

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

Stéphane Gilbert

Expression différentielle du locus multigénique de l'alpha-foetoprotéine et contrôle transcriptionnel du virus de l'hépatite B par le facteur de transcription Fetoprotein Transcription Factor (FTF).

Thèse
présentée
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
Biologie cellulaire et moléculaire
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

DÉCEMBRE 2000

© Stéphane Gilbert, 2000



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-56832-6

Canada

Résumé court

L'expression du gène de l'alpha-foetoprotéine (AFP) est régulée de façon connexe et simultanée à la différenciation et à la prolifération hépatiques. La compréhension des mécanismes impliqués dans cette régulation améliorera les connaissances quant au fonctionnement même de ces processus. Cette thèse présente le clonage et la localisation chromosomique en 3' de l'AFP chez l'humain et la souris de l'alpha-albumine dont l'expression différentielle par rapport à l'AFP n'affecte en rien l'expression de l'AFP. Cette thèse fait également la démonstration que FTF, un des facteurs essentiels à l'expression de l'AFP, est également impliqué dans la régulation d'un gène exprimé uniquement dans le foie adulte, soit le gène de la nucléocapside du virus de l'hépatite B. Ainsi FTF n'est pas la cible d'une régulation développementale qui aurait pour but de réprimer son action chez l'adulte. De même, l'identification de l'implication de FTF dans l'activité du « core promoter » de HBV est importante pour la compréhension du cycle de vie du virus. Finalement, cette thèse clarifie les interactions protéine-protéines se tenant au niveau du promoteur de l'AFP et entre le promoteur et son amplificateur en démontrant que FTF peut homodimériser et qu'il peut hétérodimériser avec c-jun, GR ainsi qu'avec C/EBP la composante majeure de l'amplificateur intergénique.

Stéphane Gilbert B.Sc.

Luc Bélanger, MD, Ph.D.

Résumé long

La régulation de l'expression du gène de l'alpha-foetoprotéine au cours du développement est intimement liée à la prolifération et à la différenciation cellulaires hépatiques. Ainsi, l'identification des différents mécanismes et facteurs de transcription impliqués dans cette régulation pourrait être très informative quant au déroulement de ces processus. Cette thèse présente le clonage, la caractérisation et la localisation chromosomique en 3' de l'AFP chez la souris et l'humain de l'alpha-albumine dont l'expression n'affecte pas la régulation de l'expression de l'AFP. Par conséquent, ces deux gènes peuvent être considérés comme des entités autonomes ne partageant aucun élément de régulation contrairement à l'albumine qui partage l'amplificateur intergénique avec l'AFP. Cette thèse fait également la démonstration que FTF, un récepteur nucléaire orphelin essentiel au développement de la souris et un inducteur principal de l'expression de l'AFP, ne subit pas, au cours du développement, de modifications significatives affectant son activité, puisque FTF est capable de fonctionner dans le foie adulte et d'activer l'expression du messenger pré-génomique du virus de l'hépatite B par l'entremise de deux sites de liaison de forte affinité dans le « core promoter ». Cette activation est plus forte que tout autres déjà caractérisées pour ce promoteur. De plus, FTF additionne son action avec celle de HNF4 pour suractiver ce promoteur et un dominant négatif pour FTF est capable de le réprimer. Finalement, cette thèse démontre que FTF est capable d'interagir *in vitro* avec plusieurs autres facteurs de transcription. Il interagit avec c-jun, un facteur associé à la prolifération cellulaire par sa participation à la formation du complexe AP1. FTF est capable également d'interagir avec C/EBP, une des composantes majeures de l'amplificateur intergénique. Ainsi FTF pourrait être impliqué dans la formation d'interactions positives avec cet amplificateur. FTF peut également

former des homodimères en solution, contrairement aux autres membres de la famille FTZ-F1, impliquant probablement l'homodimère FTF comme un élément clé dans la régulation développementale et hormonale de l'expression du gène l'AFP.

Stéphane Gilbert B.Sc.

Luc Bélanger, MD, Ph.D.

Avant-propos

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr. Luc Bélanger, mon directeur de thèse, pour m'avoir donné la chance d'effectuer mes études graduées dans son laboratoire et pour m'avoir guidé au travers les projets de recherche présentés ici et cela malgré des horaires très chargés. J'aimerais également le remercier pour les discussions scientifiques stimulantes que nous avons eu ensemble.

J'aimerais ensuite remercier les membres du laboratoire qui sont devenus rapidement d'excellents amis. Tout d'abord, Denis Allard qui m'a presque tout appris de la biologie moléculaire; Luc Galameau avec qui j'ai eu de multiples discussions scientifiques, informatiques et musicales; Sylvie Roy pour m'avoir plusieurs fois dépanné lorsque plus rien ne fonctionnait; Jean-François Paré, Alain Lamontagne, Diane Hamel, Claudia Champagne, Lise Lévesque et Julie Vézina pour leurs discussions et leur appui. Finalement, les étudiants d'été Marthe Dubé et Sylvain Déry qui sont venus me donner un coup de main.

J'aimerais également remercier le Dr. Manuel Caruso pour avoir effectué une excellente prélecture de ma thèse, le Dr. Normand Marceau pour m'avoir prodigué plusieurs conseils quant à l'organisation de cette dernière et le Dr. Mario Chevrette pour avoir accepté de lire et corriger cette thèse.

Pour terminer, j'aimerais remercier ma famille, mon père et ma mère qui m'ont toujours encouragé à pousser plus loin mes études; ma fiancée, Marie-Josée Fiset, pour avoir corrigé cette thèse mais surtout pour m'avoir soutenu, encouragé, enduré et pour être sur le point de mettre au monde notre petit garçon.

La réalisation de ces travaux a été rendue possible grâce à l'appui financier du Conseil de Recherches Médicales du Canada. Je tiens à le remercier.

Table des matières

RÉSUMÉ COURT	II
RÉSUMÉ LONG.....	III
AVANT-PROPOS.....	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VI
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XII
CHAPITRE 1	13
INTRODUCTION.....	14
1.1 LA FAMILLE DE L'ALBUMINE : STRUCTURE, FONCTIONS ET RÉGULATION	15
1.2 L'ALBUMINE.....	17
1.3 LA PROTÉINE DE LIAISON DE LA VITAMINE D	23
1.4 L'ALPHA-ALBUMINE.....	24
1.5 L'ALPHA-FOETOPROTÉINE.....	25
1.5.1 <i>Les sites hypersensibles</i>	26
1.5.2 <i>L'amplificateur intergénique</i>	27
1.5.3 <i>Le promoteur du gène de l'AFP</i>	29
1.5.4 <i>Les mécanismes développementaux</i>	30
A) <i>L'interrupteur biologique</i>	31
B) <i>La régulation hormonale</i>	32
1.6 LE RÉCEPTEUR NUCLÉAIRE ORPHELIN FTF	33
1.6.1 <i>Les récepteurs nucléaires</i>	33
1.6.2 <i>La Famille FTZ-F1</i>	38
1.6.3 <i>FTF : Fetoprotein Transcription Factor</i>	39
1.7 LE VIRUS DE L'HÉPATITE B	41
1.7.1 <i>L'hépatite virale</i>	41
1.7.2 <i>L'historique du virus de l'hépatite B</i>	41
1.7.3 <i>L'épidémiologie de HBV</i>	43
1.7.4 <i>La maladie, le traitement et la prévention de l'hépatite B</i>	43
1.7.5 <i>La biologie moléculaire de HBV</i>	45
● <i>La structure du virus</i>	45

