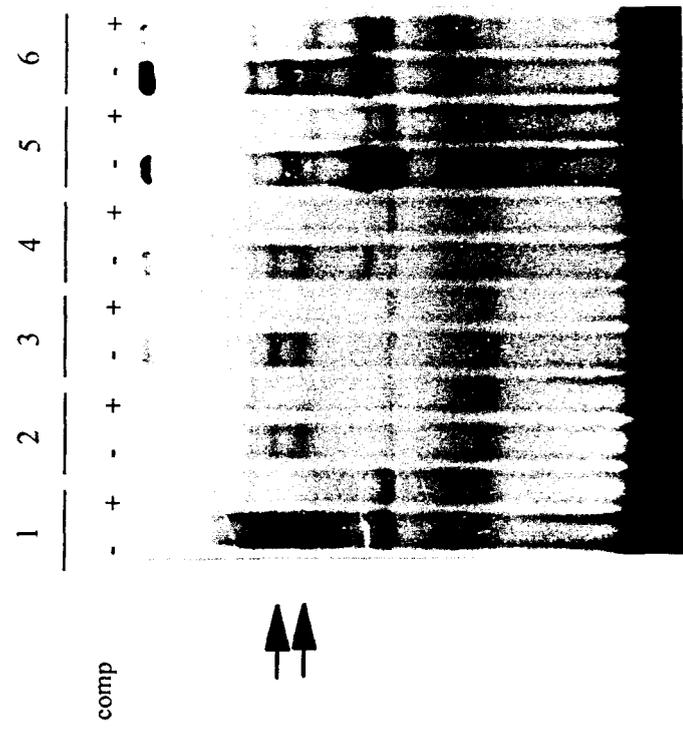
	49	→	★	→	89
wt	AGCTTGCAAGATGTGT		GAGCAGCATCCAAAGAGGCCTGGGCTGT		CGA
m1	AGCTTGCAATTAGTGAT		AGCAGCATCCAAAGAGGCCTGGGCTGT		CGA
m2	AGCTTGCAAGATGTGT		GAGCAGCATCCAAAGAGGCCATCTGTGT		CGA
m3	AGCTTGCAATTAGTGAT		AGCAGCATCCAAAGAGGCCATCTGTGT		CGA
	109	→		←	149
wt	AGCTTCAGGTTGGAATGGGCAGCAGGTAGGGAGATCCCTGGGGT		CGA		CGA
m1	AGCTTCAGGTTGGAACCAAAGCAGGTAGGGAGATCCCTGGGGT		CGA		CGA
m2	CAGGTTGGAATGGGCAGCAGGTAGG				
m3	AGCTTCAGGTTGGAATGGGCAGCAGGTATCGAGTAACCTGGGGT		CGA		CGA

Rows indicate the sequences involved in the activity of these regulatory elements. Underlined nucleotides are mutated. Stars indicate DNase I hypersensitive sites (see text). Only the main sequence is presented in bold letters, normal letters correspond to restriction sites. Numbers indicate the positions of regulatory elements ends in the intron I.

A



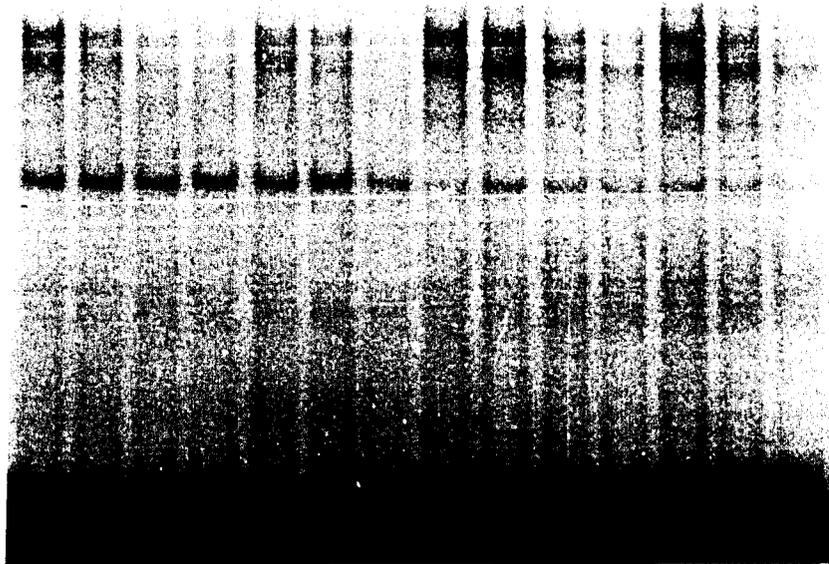
B

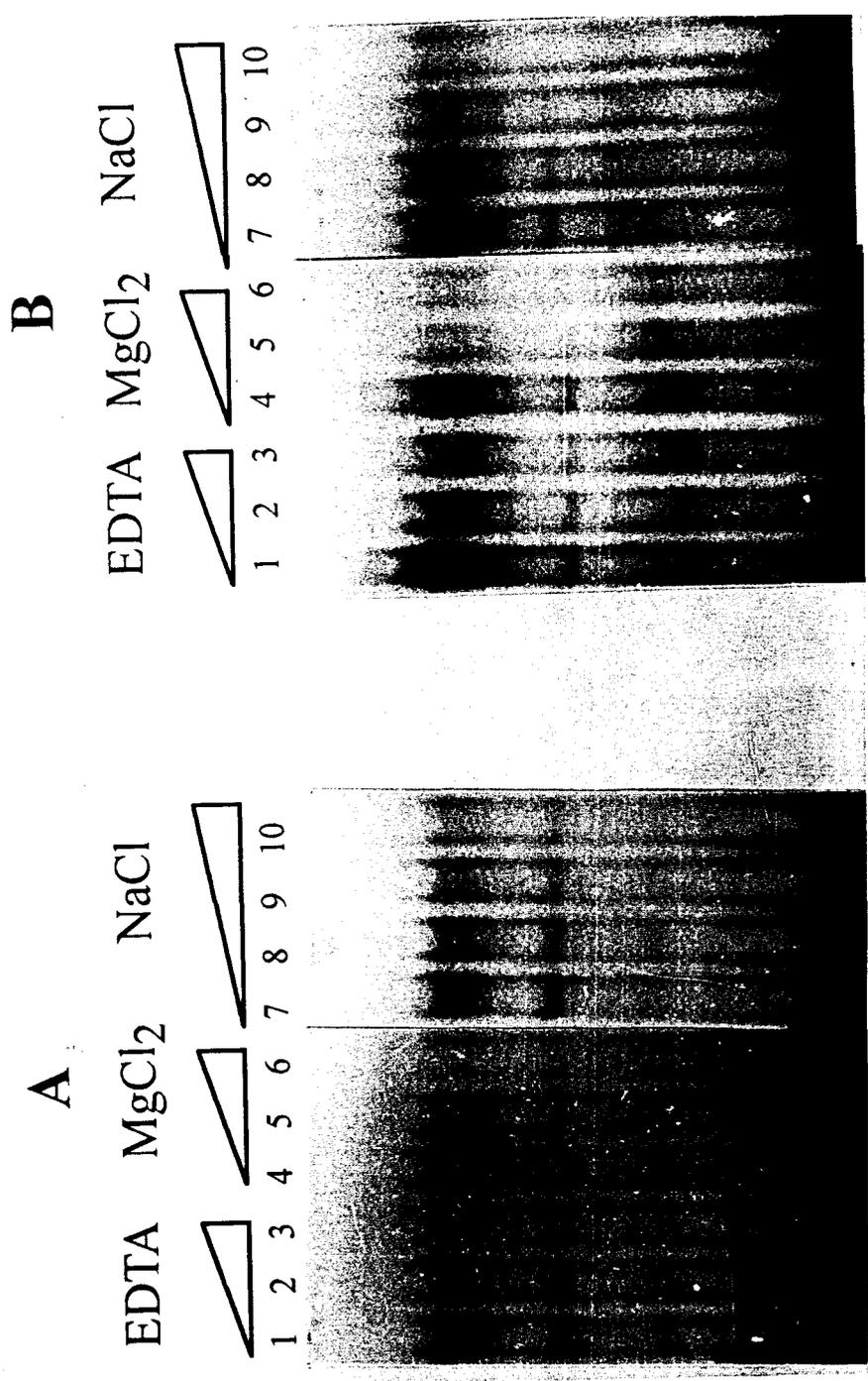


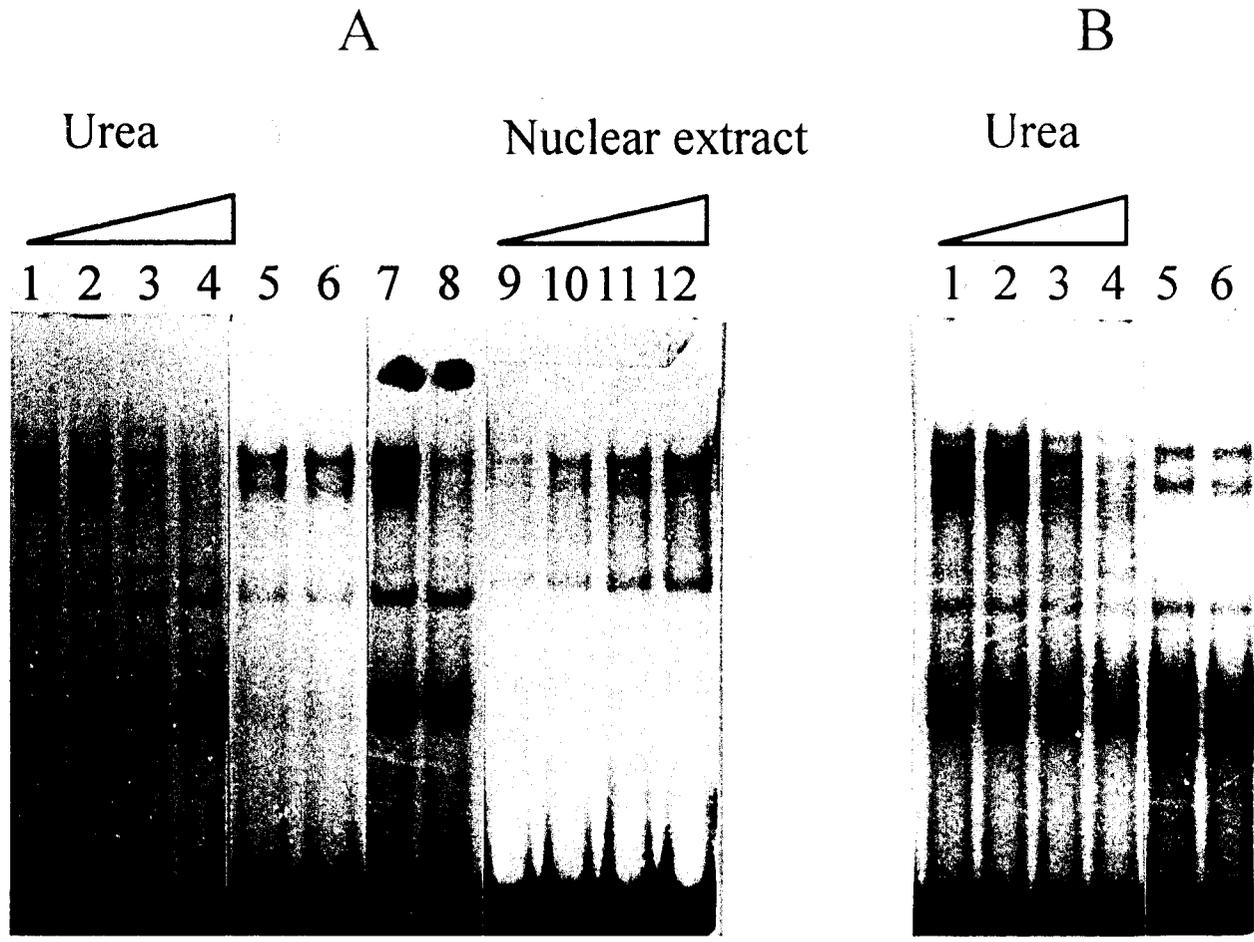
Probe	_____ I _____	_____ II _____
Comp.	- _____ I _____ II _____	- _____ II _____ I _____
Fold molar excess	25 75 150 25 75 150	25 75 150 25 75 150

Specific complexes
▶▶

Free probe

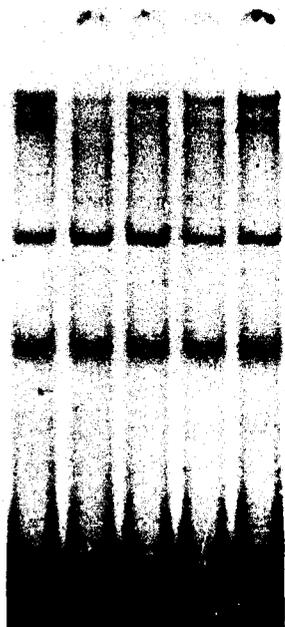






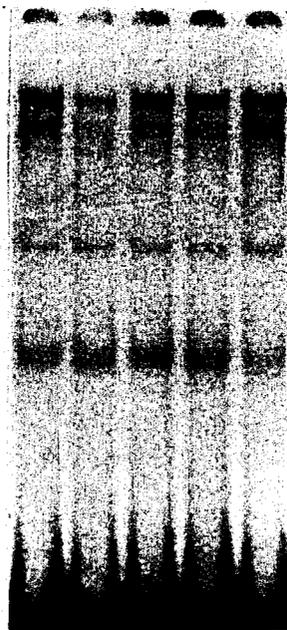
A

	1	2	3	4	5
Competitor	-	Iw	Im1	Im2	Im3
Molar fold excess		50	50	50	50



B

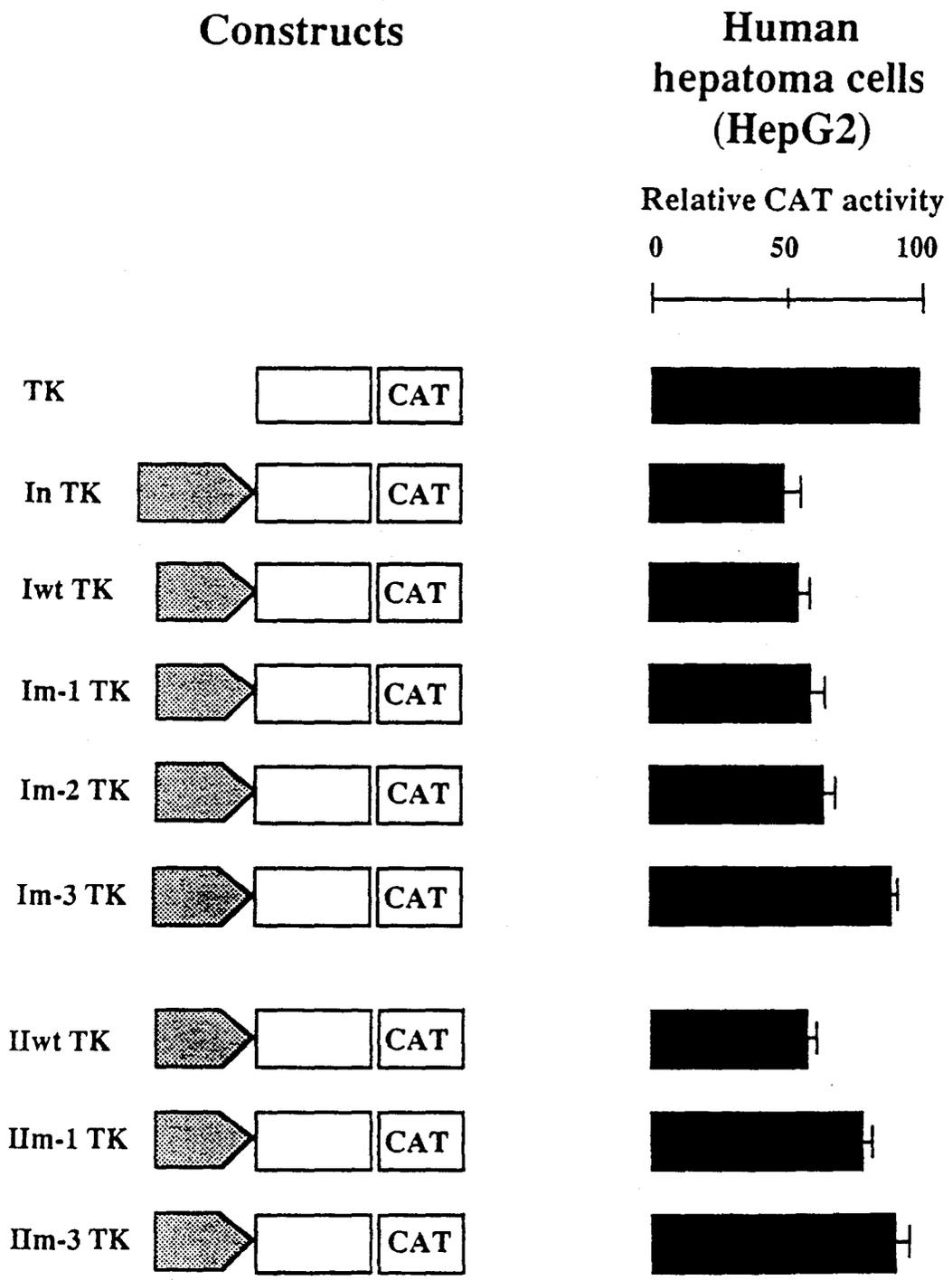
	1	2	3	4	5
Competitor	-	Iw	Im1	Im2	Im3
Molar fold excess		50	50	50	50



C

	1	2	3	4	5
Competitor	-	Iw	Im3	Im1	Im2
Molar fold excess		150	150	150	150





II- Résultats

Les principaux résultats sont les suivants.

A- Nature et particularités de l'activité de l'intron I

- Les expériences de transfection réalisées dans les lignées cellulaires d'hépatome humain HepG2, de rat Mc A-RH7777, Mc A-RH8994 et Fa32 et de carcinome du colon Caco-2 ont montré que l'intron I du gène de l'apoA-II a un effet répresseur au niveau transcriptionnel.

- Cet effet s'exerce aussi bien sur le promoteur homologue que sur le promoteur hétérologue.

- L'effet de l'intron sur le promoteur TK est observé quelque soit son orientation (sens ou antisens) dans les lignées HepG2 et Caco-2: l'intron I correspond donc à la définition d'un silencer (en terme d'orientation).

- L'activité de la construction contenant un dimère d'intron placé devant le promoteur TK montre que cet effet silencer est cumulatif.

- L'activité silencer est plus faible devant le promoteur P que devant le promoteur TK mais il faut souligner que cet effet silencer sur le promoteur P est suffisamment fort pour atténuer le puissant effet de l'enhancer distal (région -911/-680), et ceci malgré la distance et les quatorze cis-éléments compris dans la séquence -911 à +37.

B- Spécificité tissulaire de l'activité de l'intron I

1- L'activité de l'intron ne contribue pas à la spécificité hépatique et intestinale de l'expression de l'apoA-II

L'amplitude de la répression exercée par l'intron I sur l'activité du promoteur P ou TK est similaire dans les cellules HepG2 et Caco-2, ce qui prouve que l'intron ne participe pas à la répression de la synthèse de l'apoA-II dans la cellule Caco-2.

2- L'intron ne participe pas à la spécificité tissulaire de l'expression de l'apoA-II

L'absence d'effet silencer sur le promoteur TK dans les cellules JEG-3 et CV-1 montre, puisque ces lignées n'expriment pas l'apoA-II, que l'activité répressive de l'intron est spécifique des cellules l'exprimant. Cet aspect paradoxal sera commenté dans la discussion.

3- L'activité répressive de l'intron ne contribue pas à l'extinction du gène de l'apoA-II durant la vie foetale et embryonnaire

L'équivalence de l'amplitude de l'effet silencer de l'intron sur son propre promoteur dans les lignées cellulaires d'hépatome de rat Mc A-RH7777, Mc A-RH8994 et Fa32 représentant trois stades du développement suggère que l'intron I n'est pas impliqué dans la répression du gène de l'apoA-II durant les premières étapes du développement.

Nous ne pouvons toutefois pas exclure l'existence d'une synergie entre l'intron et un autre élément en amont ou en aval ou la possibilité, que nous n'avons pas abordée dans nos études, d'une régulation hormonale lors du développement impliquant des éléments de l'intron. Pour le confirmer, il faudrait appliquer les techniques de transgénèse sur animal.

Remarquons cependant que l'ensemble de ces résultats est obtenu par la méthode de transfection transitoire de cellules en culture. L'idéal serait de vérifier l'activité de l'intron et d'étudier son rôle dans la spécificité cellulaire et dans le développement par l'approche transgénèse comme cela a été fait pour l'intron II du gène de l'apoB humaine (Brooks et al., 1994).

C- Caractérisation des éléments de régulation négatifs situés à l'intérieur de l'intron I de l'apoA-II humaine

Les expériences de footprint à la DNase I ont permis de mettre en évidence trois sites d'interaction distincts entre l'intron et les protéines d'extraits nucléaires de foie de rat. Les bases spécifiques d'interaction des protéines nucléaires avec l'ADN ont été déterminées plus précisément en utilisant la mutagenèse dirigée et seront indiquées plus loin.

1- Etude de l'activité des deux premiers sites

- Les deux premiers sites, étudiés en transfection transitoire dans les cellules HepG2 et Fa32, ont tous deux une activité répressive sur le promoteur TK: ils correspondent à des éléments de régulation négatifs et ont été nommés NRE I et NRE II (Negative Regulatory Element).

- Les activités répressives sur le promoteur TK des éléments NRE I et NRE II sont voisines et un peu supérieure à celle observée pour l'intron. De même que pour l'intron, les effets répresseurs de ces deux éléments sont plus forts dans les cellules Fa32 que dans les cellules HepG2.

- L'activité de la combinaison des deux éléments dans les cellules HepG2 montrent que les séquences NRE I et NRE II ont un effet additif pour réprimer le promoteur TK.

2- Etude des activités nucléaires se fixant sur les éléments régulateurs NRE I et NRE II

- Les analyses effectuées en gel-retard montrent la formation de deux complexes ADN-protéines spécifiques et distincts, sur chaque élément, NRE I et NRE II, avec les protéines nucléaires de foie de rat ou de cellules d'hépatome (HepG2, Mc A-RH7777, Mc A-RH8994 et Fa32).

- Les deux complexes obtenus avec NRE I présentent une mobilité électrophorétique identique à celle des deux complexes obtenus avec NRE II.

- La formation des complexes entre les protéines nucléaires et NRE I peut subir une compétition par NRE II, et réciroquement, la formation des complexes entre les protéines et NRE II peut être empêchée par la compétition par NRE I.

- Ces protéines nucléaires qui se fixent sur les deux éléments de régulation sont trouvées dans les cellules d'hépatome où l'effet répresseur de l'intron I est observé, mais ne le sont pas dans les cellules CV-1 et JEG-3 où l'intron n'a pas d'effet: il existe donc une relation entre la spécificité cellulaire de l'activité de ces éléments de régulation et la présence de ces protéines.

D- Caractéristiques physico-chimiques des complexes nucléoprotéiques formés avec les NRE

L'étude de leurs caractéristiques physico-chimiques indique que les protéines se fixant sur ces deux éléments ont des propriétés physico-chimiques communes:

- elles sont thermolabiles et sont détruites en présence d'urée.
- elles sont très exigeantes vis-à-vis des conditions ioniques de formation des complexes.
- elles présentent des caractéristiques chromatographiques d'éluion identiques: le fractionnement de ces protéines sur une colonne d'Héparine-Sépharose montre qu'elles sont éluées à une concentration de 0.3 M NaCl .
- elles contiennent probablement des doigts de zinc comme motif de liaison à l'ADN mais sont incapables de se lier aux éléments A (-220 à -190) de l'apoA-I et J (-734/-716) de l'apoA-II qui fixent des récepteurs nucléaires d'hormones, eux-mêmes ayant une région de fixation à l'ADN en doigt de zinc.
- elles ne correspondent pas non plus à la protéine Sp1 qui possède également un motif à doigt

de zinc (voir ci-dessous), puisque leur fixation sur les NRE n'est pas inhibée par la compétition par un oligonucléotide portant la séquence Sp1 CTGGGCGGAGTTAGGGGCA.

La purification de ces activités nucléaires n'a pu être entreprise en raison des difficultés apportées par leur très grande labilité.

E- Conclusion tirée des résultats des paragraphes C-1, C-2, D

- NRE I et NRE II exercent la même activité répressive, forment avec les protéines nucléaires des complexes de mobilité électrophorétique identique, qui sont cross-compétés mutuellement par ces éléments et qui partagent, de plus, des propriétés physico-chimiques communes.

- Cet ensemble de similitudes démontre sans équivoque que des protéines identiques ou très similaires se lient sur NRE I et NRE II.

F- Identification des séquences impliquées dans l'activité des éléments NRE I et NRE II

- La comparaison de la séquence des deux éléments et la recherche par mutagenèse des motifs nucléotidiques reconnus par les protéines nucléaires révèlent l'existence de deux motifs distincts à l'intérieur de chaque élément, espacés différemment d'un élément à l'autre, indispensables à la fixation optimale des protéines et à l'activité maximale des deux éléments de régulation.

- Le motif situé en 3' sur le brin sens de NRE I se retrouve totalement sur le brin antisens de NRE II en 5', et le motif situé en 5' sur le brin codant de NRE I se retrouve partiellement sur le brin non codant de NRE II en 3' et en position inversée. Les éléments NRE I et NRE II sont donc des éléments répresseurs de structure similaire.

III- Conclusion générale

Nos résultats montrent que l'intron I du gène de l'apoA-II contient deux éléments de régulation négatifs de structure similaire, placés en tandem, qui fixent des activités nucléaires identiques ou très similaires, et l'activité de chacun de ces éléments est capable d'expliquer l'effet répressif de l'intron I sur l'activité du promoteur de l'apoA-II.

DISCUSSION

Nos résultats amènent un certain nombre de réflexions sur:

- Les particularités de l'intron I, en ce qui concerne:

- * la coopération des sites NRE I et NRE II dans l'effet répresseur au niveau du fragment génomique de l'intron
- * l'origine évolutive de NRE I et NRE II
- * le rôle de la troisième fenêtre de fixation des protéines nucléaires sur l'intron dans l'activité répressive de l'intron I

- Les particularités des facteurs de transcription qui se fixent sur NRE I et NRE II en ce qui concerne:

- * la spécificité tissulaire de l'expression de ces protéines, sachant que l'effet de l'intron I est spécifique de certains types cellulaires.
- * l'amplitude du pouvoir répresseur de ces protéines.
- * la parenté entre les protéines humaines de la cellule HepG2 et de rat des souches Mc A-RH7777 et Mc A-RH8994.
- * l'effet transdominant important des protéines dans la cellule de rat Fa32.
- * l'originalité de ces facteurs de transcription et leur fixation sur un nouveau type de séquence de fixation.

I- Particularités de l'intron I

- L'étude de l'activité des éléments NRE I et NRE II clonés en tandem montre, dans la lignée HepG2, que la répression au niveau de cette construction est supérieure à celle exercée par l'intron où également ces éléments se trouvent en tandem. Or nous verrons plus loin que l'élément III n'est pas activateur et ne contrebalance donc pas l'effet cumulatif de la combinaison NRE I-NRE II.

La différence du degré de répression entre notre clonage et l'intron naturel peut être liée à la distance existant entre ces deux éléments. En effet, dans la construction utilisée, la distance qui sépare NRE I et NRE II (5 nucléotides) est plus petite que celle les séparant au niveau de l'intron I (20 nucléotides). L'effet de coopération est-il toujours le même dans ce contexte ?

Pour le déterminer, il faudrait isoler le fragment génomique contenant NRE I et NRE II, le cloner devant le promoteur TK et étudier son activité dans ces conditions "naturelles". Cette

démarche a été tentée mais n'a pu aboutir en raison des difficultés apportées par le clonage.

- Les NRE I et II étant des éléments de structure similaire, nous pouvons penser que l'un dérive de l'autre par duplication. Cette hypothèse est également confortée par la présence du motif [GCAGCA (n=6) GAG] retrouvé à la fois des nucléotides +62 à +76 dans NRE I et de +122 à +136 dans NRE II, et dans la même orientation. La conservation de cette structure en tandem suggère que sa présence doit être importante dans la fonction de l'intron.

On peut rappeler que les gènes des apolipoprotéines ont évolué à travers des duplications géniques totales ou partielles à partir d'un gène ancestral commun.

II- Les facteurs de transcription se fixant sur l'intron I

- Il est paradoxal d'observer l'effet répresseur de l'intron I et la présence des protéines se fixant sur NRE I et NRE II dans les cellules qui expriment l'apoA-II, car nous nous attendions logiquement à ce que la répression se produise seulement dans les cellules ne l'exprimant pas, ce qui aurait pu expliquer en partie l'absence d'expression de l'apoA-II dans les lignées JEG-3 et CV-1. L'effet non ubiquitaire de l'intron I suggère que les protéines s'y fixant sont probablement spécifiques des cellules où s'exerce la répression.

- Comme l'effet inhibiteur de l'intron est observé dans les cellules Caco-2, il faudrait également tester des extraits nucléaires de ces cellules pour vérifier si ces protéines, présentes dans des tissus d'origine hépatique (hépatomes humain ou de rat), sont aussi rencontrées dans cette lignée intestinale.

- L'intron, lorsqu'il est placé devant le promoteur (-911/+40) de l'apoA-II, est capable de contrecarrer l'activité transcriptionnelle de ce promoteur en dépit de la présence de son très puissant enhancer distal (-903/-680). On peut alors se demander si les NRE eux-mêmes n'en sont pas capables. Pour le savoir, il faudrait cloner un NRE ou un dimère de cet élément devant ce promoteur et étudier son activité, ce qui permettrait également d'obtenir une estimation de la force répressive des facteurs qui se fixent sur ces NRE.

- L'amplitude de la répression du promoteur TK par l'intron I est voisine dans les lignées HepG2, Mc A-RH7777, Mc A-RH8994 et les mobilités électrophorétiques des deux complexes spécifiques obtenus avec les deux NRE et les extraits nucléaires de ces cellules sont identiques.

Les protéines humaines et de rat se fixant sur l'intron ont donc le même pouvoir transrépresseur et sont probablement très semblables. En raison de leur fragilité vis-à-vis de la température, il n'a pas été possible de purifier ces protéines pour vérifier cette hypothèse

- La répression du promoteur TK par l'intron ou les NRE est si forte dans les cellules Fa32 par rapport aux souches HepG2, Mc A-RH7777 et Mc A-RH8994 que l'activité du dimère d'intron ou de la combinaison NRE I-NRE II ne montre aucune synergie. C'est probablement une saturation de l'effet qui rend beaucoup moins perceptible cette synergie. Les facteurs se fixant sur les NRE ne sont pourtant pas plus abondants dans la lignée Fa32 que dans les autres lignées d'hépatome. En effet, les mêmes quantités d'extraits nucléaires de cellules HepG2 et Fa32 sont nécessaires pour obtenir la même quantité des deux complexes spécifiques. De plus, il n'existe pas un facteur supplémentaire dans la lignée Fa32 se fixant sur les NRE, puisque le profil électrophorétique obtenu avec les extraits de Fa32 n'est pas modifié en gel-retard au niveau des bandes spécifiques par rapport aux cellules HepG2. Par conséquent, il se pourrait qu'un ou plusieurs des facteurs de transcription de Fa32 se fixant sur l'intron soient devenus beaucoup plus efficaces pour réprimer, suite à une ou plusieurs mutations dans le domaine transrépresseur, tout en conservant intact le domaine de liaison à l'ADN. Nous n'avons pas pu poursuivre l'étude de ce ou ces facteurs en raison de leur thermolabilité.

- Cette caractéristique de la souche Fa32 aurait pu être utilisée lors de la détermination par mutagenèse des sites de fixation des protéines sur chaque NRE: l'étude de l'effet des mutations dans les NRE sur leur activité répressive aurait pu être en effet réalisée dans cette souche en raison du pouvoir répresseur puissant observé dans celle-ci et nous aurions sans doute obtenu des résultats plus nets que ceux obtenus avec la lignée HepG2.

- La différence des profils de gels-retard effectués sur les NRE I et II entre les cellules d'origine hépatique et les cellules JEG-3 et CV-1 (deux complexes pour les premières cellules, un seul de mobilité intermédiaire dans le second groupe de cellules) nous permet d'émettre certaines hypothèses quant au mécanisme de répression de la transcription agissant au niveau de ces NRE. Deux situations peuvent être distinguées selon que les facteurs des cellules JEG-3 et CV-1 formant avec les NRE le complexe unique sont présents ou absents dans les cellules d'origine hépatique.

- Première hypothèse:

Dans la première situation, ces facteurs fixés sur les NRE seraient inactifs ou exerceraient un effet transcriptionnel positif contrebalancé par l'activité du site III (voir ci-dessous) au sein des cellules JEG-3 et CV-1 et dans les cellules hépatiques, ils seraient déplacés par compétition pour le même site spécifique de liaison à l'ADN par les facteurs répresseurs, visualisés sous forme des deux complexes "hépatiques", ce qui aboutirait à une répression passive de la transcription par compétition

Par ailleurs, les mécanismes de répression active impliquant une coopération entre répresseurs actifs et facteurs inhibiteurs ou une interaction physique entre activateurs et répresseurs actifs (voir le chapitre V de l'état des connaissances) sont peu probables. En effet, ils font intervenir la formation d'hétérodimères entre molécules à effet positif et négatif sur les séquences cibles d'ADN. Celle-ci se serait manifestée en gel-retard par l'apparition de deux complexes "hépatiques" de mobilité plus faible que celle du complexe unique observé pour les cellules JEG-3 et CV-1.

- Deuxième hypothèse:

Elle s'applique dans la situation où les facteurs des cellules JEG-3 et CV-1 formant avec les NRE le complexe unique n'existent pas dans les cellules d'origine hépatique.

Dans cette hypothèse, un répresseur actif inhibe directement la transcription basale par des interférences avec l'assemblage du complexe de préinitiation, en absence d'activateurs transcriptionnels. Les facteurs répresseurs au niveau des cellules d'origine hépatique occupent alors, selon le modèle de l'inhibition de l'assemblage du complexe de préinitiation (voir le chapitre V de l'état des connaissances), directement des sites de liaison libres sur les NRE et répriment activement la transcription.

- Les sites A (-220 à -190) de l'apoA-I et J (-734 à -716) de l'apoA-II ne font pas de compétition pour la liaison des protéines nucléaires sur NRE I et NRE II. Or, les sites AI-A et AII-J sont des éléments de réponse pour les récepteurs nucléaires sur NRE I et NRE II. Or, les sites AI-A et AII-J sont des éléments de réponse pour les récepteurs nucléaires ARP-1, Ear2 et Ear3/COUP-TF qui sont tous des répresseurs de l'activité des promoteurs de l'apoA-I et de l'apoA-II. Les protéines se fixant sur les NRE ne correspondent donc pas à ce type de récepteurs nucléaires.

- Les complexes formés entre les protéines nucléaires et les NRE sont sensibles à l'EDTA. Il est donc probable que ces protéines possèdent des doigts de zinc comme motif de liaison à

l'ADN. Une homologie partielle de séquence a été trouvée au niveau du consensus de fixation de la protéine Sp1, qui est une protéine possédant aussi des doigts de zinc comme motif de liaison à l'ADN (**fig.11**). Cependant, nos protéines sont différentes de Sp1, puisque, rappelons le, leur fixation sur les NRE n'est pas supprimée par la compétition par un oligonucléotide portant la séquence Sp1 CTGGGCGGAGTTAGGGGCA (résultat non montré).

- De plus, notre motif de fixation sur les NRE est composé d'une association de deux séquences nucléotidiques qui n'est pas retrouvée dans les consensus de fixation des facteurs de transcription connus. Seule une homologie partielle a été localisée dans le silencer SE2 du gène de la vimentine de poulet (Garzon et Zehner, 1994) pour seulement la séquence TGGGC présente dans les NRE (**fig.11**).

Conclusion:

Un nouveau type de séquence nucléotidique de fixation pour protéines nucléaires a donc été découvert au niveau des NRE I et II de l'intron I. Les protéines reconnaissant cette séquence sont par conséquent de nouveaux facteurs de transcription.

III- Etude du troisième site de l'intron I

- L'intron I possède deux NRE, et chacun peut expliquer son activité répressive. Cependant, les études réalisées en footprint ont montré l'existence d'un troisième site de fixation (site III) de protéines nucléaires de foie de rat entre les positions +152 et +192 sur le brin sens et + 149 et +192 sur l'antisens. Il est donc important de connaître sa contribution dans l'activité répressive de l'intron.

- Pour étudier l'activité de cette séquence, nous avons voulu suivre la même stratégie que celle utilisée lors de l'étude des sites I et II, c'est à dire par synthèse chimique d'oligonucléotides correspondant à ce site en vue de le cloner devant le promoteur TK. Cette stratégie n'a pu aboutir car les oligonucléotides obtenus comportaient toujours plusieurs mutations en raison de la longueur du site et surtout de la richesse en GC.

- Une stratégie classique faisant appel à l'utilisation de sites de restriction et très complexe a permis d'isoler ce fragment intégralement. Elle est présentée dans la **figure 12**. Ce site, appelé site III, a été purifié à partir du fragment génomique de l'intron I et cloné dans le vecteur pUC19 afin de le produire en quantité suffisante pour:

- l'étude de la fixation des protéines nucléaires en gel-retard

- son clonage, soit seul devant le promoteur TK du vecteur pBLCAT4 en vue d'étudier son activité régulatrice, soit en combinaison avec les sites NRE I et NRE II pour tester d'éventuels phénomènes de coopération entre ces sites.

A- Clonage du site III

La stratégie complète du clonage de ce site est présentée dans la **figure 12**. L'intron I a été préalablement isolé du fragment génomique recouvrant le gène complet de l'apoA-II, puis cloné dans le vecteur pUC19. Cette construction appelée Z1 a été digérée par EcoRII, ce qui a permis la libération d'un fragment d'ADN de 139 bp recouvrant le troisième site et d'une partie du pUC19. Ce fragment, une fois purifié, a été cloné dans le site HincII du pUC19.