A) L'enveloppe.....	46
B) La nucléocapside	47
C) La protéine E	49
D) La polymérase virale	50
E) La protéine X et les carcinomes hépatocellulaires	50
● Le processus infectieux	52
● La réplication.....	55
● La transcription des gènes de HBV.....	57
A) Les promoteurs X, SPI et SPII	58
B) L'amplificateur I.....	600
C) Le « core promoter », le promoteur pre-C, l'amplificateur II et le NRE.....	611
1.8 APERÇU DU PROJET	63
CHAPITRE 2	663
IDENTIFICATION DU PRODUIT DU GÈNE DE L'ALPHA-ALBUMINE DE RAT ET CLONAGE DE L'ADN_c DE SON ORTHOLOGUE HUMAIN	66
2.1 RÉSUMÉ	67
CHAPITRE 3	70
ANALYSE DE LA STRUCTURE, DE LA FONCTION ET DE LA RÉGULATION DE L'ALPHA-ALBUMINE.....	70
3.1 INTRODUCTION	71
3.2 MATÉRIELS ET MÉTHODES	72
3.2.1 Clonage pour la surexpression de ALF	72
3.2.2 Surexpression via les systèmes procaryotes	74
3.2.3 Purification de la protéine de fusion GST/ALFs.....	76
3.2.4 Production de l'anticorps anti-ALF humain.....	76
3.2.5 L'immunodétection (le « western »)	76
3.2.6 Transfections stable et transitoires.....	77
3.2.7 Le criblage de ALF de souris.....	78
3.2.8 FISH – Hybridation sur chromosomes mécaniquement allongés.....	78
3.2.9 Gel à champ pulsé.....	79
3.2.10 Logiciels utilisés pour les analyses d'homologie, de phylogénie et leur présentation..	79
3.2.11 Calcul du point isoélectrique.....	80
3.3 RÉSULTATS	81
3.3.1 Surexpression de ALF dans des systèmes procaryotes	81

3.3.2 Mise au point de l'immunodétection avec les anticorps anti-ALF humain.....	83
3.3.3 Surexpression de ALF humain dans des cellules eukaryotes.....	86
3.3.4 Criblage de l'ADNc pour ALF de Souris.....	87
3.3.5 Localisation de ALF en 3' de L'AFP chez l'humain et la souris.....	89
3.3.6 Comparaison des séquences des différents membres de la famille.....	91
3.3.7 Phylogénie de la famille de l'albumine.....	96
3.3.8 Détermination du point isoélectrique de ALF.....	99
3.3.9 Analyses de diverse pathologies.....	99
3.4 DISCUSSION.....	102
CHAPITRE 4.....	110
THE HEPATITIS B VIRAL CORE PROMOTER IS STRONGLY ACTIVATED BY THE LIVER NUCLEAR RECEPTOR FETOPROTEIN TRANSCRIPTION FACTOR (FTF) OR BY ECTOPICALLY EXPRESSED STEROIDOGENIC FACTOR 1 (SFI)	110
.....	
RÉSUMÉ.....	111
ABSTRACT.....	113
INTRODUCTION.....	114
MATERIALS AND METHODS.....	116
<i>Electromobility shift assays</i>	116
<i>Gene constructs</i>	116
<i>Transfections</i>	117
RESULTS.....	119
<i>The HBV core promoter contains two high-affinity FTF-binding sites</i>	119
<i>FTF (or SFI) strongly activates the nucleocapsid promoter</i>	121
<i>FTF directly activates the core promoter</i>	123
<i>FTF effect on core promoter interactions with enhancer I</i>	125
<i>AF2-truncated FTF deactivates the core promoter</i>	127
DISCUSSION.....	130
ACKNOWLEDGEMENTS.....	133
REFERENCES.....	134
CHAPITRE 5.....	139
FTF ET SES INTERACTIONS PROTÉINE-PROTÉINES.....	139
5.1 INTRODUCTION.....	140

5.2 MATÉRIELS ET MÉTHODES	142
5.2.1 Constructions plasmidiques.....	142
5.2.2 Purification des protéines GST.....	143
5.2.3 Gels de retardement.....	144
5.2.4 Synthèse de protéines marquées <i>in vitro</i>	144
5.2.5 Expériences de rétention sur colonne (« Pull Down »).....	145
5.2.6 Transfections transitoires	145
5.3 RÉSULTATS.....	147
5.3.1 Préparation des rétentions sur colonne.....	147
5.3.2 Les rétentions sur colonne (« pull down »).....	149
5.3.3 L'effet des coactivateurs SRC-1, Rip140 et Grip1.....	156
5.3.4 Le FTF chimérique active plus fortement.....	156
5.4 DISCUSSION	158
CHAPITRE 6	170
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	170
6.1 LES IMPLICATIONS SUR LA RÉGULATION DE L'AFP	171
6.2 LA FAMILLE DE L'ALBUMINE.....	176
6.3 LE VIRUS DE L'HÉPATITE B	177
6.4 LES PERSPECTIVES.....	179
6.4.1 La suite de la caractérisation de ALF.....	179
6.4.2 L'implication de FTF dans la régulation du « core promoter » de HBV.....	180
6.4.3 Les interactions protéine-protéines	181
6.5 CONCLUSION	182
BIBLIOGRAPHIE	184

Liste des figures

FIGURE 1.1 ARRANGEMENT CHROMOSOMIQUE DES GÈNES DE LA FAMILLE DE L'ALBUMINE.....	16
FIGURE 1.2 REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DE L'ALBUMINE HUMAINE.....	18
FIGURE 1.3 REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DE VDBP HUMAINE.....	19
FIGURE 1.4 REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DE L'ALPHA-FOETOPROTÉINE HUMAINE.....	20
FIGURE 1.5 SCHÉMA DES PROMOTEURS DES MEMBRES DE LA FAMILLE DE L'ALBUMINE	22
FIGURE 1.6 STRUCTURE GÉNÉRALE DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES ET DE FTF	35
FIGURE 1.7 SCHÉMA REPRÉSENTANT LES DIFFÉRENTES PROTÉINES DU VIRUS DE L'HÉPATITE B .	48
FIGURE 1.8 SCHÉMA REPRÉSENTANT LE CYCLE DE VIE DE HBV	53
FIGURE 1.9 RÉPLICATION DU GÉNOME DU VIRUS DE L'HÉPATITE B	56
FIGURE 1 (CH. 2) ANALYSIS OF α ALB	69
FIGURE 3.1 SUREXPRESSION DE LA PROTÉINE ALF COMPLÈTE OU PARTIELLE.....	82
FIGURE 3.2 ANALYSE DU NOUVEL ANTICORPS ANTI-ALF HUMAIN	84
FIGURE 3.3 SÉQUENCE PROTÉIQUE DE ALF DE SOURIS	88
FIGURE 3.4 LIAISON SUR LE CHROMOSOME DE L'AFP ET ALF CHEZ L'HUMAIN ET LA SOURIS...	90
FIGURE 3.5 REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DE L'ALPHA-ALBUMINE HUMAINE	93
FIGURE 3.6 COMPARAISON INTER-ESPÈCE DES SÉQUENCES PROTÉIQUES DE ALF	94
FIGURE 3.7 ARBRE PHYLOGÉNIQUE DE LA FAMILLE DE L'ALBUMINE	97
FIGURE 3.8 CALCUL DES POINTS ISOÉLECTRIQUES POUR ALF DE RAT ET HUMAINE	98
FIGURE 3.9 ÉTUDES DE LA VARIATION DE ALF DANS DIFFÉRENTES CONDITIONS	100
FIGURE 1 (CH. 4) HBV CORE PROMOTER CONTAINS TWO HIGH-AFFINITY SITE FOR FTF	120
FIGURE 2 (CH. 4) TRANSIENT TRANSFECTION ASSAYS USING CAT REPORTER CONSTRUCT HP .	122
FIGURE 3 (CH. 4) TRANSIENT COTRANSFECTION ASSAYS WITH HP.....	124
FIGURE 4 (CH. 4) FTF EFFECTS ON HBV CORE PROMOTER/ENHANCER I ACTIVITY	126
FIGURE 5 (CH. 4) REPRESSION OF HBV ENHANCER-PROMOTER ACTIVITY BY FTF Δ AF2	128
FIGURE 5.1 PRÉPARATION POUR LES RÉTENTIONS SUR COLONNE.....	148
FIGURE 5.2 RÉSULTATS OBTENUS LORS DES ESSAIS DE RÉTENTION	150
FIGURE 5.3 EFFETS DE DIFFÉRENTS FACTEURS ET COFACTEURS SUR L'ACTION DE FTF.....	153
FIGURE 5.4 ANALYSES DE L'ACTIVITÉ DE AFTF	157