Le troisième site de 64 bp aurait pu être isolé à partir de cette nouvelle construction (Z2) en digérant simplement par BamHI et HindIII. Cependant, cette digestion libère également un fragment de taille très voisine (75 bp) comigrant avec le fragment de 69 bp qui nous intéresse.

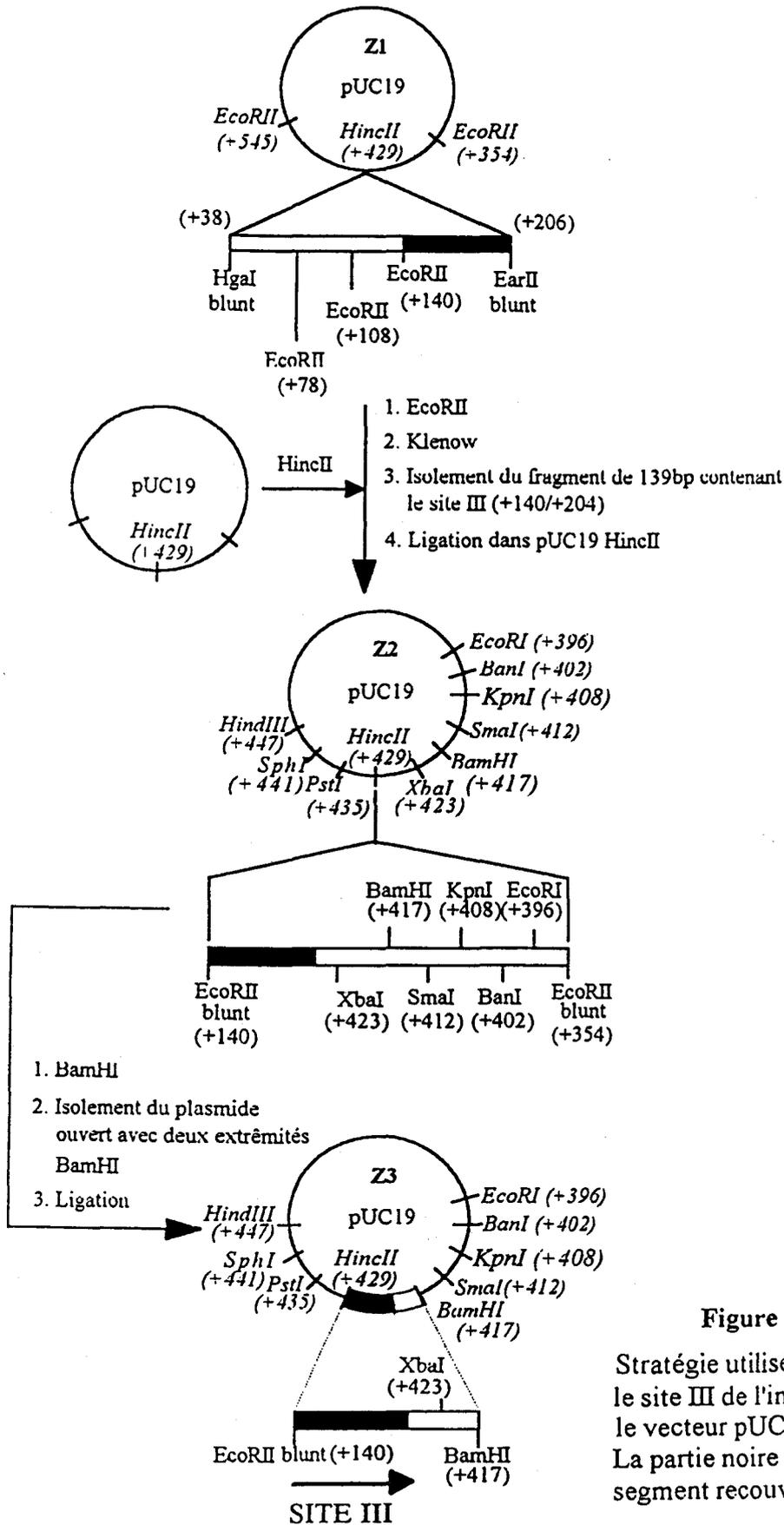


Figure 12:

Stratégie utilisée pour cloner le site III de l'intron I dans le vecteur pUC19. La partie noire représente le segment recouvrant le site III.

Une digestion préalable par BamHI a permis d'éliminer le fragment de 75 bp portant les sites SmaI, KpnI, BanI et EcoRI, et après ligation, est obtenue une construction (Z3) renfermant, à l'intérieur du site HincII de son polylinker, le troisième site. Ce site peut être libéré après digestion par BamHI et HindIII pour effectuer du retard sur gel ou être cloné dans le pBLCAT4 pour mesurer son activité.

B- Etude des protéines nucléaires se liant au site III

L'analyse en gel-retard des protéines nucléaires se liant au site III est présentée dans la **figure 13**. Ce site forme un nombre élevé de complexes spécifiques avec des extraits nucléaires de foie de rat: leur formation est compétée par le site III non marqué, mais ne l'est pas par un oligonucléotide non apparenté (le site J de l'apoA-II humaine).

1- Etude de la spécificité cellulaire des protéines nucléaires se fixant sur le site III

- Lorsque des extraits nucléaires de différentes souches cellulaires sont testés, quatre à six complexes se forment selon l'origine cellulaire. Notons surtout que les extraits de cellules HepG2 et Fa32, où est observé l'effet inhibiteur de l'intron, sont très similaires et forment trois bandes majeures (1, 3 et 6), les bandes 1 et 6 étant d'ailleurs plus abondantes dans les extraits de cellules Fa32 où l'effet inhibiteur est plus marqué. Dans la cellule JEG-3 où l'effet de l'intron ne s'exerce pas, la bande 5 est nettement prépondérante. Par conséquent, il semble exister une relation entre la spécificité cellulaire de l'activité de l'intron et la présence de certaines activités nucléaires se liant au site III. Toutefois, il faudrait confirmer cette spécificité avec des extraits nucléaires provenant d'autres cellules.

- Il faut remarquer que dans les diagrammes des cellules HepG2, Fa32 et du foie de rat, les complexes 1, 2 et 3 ne sont pas totalement déplacés par le compétiteur site III froid (compétition par 100 fois). De plus, ces complexes ne sont pas spécifiques des cellules d'origine hépatique car nous les retrouvons dans la cellule JEG-3. Par contre, le complexe 6 est abondant, totalement déplacé par le compétiteur froid, est spécifique des cellules d'origine hépatique et donc particulièrement intéressant. Pour ces raisons, nous avons focalisé la suite du travail sur la caractérisation de ce complexe en étudiant ses caractéristiques physico-chimiques et en recherchant si son composant protéique présente des similitudes avec des facteurs de transcription connus.

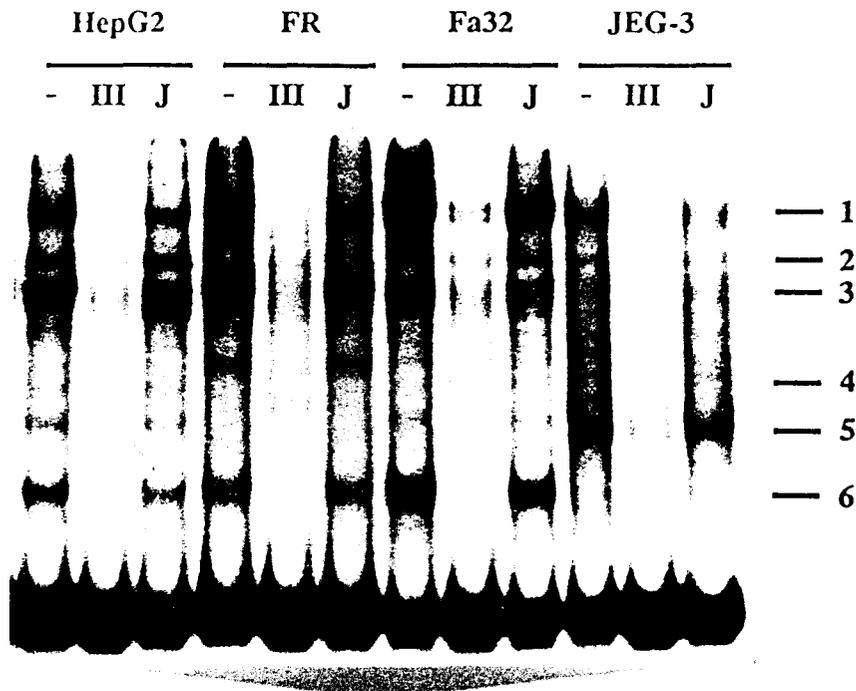


Figure 13:

Etude de la fixation de protéines nucléaires d'origine hépatique ou non hépatique sur le site III du premier intron du gène de l'apolipoprotéine A-II humaine

HepG2, cellules d'hépatome humain

FR, foie de rat

Fa32, cellules d'hépatome de rat

JEG-3, cellules de choriocarcinome humain

-, sans compétiteur

III, avec le compétiteur spécifique froid (site III)

J, avec un compétiteur non spécifique froid (site J de l'apoA-II humaine)

Les compétiteurs sont utilisés à un excès molaire de 100 fois

1, 2, 3, 4, 5 et 6, complexes nucléo-protéiques

Les complexes sont formés en milieu 20mM Hepes pH 7.9, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA en présence de 1 mM DTT, de 20% glycérol et de 3µg de poly(dIdC) dans un volume final de 20 µl.

2- Caractérisation physico-chimique du complexe nucléoprotéique 6

Les caractéristiques de liaison à l'ADN de la protéine du complexe 6 ont été déterminées en gel-retard en faisant varier les conditions d'incubation (**fig.14**). Les résultats obtenus sont les suivants:

- L'EDTA à 5mM renforce la stabilité du complexe mais à 50 mM, ce complexe est détruit.
- Le complexe commence à être fortement destabilisé en présence de 10 mM MgCl₂ ou de 210 mM NaCl
- Sa stabilité ne dépend pas de liaisons disulfures, puisqu'elle n'est pas affectée par des quantités croissantes de DTT variant de 1 à 20 mM. Le complexe 6 est encore stable en présence d'une concentration de 4M urée.
- Une incubation à 65°C pendant une durée de 5 minutes a pour effet de détruire ce complexe: les protéines sont donc thermolabiles (**fig. 15**).
- La protéine de foie de rat formant le complexe 6 sur le site III est éluée d'une colonne d'Héparine-Sépharose par une molarité en NaCl comprise entre 0.4 M et 0.6 M NaCl.

3- Recherche de similitudes entre le site III et des éléments de régulation ou des séquences consensus reconnues par divers facteurs de transcription

Une recherche d'homologie de séquence avec les sites de facteurs de transcription connus (Faisst et Meyer, 1992) et le programme informatique "Signal Scan" accessible à partir du réseau Internet révèle une similitude avec les sites présentés dans le **Tableau VII**.

- le site III contient un heptanucléotide similaire au motif E₂-box (Murre et al., 1989) au niveau du brin anti-sens; ce motif est connu pour lier des protéines hélice-boucle-hélice et joue un rôle crucial dans l'expression tissu-spécifique de nombreux gènes lors du développement.
 - le site III contient au niveau du brin anti-sens, une séquence identique au motif consensus du keratinocyte appelé keratinocyte CS (Blessing et al., 1987) et rencontré dans un élément assurant la spécificité tissulaire d'expression du gène de la kératine I (Huff et al., 1993).
 - le site III présente également une bonne similarité avec les motifs NRE box2 (Banahmad et al., 1987) et CF1 (Riggs et al., 1991) qui sont impliqués dans la régulation négative des gènes.
- L'existence de ces homologues nous a amené à penser que les protéines se liant au site III peuvent se lier à l'un des motifs mentionnés ci-dessus. Nous avons donc réalisé des expériences de compétition en gel-retard destinées à savoir si des oligonucléotides froids correspondant

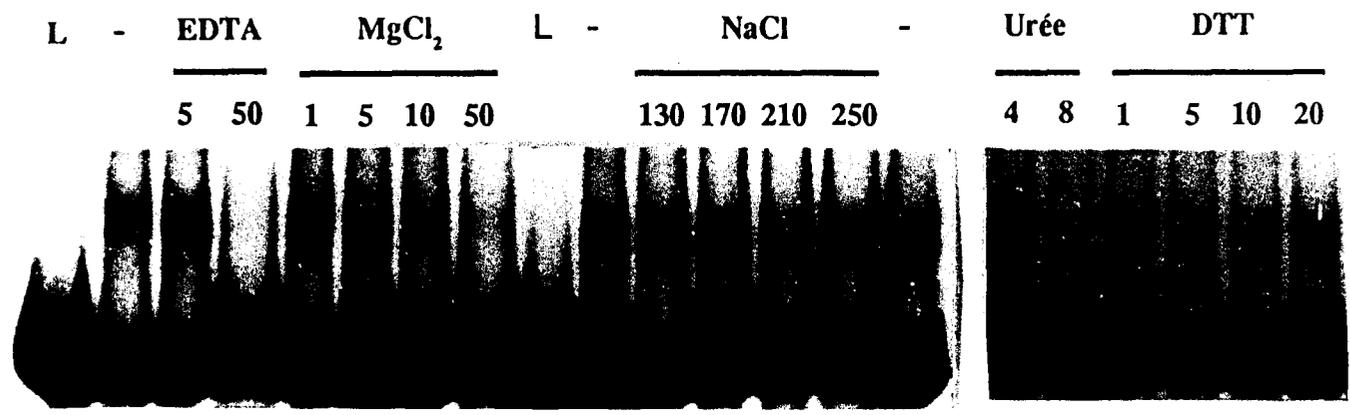


Figure 14:

Caractérisation physico-chimique du complexe 6 obtenu entre le site III du premier intron du gène de l'apolipoprotéine A-II humaine et les protéines d'extrait nucléaire de foie de rat

Les molarités de l'EDTA, du MgCl₂, du DTT et du NaCl sont exprimées en mM tandis que celle de l'urée est exprimée en M.

L, sonde III libre

-, milieu non modifié d'incubation du complexe indiqué dans la légende de la figure 13.



Figure 15:

Etude de la thermolabilité du complexe 6 obtenu entre le site III du premier intron du gène de l'apolipoprotéine A-II humaine et les protéines d'extrait nucléaire de cellules Fa32

-, sonde libre

T, complexe formé non traité par la chaleur

D, complexe formé et incubé pendant 5 minutes à 65°C

soit à E₂-box, au keratinocyte CS, au NRE box2 ou au CF1 sont capables de déplacer la protéine nucléaire de foie de rat formant le complexe 6 sur le site III. La **figure 16** montre que le complexe 6 n'est pas déplacé par ces compétiteurs à une concentration de 100 fois. Notons également que les autres complexes ne sont pas déplacés par ces mêmes compétiteurs (résultat non présenté).

Par conséquent, la protéine nucléaire de foie de rat formant le complexe 6 est différente de celles se liant à ces quatre motifs connus.

		Séquence	Localisation génique	Bases identiques
Footprint III	as	AATGGGCTTCAGCTCC	+163 à +148	
E2-box	s	CANCTGC		6/7
Footprint III	s	TTTGGC TT	+162 à +169	
keratinocyte CS	as	TTTGGPy TT		8/8
Footprint III	as	AAATGG	+164 à +159	
CF1	s	ANATGG		6/6
Footprint III	s	AGTGTCCCCC	+171 à +181	
NRE box 2	s	ANTCTCCTCC		8/10

Tableau VII:

Similarités entre la séquence du footprint III du premier intron de l'apolipoprotéine A-II humaine et les éléments régulateurs ou les séquences consensus de reconnaissance de divers facteurs de transcription.

Les nucléotides similaires sont représentés en gras.

s: brin sens, as brin anti-sens; cs: séquence consensus; N: A, G, T ou C.

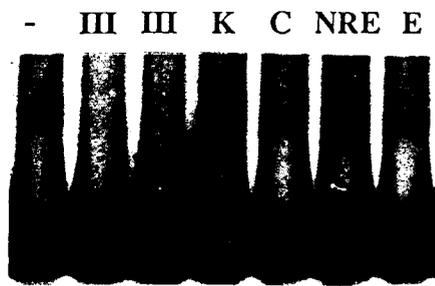


Figure 16:

Compétition par des sites de fixation de facteurs connus

Les compétiteurs froids utilisés à un excès molaire de 100 fois (sauf à 200 fois pour la troisième piste en partant de la gauche) sont les suivants:

III, site III

K, motif consensus du keratinocyte (keratinocyte CS)

C, motif CF1

NRE, motif NRE box 2

E, motif E₂ box

C- Etude des caractéristiques fonctionnelles du site III

- L'étude de l'activité de ce site sur le promoteur de la thymidine kinase (**fig.17**) montre qu'il est capable de réprimer la transcription. C'est donc un élément de régulation négatif qui a été nommé NRE III. L'amplitude de la répression qu'il exerce est très voisine de celle obtenue avec NRE I et NRE II, et par conséquent également proche de celle de l'intron I.
- L'étude de l'activité des associations NRE I-NRE III et NRE II-NRE III montre qu'il n'existe pas d'additivité de l'effet entre le NRE III et les deux autres sites de l'intron (**fig.17**).

Des explications peuvent être avancées pour tenter de comprendre ce résultat:

- Puisque les éléments NRE I, NRE II et NRE III ont un effet répressif dans la lignée HepG2, il apparaît paradoxal que l'intron complet n'ait pas une activité répressive supérieure à celle de chacun de ses éléments constitutifs. Nos résultats laissent donc supposer que dans l'intron, lorsqu'un élément entre en activité, ses voisins sont rendus "silencieux". Cette hypothèse est en accord avec l'observation que l'élément III n'a pas d'effet additif lorsqu'il est associé à NRE I ou NRE II (**fig. 17**), par contre elle n'est pas vérifiée pour l'association "synthétique" NRE I-NRE II dans la construction NRE I-NRE II TK CAT.

- L'absence d'effet additif ne semble pas liée à un encombrement stérique des protéines sur les éléments. En d'autres termes, la fixation des protéines sur un élément n'empêche pas celle sur les sites voisins. En effet, *in vitro*, les protéines se fixent sur les trois sites en même temps puisque les expériences de footprint ont permis de révéler ces fixations sur les trois sites simultanément (voir la figure 2 de la référence "Bossu et al.,1994"). Notons cependant que le footprint est réalisé sur un ADN linéaire tandis que sur le plasmide transfecté, l'ADN est probablement soumis à des contraintes structurales dues à son surenroulement.

- La différence d'effet répresseur observée entre la construction In TK CAT et la construction NRE I-NRE II TK CAT peut être liée à la différence de distance entre les NRE I et NRE II dans l'intron (20 paires de bases) et dans la construction NRE I et NRE II (5 paires de bases), ou à la nature des séquences présentes entre ces éléments répresseurs. L'absence d'effet additif ou l'intervention de séquences flanquantes sur l'activité d'éléments de régulation a d'ailleurs été observée dans d'autres gènes (Paik et al., 1988).

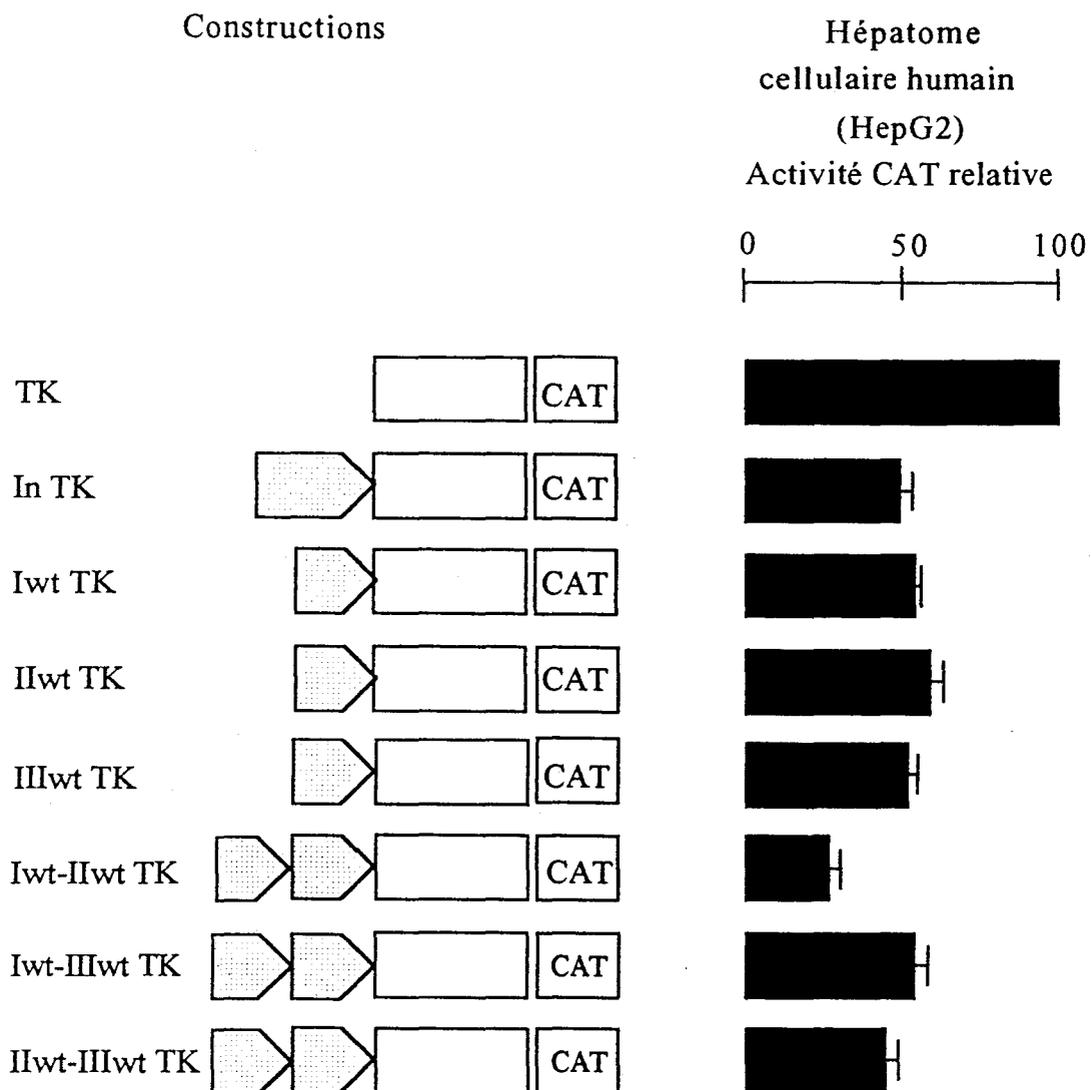


Figure 17:

Activité des NRE I, NRE II, NRE III sur le promoteur de la thymidine kinase.

TK et In TK représentent respectivement le promoteur thymidine kinase seul et flanqué par l'intron en monomère. Iwt TK, IIwt TK, IIIwt TK représentent respectivement les séquences de footprint I, II et III (correspondant respectivement aux NRE I, NRE II, NRE III) placées isolément devant le promoteur thymidine kinase. Iwt-IIwt TK, Iwt-IIIwt TK, IIwt-IIIwt TK représentent respectivement les séquences I et II, I et III, II et III placées en combinaison devant ce même promoteur. Les activités CAT, déterminées et normalisées en fonction des différences d'efficacité de transfection, sont exprimées par rapport à l'activité du promoteur de la thymidine kinase. Les résultats présentés sont les moyennes d'au moins trois expériences de transfection indépendantes réalisées en double avec deux préparations de plasmides différentes, avec les écart-types indiquées par des barres d'erreurs.

- Nous ne pouvons pas exclure également qu'un phénomène plus subtil lié à la complexité naturelle du site NRE III soit mis en jeu.

IV- Conclusions: intérêts de l'étude de l'intron I du gène de l'apolipoprotéine A-II humaine

L'intron I du gène de l'apoA-II humaine représente un **type original de répresseur de la transcription** pour trois raisons:

- 1- tout d'abord, s'il existe de nombreux exemples d'introns capables d'augmenter la transcription, on connaît peu d'introns ayant des caractéristiques de silencer.
- 2- ensuite par la complexité: il contient trois éléments de régulation alors que généralement les introns dotés de fonctions régulatrices en contiennent au plus deux.
- 3- surtout par sa structure: il contient des éléments composés de deux séquences qui ont un effet additif et les séquences impliquées ne correspondent pas à des séquences connues.

Il a très probablement un **effet bénéfique pour la santé**: c'est un élément de régulation intervenant dans la répression d'un gène dont la surexpression entraînerait des complications médicales désastreuses.

- De nombreuses études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont ainsi démontré que l'apoA-II atténue l'effet protecteur des HDL contre l'athérosclérose. Nous rappellerons que:

* les lipoprotéines contenant l'apoA-I sans l'apoA-II (Lp A-I) sont capables de promouvoir un efflux de cholestérol plus important que celles contenant l'apoA-II (Lp A-I:A-II) (De Lamatre, 1986; Mahlberg, 1990; Steinmetz et al., 1990; Castro et al., 1994; Metelskaya et al., 1995; Lagrost et al., 1995).

* Les expériences réalisées avec les souris transgéniques surexprimant les apolipoprotéines des HDL montrent que l'apoA-II diminue l'effet protecteur de l'apoA-I contre le développement des lésions athéromateuses (Warden et al., 1993; Schultz et al., 1993).

- Des études réalisées sur des individus normolipidémiques ont également montré que le taux de production de l'apoA-II est un déterminant majeur non seulement de la quantité d'apoA-I dans les particules LpA-I:A-II mais aussi de la distribution de l'apoA-I entre les particules LpA-I et LpA-I:A-II, ce qui module la susceptibilité à l'athérosclérose chez l'homme. En effet, une synthèse accrue d'apoA-II diminue la concentration plasmatique de particules LpA-I et élève celle de particules LpA-I:A-II (Ikewaki et al., 1995).

L'intron offre la possibilité de **recherches ayant des finalités thérapeutiques** par la sélection de drogues capables de stimuler son activité inhibitrice, ce qui permettrait une réduction de la production d'apoA-II et des particules LpA-I:A-II accompagnée d'une augmentation de la proportion des particules LpA-I anti-athérogènes dans le plasma. Le risque de maladies cardiovasculaires et des complications encourues se trouveraient ainsi réduits.

DEUXIEME PARTIE:
ETUDE DU FACTEUR HNF-4 HUMAIN

ETAT DES CONNAISSANCES

I- Fonctions, importance

Le facteur de transcription HNF-4 appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires d'hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes (Sladek et al., 1990). Son ligand n'étant pas connu, on le dit récepteur orphelin. Chez la souris adulte, il est abondant dans le foie, l'intestin, le rein et il est présent en quantité moindre dans le pancréas. HNF-4 joue un rôle primordial au cours de l'embryogenèse, il apparaît être un facteur déterminant dans la différenciation de cellules hépatiques et contrôle l'expression d'une grande variété de gènes.

A- Le facteur HNF-4 joue un rôle primordial au cours de l'embryogenèse

L'étude par hybridation in situ de l'expression de HNF-4 (Duncan et al., 1994) et du phénotype d'embryons délétés en ce facteur (souris knock out) (Chen et al., 1994) ont permis de mettre en évidence son rôle dans l'embryogenèse. Il interviendrait dès les premières étapes du développement après l'implantation dans la muqueuse utérine chez la souris et dans l'organogenèse (Duncan et al., 1994) et apparaît être un marqueur de l'endoderme primaire dans l'implantation du blastocyste. Le knock out de HNF-4 provoque un retard de la formation du mésoderme et de l'expression des gènes T et HNF-3 β qui sont des marqueurs cellulaires de la strie primitive. Il est accompagné de sévères perturbations du développement de l'embryon qui ne survit pas. Ces résultats montrent que l'expression de HNF-4 est essentielle pour la survie de l'ectoderme embryonnaire et le développement normal de la gastrulation.

HNF-4 interviendrait également dans l'organogenèse durant le développement de l'embryon de la drosophile; là, la localisation de son ARNm dans l'intestin moyen, les corps gras, les tubes de Malpighi correspond à celle observée dans les organes équivalents du rat, soit l'intestin, le foie et le rein (Zhong et al., 1993).

B- HNF-4 est un facteur déterminant de la différenciation de cellules hépatiques

HNF-4 est également un facteur déterminant de la différenciation de cellules hépatiques: la perte de nombreuses fonctions hépatiques et leur réexpression sont respectivement corrélées directement à l'extinction et à la réexpression de HNF-4 et une étude sur des cellules hybrides indique que l'abondance de HNF-4 détermine le degré de différenciation hépatique (Kuo et al., 1992; Griffio et al., 1993). En effet, dans la lignée C2 d'hépatome dédifférenciée de rat, qui a perdu l'expression des facteurs HNF-1 et HNF-4, une réexpression constitutive de l'ADN complémentaire de HNF-4 rétablit le phénotype hépatique et l'expression de HNF-1 endogène.

C- HNF-4 contrôle l'expression d'une grande variété de gènes

Ce facteur occupe une position clé dans la hiérarchie transcriptionnelle puisqu'il est un régulateur positif de l'expression du facteur HNF-1 qui lui-même est important pour l'expression hépatique de plusieurs gènes tels que l'albumine, le béta-fibrinogène.... (Kuo et al., 1992; Miura et Tanaka, 1993). Inversement, une étude récente montre que le promoteur de HNF-4 de souris (région -228 à +182) est transactivé par le facteur HNF-1 α qui se fixe sur la séquence -98 à -68 (Zhong et al., 1994).

Par ailleurs, le facteur HNF-4 contrôle l'expression d'une grande variété de gènes dont ceux impliqués dans le métabolisme des acides gras et du cholestérol (le gène des apolipoprotéines, de la chaîne médiane de l'acyl CoA déhydrogénase MCAD, de l'acyl CoA oxidase ACO et de la protéine intestinale fixant les acides gras i-FABP), le métabolisme du glucose (la phosphoenolpyruvate carboxykinase PEPCCK et la L-pyruvate kinase L-PK), la coagulation sanguine (les facteurs VII, IX et X), ou des protéines intervenant dans l'infection par le virus de l'hépatite B (Miura et Tanaka, 1993; Harnish et al., 1994).

Dans de nombreux cas, l'expression des gènes contrôlés par HNF-4 dépend de l'abondance relative de ce facteur qui est un activateur et d'autres récepteurs nucléaires antagonistes orphelins comme ARP-1, Ear2 et Ear3/COUP-TF qui sont des répresseurs et se fixent sur le même élément de réponse des promoteurs cibles. Par exemple, HNF-4 active la transcription des gènes de l'apoB, de l'apoCIII et de l'apoAII humaine via les sites B-A1 (1), CIII-B, AII-J et du gène de l'apoA-I via les sites AI-A et AI-C, de l'apoA-IV humaine via des séquences encore non identifiées du promoteur de l'apoA-IV (Ochoa et al., 1993) (**Tableau VIII**).

Ainsi, lorsqu'il est fortement exprimé, HNF-4 supprime la répression exercée par ARP-1, Ear2 ou Ear3/COUP-TF et inversement, ces facteurs antagonistes répriment l'activation par HNF-4 lorsqu'ils sont fortement exprimés. On pense que ces effets transcriptionnels opposés sont médiés par une compétition pour le site de liaison à l'ADN (Ladiaz et al., 1992; Mietus-Snyder et al., 1992; Metzger et al., 1993; Chan et al., 1993). L'antagonisme entre HNF-4 et ARP-1 est significatif *in vivo* car l'hybridation *in situ* a permis de localiser l'ARN messager de ces deux facteurs dans les mêmes cellules de foie, mais des quantités plus élevées de HNF-4 sont observées dans les cellules où sont exprimés les gènes des apolipoprotéines.

(1) Mononclature des sites: la première lettre correspond au nom du gène tandis que la seconde correspond au nom de l'élément de régulation; le chiffre 1 de l'élément BA1 définit l'un des oligonucléotides utilisés pour caractériser l'élément A du promoteur de l'apoB humaine (Kardassis et al., 1992).

Gènes	Nom de l'élément de réponse	Position	Fixation				Effet sur la transcription	
			HNF-4	ARP-1	Ear2	Ear3	HNF-4	COUP
apoC-III	B	-92/-67	+	+	+	+	+	-
apoB	A1	-88/-62	+	+	+	+	+	-
apoA-II	J	-739/-715	+	+	+	+	+	-
apoA-I	A	-214/-192	+	+	+	+	+	-
	C	-136/-114	+	?	+	+	+	?
apoA-IV	?	?	+	?	?	+	+	-

Tableau VIII:

Fixation et effet sur la transcription des récepteurs nucléaires orphelins HNF-4, Ear-2 et Ear-3/COUP-TF sur les séquences régulatrices de différents gènes

+: fixation ou activation de la transcription; -: pas de fixation ou répression de la transcription; ?: non démontré.

Les facteurs ARP-1/COUP-TFII (désigné par ARP-1), EAR2 et EAR3/COUP-TF sont connus sous le nom de facteurs COUP-TF (Chicken Ovalbumine Upstream Promoter Transcription Factor) et sont des membres orphelins de ligand de la superfamille des récepteurs nucléaires (Ladiaz et Karathanasis, 1991; Wang et al., 1989). Ces facteurs initialement caractérisés dans des extraits nucléaires d'oviducte de poulet et de cellules HeLa se lient sous forme de dimères sur l'élément COUP du gène de l'ovalbumine pour activer la transcription (Sagomi et al., 1986; Bagchi et al., 1987; Wang et al., 1989). Ces facteurs sont d'expression ubiquitaire (Ladiaz et Karathanasis, 1991; Wang et al., 1989) alors que le facteur HNF-4 est une protéine à distribution tissulaire restreinte (Sladek et al., 1990). Les extraits nucléaires de tissu hépatique de rat, de cellules HepG2 et Caco-2 contiennent plus d'activité HNF-4 que d'activité COUP-TF et ARP-1 (Mietus-Snyder et al., 1992). La transcription des gènes des apolipoprotéines dépendrait donc en partie de l'équilibre intracellulaire entre ces facteurs, et en particulier, l'absence du facteur HNF-4 serait responsable de la non-expression de ces gènes dans les tissus correspondants, les facteurs de la famille COUP jouant le rôle de répresseurs (Chan et al., 1993).

Il a été également montré que HNF-4 et le facteur en "leucine-zipper" C/EBP α (Ladiaz et al., 1992; Metzger et al., 1993; Tzamelis et Zannis, 1994; Garcia et al., 1993) peuvent agir en synergie pour activer la transcription des gènes de l'apoA-I et B et que cette synergie dépend de la liaison de chaque facteur sur le promoteur; toutefois, les deux facteurs sont incapables de se lier *in vitro* en coopérativité à cette région, bien que leurs sites de liaison soient chevauchants, suggérant l'existence d'un autre mécanisme inconnu responsable de cette synergie (Metzger et al., 1993). HNF-4 agit aussi en synergie avec HNF-3 β sur le promoteur de l'apoA-I humaine (Harnish et al., 1994) et avec Sp1 sur le promoteur de l'apoC-III humaine (Talianidis et al., 1995). Le virus de l'hépatite B (HBV) est un agent qui provoque un hépatocarcinome. HNF-4 agit sur deux des quatre promoteurs impliqués dans la régulation de HBV. Le premier est le "core" promoteur qui contrôle l'expression d'un transcrite qui soit est traduit en la protéine majeure de la nucléocapside ou en protéine polymérase, soit devient un ARN pré-génomique qui sera rétro transcrite (Guo et al., 1993). La seconde région où intervient HNF-4 est l'enhancer I du gène codant la protéine X, un transactivateur ne se fixant pas sur l'ADN mais capable de transformer des cellules en culture et d'induire des hépatocarcinomes dans des souris transgéniques (Yen, 1993). Dans ce cas aussi, on observe un antagonisme entre HNF-4 et COUP-TF qui se fixent et agissent sur l'élément de régulation GB. HNF-4 agit en

synergie avec le facteur se fixant sur le deuxième élément de régulation de ce promoteur (Garcia et al., 1993).

D- Structures et isoformes du facteur HNF-4 de rat et de souris

Chez le rat, il existe trois isoformes de HNF-4. Les isoformes A ou $\alpha 2$ et B ou $\alpha 1$ diffèrent essentiellement par l'insertion de dix acides aminés dans la région carboxyterminale de la forme $\alpha 2$ qui est prépondérante dans le foie (Hata et al., 1992). L'isoforme C ou $\alpha 3$ est tronquée au niveau d'une jonction potentielle intron-exon et où précisément s'arrête la conservation de structure primaire avec d'autres récepteurs nucléaires dans la région de fixation du ligand et donc d'un domaine fonctionnel (Sladek, 1995 (in press)). En contrepartie, cette isoforme possède un domaine aminoterminal plus long résultant d'un épissage alternatif. L'exon codant cette séquence supplémentaire se trouve à plus de 30 kb en amont du gène qui code pour les trois isoformes de HNF-4 et, très probablement, l'expression de l'isoforme $\alpha 3$ est contrôlée par un promoteur individuel. Une situation similaire est observée pour l'isoforme γ du récepteur RXR. Signalons d'autre part que, sur la base de la structure primaire, le facteur HNF-4 est proche du récepteur des rétinoïdes RXR α . Le domaine de fixation du ligand de RXR α est plus proche de celui de HNF-4 $\alpha 1$ que de celui de RAR α (44% d'identité de séquence au lieu de 27%). Cependant, l'activité de HNF-4 n'est liée à la présence d'aucune forme de l'acide rétinoïque (Sladek, 1995 (in press)). De plus, HNF-4 et RXR α diffèrent par leurs propriétés de dimérisation: alors que RXR α se fixe et agit avec beaucoup plus d'efficacité sur ses éléments de réponse en formant des hétérodimères avec les récepteurs de l'hormone thyroïdienne, de la vitamine D, de l'acide rétinoïque RAR et des récepteurs PPAR, ARP-1 et COUP-TF, HNF-4 se fixe très bien en homodimère et ne forme pas d'hétérodimère avec RXR α , ni avec ARP-1 ou PPAR (Sladek, 1995 (in press)).