Liste des tableaux

TABLEAU 1.1 CARACTÉRISTIQUES DES DIFFÉRENTS VIRUS POUVANT CAUSER UNE HÉPATITE	42
TABLEAU 3.1 COMPARAISON EN ACIDE AMINÉ DES MEMBRES DE LA FAMILLE DE L'ALBUMINE .	91
TABLEAU 3.2 CARACTÉRISTIQUES PROTÉIQUES DES MEMBRES DE LA FAMILLE DE L'ALBUMINE	92
TABLEAU 3.3 POURCENTAGE D'IDENTITÉ INTER-ESPÈCE DES MEMBRES DE LA FAMILLE.	95
TABLEAU 3.4 POINTS ISOÉLECTRIQUES THÉORIQUES, PUBLIÉS ET EXPÉRIMENTAUX.....	98
TABLEAU 5.1 RÉSUMÉ DES INTERACTIONS PROTÉINE-PROTÉINES TESTÉES.....	159

LISTE DES ABRÉVIATIONS

a.a = Acide aminé
AF-1 = Fonction d'activation 1
AF-2 = Fonction d'activation 2
AFP = Alpha-foetoprotéine
ALF = Alpha-albumine
ALB = Albumine
AP1 = Activating Protein 1
ATF-2 = Activating Transcription Factor 2
au = antigène australien
CAK = Core Associated Kinase
C/EBP = CAAT / Enhancer Binding Protein
CHC = Carcinome Hépatocellulaire
CKII = Caséine Kinase II
COUP-TF1 = Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor 1
Cp = Core promoter
CREB = Cyclic AMP-Responsive Element Binding protein
DBD = Domaine de liaison de l'ADN
dGR = DBD de GR
DH = Site Hypersensible
DR1 = Direct Repeat 1
DR2 = Direct Repeat 2
EGF = Epidermal Growth Factor
EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor
ER = Récepteur de l'estradiol
ERR2 = Estrogen Receptor Related factor 2
FISH = Interphasic in situ fluorescent hybridization
FTF = Fetoprotein Transcription Factor
FTZ-F1 = *Fushi Tarazu* factor 1
FXR = Farnesoid X-activated Receptor
GAPD-PK = Glycéraldéhyde-3-Phosphate Deshydrogénase Protein Kinase
GR = Récepteur des glucocorticoïdes
GRE = Élément de réponse de GR
GRIP-1 = Glucocorticoid Receptor Interacting Protein 1
GST = Glutathione-S-Transferase
HAV = Virus de l'Hépatite A
HBcAg = Protéine de la nucléocapside ou C de HBV
HBD = Domaine de liaison de l'hormone
HBeAg = Protéine E de HBV
HBsAg = Protéine de surface de HBV
HBV = Virus de l'Hépatite B
HBx = Protéine X de HBV
HCV = Virus de l'Hépatite C
HDV = Virus de l'Hépatite D
HEV = Virus de l'Hépatite E

HGV = Virus de l'Hépatite G
HNF1 = Hepatocyte Nuclear Factor 1
HNF3 = Hepatocyte Nuclear Factor 3
HNF4 = Hepatocyte Nuclear Factor 4
HNF6 = Hepatocyte Nuclear Factor 6
HRE = Hormone Response Element
IGFI / IGF II = Insulin-like Growth Factor I / II
Kb = Kilopaire de base
KDa = Kilodalton
L = Protéine de surface large de HBV
LB = Low Browth
LBD = Domaine de liaison du ligand
LCR = Région de contrôle du locus
LF = Linker Factor
LPS = Lipopolysaccharide
LTR = Long Terminal Repeat
M = Protéine de surface moyenne de HBV
mA = Milliampère
MBF1 = Mediation of *Bombyx mori* FTZ-F1 type 1
MBF2 = Mediation of *Bombyx mori* FTZ-F1 type 2
MDR-1 = Multidrug resistance 1
MU/MSQ = Millions d'unités / par mètre carré de surface du corps
NFAT = Nuclear Factor of Activated T cells
NF1 = Nuclear Factor 1
NF κ B = Nuclear Factor kappa B
NF-Y = Nuclear Factor Y
NGFI = Nerve Growth Factor Inducible
NRE = Element de régulation négative
OMS = Organisation Mondiale de la Santé
OCT-1 = Octamer Transcription Factor 1
P = Polymérase de HBV
PCF = Promoter-linked Coupling Factor
pF Δ 3 = DBD de FTF
PFU = Plaque Forming Unit
pi = Point isoélectrique
PKC = Protein Kinase C
PPAR = Peroxysome Proliferator Activated Receptor
PR = Récepteur de la progestérone
R = Séquence redondante
RAR = Retinoic Acid Receptor
RE = Réticulum Endoplasmique
R.I.A. = Radioimmunoassay
RIP-140 = Receptor-Interacting Protein 140
RPM = Rotation par minute
RXR = Retinoic acid X receptor
S = Protéine de surface majeure de HBV

SDS-PAGE = Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamid Gel Electrophoresis

SF1 = Steroidogenic Factor 1

SHP = Small Heterodimer Partner

SP = Sclérose en plaque

SPI = S promoter I

SPII = S promoter II

SRC-1 = Steroid Receptor Coactivator-1

TBP = TATA box Binding Protein

TGF α = Tumor Growth Factor α

TIF1 β = Transcriptional Intermediary Factor 1 β

TNF α = Tumor Necrosis Factor α

TR2 = Thyroid Receptor 2

VDBP = Protéine de liaison de la vitamine D

Xp = X promoter

X-PBP = X promoter Binding Protein

Chapitre 1

Introduction

Revue de la littérature

L'alpha-fœtoprotéine est une protéine sérique embryonnaire, membre de la famille de l'albumine, dont l'expression s'initie de façon simultanée avec l'apparition des premières cellules hépatiques (1-3). En effet, l'initiation de l'expression de l'AFP est très précoce et débute au moment où, lors du développement, l'endoderme se rétracte pour se rapprocher du mésenchyme et du mésoderme cardiaque entraînant la différenciation des cellules endodermiques en hépatocytes primaires (4-6). Par la suite, l'AFP est produite au cours de toute la gestation pour s'éteindre presque entièrement durant la période périnatale (7, 8), période correspondant à l'arrêt de la prolifération et de la différenciation hépatiques (9, 10). De plus, la réexpression de l'AFP est détectée lors de la réinitiation de la différenciation hépatique via l'utilisation de procédés mécaniques (hépatectomie partielle) ou chimiques (11-13). Cette synchronisation de l'expression de l'AFP avec la différenciation et la prolifération hépatiques fait de l'étude de la régulation transcriptionnelle de ce gène un excellent modèle pour la compréhension du fonctionnement de ces processus, puisque les facteurs impliqués dans cette régulation le seront également dans ces processus.