II- Intérêts de l'étude de HNF-4 chez l'homme

Le facteur HNF-4 n'a été cloné que chez le rat, la souris, le xénope et la drosophile (Sladek et al., 1990; Zhong et al., 1993). Nous avons vu que les deux isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du foie de rat diffèrent essentiellement par une séquence épissée alternativement, mesurant 30 paires de bases et situé dans la région carboxy-terminale.

La forme longue HNF-4 $\alpha 2$ est prépondérante dans le foie de rat. Or, jusqu'à présent, toutes les études de régulation des gènes humains par le facteur HNF-4 ont été effectuées avec la forme

mineure du facteur HNF-4 de rat (l'isoforme $\alpha 1$). Il est important de savoir que les isoformes d'un même facteur de transcription peuvent avoir des effets variés ou même opposés sur l'expression d'un gène. C'est le cas des isoformes de HNF1 générés par l'utilisation différentielle des sites de splicing, parmi lesquels l'on retrouve des transactivateurs plus puissants que d'autres, ou même un répresseur transdominant (Bach et Yaniv, 1993); ou le cas du facteur vHNF1-A différent seulement de l'isoforme vHNF1-B par un peptide de 26 acides aminés, ce qui confère une capacité de transactivation plus puissante (Ringeisen et al., 1993).

Nous avons donc cloné le facteur HNF-4 humain afin de rechercher s'il existe plusieurs isoformes et d'en étudier l'effet sur la transactivation de gènes humains.

Notre travail a abouti à la publication de l'article:

François L. Chartier, Jean-Pierre Bossu, Vincent Laudet, Jean-Charles Fruchart and Bernard Laine "Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human hepatocyte nuclear factor 4 indicate the presence of two isoforms in human liver". (1994) *Gene* 147: 269-272.

GENE 08114

Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human hepatocyte nuclear factor 4 indicate the presence of two isoforms in human liver

(Hepatic transcription factor; HNF-4; steroid hormone nuclear receptor superfamily)

François L. Chartier^a, Jean-Pierre Bossu^a, Vincent Laudet^b, Jean-Charles Fruchart^a
and Bernard Laine^a

^aDepartment of Atherosclerosis, U 325 INSERM, Institut Pasteur de Lille, 59045 Lille, France; and ^bURA 1160 CNRS, Institut Pasteur de Lille, Rue du Professeur Calmette, 59045 Lille, France

Received by G. Bernardi: 11 February 1994; Accepted: 14 April 1994; Received at publishers: 19 May 1994

SUMMARY

Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4) is a key transcription factor involved in the specific expression of many genes in liver and intestine. Sequences of cDNAs coding for HNF-4 have been established in rat and *Drosophila melanogaster*. Rat *HNF-4* exhibits two isoforms which probably result from differential splicing. We have isolated *HNF-4* cDNAs from an adult human cDNA library. Sequence analysis revealed that two *HNF-4* isoforms are also present in human liver. The complete sequence of the longest human isoform has been established and compared to the rat HNF-4 amino-acid sequences.

INTRODUCTION

Cell specificity is based on differential gene expression, which is in turn determined, at least in part, by a particular set of transcription factors present and active in a given cell at a certain time. Isoforms of a transcription factor can be expressed at different stage of cell differentiation (Cao et al., 1991) and have different effects onto cell differentiation (Umek et al., 1991; Freytag and Geddes, 1992). Many transcription factors have been identified and characterized (Faisst and Meyer, 1992), particularly in the liver where there is a wide range of transcriptionally controlled genes. There are now evi-

dences that the extinction of many hepatic functions and their reexpression are correlated to the extinction and expression of the hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4) (Kuo et al., 1992; Griffo et al., 1993). Moreover, HNF-4 has a key role in a transcriptional hierarchy since it also controls the expression of the transcription factor HNF-1 (Kuo et al., 1992; Miura and Tanaka, 1993) which is important in the expression of several hepatic genes too. In addition, co-transfection experiments indicate that HNF-4 is able to activate strongly the transcription of several hepatic genes (Ladias et al., 1992; Mietus-Snyder et al., 1992; Metzger et al., 1993; Chan et al., 1993). HNF-4, a member of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily, has been cloned in *Drosophila* and rat, in this later HNF-4 is only found in liver, kidney and intestine (Sladek et al., 1990; Zhong et al., 1993). Adult rat liver and kidney contain two isoforms of *HNF-4* mRNA, which mainly differ by an extra 30-nt segment in the coding part near the C terminus of the protein. The longest of the two isoforms, which is dominant in rat liver and kidney, could result from a differential splicing and could have a slightly different biological role

Correspondence to: Dr. F.L. Chartier, U325 INSERM, Institut Pasteur de Lille, Rue du Professeur Calmette, 59045 Lille, France. Tel. (33-20) 877-758; Fax (33-20) 877-360.

Abbreviations: aa, amino acid(s); bp, base pair(s); HNF, hepatocyte nuclear factor, *HNF-4*, gene (DNA) encoding HNF-4; kb, kilobase(s) or 1000 bp; nt, nucleotide(s); oligo, oligodeoxyribonucleotide; PA, polyacrylamide; PAGE, PA-gel electrophoresis; PCR, polymerase chain reaction; RT, reverse transcription; SDS, sodium dodecyl sulfate; UTR, untranslated region; v, variant.

(Hata et al., 1992). Isoforms of a transcription factor can have variable or even opposite effects on the expression of a precise gene (Bach and Yaniv, 1993). As an example, the transcription factor vHNF-1-A only differs from the isoform vHNF-1-B by an extra peptide of 26 aa, which confers a stronger transactivation activity (Ringeisen et al., 1993). Our aim was to investigate if HNF-4 also exists as two isoforms in human liver. In this paper we present evidences of the presence of two isoforms of HNF-4 in adult human liver. The full-length sequence of the longest isoform of HNF-4 has been established and is compared to the rat HNF-4 sequences.

EXPERIMENTAL AND DISCUSSION

(a) Screening of the human adult liver cDNA library

cDNA clones encoding human HNF-4 were obtained from an adult human cDNA library (a gift from Dr. C. De Taisne) constructed with *EcoRI* adaptators into phage λ NM1149. This library was screened with a probe encompassing nt 413 through 1114 of the rat *HNF-4* sequence, which was prepared by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using oligos corresponding to peptides 3 and 2 as primers (see Sladek et al., 1990). This probe which encompasses the dimerisation activation domain of rat HNF-4 allowed us to identify four positive clones out of 2.7×10^6 plaques. Positive clones were checked whether they encompass the entire coding sequence of *HNF-4* with a 5' probe (sequence 1 to 175, produced by PCR) and with a 3' probe (a 700-bp *SphI-HindIII* fragment) derived from the rat *HNF-4* cDNA in pBluescript SK⁻ vector (kindly provided by Dr. J. Darnell). Two clones, C and F, were positive for the three probes, their 2.5-kb *EcoRI* insert contain the full length coding sequence of *HNF-4*. The other clones (B and H) correspond to uncomplete cDNAs. The *EcoRI* fragments were subcloned into pUC19 vector for sequence determination.

(b) Comparison of human *HNF-4* with the rat *HNF-4*

Sequence analysis of *HNF-4* cDNAs were performed with the T7 sequencing kit (Pharmacia), oligos used as primers were designed when necessary from data obtained by sequencing. Sequence determination indicates that the two complete clones C and F are identical and correspond to the largest isoform of HNF-4 named HNF-4A. Clone H also corresponds to this isoform, whereas clone B corresponds to the shortest isoform of this transcription factor and is named HNF-4B, thus establishing the existence of two transcripts of *HNF-4* in human liver differing by the presence of an insertion sequence of 30 bp in isoform A.

A RT-PCR analysis of the HNF-4 isoforms (Fig. 1) present in the human hepatoma cell line HepG2 was performed using oligonucleotides flanking the insertion region (1247/1276 in Fig. 2). Our results indicate that the HNF-4A isoform is by far dominant or even the only isoform found in this human cell line. Since from a cDNA library analysis we cannot establish the ratio of the two isoforms, it could be of interest to determine this ratio in adult human liver and to study the expression of the two isoforms during cell differentiation and early stage of life.

The complete nt sequence of *HNF-4A* is presented in Fig. 2. The largest isoforms of human and rat *HNF-4* have a high level of similarity (90.3%). Most of the mutations are silent and the translated proteins present an overall similarity of 96% (Fig. 3). As expected, the DNA-binding domain is perfectly conserved between human and rat. This domain exhibits 91% aa sequence similarity between rat and *Drosophila* HNF-4 proteins (Zhong et al., 1993) and is highly conserved among the members of steroid hormone receptor superfamily (Laudet et al., 1992). The aa 114–429 of human and rat HNF-4, which contain the dimerisation domain, differ by three conservative aa substitutions and four non-conservative aa substitutions. In this region, the Leu²⁰³→Pro substitution could have consequences on the protein secondary and tertiary structures, and therefore could modify the activity of the protein. The C-terminal part of the protein is the most variable sequence and contains nearly half of the substitutions found between human and rat HNF-4.

The *HNF-4A* cDNA has been cloned in the eukaryotic expression vector pSG5 (Green et al., 1988) to produce the protein by in vitro transcription (Clontech Kit) and in vitro translation in reticulocyte lysates (Promega Kit,

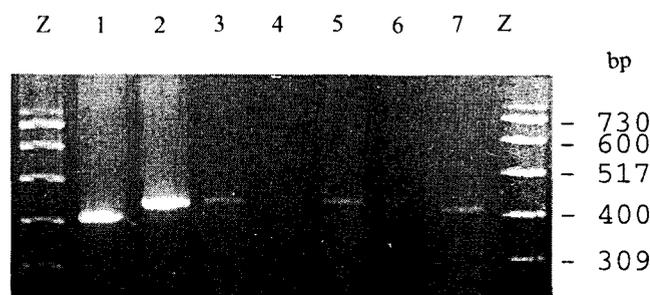


Fig. 1. RT-PCR analysis of *HNF-4* isoforms in the human hepatoma cell line HepG2. Total RNA was prepared by the acid thiocyanate method (Chomczynski and Sacchi, 1987). RT was performed with the following 3' antisense oligo 5'-ACGTGATCACCAGTGCTCTCT, located in the 3' UTR). PCR was performed with the above oligo and with a 5' sense oligo 5'-TCGAGCAGATCCAGTTCATCA using the following DNA as template. Lanes: 1, Human *HNF-4B* in pUC19; 2, human *HNF-4A* in pUC19; 3 to 5, three different preparations of cDNA produced from HepG2 cell; 6, cDNA produced from the non-HNF-4 producing HeLa cell; 7, rat *HNF-4* (short isoform from clone p17; Sladek et al., 1990) in pBluescript SK⁻; Z, size markers in bp. Samples were loaded on a 2.5% agarose gel.

CTCCAAAACCTCGTCGACATGGCA**ATG**GCCGACTACAGTGTGCACTGGACCCAGCCTA 60
 CACCACCTTGAATTTGAGAATGTGCAGGTGTGACGATGGGCAATGACACGTCCTCCCATC 120
 AGAAGGCCAACCTCAACGCGCCCAACAGCCTGGGTGTGAGCGCCCTGTGTGCCATCTG 180
 CGGGGACCGGGCCACGGGCAAAACACTACGGTGCCTCGAGCTGTGACGGCTGCAAGGGCTT 240
 CTTCCGAGGAGCGTGGGAAGAACACATGTACTCTGTCAGATTAGCCGGCAGTGCCT 300
 GGTGGACAAAGACAAGAGGAACCAAGTCCGCTACTGACAGGCTCAAGAAATGCTTCCGGGC 360
 TGGCATGAAGAAGGAGCCGTCAGAAATGAGCGGGACCGGATCAGCACTCGAAGGTCAAG 420
 CTATGAGGACAGCAGCTGCCCTCCATCAATGCGCTCTGTCAGGCGGAGGTCTGTCCCG 480
 ACAGATCACCTCCCGTCTCCGGATCAACGGGACATTCGGGCAAGAAGATTGCCAG 540
 CATCGCAGATGTGTGAGTCCATGAAGGAGCAGCTGCTGTTCTCGTTGAGTGGGCCAA 600
 GTACATCCACGCTTCTGCGAGCTCCCGTGGACGACAGGAGTGCCTGCTCAGAGCCCA 660
 TGCTGGCGAGCACCTGCTGCTCGGAGCCCAAGAGATCCATGGTGTCAAGGACGTGCT 720
 GCTCTAGGCAATGACTACATTTGCCCTCGCACCTGCCCGAGCTGGGGAGATGAGCCG 780
 GGTGTCCATACGCATCCTTGAAGAGCTGGTGTGCCCTTCCAGGAGCTGAGATCGATGA 840
 CAATGATGATGCCTACCTCAAGCCATCATCTTCTTTCAGCCAGATGCCAAGGGGCTGAG 900
 CGATCCAGGGAAGATCAAGCGGCTCGTTCACAGGTGACAGTGTGGAGGACTACAT 960
 CAACGACCGCCAGTATGACTCGCGTGGCCGCTTTGGAGAGCTGCTGCTGCTGCCAC 1020
 CTTGCAGAGCATCACCTGGCAGATGATCGAGCAGATCCAGTTCATCAAGCTCTTCGGCAT 1080
 GGCCAAGATTGACAACCTGTGTCAGGAGATGCTGCTGGGAGGGTCCCCAGCGATGCC 1140
 CCATGCCCAACCCCTGACCCCTCACTGATGCGAGAACATATGGGAACCAAGTCCAT 1200
 CGTTGCCAACACAATGCCCACTCACCTCAGCAACGGACAGATGT**GAGTGGCCCCGACC** 1260
CAGGGGACAGGCGCCACCCCTGAGACCCACAGCCCTCACCGCCAGGTGCGTCAAGGGTTC 1320
 TGAGCCCTATAAGCTCTGCGGGAGCGTCCGCAAAATCGTCAAGCCCTCTCTGCCAT 1380
 CCCCAGCCGACCATCAACCAAGCAGGAAGTTATCT**AG**CAAGCCGCTGGGGCTGGGGCT 1440

Fig. 2. Nucleotide sequence of human liver *HNF-4A* cDNA. The full-length sequence was determined in both orientations using the T7 sequencing kit (Pharmacia). There are 19 nt of 5' untranslated region (*UTR*) and 23 bp of 3' *UTR*, the start and stop codons are in bold and underlined letters. The boxed sequence corresponds to the nt present in the longest isoform *HNF-4A*, and which lack in the isoform *HNF-4B*. (EMBL accession No. X76930 HSHNF4)

Madison, WI, USA). SDS-PAGE (Fig. 4A) reveals that the in vitro synthesized human HNF-4A has a molecular mass of 52 kDa, which is in agreement with the nt sequence. It has been previously shown that the rat HNF-4 protein binds to human apolipoprotein A-I site A (-214/-192) (Tzamelis et al., 1993). Gel-retardation assays (Fig. 4B, lanes 2 and 5) show that, as the rat HNF-4, the in vitro synthesized human HNF-4A binds to site A of apolipoprotein A-I. The apolipoprotein C-III site B (-90/-64) is known to bind rat HNF-4 (Mietus-Snyder et al., 1992; Ladias et al., 1992), this site was used successfully to compete the complexes formed between human or rat HNF-4 and apolipoprotein A-I site A (Fig. 4B, lanes 3 and 6). These data indicate that human HNF-4A isoform recognizes the same sites as does the shortest isoform of rat HNF-4 and may modulate gene expression differently as observed with *vHNF-1* isoforms.

a	MDMADYSAAALDPAYTTTLEFENVQVLTMGNDTSPSEGTNLNAPNSLGVSLCAICGDRATG	60
b		
c		
a	KHYGASSCDGCKGFFRRSVRKNHMYSCRFSRQCVDKDRNQCRYCRLLKCRFAGMKKEA	120
b		
c		
a	VQNERDRISTRSSYEDSSLPISINALLQAEVLSRQITSPVSGINGDIRAKKIASIADVCE	180
b		
c		
a	SMKEQLLVVEWAKYIPAFCEPLDDQVALLRAHAGEHLLLGATKRSMVFKDVLVLLGNDY	240
b		
c		
a	IVPRHCELAEMSRVSIIRILDELVLFPQELQIDDNEYAYLKAIIFPDFDAKGLSDPGKIK	300
b		
c		
a	RLRSQVQVSLDYINDRQYDSRGRFGELLLLPQLQSIWQMIQIQFIKLFPMKIDNL	360
b		
c		
a	LQEMLLGGSPDAPHAHPLHPLHMQEHMGTNIVIVANTMPTHLNSGQMCWEVPRRQQAAT	420
b		
c		
a	PETPQSPPPGASGSEPYKLLPGAVATIVKPLSAIPQPTITKQEVI	465
b		
c		

Fig. 3. Comparison of human and rat HNF-4 aa sequences. The full sequence of the human HNF-4A protein is presented on line a. Only differences observed in the sequence of the long isoform of rat HNF-4 (Hata et al., 1992) and in the sequence of the short isoform of rat HNF-4 (Sladek et al., 1990) are presented on lines b and c, respectively. Bold letters correspond to non-conservative substitutions. Line — indicates the extra-peptide which is lacking in the short isoforms of human and rat HNF-4.

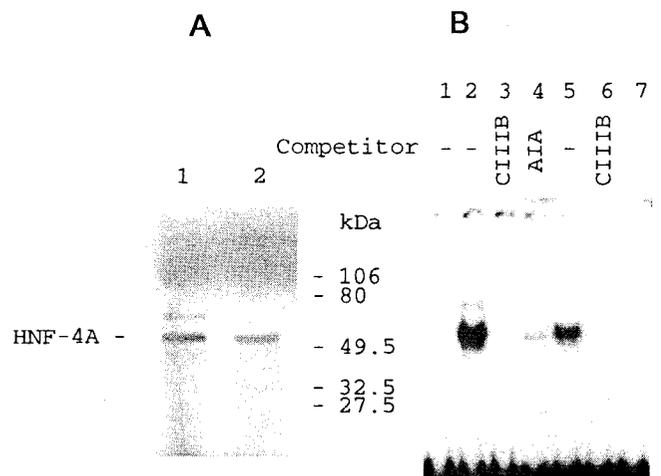


Fig. 4. Analysis of in vitro synthesized human HNF-4A protein. (A) 0.1% SDS-10% polyacrylamide slab gel. Lanes: 1, human HNF-4A; 2, rat HNF-4 (short isoform). (B) Gel retardation analysis of the binding of HNF-4 to the human apolipoprotein A-I site A. Lanes: 1, γ - 32 P-ATP-labeled human apolipoprotein A-I site A probe (0.4 ng). Human HNF-4A protein (lanes 2 to 4) and rat HNF-4 protein, short isoform, (lanes 5 and 6) were complexed to the probe and loaded on a 5% PA slab gel in 0.25xTBE buffer (89 mM Tris-boric acid/2 mM EDTA). Competitors were as follows: -, none; CIII-B, unlabelled human apolipoprotein C-III site B (40 ng); A1-A, unlabelled human apolipoprotein A-I site A (40 ng); 7, assay performed with non-programmed expression vector pSG5.