La rétrodifférenciation est un des phénotypes fréquents lors de la cancérogenèse hépatique et elle est caractérisée entre autres par la réapparition de l'AFP (14, 15). La possibilité d'exercer un contrôle sur la prolifération et la différenciation ouvrirait alors des avenues inestimables pour tenter d'enrayer la croissance de tumeurs hépatiques rétrodifférenciées. En effet cette connaissance pourrait permettre d'initier à nouveau la différenciation dans de telles tumeurs afin de contrecarrer la prolifération aberrante et de bloquer le développement du phénotype maligne. La réinduction de la différenciation pour stopper la néoplasie a déjà été démontrée comme étant efficace (16). En effet, l'utilisation d'agents inducteurs de la différenciation (17) tels que l'acide rétinoïque s'est démontrée utile dans le traitement de certains types de cancer (18, 19). Également, la formation de souris chimériques normales à partir de cellules de tératocarcinomes est un bon exemple montrant que le processus oncogénique peut être inversé par l'initiation de la différenciation (11, 12). Cependant, une meilleure compréhension des

mécanismes développementaux est essentielle pour l'exploitation maximale de cette avenue. C'est donc dans cette optique que le laboratoire d'accueil étudie depuis plusieurs années les mécanismes de régulation impliqués dans le contrôle du gène de l'AFP.

Dans le texte qui suit vous retrouverez une revue de la littérature concernant les différents sujets reliés aux résultats de cette thèse. Tout d'abord le thème de la famille de l'albumine, avec ses quatre membres (l'albumine (ALB), l'alpha-fœtoprotéine (AFP), la protéine de liaison de la vitamine D (VDBP) et l'alpha-albumine (ALF)), est abordé en ce qui a trait à leur structure, leurs fonctions et leur régulation. Par la suite, une description exhaustive de la régulation du gène de l'AFP est présentée en survolant la majorité des travaux effectués auparavant par le laboratoire d'accueil. La caractérisation des sites hypersensibles, le clonage et la caractérisation de l'amplificateur intergénique et du promoteur de l'AFP font partie des sujets traités. L'implication des facteurs de transcription tels que HNF1 et NF1 dans le modèle d'interrupteur biologique, la description de la régulation hormonale du locus de l'AFP ainsi que l'identification par le laboratoire et la caractérisation du récepteur nucléaire orphelin FTF concluent cette description de la régulation développementale de l'AFP.

Finalement, une description du virus de l'hépatite B (HBV) vous est présentée. Tout d'abord, un bref historique de la découverte du HBV ainsi qu'une description clinique introduisent le sujet. Le tout est suivi par une présentation du virus au niveau de sa structure, de son cycle de vie et de la régulation de la transcription de ses gènes.

1.1 La famille de l'albumine : structure, fonctions et régulation

L'AFP est un gène embryonnaire appartenant à la famille des gènes de l'albumine. Ces gènes sont tous situés en tandem sur le génome et ont la même polarisation d'expression (figure 1.1) (20, 21). Ils possèdent des niveaux

d'expression différents et sont régulés de façon distincte. Trois gènes de cette famille avaient été identifiés avant 1994, soit l'alpha-foetoprotéine (AFP), l'albumine (ALB) et la protéine de liaison de la vitamine D (VDBP). En 1994, le laboratoire d'accueil a identifié un quatrième membre à cette famille qu'il a nommé alpha-albumine (ALF) (21).

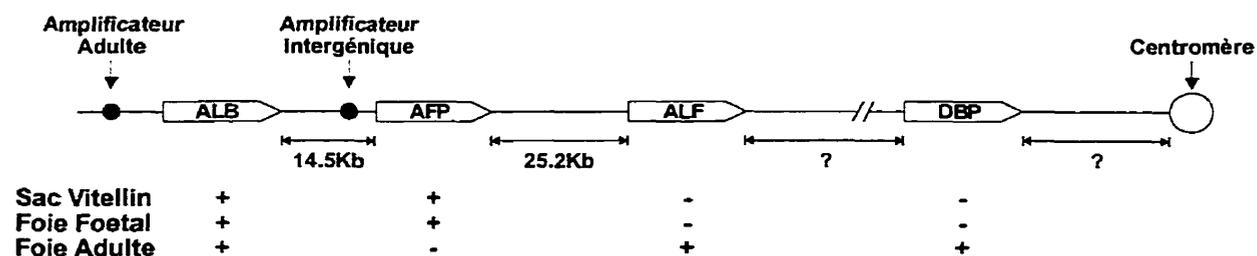


Figure 1.1. Schéma de l'arrangement chromosomique en tandem des gènes membres de la famille de l'albumine. La polarisation de l'expression (indiquée par la pointe du rectangle entourant le gène) est la même pour tout les membres de la famille de l'albumine. En dessous du schéma est présentée l'expression des différents gènes au niveau du sac vitellin, du foie foetal et du foie adulte. (figure adaptée de : **Nishio et Al.** 1996, *J. Mol. Bio* **259**(1), p.113-9)

La fonction principale des protéines membres de cette famille est de transporter divers ligands présents dans le sérum et de les acheminer vers divers organes les nécessitant. Les gènes appartenant à cette famille possèdent, entre eux, une homologie de séquence assez faible. Toutefois, c'est au niveau de leur structure qu'une homologie marquante est retrouvée. Ainsi, il existe dans tous ces gènes un patron répétitif de cystéines. Pratiquement, ces cystéines sont responsables de la formation de 17 ponts disulfures nécessaires à l'obtention de la bonne conformation quaternaire de la protéine (22). Deux cavités, formées par le rapprochement en trois dimensions de 33 acides aminés (a.a.) hydrophobes (16 a.a. pour la première et 17 a.a. pour la seconde), sont présentes dans cette structure quaternaire. Ces cavités, appelées poches hydrophobes (figure 1.2), sont impliquées dans la liaison de différents ligands (23). Trois domaines (1, 2 et 3) pouvant être divisés à leur tour en trois sous-domaines (A, B et C) (figure 1.2 à 1.4)

ont été identifiés dans la séquence de ces protéines et résulteraient des duplications ayant eu lieu cours de l'évolution de la famille.

Ces gènes descendent tous d'un ancêtre commun qui se serait dupliqué il y a 560 millions d'années (22, 24). Certaines études phylogéniques vont encore plus loin et mentionnent que cette protéine ancestrale provient d'une multimérisation d'un domaine de 190 a.a. et que ce domaine, appelé proto-albumine, résulterait d'une duplication incomplète impliquant des gènes précurseurs de la globine et cela avant l'apparition des vertébrés (25). Il est intéressant de noter que ces gènes sont demeurés, au cours de l'évolution, organisés en tandem sur le même chromosome et cela avec une polarisation dans l'orientation de leur expression (figure 1.1) (21, 26). Ainsi, chez l'humain ces gènes se retrouvent sur le chromosome 4. Pour le rat ils sont situés sur le 14^{ième} chromosome et sur le 5^{ième} pour la souris. Au chapitre 3 de cette thèse est démontré que ALF est également présente dans ces locus chez l'humain et chez la souris.

1.2 L'albumine

L'albumine est le prototype même de cette famille (figure 1.2). Il s'agit d'une protéine sérique de 66KDa, exprimée autant chez l'embryon que chez l'adulte avec une progression croissante dans sa concentration suivant le développement, atteignant son maximum après la naissance. La forme humaine est une protéine de 609 acides aminés comprenant 18 a.a. codant pour un peptide signal et 8 a.a. codant pour un pro-peptide. L'albumine est le seul membre de la famille à être d'abord synthétisé sous forme de précurseur (pro-albumine) avant d'être digéré pour former une protéine mature. L'albumine mature est une protéine non glycosylée dont la demi-vie est de 19 jours. Elle possède les 17 ponts disulfures caractéristiques des membres de la famille de l'albumine.

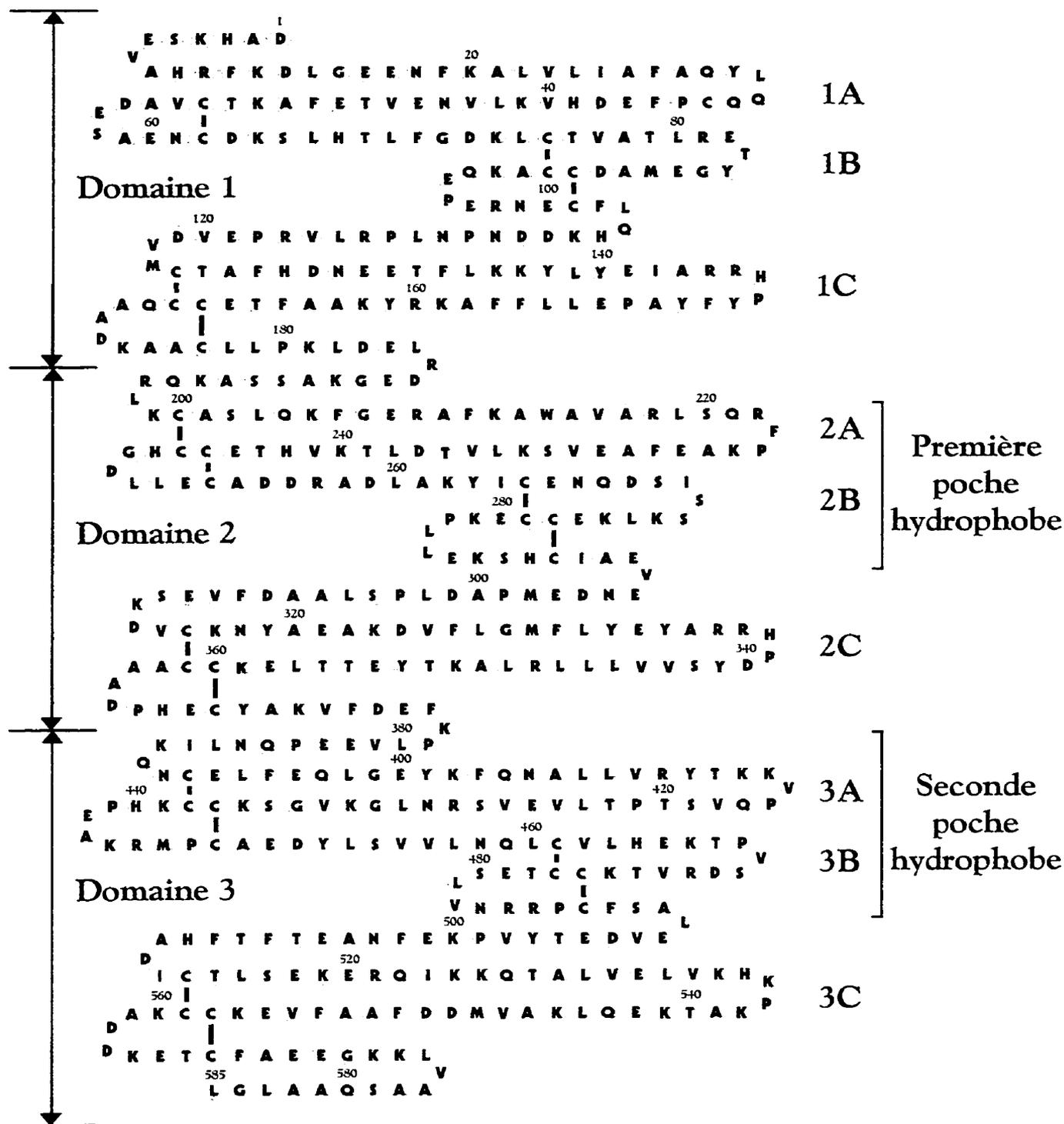


Figure 1.2. Représentation schématique de l'albumine humaine sous forme de serpent. La localisation des différents domaines (1, 2 et 3) et des différents sous-domaines (1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B et 3C) est indiquée. La localisation des poches hydrophobes est également présentée. Les traits noirs représentent les ponts disulfures. (Figure adaptée de : **Peters, T., Jr.** *Adv Protein Chem.* **37**:161-245, 1985 avec la séquence protéique provenant de la GenBank, numéro d'accèsion : #AF190168)