(c) Conclusions

Our results indicate:

- (1) As observed in rat liver, the transcription factor HNF-4 is expressed in two isoforms in human liver.
- (2) The largest isoform, called HNF-4A, is by far dominant in the human hepatoma cell line HepG2.
- (3) The two isoforms differ by an extra peptide of 10 aa located in the C-terminal part of the protein.
- (4) The largest HNF-4 isoforms of human and rat exhibit a high level of aa sequence similarity.
- (5) The in vitro synthesized transcription factor has the expected molecular size and binds HNF-4 responsive elements present in human apolipoprotein encoding genes.
- (6) The clone HNF-4A will allow to study the regulation of human genes with the human HNF-4.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to Dr. C. De Taines for providing the adult human liver cDNA library and to Prof. J.E. Darnell Jr. for providing the rat HNF-4 cDNA in the pBluescript SK⁻ vector, to Eve Clement and Marie-Joëlle Dupire for technical assistance and to Agnès Bégue for skillful advice and discussions. This work was supported by the INSERM, grants from the Institut Pasteur de Lille and from the Institut de Chimie Pharmaceutique (University of Lille II) and by a Bio Avenir Program Project grant to SERLIA (Service d'Etude et de Recherche sur les Lipoprotéines et l'Athérosclérose) from Rhône Poulenc, with the participation of the French Ministry of Research and the French Ministry of Industry. J.-P.B. is a predoctoral fellow of the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

REFERENCES

- Bach, I. and Yaniv, M.: More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing. *EMBO J.* 12 (1993) 4229–4242.
- Cao, Z., Umek, R.M. and McKnight, S.L.: Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* 5 (1991) 1538–1552.
- Chan, J., Nakabayashi, H. and Wong, N.C.: HNF-4 increases activity of the rat Apo A1 gene. *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 1205–1211.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156–159.
- Faisst, S. and Meyer, S.: Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 3–26.
- Freytag, S.O. and Geddes, T.J.: Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBP alpha. *Science* 256 (1992) 379–382.
- Green, S., Issemann, I. and Sheer, E.: A versatile in vivo and in vitro eukaryotic expression vector for protein engineering. *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 369.
- Griffo, G., Hamon-Benais, C., Angrand, P.-O., Fox, M., West, L., Lecoq, O., Povey, S., Cassio, D. and Weiss, M.: HNF4 and HNF1 as well as a panel of hepatic functions are extinguished and reexpressed in parallel in chromosomally reduced rat hepatoma-human fibroblast hybrids. *J. Cell Biol.* 121 (1993) 887–898.
- Hata, S., Tsukamoto, T. and Osumi, T.: A novel isoform of rat hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4). *Biochim. Biophys. Acta* 1131 (1992) 211–213.
- Kuo, C.J., Conley, P.B., Chen, L., Sladek, F.M., Darnell Jr., J.E. and Crabtree, G.R.: A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature* 355 (1992) 457–461.
- Ladiaz, J.A., Hadzopoulou Cladaras, M., Kardassis, D., Cardot, P., Cheng, J., Zannis, V. and Cladaras, C.: Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII, and ApoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 15849–15860.
- Laudet, V., Hanni, C., Coll, J., Catzeflis, F. and Stehelin, D.: Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.* 11 (1992) 1003–1013.
- Metzger, S., Halaas, J.L., Breslow, J.L. and Sladek, F.M.: Orphan receptor HNF-4 and bZip protein C/EBP bind to overlapping regions of the apolipoprotein B gene promoter and synergistically activate transcription. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 16831–16838.
- Mietus-Snyder, M., Sladek, F.M., Ginsburg, G.S., Kuo, C.F., Ladiaz, J.A., Darnell Jr., J.E. and Karathanasis, S.K.: Antagonism between apolipoprotein AI regulatory protein 1, Ear3 COUP-TF, and hepatocyte nuclear factor 4 modulates apolipoprotein CIII gene expression in liver and intestinal cells. *Mol. Cell. Biol.* 12 (1992) 1708–1718.
- Miura, N. and Tanaka, K.: Analysis of the rat hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 gene promoter: synergistic activation by HNF4 and HNF1 proteins. *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 3731–3736.
- Ringeisen, F., Rey-Campos, J. and Yaniv, M.: The transactivation potential of variant hepatocyte nuclear factor 1 is modified by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 25706–25711.
- Sladek, F.M., Zhong, W., Lai, E. and Darnell Jr., J.E.: Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev.* 4 (1990) 2353–2365.
- Tzamelis, E., Cladaras, C. and Zannis, V.: Effect of mutations in the nuclear receptor response element of apo A-I on transcription and the binding of homo and heterodimeric complexes of nuclear receptors. *Circulation* 88 (1993) I-422.
- Umek, R.M., Friedman, A.D. and McKnight, S.L.: CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science* 251 (1991) 288–292.
- Zhong, W., Sladek, F.M. and Darnell Jr., J.E.: The expression pattern of a *Drosophila* homolog to the mouse transcription factor HNF-4 suggests a determinative role in gut formation. *EMBO J.* 12 (1993) 537–544.

**RESULTATS
EXPERIMENTAUX
ET
DISCUSSION**

I- Clonage et étude de la séquence protéique de HNF-4

- Le clonage réalisé à partir d'une banque d'ADNc de foie humain adulte a permis d'isoler deux familles de clones correspondant aux deux isoformes du facteur HNF-4: la forme longue désignée HNF-4 α 2 et la forme courte désignée HNF-4 α 1. Le séquençage des ADN complémentaires correspondants montre que les deux transcrits diffèrent par la présence d'une séquence de 30 paires de bases (bp) au niveau du domaine F de l'isoforme HNF-4 α 2. La présence de deux isoformes de HNF-4 différant par l'insertion d'une séquence de 30 bp localisée dans la partie C-terminale ont également été décrite chez le rat (Hata et al., 1992).

Un mécanisme d'épissage alternatif conduit probablement à ces deux types d'isoforme chez l'homme et le rat. Il apparaît d'ailleurs que l'utilisation alternative d'un site 5' d'épissage soit également conservée au niveau du gène HNF-4 de souris. Une séquence de 10 acides aminés est aussi insérée sans pour cela modifier le cadre de lecture des bases codant pour la séquence carboxy-terminale de la protéine (Taraviras et al., 1994).

- Les analyses de RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) mettent en évidence que l'isoforme α 2 est prépondérante dans la lignée cellulaire hépatique humaine HepG2.

- La comparaison de la séquence de l'ADNc de cette isoforme avec celle de l'isoforme longue du rat a été effectuée (fig.18). Ces séquences nucléotidiques partagent une similarité importante (90.3%) et la plupart des mutations rencontrées sont silencieuses. La plus grande variabilité est rencontrée au niveau de l'extrémité carboxy-terminale dans le domaine F. On trouve dans ce domaine dix substitutions soit presque la moitié des substitutions observées entre les protéines humaine et de rat. Parmi ces substitutions, il faut surtout noter une proline changée en alanine, une leucine en proline et une proline en serine. C'est de plus dans ce même domaine que se localise l'insertion de 10 acides aminés caractéristique des isoformes α 2 humaine et de rat et absente des isoformes α 1 correspondantes. Par contre, aucune différence n'est notée au niveau du domaine C renfermant les deux doigts de zinc responsables de la fixation de la protéine sur l'ADN. L'étude de la séquence nucléotidique a également révélé qu'aucune mutation intervient dans les dix séquences répétitives de sept résidus hydrophobes se mettant en hélice appelées "heptad repeats". Celles-ci localisées dans le domaine E sont responsables de la dimérisation.

a	MDMADYSAALDPAYTTLEFENVQVLTMGNDTSPSEGTNLNAPNSLGVSALCAICGDRATG	60
b		
c		
	Domaine C	
a	KHYGASSCDGCKGFFFRRSVRKNHMYSCRFSRQC VVDKDKRNQCRYCRLKKCFRAGMKKEA	120
b		
c		
a	VQNERDRISTRSSYEDSSLPSINALLQAEVLSRQITSPVSGINGDIRAKKIASIADVCE	180
b		
c		
a	SMKEQLLVLVEWAKYIPAFCELPLDDQVALLRAHAGEHLLLGATKRSMVFKDVLLGNDY	240
b		
c		
	Domaine E	
a	<u>IVPRHCPELAEMSRVSIRILDELVLPFOELOIDDNEYAYLKAIFFDPAKGLSDPGKIK</u>	300
b		
c		
a	<u>RLRSQVQVSLEDYINDRQYDSRGRFGELLLLLPTLQSITWQMEIQFIKLFGMAKIDNL</u>	360
b		
c		
	Domaine F	
a	LQEMLLGGSPSDAPHAHHPLHPLHMQEHMGTNVIVANTMPTHLSNGQMCEWPRPRGQAAT	420
b	<u>LMEMLE</u> A	S
c	A	S S
a	PETPQPSPPGASGSEPYKLLPGAVATTVKPLSAIPQPTITKQEVI	
b	SG S IT P A	
c	SG S IT P A	

Figure 18:

Comparaison des séquences en acides aminés de HNF-4 humain et de rat.

La séquence complète de l'isoforme $\alpha 2$ humaine est présentée sur la ligne a. Seulement les différences observées avec la séquence de l'isoforme longue $\alpha 2$ de rat (Hata et al., 1992) et avec la séquence de l'isoforme courte $\alpha 1$ de rat sont respectivement présentées sur les lignes b et c. Les lettres grasses correspondent à des substitutions non-conservatives. La ligne --- indique l'extra-peptide de 10 acides aminés qui est absent des isoformes courtes humaine et de rat. Les séquences soulignées correspondent aux "heptad repeats". La flèche indique le début du domaine F.

II- Etude de la fixation de l'isoforme $\alpha 2$ de HNF-4 à l'ADN

L'isoforme $\alpha 2$ humaine a été synthétisée "*in vitro*" après avoir cloné l'ADNc dans le vecteur d'expression de gènes Eucaryotes, pSG5, et l'électrophorèse en présence de SDS a montré qu'elle a une taille moléculaire de 55000 Da. Les expériences de gel-retard montrent que cette isoforme produite "*in vitro*" se fixe sur les éléments de réponse reconnus par HNF-4 de rat et présents au niveau des promoteurs des gènes des apolipoprotéines humaines A-I, C-III, A-II (résultats non présentés), respectivement les sites AI-A, CIII-B et AII-J.

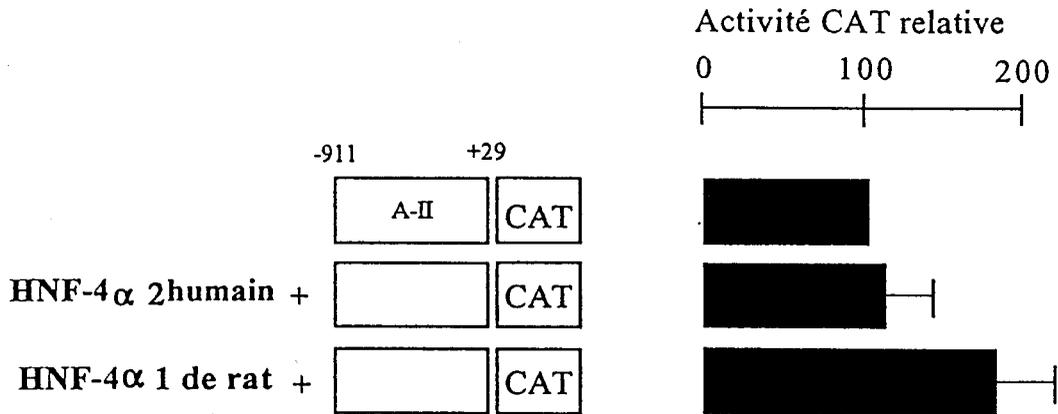
III- Etude de l'activité régulatrice de l'isoforme $\alpha 2$ de HNF-4

Des expériences de cotransfection visant à étudier l'activité régulatrice de HNF-4 $\alpha 2$ ont été menées dans la souche cellulaire HepG2 exprimant HNF-4 ainsi que dans la lignée JEG-3 ne l'exprimant pas. Le vecteur d'expression de HNF-4 $\alpha 2$ humain et de HNF-4 $\alpha 1$ de rat et deux constructions renfermant le promoteur humain de l'apoA-II cloné devant le gène reporter CAT du vecteur pBLCAT5 ou le site CIII-B placé devant le promoteur humain minimal de l'apoA-I (-40/+90) devant le gène reporter CAT ont été cotransfectés dans ces souches cellulaires. Ces essais montrent que HNF-4 $\alpha 2$ n'a aucune activité sur les promoteurs testés, même si ce facteur peut se fixer sur leur élément de réponse, alors que la forme courte $\alpha 1$ de HNF-4 de rat testée parallèlement en contrôle est capable de les transactiver. Les résultats concernant le promoteur de l'apoA-II humaine et le promoteur minimal de l'apoA-I humaine sont présentés dans la **figure 19**. La transactivation du promoteur de l'apoA-II par HNF-4 $\alpha 1$ dans la cellule HepG2 paraît relativement faible (deux fois). Un résultat similaire a été obtenu précédemment par Ladias et al. (Ladias et al., 1992). Des résultats récents de l'équipe de Karathanasis montrent que la transactivation du promoteur de l'apoA-I dans la cellule HepG2 n'est pas décelable, ce qui est probablement causé par la richesse de cette cellule en HNF-4 endogène. Nos résultats dans la lignée HepG2 sont vraisemblablement dus à la même raison.

Pour l'instant, nous ignorons pourquoi la forme HNF-4 $\alpha 2$ humaine ne peut transactiver mais diverses hypothèses peuvent être avancées:

- Nous avons vu précédemment qu'une grande variabilité au niveau des acides aminés est rencontrée dans le domaine F entre l'isoforme $\alpha 2$ humaine et l'isoforme $\alpha 1$ de rat et celle-ci met en jeu des substitutions non conservatives. De plus, l'insertion de 10 acides aminés au niveau de l'isoforme $\alpha 2$ de HNF-4 est localisée dans ce même domaine.

Hépatome cellulaire humain (HepG2)



Choriocarcinome cellulaire humain (JEG-3)

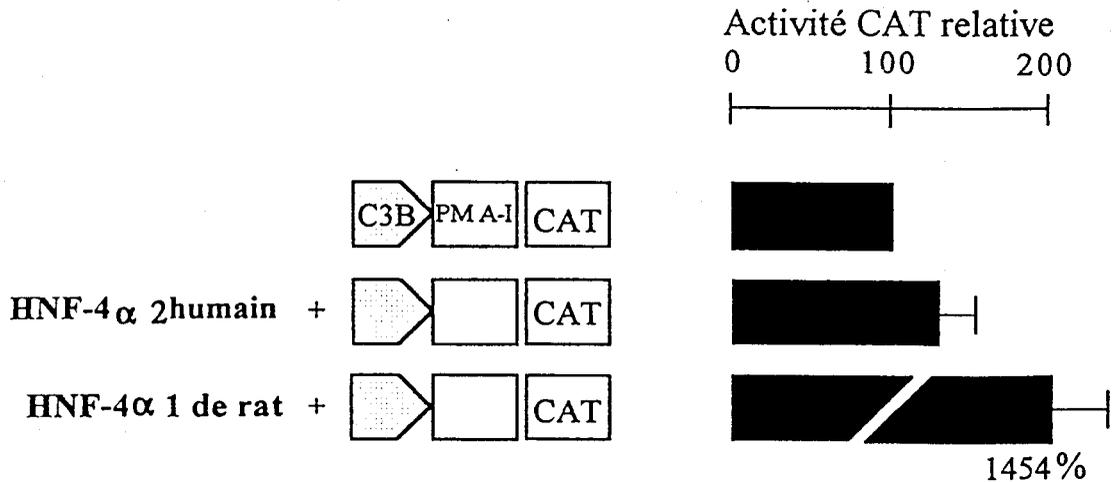


Figure 19:

Effet des isoformes HNF-4 α 1 de rat et HNF-4 α 2 humaine sur l'activité du promoteur de l'apoA-II humaine dans les cellules HepG2 et de l'apoA-I humaine via le site C3B dans les cellules JEG-3.

AII: promoteur -911/+29 de l'apoA-II humaine; PM A-I: promoteur minimal de l'apoA-I humaine; C3B: élément de réponse de HNF-4 du promoteur de l'apoCIII humaine (-90/-66).

Les activités CAT, déterminées et normalisées en fonction des différences d'efficacité de transfection, sont exprimées par rapport à l'activité du promoteur thymidine kinase. Les résultats présentés sont les moyennes d'une seule expérience de transfection réalisée en triple avec les écart-types indiqués par des barres d'erreurs.

Nous pouvons donc suspecter que l'absence d'activité transactivatrice de HNF-4 α 2 humaine soit due à ces modifications.

- Nous pouvons aussi nous demander si l'isoforme HNF-4 α 2 n'est pas un dominant négatif naturel, comme c'est le cas de l'une des isoformes de HNF1 générée par épissage alternatif (Bach et Yaniv, 1993). L'étude est en cours actuellement au Laboratoire de Biochimie Structurale (C.J.F. INSERM 9203) de la Faculté de Médecine de Lille.

- Il est fort probable que la forme courte HNF-4 α 1 humaine soit, comme son homologue chez le rat, la forme transactivatrice et il se pourrait que son activité soit modulée par l'isoforme α 2 inactive ou répressive, par compétition pour les mêmes sites de liaison, ce qui est vérifiable en cotransfectant une construction renfermant un promoteur cible de HNF-4 placé devant le reporter CAT et des rapports variables des deux types de vecteur d'expression de HNF-4 α 1 de rat et de HNF-4 α 2 humaine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alaupovic, P. (1980) The concepts, classification systems and nomenclatures of human plasma lipoproteins. In CRC Handbook of electrophoresis, Volume I, Lipoproteins. Basic Principles and Concepts. L. A. Lewis and J. J. Oppl, editors. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida 27-46.

Anantharamaiah, G. M., Venkatachalapathi, Y. V., Brouillette, C. G., Segrest, J. P., Use of synthetic peptide analogues to localize lecithin : cholesterol acyltransferase activating domain in apolipoprotein A-I. (1990) *Arteriosclerosis* 10: 95-105.

Applebaum-Bowden, D., Mc Lean, P., Steinmetz, A., Fontana, D., Matthys, C., Warnick, G. R., Cheung, M., Albers, J. J. and Hazzard, W. R., Lipoprotein, apolipoprotein, and lipolytic enzyme changes following estrogen administration in postmenopausal women. (1989) *J. Lipid. Res.* 30: 1895-1906.

Ash, J., Ke, Y., Korb, M., Johnson, L. F., Introns are essential for growth-regulated expression of the mouse thymidilate synthase gene. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13: 1565-1571.

Bach, I., Yaniv, M., More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing. (1993) *EMBO J.* 12: 4229-4242.

Baeurle, P. A., Baltimore, P., Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF- κ B transcription factor. (1988a) *Cell* 53: 211-217.

Baeurle, P. A., Baltimore, P., I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. (1988b) *Science* 242: 540-545.

Bagchi, M. K., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., O'Malley, B. W., Purification and characterization of chicken ovalbumine gene upstream promoter transcription factor from homologous oviduct cells. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7: 4151-4158.