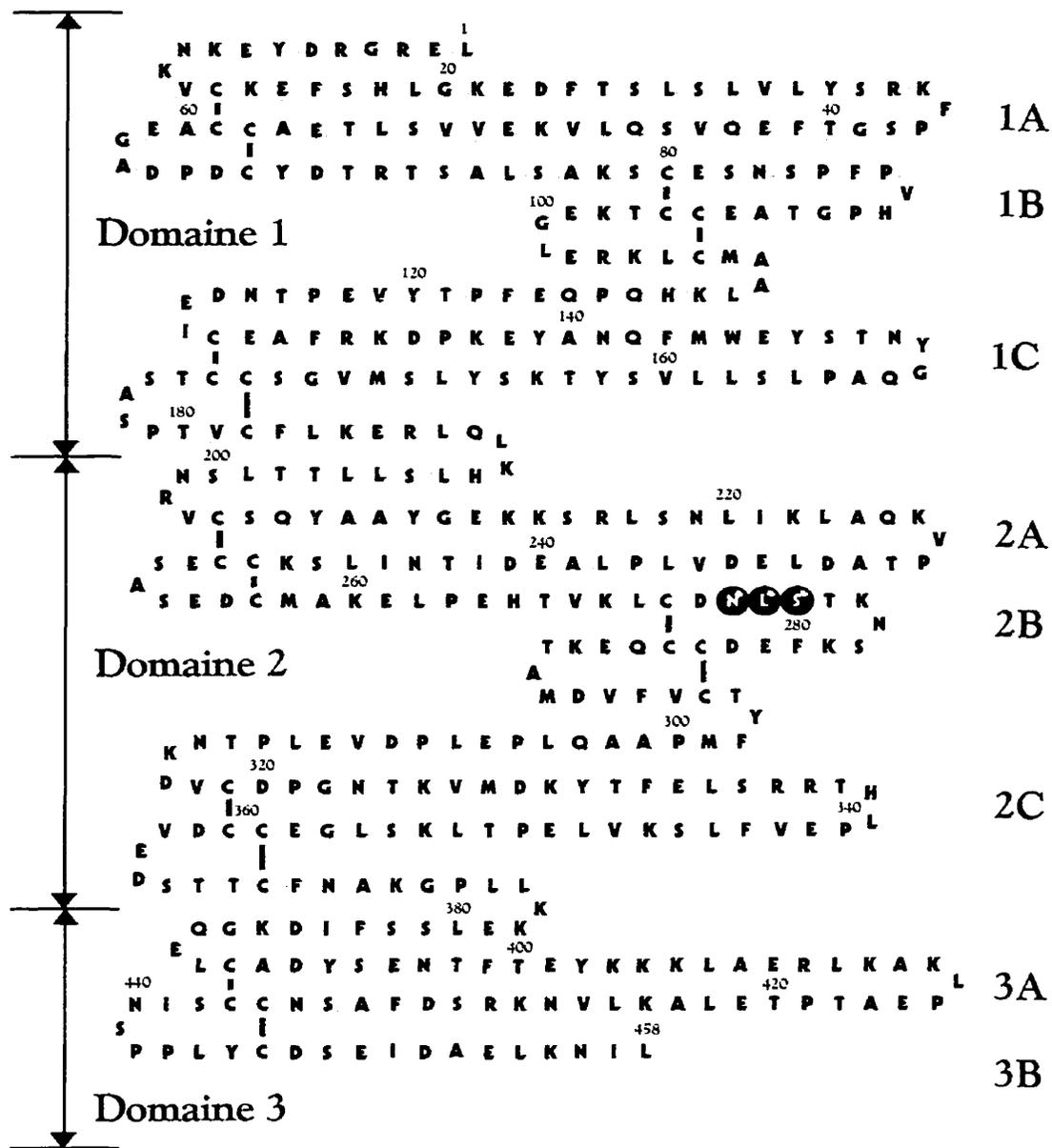


Figure 1.3. Représentation schématique de la protéine de liaison de la vitamine D humaine sous forme de serpent. La localisation des différents domaines (1, 2 et 3) et des différents sous-domaines (1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 2C, 3A et 3B) est indiquée. Les acides aminés en noir correspondent au site potentiel de N-glycosylation. Les traits noirs représentent les ponts disulfures. (Figure adaptée de : Peters, T., Jr. *Adv Protein Chem.* 37:161-245, 1985 avec la séquence protéique provenant de la GenBank, numéro d'accèsion : #L10641)

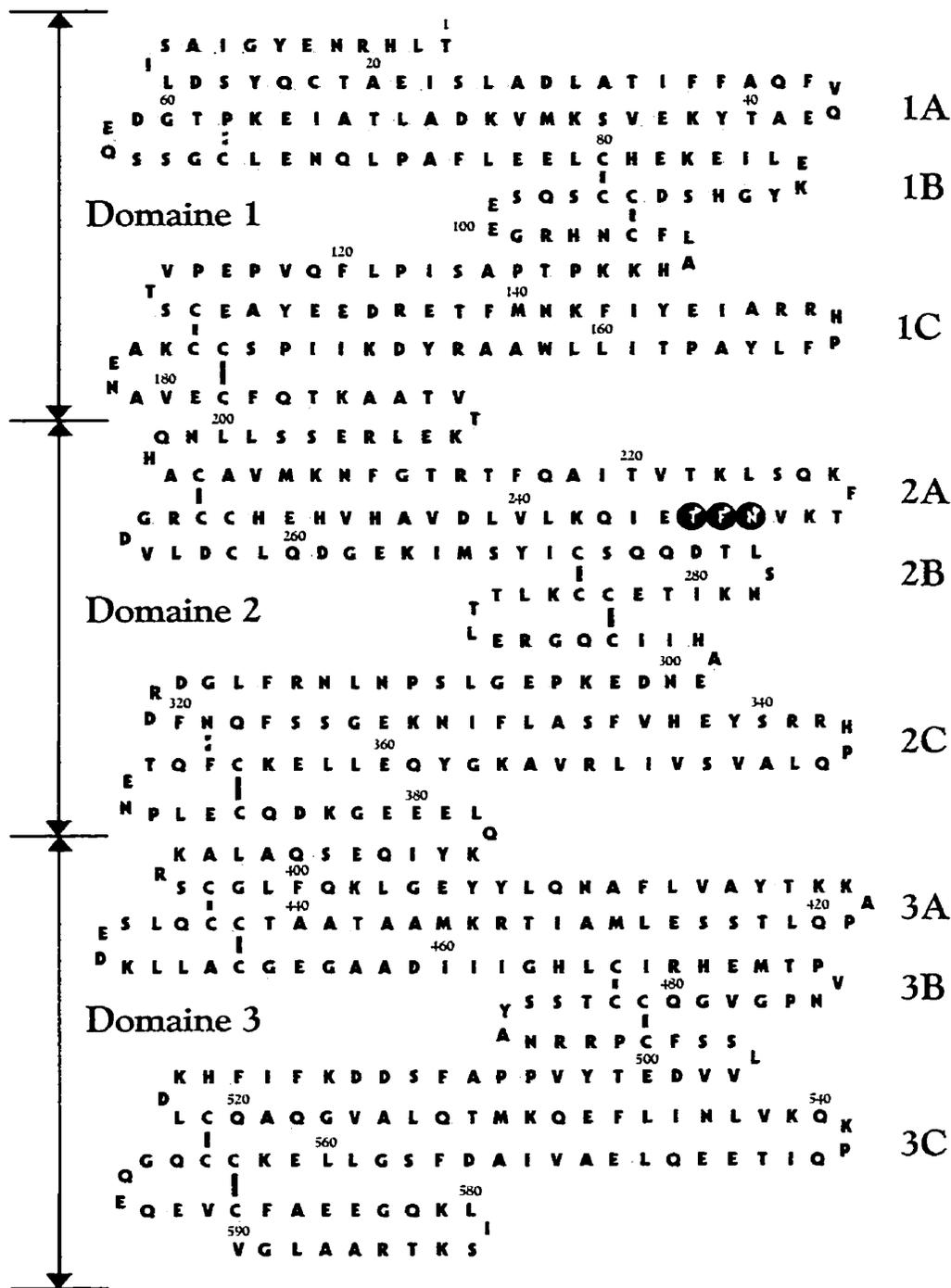


Figure 1.4. Représentation schématique de l'alpha-foetoprotéine humaine sous forme de serpent. La localisation des différents domaines (1, 2 et 3) et des différents sous-domaines (1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B et 3C) est indiquée. Les acides aminés en noir correspondent au site potentiel de N-glycosylation. Les traits noirs représentent les ponts disulfures. (Figure adaptée de : Peters, T., Jr. *Adv Protein Chem.* 37:161-245, 1985 avec la séquence protéique provenant de la GenBank, numéro d'accèsion: # J00076)

Le rôle majeur de l'albumine est de transporter et de distribuer plusieurs ligands, d'origine endogène ou exogène, à plusieurs organes dont le foie, les intestins, les reins et le cerveau (27). Les principaux ligands sont les acides gras, la bilirubine et différents métaux (22, 23, 28-36). Deux régions principales responsables de la liaison de petits composés hétérocycliques ou aromatiques ont été identifiées sur l'ALB, il s'agit des deux poches hydrophobes aussi appelées domaines IIA et IIIA (figure 1.3) (22). L'albumine est responsable également de 80% de la pression osmotique colloïde et ceci à cause de son haut taux sérique de 40mg/ml (28). Elle serait également impliquée dans le maintien du pH sanguin (22, 28). L'albumine n'est pas une protéine essentielle à la survie, car il existe des gens qui n'en produisent pas. Ces gens, dits analbuminémiques, ne sont affectés que par quelques symptômes mineurs (hyperlipidémie, œdème, hypercholestérolémie) (22, 28, 37).

Le gène de l'albumine humaine contient 15 exons coupés de 14 introns disposés de façon symétrique au travers ses domaines structuraux (38). Trois signaux de polyadénylation (dont deux véritablement utilisés) sont retrouvés dans la séquence du gène (38). Au niveau de sa régulation, l'ALB est exprimée principalement au foie. Cependant, la présence de son messager est également détectée dans le sac vitellin, les testicules, l'utérus et le placenta (39). Le promoteur de l'albumine possède des sites de liaison pour les facteurs de transcription HNF1 (40-42), vHNF1 (43), NF1 (40, 44, 45), NF-Y (40, 46-48) et C/EBP α,β,δ (figure 1,5) (40, 42, 48-52). Ces facteurs ont tous une fonction activatrice de l'expression du gène de l'albumine. De plus, il a été démontré que HNF1 et C/EBP peuvent coopérer et entraîner une suractivation de ce promoteur (42). L'expression de l'albumine est réprimée dans le diabète mellitus (53), lors de l'induction de la régénération hépatique (54, 55) et par l'inoculation de produits chimiques tels que la butyrolactone (56) et l'acide rétinoïque (57). Cependant ces répressions se font toujours de façon indirecte en affectant à la baisse la concentration du facteur de transcription HNF1 en agissant soit au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel (53-57). Le gène de l'albumine possède

également un amplificateur (de -10kb à -8,4kb) capable d'augmenter son expression et responsable de son haut taux de production chez l'adulte (58-60). Cet amplificateur est régulé de façon positive par C/EBP (58, 61), HNF1 (60), HNF3 (62), GATA (63) et NF1/CTF (62) et de façon négative par Ha-Ras via un site AP1 (64). De plus, l'amplificateur de l'AFP, appelé amplificateur intergénique, serait fort probablement capable d'influencer l'expression de l'albumine chez l'embryon (7, 65).

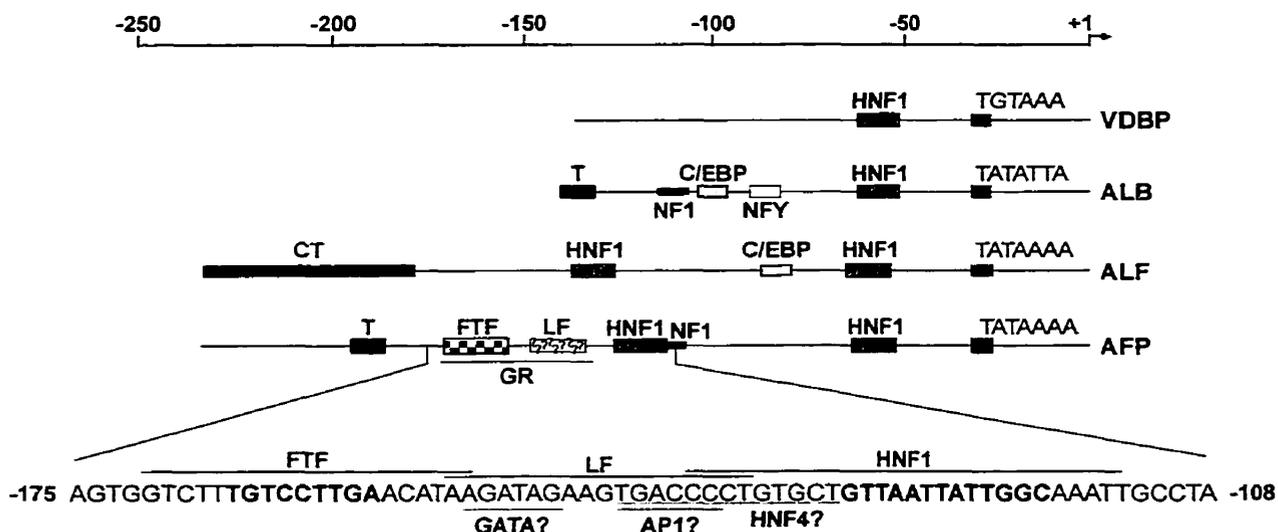


Figure 1.5. Représentation schématique des différents promoteurs des protéines membres de la famille de l'albumine. T = une répétition du nucléotide T et CT = une répétition des nucléotides CT. La séquence correspond à la région -175 à -108 du promoteur de l'AFP et les traits correspondent à des empreintes à la DNase I (7). Les traits pointillés représentent des séquences potentielles de liaison pour les facteurs de transcription indiqués. (Figure adaptée a partir de : **Bernier, D. et Al., Mol Cell Biol. 13:619-1633, 1993.**)

1.3 La protéine de liaison de la vitamine D

La protéine de liaison de la vitamine D (VDBP), également appelée Gc Globuline, est le membre de la famille le plus dégénéré. Ce gène serait le premier à s'être dupliqué à partir de l'ancêtre commun de la famille (24). En comparaison avec les autres membres de la famille, VDBP possède deux exons de moins soit les deux avant derniers (les exons 12 et 13). Le gène de la VDBP contient ainsi 13 exons produisant une protéine de 58KDa (66, 67). VDBP possède chez l'humain 474 a.a. incluant un peptide signal de 16 acides aminés (figure 1.3). Un seul site potentiel de N-glycosylation est retrouvé sur la protéine (figure 1.3) qui possède une demi-vie de 2,5 jours. VDBP possède 13 des 17 ponts disulfures caractéristiques de la famille de l'albumine et à cela s'ajoute un nouveau pont situé dans le premier domaine (figure 1.3) (67). Ce nouveau pont serait en fait le vestige d'un 18^{ème} pont qu'aurait possédé l'ancêtre commun à la famille (67).

La fonction principale de VDBP est de transporter la vitamine D et ses métabolites (68, 69), mais VDBP est capable également de transporter des acides gras insaturés (acide arachidonique) (70). VDBP est impliquée dans la séquestration de l'actine, elle facilite la dépolymérisation des filaments d'actine et serait également responsable de l'élimination de l'actine libérée dans la circulation (71-74).

Au niveau de sa régulation, VDBP est produite majoritairement dans le foie, son messenger est également détecté dans les reins, les testicules et le placenta (39). VDBP est exprimée durant le développement du fœtus et elle est détectable après 13 semaines de gestation chez l'humain (67). Son niveau sérique atteint cependant son maximum (400µg/ml) chez l'adulte (67). Dans aucun cas l'absence d'expression de VDBP n'a été notée ce qui amène la possibilité que, contrairement à l'ALB, VDBP soit essentielle à la survie (75, 76). Les œstrogènes et les androgènes possèdent un effet inducteur sur l'expression de VDBP tout comme l'interleukine-6, l'EGF et la dexaméthasone; le TGFβ quant à lui possède un effet répresseur (77-79). Son promoteur (-141 à -43) ne possède pas de boîte TATA

classique et est régulé par le facteur de transcription HNF1 (figure 1.5) (80). Il existe également deux éléments régulateurs, agissant comme des amplificateurs, situés en amont du gène (-1844 à -1621 et -254 à -140). Ces deux éléments sont activés par HNF1 α et réprimés par HNF1 β (81). Le gène de VDBP, situé dans le même locus que ALB, AFP et ALF, ne semble pas utiliser d'éléments régulateurs communs aux autres membres de la famille et est donc considéré comme une entité régulée de façon autonome.

1.4 L'*alpha*-albumine

Le promoteur de l'AFP subit l'influence d'un amplificateur situé à -4kb du promoteur, soit l'amplificateur intergénique (section 1.5.2). Cet amplificateur possédant la capacité d'induire également le promoteur de l'albumine (65,115,116), le laboratoire d'accueil s'est intéressé à savoir si, en 3' du gène de l'AFP, il ne pouvait pas y avoir également un élément régulateur influençant le promoteur de l'AFP. L'existence en 3' d'un élément de contrôle du locus (LCR) était une possibilité, car l'organisation en tandem des gènes de l'ALB et de l'AFP avec une polarisation gène embryonnaire vers gène adulte ressemblait à l'organisation du locus des gènes de la globine qui sont régulés par un tel élément (82, 83). C'est pourquoi, une marche sur le chromosome en 3' de l'AFP a été entreprise dans le laboratoire. Cette marche n'a révélé aucun élément régulateur en 3' de l'AFP, néanmoins elle a permis de découvrir à 10Kb en 3' de l'AFP, un nouveau gène : l'*alpha*-albumine (21). L'étude de ce gène a alors été entreprise pour, dans un premier lieu, caractériser ce gène et ensuite pour connaître ses éléments régulateurs et tester s'ils pouvaient influencer l'expression de l'AFP.