Baldo, E. G., Giada, F., Zuliani, G., Baroni, L., Vitale, E., Enzi, G., Magnanini, P., Fellin, R., Lipid and apoprotein modifications in body builders during and after self-administration of anabolic steroids. (1990) *Metabolism* 39: 203-208.

Baniahmad, A., Muller, M., Steiner, C., Renkavitz, R., Activity of two different silencer elements of the chicken lysozyme gene can be compensated by enhancer elements. (1987) EMBO J. 6: 2297-2303.

Baniahmad, A., Köhne, A. C., Renkavitz, R., A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor. (1992) EMBO J. 11:1015-1023.

Banka, C. L., Smith, R. S., Bonnet, D. J., Curtis, L. K., Inhibition of apolipoprotein A-I-mediated cholesterol efflux from monocytic cells by monoclonal antibodies. (1990) Circulation 87 abstract 1308

Barbaras, R., Grimaldi, P., Negrel, R., Ailhaud, G., Binding of lipoproteins and regulation of cholesterol synthesis in cultured mouse adipose cells. (1985) Biochem. Biophys. Acta 845: 492-501.

Barbaras, R., Puchois, P., Grimaldi, P., Barkia, A., Fruchart, J. C., Ailhaud, G., Relationship in adipose cells between the presence of receptors sites for High Density lipoproteins and the promotion of reverse cholesterol transport. (1987) Biochem. Biophys. Res. Comm. 149: 545-554.

Bard, J. M., Parra, H. J., Douste-Blazy, P., Fruchart, J. C., Effect of pravastatin, an HMG CoA reductase inhibitor, and cholestyramine, a bile acid sequestrant, on lipoprotein particles defined by their apolipoprotein composition. (1990) Metabolism 39: 269-273.

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

Berkowitz, E. A., Evans, M. I., Functionnal analysis of regulatory regions upstream and in the first intron of the estrogen-responsive chicken very low density apolipoprotein A-II gene. (1992) J. Biol. Chem. 267: 7134-7138.

Blessing, M., Zentgraf, H., Jorcano, J. L., Differentially expressed bovine cytokeratin genes. Analysis of gene linkage and evolutionary conservation of 5'-upstream sequences. (1987) *EMBO J.* 6: 567-575.

Bossu, J. P., Chartier, F. L., Vu-Dac, N., Fruchart, J. C., Laine, B., Transcription of the human apolipoprotein A-II gene is down-regulated by the first intron of its gene. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 202: 822-829.

Brewer, H. B. J., Lux, S. E., Ronan, R., John, K. M., The primary structure of apolipoprotein from Human High Density lipoprotein A-II. (1972) *J. Biol. Chem.* 257: 7189-7195.

Brewer, H. B. J., Fairwell, T., Larue, A., Ronan, R., Bronzert, T. J., The amino acid sequence of human apoA-I and apolipoprotein isolated from high density lipoprotein. (1978) *Biochem. Biophys. Acta* 80: 625-630.

Brooks, A. R., Blackhart, B. D., Haubold, K., Levy-Wilson, B., Characterization of tissue-specific enhancer elements in the second intron of the human apolipoprotein B gene. (1991) *J. Biol. Chem* 266: 7848-7859.

Brooks, A. R., Levy-Wilson, B., Hepatocyte Nuclear Factor 1 and C/EBP are essential for the activity of the human apolipoprotein B gene second intron. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 18: 1134-1148.

Brooks, A. R., Nagy, B. P., Taylor, S., Scott Simonet, W. S., Taylor, J. M., Levy-Wilson, B., Sequences containing the second-intron enhancer are essential for transcription of the human apolipoprotein B gene in livers of transgenic mice. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14: 2243-2256.

Brown, M. S., Goldstein, J. C., A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. (1986) *Science* 232: 34-47.

Bruhat, A., Tourmente, S., Chapel, S., Sobrier, M. L., Couderc, J. L., Dastugne, B., Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional regulation of the β 3 tubulin gene. (1990) *Nucleic Acid. Res.* 18: 2861-2867.

Burbelo, P. D., Bruggeman, L. A., Gabriel, G. C., Klotman, P. E., Yamada, Y., Characterization of a cis-element required for transcriptional activation of the collagen IV enhancer. (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 22297-22302.

Cardot, P., Chambaz, J., Cladaras, C., Zannis, V. I., Regulation of the human apoA-II gene by the synergistic action of factors binding to the proximal and distal regulatory elements. (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 24460-24470.

Cardot, P., Chambaz, J., Kardassis, D., Cladaras, D., Zannis, V. I., Factors participating in the liver-specific expression of the human apolipoprotein A-II gene and their significance for transcription. (1993) *Biochemistry* 32: 9080-9093.

Cardot, P., Pastier, D., Lacorte, J. M., Mangeney, M., Zannis, V. I., Chambaz, J., Purification and characterization of nuclear factors binding to the negative regulatory element D of human apolipoprotein A-II promoter: a negative regulatory effect is reversed by GABP, an Ets-related protein. (1994) *Biochemistry* 33: 12139-12148.

Castro, G. R., Fielding, C., Early incorporation of cell derived cholesterol into pre β -migrating High Density lipoprotein. (1988) *Biochemistry* 27: 25-29.

Castro, G., Nihoul, L., Dengremont, C., Tailleux, A., Duverger, N., Deneffe, P., Rubin, E., Fruchart, J. C., Plasma from human apoA-I and apoA-I plus apoA-II transgenic mice show a correlation between *in vivo* atherogenesis, *in vitro* cholesterol efflux, and formation of lipoproteins with pre- β mobility. (1994) *Circulation* 90: I-240.

Chambaz, J., Cardot, P., Pastier, D., Zannis, V. I., Cladaras, C., Promoter elements and factors required for hepatic transcription of the human apoA-II gene. (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 11676-11685.

Chan, J., Nakabayashi, H., Wong, N. C. W., HNF-4 increases activity of the rat apoA1 gene. (1993) *Nucleic Acid Res.* 21: 1205-1211.

Chen, C. H., Albers, J. J., Enhancement of apolipoprotein A-I activated human plasma lecithine: cholesterol acyltransferase activity by apolipoprotein A-II. (1988) *Arteriosclerosis* 489a.

Chen, W. S., Manova, K., Weinstein, D. C., Duncan, S. A., Plump, A. S., Prezioso, V. R., Bachvarova, R. F., Darnell J. E. J., Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. (1994) *Genes and Dev.* 8: 2466-2477.

Cheung, M. C., Albers, J. J., Distribution of cholesterol and lipoprotein A-I and A-II in human High Density lipoproteins subfractions separated by CsCl equilibrium gradient ultracentrifugation: evidence for High Density lipoprotein subpopulations with differing A-I/A-II molar ratios. (1979) *J. Lipid. Res.* 20: 200-207.

Cheung, M. C., Wolf, A. C., Lum, K. D., Tollefson, J. H., Albers, J. J., Distribution and localization of lecithin: cholesterol acyltransferase and cholesterol ester transfer activity in A-I containing lipoproteins. (1986) *J. Lipid. Res.* 27: 1135-1144.

Cheung, M. C., Nichols, A. V., Blancke, P. J., Gong, E., Franceschini, G., Sistori, C. R., Characterization of A-I containing lipoproteins in subjects with A-I Milano variant. (1988) *Biochem. Biophys. Acta* 960: 73-82.

Cowell, I. G., Skinner, A., Hurst, H. C., Transcriptional repression by a novel member of the bZip family of transcription factors. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12: 3070-3077.

Cowell, I. G., Repression versus activation in the control gene of transcription. (1994) *TIBS* 19: 38-42.

Dabeva, M. D., Post-Beittenmiller, M. A., Warner, J. R., Autogenous regulation of splicing of the transcript of a yeast ribosomal protein gene. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5854-5857.

Deckelbaum, R. J., Eisenberg, S., Oschry, Y., Granot, E., Sharon, I., Conversion of human plasma HDL-2 to HDL-3. Roles of neutral lipid exchange



triglycerides lipases. (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 5201-5208.

De Lamatre, J., Wolfbauer, G., Phillips, M. C., Rothblat, G. H., Role of apolipoproteins in cellular cholesterol efflux. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 875: 419-428.

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

Dillon, N., Grosfeld, F., Chromatin domains as potential units of eukaryotic gene function. (1994) *Curr. Opin. Genet. Develop.* 4: 260-264.

Docherty, K., Steiner, D. F., Post-transcriptional proteolysis in polypeptide hormone synthesis. (1982) *Annu. Rev. Physiol.* 44: 625-638.

Drapkin, R., Merino, A., Reinberg, D., Regulation of RNA polymerase II transcription. (1993) *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5: 469-476.

Duncan, S. A., Manova, K., Chen, W. S., Hoodless, P., Weinstein, D. C., Bachvarova, R. F., Darnell, J. E. J., Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm gut and the nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7598-7602.

Dynan, W. S., Modularity in promoters and enhancers. (1989) *Cell* 58:1-4.

Edelstein, C., Kaiser, M., Piras, G., Scanu, A. M., Demonstration that the enzyme that converts precursor of apolipoprotein A-I to apolipoprotein A-I is secreted by the hepatocarcinoma cell line HepG2. (1988) *Archives of Biochemistry and Biophysics* 113: 527-531.

Eden, S., Cedar, H., Role of DNA methylation in the regulation of transcription. (1994) *Curr. Opin. Genet. Develop.* 4: 255-259.

Eggerman, T. L., Hoeg, J. M., Meng, M. S., Trombagel, A., Bojanovski, D., Brewer, H. B. J., Differential tissue specific expression of human apoA-I and apoA-II. (1991) *J. Lipid Res.* 32: 821-828.

- Eisenberg, S., High density lipoprotein metabolism. (1984) *J. Lipid Res.* 25: 1017-1058.
- Faisst, S., Meyer, S., Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20: 3-26.
- Fidge, N. H., Nestle P. J., Identification of apolipoproteins involved in the interaction of human high density lipoprotein with receptors on cultured cells. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 3570-3575.
- Fielding, C. J., Shore, V. G., Fielding, P. E., A protein cofactor of lecithin: cholesterol acyltransferase. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46: 1493-1498.
- Fielding, C. J., Fielding, P. E., Evidence for a lipoprotein carrier in human plasma catalysing sterol efflux from cultured fibroblasts and its relationship to lecithin: cholesterol acyl transferase. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3911-3914.
- Frain, M., Swart, G., Monaci, P., Nicosia, A., Stampfli, S., Frank, R., Cortese, R., The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain. (1989) *Cell* 59: 145-157.
- Francone, O. L., Fielding, C. J., Fielding, P. E., Distribution of cell derived cholesterol among plasma lipoproteins: a comparison of three techniques. (1990) *J. Lipid Res.* 31: 2195-2200.
- Franklin, G. C., Donovan, M., Adam, G.I., Holmgren, L., Pfeifer-Ohlsson, S. P., Ohlsson, R., Expression of the human PDGF- β gene is regulated by both positively and negatively acting cell type-specific regulatory elements located in the first intron. (1991) *EMBO J.* 10: 1365-1373.
- Fuller, P. J., The steroid receptor superfamily mechanisms of diversity. (1991) *FASEB J.* 5: 3092-3099.
- Garzon, R. J., Zehner, Z. E., Multiple silencer elements are involved in regulating the chicken vimentin gene. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14: 934-943.

Glomset, J. A., Norum, K. R., Gjone, E., Familial lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency. (1983) In the metabolic basis of inherited disease (J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden and D.S. Fredrickson, eds), pp643-654, McGraw-Hill, New York.

Golder-Novoselsky, E., Forte, T. M., Nichols, A. V., Rubin, E. M., Apolipoprotein A-I expression and high density lipoprotein distribution in transgenic mice during development. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 20787-20790.

Gordon, J. I., Budelier, K. A., Sims, H. F., Edelstein, C., Scanu, A. M., Strauss, A. W., Proteolytic processing of human preapolipoprotein A-I. A proposed defect in the conversion of pro A-I to A-I in Tangier's disease. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 14054-14059.

Greenblatt, J., RNA polymerase-associated transcription factors. (1991) *Trends Biochem. Sci.* 16: 408-411.

Griffo, G., Hamon-Benais, C., Angrand, P. O., Fox, M., West, L., Lecoq, O., Pivey, S., Cassio, D., Weiss, M.: HNF-4 and HNF-1 as well as a panel of hepatic functions are extinguished and reexpressed in parallel in chromosomally reduced rat hepatoma-human fibroblast hybrids. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 887-898.

Gross, D. S., Garrard, W. T., Nuclease hypersensitive sites in chromatin. (1988) *Ann. Rev. Biochem.* 57: 159-197.

Grundy, S. M., Denke, M. A., Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. (1990) *J. Lipid. Res.* 31: 1149-1172.

Hahn, S., Structure (?) and function of acidic transcription activators. (1993) *Cell* 72: 481-483.

Hamilton, R. C., William, M. C., Fielding, C. T., Havel, R. J., Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoprotein from perfused rat liver. (1976) *J. Clin. Invest.* 58: 667-680.

Han, K., Manley, J. L., Transcriptional repression by the *Drosophila* Even-skipped protein: definition of a minimal repression domain. (1993) *Genes Dev.* 7: 491-503.

Han, K., Manley, J. L., Functional domains of the *Drosophila* Engrailed protein. (1993) *EMBO J.* 12: 2723-2733.

Harnish, D. C., Malik, S., Karathanasis, S. K., Activation of apoA-I gene transcription by HNF-3 β and HNF-4. (1994) *Circulation* 90: I-570.

Hata, S., Tsukamoto, T., Osami, T., A novel isoform of rat hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4). (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1131: 211-213.

Hedrick, C. C., Castellani, L. W., Warden, C. H., Puppione, D. L., Lusic, A. J., Influence of mouse apolipoprotein A-II on plasma lipoproteins in transgenic mice. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 20676-20682.

Huff, C. A., Yuspa, S. H., Rosenthal, D., Identification of control elements 3' to the human keratin 1 gene that regulate cell type and differentiation-specific expression. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 377-384.

Hussain, M. M., Zannis, V. I., Intracellular modification of human apolipoprotein A-II (ApoA-II) and sites of ApoA-II mRNA synthesis. Comparison of apoA-II with ApoC-II and ApoC-III Isoproteins. (1990) *Biochemistry* 29: 209-217.

Ikewaki, K., Zech, L. A., Kindt, M., Brewer, H. B., Rader, D. J. Junior, Apolipoprotein A-II production rate is a major factor regulating the distribution of apolipoprotein A-I among HDL subclasses LpA-I and LpA-I:A-II in normolipidemic humans. (1995) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 306-312.

Inostroza, J. A., Mermelstein, F. H., Ha, I., Lane, W. S., Reinverg, D., Dr1, a TATA-binding protein-associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. (1992) *Cell* 70: 477-489.

Ito, Y., Azrolan, N., O'Connell, A., Walsh, A. M., Breslow, J. L., Hypertriglyceridemia as a result of human apoCIII gene expression in transgenic mice. (1991) *Science* 249: 790-793.

- Jahn, C. E., Osborne, J. C., Schaeffer, E. J., Brewer, H. B. Junior, Activation of the enzymatic activity of hepatic lipase by apolipoprotein A-II. (1983) *Eur. J. Biochem.* 131: 25-29.
- Jaynes, J. B., O'Farrell, P. H., Active repression of transcription by the Engrailed homeodomain protein. (1991) *EMBO J.* 10: 1427-1433.
- Johnson, W. J., Kilsdonck, E. P. C., Van Tol, A., Phillips, M. C., Rothblatt, G. H., Cholesterol efflux from cells to immunopurified subfractions of human high density lipoprotein: Lp-AI and Lp-AII. (1991) *J. Lipid. Res.* 32: 1993-2000.
- Jonas, A., Sweeny, S. A., Herbert, P. N., Discoidal complexes of A and C apolipoproteins with their lipids and their reactions with lecithin: cholesterol acyltransferase. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 6359-6375.
- Jonas, A., Kedzy, K. E., Wald, J. F., Defined apolipoprotein A-I conformations in reconstituted high density lipoprotein. (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 4818-4824.
- Jonas, A., Von Eckardstein, A., Kezdy, K. E., Steinmetz, A., Assmann, G., Structural and functional properties of reconstituted high density lipoprotein discs prepared with six apolipoprotein A-I variants. (1991) *J. Lipid Res.* 32: 95-106.
- Jonsson, J. J., Foresman, M. D., Wilson, N., Mc Ivor, R. S., Intron requirement for expression of the human purine nucleoside phosphorylase gene. (1992) *Nucleic Acid Res.* 18: 2861-2867.
- Kageyama, R., Pastan, I., Molecular cloning and characterization of a human DNA binding factor that represses transcription. (1989) *Cell* 59: 815-825.
- Karathanasis, S. K., Apolipoprotein multigene family and tandem organization of human apolipoprotein A-I, C-III and A-IV genes. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6374-6378.
- Kardassis, D., Zannis, V. I., Cladaras, C., Organization of the regulatory elements and nuclear activities participating in the transcription of the human apolipoprotein B gene. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 2622-2632.

Kingston, R. E., Green, M. R., Modeling eukaryotic transcriptional activation. (1994) *Curr. Biol.* 4: 325-332.

Kiss, I., Bosze, Z., Szabo, P., Altanchung, R., Barla, E., Deak, F., Identification of positive and negative regulation regions controlling expression of the cartilage matrix protein gene. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 2432-2436.

Knott, T. J., Priestley, L. M., Urdea, M., Scott, J., Isolation and characterisation of a cDNA encoding the precursor for human apolipoprotein AII. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 734-740.

Korb, M., Ke, Y., Johnson, F. L., Stimulation of gene expression by introns: conversion of an inhibitory intron to a stimulatory intron by alteration of the splice donor sequence. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21: 5901-5908.

Kuo, C. J., Conley, P. B., Chen, L., Sladek, F. M., Darnell, J. E. J., Crabtree, G. R., A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. (1992) *Nature* 355: 457-461.

Kushwaha, R. S., Foster, D. M., Murthy, V. N., Carey, K. D., Bernard, M. G., Metabolic regulation of apoproteins of high-density lipoproteins by estrogen and progesterone in the baboon (*Papio sp.*). (1990) *Metabolism* 39: 544-552.

Ladas, J. A., Hadzopoulou-Cladaras, M., Kardassis, D., Cardot, P., Cheng, J., Zannis, V., Cladaras, C., Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII and ApoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, Ear-2 and Ear-3. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 15849-15860.

Ladas, J. A., Karathanasis, S. K., Regulation of the Apolipoprotein AI gene by ARP-1, a novel member of the steroid receptor superfamily. (1991) *Science* 251: 561-565.

Lagoki, P. A., Scanu, A. M., *In Vitro* modulation of the apolipoprotein composition of High Density lipoprotein; Displacement of apolipoprotein A-I from High Density lipoprotein by

apolipoprotein A-II. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 3701-3706.

Lagrost, L., Dengremont, C., Athias, A., De Geitere, C., Fruchart, J. C., Lallemand, C., Gambert, P., Castro, G., Modulation of cholesterol efflux from Fu5AH hepatoma cells by the apolipoprotein content of high density lipoprotein particules. (1995) *J. Biol. Chem.* (in press).

Lauer, S. J., Walker, D., Elshourbogy, N. A., Reardon, C. A., Levy-Wilson, B., Taylor, J. M., Two copy of the human apolipoprotein C-I gene are linked closely to the apolipoprotein E gene. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 7277-7286.

LeBoeuf, R., Doolittle, M. H., Montcalm, A., Martin, D. C., Reue, K., Lusis, A. J., Phenotypic characterization of the Ath-1 gene controlling high density lipoprotein levels and susceptibility to atherosclerosis. (1990) *J. Lipid. Res.* 31: 91-101.

Lenich, C., Brecher, P., Makorides, S., Chobanian, A., Zannis, V. I., Apolipoprotein gene expression in the rabbit: abundance, size and distribution of apolipoprotein in RNA species in different tissue. (1988) *J. Lipid. Res.* 29: 755-764.

Levy-Wilson, B., Paulweber, B., Nagy, B., Ludwig, E. H., Brooks, A. R., Nuclease hypersensitive sites define a region with the enhancer activity in the third intron of the human apolipoprotein B gene. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 18375-18743.

Li, W. H., Janimura, M., Luo, C. C., Dattu, S., Chan, L., The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships and evolution. (1988) *J. Lipid Res.* 29: 245-271.

Li, H., Reddick, R. L., Maeda, N., Lack of apoA-I is not associated with increased susceptibility to atherosclerosis in mice. (1993) *Arterioscler. Thromb.* 13: 1814-1821.

Licht, J. D., Gossel, M. J., Figge, J., Hausen, U. M., Drosophila Krüppel protein is a transcriptional repressor. (1990) *Nature* 346: 76-79.

Liu, B., Wu, Z., Zhang, Z., Fan, P., Liu, M., Fu, M., Luo, J., Effects of high carbohydrate and

high fat diet on plasma apolipoproteins AI, AII, B100, CI, CII, CIII and E in normal and hypertriglyceridemic humans. (1990) *Hua. Hsi. I. Ko. Ta. Hsueh. Hsueh. Pao.* 21: 349-353.

Liu, Y., Yang, N., Teng, C. T., COUP-TF acts as a competitive repressor for estrogen receptor-mediated activation of the mouse lactoferrin gene. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13: 1836-1846.

Lopez, J., Roghani, A., Bertrand, J., Zannis, E., Kalopissis, A., Zannis, V. I., Chambaz, J., Intracellular early and late modifications of human apolipoprotein A-II. Effect of Glutamine +1 to Leucine substitution. (1994) *Biochemistry* 33: 4056-4064.

Lue, N. F., Chasman, D. I., Buchman, A. R., Kornberg, R. D., Interaction of Gal4 and Gal80 gene regulatory proteins *in vitro*. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7: 3446-3451.

Madden, S. L., Cook, D. M., Rauscher, F. J., A structure-function analysis of transcriptional repression mediated by the WT1, Wilm's tumor suppressor protein. (1993) *Oncogene* 8: 1713-1720.

Malhberg, F. H., Lund-Katz, S., Glick, J. M., Phillips, M. C., Rothblat, G. H., Influence of apolipoproteins A-I, A-II and C on the metabolism of lysosomal and endogenous cholesterol in a macrophage foam cell model. (1990) *Arteriosclerosis* 10: 768a.

Mao, S. T. J., Sparrow, J. T., Gilliani, E. B., Gutto, A. M., Jackson, R. L., Mechanisms of lipid-protein interaction in the plasma lipoproteins: lipid binding properties of a synthetic fragment of apolipoprotein A-II. (1977) *Biochemistry* 16: 4150-4156.

Martin, K. J., The interaction of transcription factors and their adaptators, coactivators and accessory proteins. (1991) *Bioassays* 13: 499-503.

Mendez, A. J., Oram, J. F., Bierman, E. L., Protein Kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol. (1991) *J. Biol. Chem.* 16: 10104-10111.

Metelskaya, V. A., Dehouck, M. P., Cecchelli, R., Bard, J. M., Fruchart, J. C., Luc, G., LpA-I, but not LpA-I:A-II, promotes efflux of cholesterol from bovine aortic endothelial cells. (1995) *Cardiovascular Risk Factors* 5: 1-8.

Metzger, S., Halaas, J. L., Breslow, J. L., Sladek, F. M., Orphan receptor HNF-4 and b-Zip protein C/EBP bind to overlapping regions of the apolipoprotein B gene promoter and synergistically activate transcription. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 16831-16838.

Mietus-Snyder, M., Sladek, F. M., Ginsburg, G. S., Kuo, C. F., Ladas, J. A., Darnell, J. E. J., Karathanasis, S. K., Antagonism between apolipoprotein A-I regulatory protein 1, Ear3/COUP-TF and hepatocyte nuclear factor 4 modulates apolipoprotein C-III gene expression in liver and intestinal cells. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12: 1708-1718.

Mitchell, P. J., Tjian, R., Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence specific DNA binding proteins. (1989) *Science* 245: 371-378.

Miura, N., Tanaka, K., Analysis of the rat hepatocyte nuclear factor (HNF)1 gene promoter: synergistic activation by HNF-4 and HNF-1 proteins. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21: 3731-3736.

Murre, C., Mc Caw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B., Weintraub, H., Baltimore, D., Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. (1989) *Cell* 58: 537-544.

Ochoa, A., Bovard-Houppermans, S., Zakin, M. M., Human apolipoprotein A-IV gene expression is modulated by members of the nuclear hormone receptor superfamily. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1210: 41-47.

Ogami, K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Zannis, V. I., Promoter elements and factors required for hepatic and intestinal transcription of the human apoCIII gene. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 9808-9815.

Ogami, K., Kardassis, D., Cladaras, C., Zannis, V. I., Purification and characterization of a heat stable nuclear factor CIIB1 involved in the regulation of the human apoC-III gene. (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 9640-9646.

Oppenheimer, M. J., Oram, J. F., Bierman, E. L., Up-regulation of high density lipoprotein receptor activity by γ -interferon associated with inhibition of cell proliferation. (1988) *J. Biol. Chem.* 236: 19318-19323.

Paik, Y. K., Chang, D. J., Reardon, C. A., Walker, M. D., Taxman, E., Taylor, J. M., Identification and characterization of transcriptional regulatory regions associated with expression of the human apolipoprotein E gene. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 13340-13349.

Peterlin, B. M., Transcriptional regulation of HLA-DRA gene. (1991) *Res. Immunol.* 142: 393-399.

Phillips, M. C., Johnson, W. J., Rothblat, G. H., Mechanisms and consequences of cellular exchange and transfert. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 906: 223-276.

Pierce, J. W., Gifford, A. M., Baltimore, D., Silencing of the expression of the immunoglobulin kappa gene in non-B cells. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11: 1431-1437.

Pinkert, C. A., Ornitz, D. N., Brinster, R. L., Palmiter, R. D., An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoters to direct efficient liver-specific expression in transgenic mice. (1987) *Genes Dev.* 1: 268-276.

Pittman, R. C., Steinberg, D., Sites and mechanisms of uptake and degradation of high density lipoproteins. (1984) *J. Lipid Res.* 25: 1577-1585.

Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A. M., Verstuyft, J. G., Rubin, E. M., Breslow, J. L., Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. (1992) *Cell* 71: 343-353.

Plump, A. S., Hayek, T., Walsh, A., Breslow, J. L., Diminished HDL cholesterol ester flux in

apoA-I deficient mice. (1993) *Circulation* 88: 2266a.

Razin, A., Szyf, M., DNA methylation patterns. Formation and function. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 782: 331-342.

Rifici, V. A., Eder, H. A., A hepatocyte receptor for high-density lipoproteins specific for apolipoprotein A-I. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 13814-13818.

Riggs, K. J., Merrell, K. T., Wilson, G., Calame, K., Common factor 1 is a transcriptional activator which binds in the c-myc promoter, the skeletal α -actin promoter, and the immunoglobulin heavy-chain enhancer. (1991) *Mol. Cell Biol.* 11: 1765-1769.

Ringeisen, F., Rey-Campos, J., Yaniv, M., The transactivation potential of variant hepatocyte nuclear factor 1 is modified by alternative splicing. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 25706-25711.

Roeder, R. G., The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. (1991) *Trends Biochem. Sci.* 16: 402-408.

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

Rothblat, G. H., Mahlberg, F. H., Johnson, W. J., Phillips, M. C., Apolipoprotein, membrane cholesterol domains and the regulation of cholesterol efflux. (1992) *J. Lipid Res.* 33: 1091-1097.

Rubin, E. M., Smith, D. J., Atherosclerosis in mice: getting to the heart of a polygenic disorder. (1994) *TIG* 10: 199-203.

Rubin, E. M., Ishida, B. Y., Clift, S. M., Krauss, R. M., Expression of human apolipoprotein A-I in transgenic mice results in reduced plasma levels of murine apolipoprotein A-I and the appearance of two new high density lipoprotein size subclasses. (1991a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 434-438.

Rubin, E. M., Krauss, R. M., Spangler, E. A., Verstuyft, J. G., Clift, S. M., Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein. (1991b) *Nature* 353: 265-267.

Sagomi, I., Tsai, S. Y., Wang, H., Tsai, M. J., O'Malley, B. W., Identification of two factors required for transcription of the ovalbumine gene. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 6: 4259-4267.

Sauer, F., Jäckle, H., Dimerization and the control of transcription by Krüppel. (1993) *Nature* 364: 454-457.

Savagner, P., Migashita, T., Yamada, Y., Two silencers regulate the tissue-specific expression of the collagenase II gene. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 6669-6674.

Savion, N., Gambiel, A., Binding of apolipoprotein A-I and apolipoprotein A-IV to cultured bovine aortic endothelial cells. (1988) *Arteriosclerosis* 8: 178-186.

Schmitz, G., Williamson, E., High density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport and membrane protection. (1991) *Current Opinion in Lipidology* 2: 177-179.

Schmitz, G., Robenek, H., Lohmann, U., Assmann, G., Interaction of High Density lipoproteins with cholesteryl ester-macrophages: biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and reexcretion of High Density lipoproteins by macrophages. (1985) *Embo J.* 4: 613-622.

Schultz, J. R., Rubin, E. M., The properties of HDL in genetically engineered mice. (1994) *Current opinion in Lipidology* 5: 126-137.

Schultz, J. R., Gong, E. L., Mc Call, M. R., Nichols, A. V., Clift, S. M., Rubin, E. M., Expression of human apolipoprotein A-II and its effect on high density lipoproteins in transgenic mice. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 21630-21636.

Schultz, J. R., Verstuyft, J. G., Gong, E. L., Nichols, A. V., Clift, S. M., Rubin, E. M., Protein composition determines the anti-atherogenic properties of HDL in transgenic mice. (1993) *Nature* 365: 762-764.

Sharpe, C. R., Sidoli, A., Shelley, C. S., Lucero, M. A., Shoulders, C. C., Baralle, F. E., Human apolipoproteins AI, AII, CII and CIII. cDNA sequences and mRNA abundance. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12: 3917-3932.

Shelley, C. S., Baralle, F. E., Dual tissue-specific expression of apoA-II is directed by an upstream enhancer. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15: 3801-3821.

Shi, Y., Seto, E., Chang, L. S., Shenk, T., Transcriptional repression by YY1, a human GLI-krüppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. (1991) *Cell* 67: 377-388.

Shoji, T., Nishizawa, Y., Koyama, H., Hagiwara, S., Aratani, H., Sasao, K., Kishimoto, H., Tanishita, H., Morii, H., High density lipoprotein metabolism during a very-low-calorie diet. (1992) *Am. J. Clin. Nutr.* 56: 2975-2985.

Simonet, W. S., Bucay, N., Pitas, R. E., Lauer, S. J., Taylor, J. M., Multiple tissue-specific elements control the apolipoprotein E/C-I gene locus in transgenic mice. (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 8651-8654.

Sladek, F. M., Zhong, W., Lai, E., Darnell, J. E. J., Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a member of the steroid hormone receptor superfamily. (1990) *Genes Dev.* 4: 2353-2365.

Sladek, F. M., Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4). In transcriptional regulation of liver specific genes. (1995) (eds. F. Tronche and M. Yaniv). R. G. Landes Company, Austin, T. X.. In press.

Slotte, J. P., Oram, J. F., Bierman, E. L., Binding of high density lipoproteins to cell receptors promotes translocation of cholesterol from intracellular membranes to the cell surface. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 12904-12907.

Smith, J. D., Melian, A., Leff, T., Breslow, J. L., Expression of the human apolipoprotein E gene is regulated by multiple positive and negative elements. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 8300-8308.

Sorci-Thomas, M., Kearns, M., W., Transcriptional regulation of the apolipoprotein A-I gene. (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 18045-18050.

Staels, B., Auwerx, J., Chan, L., Van Tol, A., Rosseneu, M., Verhoeven, G., Influence of development, estrogens, and food intake on apolipoprotein A-I, A-II, and E mRNA in rat liver and intestine. (1989) *J. Lipid Res.* 30: 1137-1145.

Staels, B., Van Tol, A., Chan, L., Will, H., Verhoeven, G., Auwerx, J., Alterations in thyroid status modulate apolipoprotein, hepatic triglyceride lipase, and low density lipoprotein receptor in rats. (1990) *Endocrinology* 127: 1144-1152.

Staels, B., Peinado-Onsurbe, J., Auwerx, J., Down-regulation of hepatic lipase gene expression and activity by fenofibrate. (1992a) *Biochim. Biophys. Acta* 1123: 227-230.

Staels, B., Van Tol, Andreu, T., Auwerx, J., Fibrates influence the expression of genes involved in lipoprotein metabolism in a tissue-selective manner in the rat. (1992b) *Arterioscler. Thromb.* 12: 286-294.

Staels, B., Van Tol, A., Skretting, G., Auwerx, J., Lecithin: cholesterol acyltransferase gene expression is regulated in a tissue-specific manner by fibrates. (1992c) *J. Lipid Res.* 33: 727-735.

Staels, B., Vu-Dac, N., Saladin, R., Auwerx, J., Tissue-specific down-regulation of apoC-III gene expression by fibrates. (1995) *Nuclear Orphan Receptors: Novel Regulators in Physiology and Pathology (7th International CBT symposium)* p39.

Steinmetz, A., Barbaras, R., Ghalim, N., Clavey, V., Fruchart, J. C., Ailhaud, G., Human apolipoprotein A-IV binds to apolipoprotein A-I/A-II receptor sites and promotes cholesterol efflux from adipose cells. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 7859-7863.

Svaren, J., Hörz, W., Histones, nucleosomes and transcription. (1994) *Current Opinions in Genetics and Development* 3: 219-225.

Talianidis, I., Tambakaki, A., Toursounova, J., Zannis, V. I., Complex interactions between Sp1 bound to multiple distal regulatory sites and HNF-4 bound to the proximal promoter lead to transcriptional activation of liver-specific human apoCIII gene. (1995) *Biochemistry* 34: 10298-10309.

Tan, J., Marschke, K. B., Ho, K. C., Perry, S. T., Wilson, E. M., French, F. S., Response elements of the androgen-regulated C3 gene. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 4456-4466.

Taraviras, S., Monaghan, A. P., Schütz, G., Kelsey, G., Characterization of the mouse HNF-4 gene and its expression during mouse embryogenesis. (1994) *Mechanisms of development* 48: 67-79.

Theret, N., Delbart, C., Aguie, G., Fruchart, J. C., Vassaux, G., Ailhaud, G., Cholesterol efflux from adipose cells is coupled to acylglycerol production and protein kinase C activation. (1990) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 173: 1361-1368.

Tjian, R., Maniatis, T., Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. (1994) *Cell* 77: 5-8.

Tzamelis, E., Zannis, V., Role of nuclear hormone receptors and C/EBP family members on the transcriptional regulation of the human apoA-I gene. (1994) *Circulation* 90: I-570.

van Berkel, T. J. C., Ziere, G. J., Bijsterbosch, M. K., Kuiper, J., Lipoprotein receptors and atherogenic receptor-mediated mechanisms. (1994) *Current Opinion in Lipidology* 5: 331-338.

Veenstra, J., Ockhuizen, T., van de Pol, H., Wedel, M., Schaafsma, G., Effects of a moderate dose of alcohol on blood lipids and lipoproteins postprandially in the fasting state. (1990) *Alcohol* 25: 371-377.

Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Laine, B., Fruchart, J. C., Auwerx, J., Staels, B., Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 31010-31018.

Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Kosykh, V., Dallongeville, J., Fruchart, J. C., Staels, B., Auwerx, J., Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. (1995) *J. Clin. Invest.* 96: 741-750.

Wahli, N., Martinez, E., Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative gene expression. (1991) *FASEB J.* 5: 2243-2249.

Walsh, A., Ito, Y., Breslow, J. L., High levels of human apolipoprotein A-I in transgenic mice result in increased plasma levels of small high density lipoprotein (HDL) particles comparable to human HDL3. (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 6488-6494.

Walsh, A., Azoolan, N., Wang, K., Marcigliano, A., O'Connell, A., Breslow, J. L., Intestinal expression of the human apoA-I gene in transgenic mice is controlled by a DNA region 3' to the gene in the promoter of the adjacent convergently transcribed apoC-III gene. (1993) *J. Lipid Res.* 34: 617-623.

Wang, L. H., Tsai, S. Y., Cook, R. G., Beattie, W. C., Tsai, M. J., O'Malley, B. W., COUP transcription factor is a member of steroid receptor superfamily. (1989) *Nature* 340: 163-166.

Wang, Z. Y., Qiu, Q. Q., Deuel, T. F., The Wilm's tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through separate functional domains. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 9172-9175.

Warden, C. H., Hedrick, C. C., Quiao, J. H., Castellani, L. W., Lusis, A. J., Atherosclerosis in transgenic mice overexpressing apolipoprotein A-II. (1993) *Science* 261: 469-472.

Williamson, R. L. D., Hagerman, J., Maeda, N., Marked reduction of high density lipoprotein cholesterol in mice genetically modified to lack apolipoprotein A-I. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7134-7138.

Wolffe, A. P., Transcription: in tune with the histones. (1994) *Cell* 77: 13-16.

Workman, J. L., Buchman, A. R., Multiple functions of nucleosomes and regulatory factors in transcription. (1993) Trends Biochem. Sci. 18: 90-95.

Yokoyama, S., Fukushima, D., Kupferberg, J. P., Kezdy, F. J., Kaiser, E. T., The mechanism of activation of lecithin: cholesterol acyltransferase by apolipoprotein A-I and an amphiphilic peptide. (1980) J. Biol. Chem. 255: 7333-7339.

Zawel, L., Reinberg, D., Advances in RNA polymerase II transcription. (1992) Current Opinion in Cell Biology 4: 488-495.

Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. A., Maeda, N., Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. (1992) Science 258: 463-471.

Zhong, W., Sladek, F. M., Darnell, J. E. J., The expression pattern of a Drosophila homolog to the mouse transcription factor HNF-4 suggests a determinative role in gut formation. (1993) EMBO J. 12: 537-544.

Zhong, W., Mirkovitch, J., Darnell, J. E. J., Tissue-specific regulation of mouse hepatocyte nuclear factor 4 expression. (1994) Mol. Cell. Biol. 14: 7276-7284.