ALF a été identifié par une marche sur le chromosome chez le rat (21). Sa séquence complète a révélé que ALF était un nouveau membre de la famille de l'albumine situé en 3' de l'AFP sur le chromosome 4 de rat. ALF de rat est une protéine de 608 acides aminés comprenant un peptide signal de 21 acides aminés donnant une protéine dont le poids moléculaire s'estime à 69KDa (21). Elle

possède 15 des 17 ponts disulfures caractéristiques de la famille de l'albumine. Trente-deux des trente-trois acides aminés hydrophobes identifiés comme impliqués dans la formation des poches hydrophobes et responsables de liaison des ligands (23) sont conservés. Cinq sites potentiels de N-glycosylation sont retrouvés sur ALF de rat (21). ALF est exprimée à un niveau très faible dans le foie fœtal et son expression augmente après la naissance. Par l'entremise de l'analyse de la séquence de son promoteur il a été proposé que celui-ci possède deux sites de liaison pour le facteur de transcription HNF1 et un site pour le facteur C/EBP (figure 1.5) (21).

1.5 L'*alpha*-foetoprotéine

L'AFP humaine est une protéine de 609 a.a. contenant un peptide signal de 19 a.a. et possédant un poids moléculaire de 70KDa (figure 1.5). L'AFP est une protéine glycosylée, un site de N-glycosylation est retrouvé sur la protéine humaine (figure 1.4) et deux chez la souris et le rat. L'AFP tout comme l'ALB est encodée par 15 exons. Elle possède 15 des 17 ponts disulfures caractéristiques de la famille de l'albumine (figure 1.4) (84).

La fonction principale de l'AFP est de transporter des acides gras, surtout les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (l'acide 4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque, l'acide arachidonique, l'acide oléique et l'acide linoléique) (85) et de les distribuer aux cellules en division où l'apport d'acides gras est utilisé à plusieurs fonctions dont la synthèse de membranes cellulaires (8, 86, 87). L'AFP est une meilleure transporteuse d'acides gras insaturés que l'ALB et elle contient 3 sites de liaison, d'affinité décroissante, pour ceux-ci. Le site le plus fort se retrouve dans le domaine 3, soit dans la seconde poche hydrophobe (85, 88-95). Les AFPs de rat et de souris lient l'estradiol alors que la forme humaine n'en est pas capable. Cette capacité de lier l'estradiol de la part de l'AFP de rat et de souris pourrait protéger le fœtus contre un surplus d'œstrogène (96-100). L'AFP lie également la bilirubine (101-103) et plusieurs autres ligands (104-107). Deux sites de liaison

pour la bilirubine ont été caractérisés sur l'AFP, un de forte affinité qui se retrouve dans le domaine 3 et un de faible affinité situé dans le domaine 2 (88).

L'AFP est principalement exprimée au foie et dans le sac vitellin mais son messenger est également détecté dans les testicules, le cerveau, l'utérus et le placenta (39). L'AFP est une protéine embryonnaire, qui voit son expression apparaître avec la formation des premières cellules hépatiques (1-4). Puis, son expression augmente pour atteindre un niveau sérique élevé de 2mg/ml. Après la naissance, au moment où la prolifération et la différenciation hépatiques cessent, l'expression de l'AFP est réprimée très rapidement pour atteindre un niveau presque nul chez l'adulte (environ 3 ng/ml) (7, 8). Ce niveau se maintient alors tout le long de la vie de l'individu en santé. Toutefois certaines maladies telles que la tyrosinémie héréditaire occasionnent une persistance de l'expression de l'AFP chez l'adulte (108). Également, une augmentation du niveau de l'AFP dans le sérum peut être un indicateur précoce de l'apparition de tumeurs hépatiques (14, 15). L'expression de l'AFP corrèle avec la présence de différenciation et de prolifération dans le foie (9, 10). Ainsi l'hépatectomie partielle qui entraîne la réapparition de la prolifération hépatique, amène une réinduction de l'expression de l'AFP (11, 13).

La régulation du gène de l'AFP met en jeu plusieurs éléments régulateurs *cis* et *trans*, dont les interactions entre eux sont responsables de l'expression développementale du gène de l'AFP.

1.5.1 Les sites hypersensibles

Dans la région 5' de l'AFP se retrouvent trois sites hypersensibles (DHI, DHII et DHIII) (109-111). Le site DHI, dont l'ouverture spécifique au foie fœtal corrèle toujours avec la présence de l'expression de l'AFP, correspond au promoteur de cette dernière. Ce site DHI est la cible du récepteur des glucocorticoïdes (GR) qui a pour effet de le clore (110). Le site DHII est également spécifique aux hépatocytes immatures. Il demeure cependant ouvert quelques

semaines suivant l'arrêt de l'expression de l'AFP (111). Ce site DHII, qui est également ouvert lors de néoplasies hépatiques (tout comme le promoteur) (109), correspond à l'amplificateur intergénique et est situé de -2850 à -2100 nucléotides à partir du site d'initiation de la transcription (7, 112). Le site DHIII est un site constitutivement ouvert dans les hépatocytes (109-111). Il possède une faible activité amplificatrice (environ 10x comparé à 50-200x pour le DHII (7, 112)) mais il ne peut cependant pas compenser l'absence du site DHII (14). La fonction proposée pour ce site serait de maintenir la chromatine du locus dans un état permissif à l'expression de l'AFP et de l'albumine chez l'embryon et de l'albumine chez l'adulte.

1.5.2 L'amplificateur intergénique

Une activité amplificatrice en 5' de l'AFP a été démontrée pour la première fois chez la souris par Godbout et Tilghman (119) puis chez l'humain (113) et le rat (112, 114). L'amplificateur intergénique a été nommé ainsi car il est situé entre l'albumine et l'AFP et parce qu'il possède un effet inducteur sur ces deux gènes (65, 115, 116). Cette induction des promoteurs de l'albumine et de l'AFP par l'amplificateur semble être non-compétitive (65). Ainsi, au cours du développement, l'amplificateur intergénique stimulerait l'expression de l'AFP (7, 112, 114, 117) et de l'albumine (65, 115, 116). Plusieurs résultats sont en faveur de cette possibilité. Premièrement, tel que mentionné précédemment, le site DHII demeure ouvert quelques semaines suite à l'arrêt de la transcription du gène de l'AFP (111). À ce moment, il n'active plus l'expression de l'AFP mais maintiendrait l'activation de l'albumine jusqu'à ce que son propre amplificateur s'ouvre et prenne le relais puisqu'il est démontré que l'amplificateur de l'albumine n'est pas fonctionnel chez le fœtus (115). Deuxièmement, il a été démontré que cet amplificateur intergénique n'est pas essentiel à l'initiation de l'expression de l'AFP ni à son contrôle développemental; dans le rein fœtal, le promoteur suffit pour exprimer l'AFP (à des niveaux plus faibles cependant) tout en conservant sa régulation développementale (118). De même qu'en transgénèse, l'utilisation de ce promoteur uniquement suffit pour conférer au transgène la régulation

développementale (115). Ainsi, l'activation de l'amplificateur intergénique n'est pas essentielle pour l'expression et pour la régulation développementale du gène de l'AFP. Toutefois, elle est importante pour l'obtention d'un niveau d'expression élevée (112). Cette activation semble cependant capitale à l'expression de l'albumine chez l'embryon. C'est également le cas dans certains types d'hépatomes où il existe une meilleure corrélation de l'ouverture du site DHII avec l'expression de l'albumine qu'avec l'expression de l'AFP (109, 110). Troisièmement, l'EGF (Epidermal Growth Factor) possède un effet répresseur sur l'amplificateur intergénique et sur le promoteur de l'AFP, mais ne possède aucun effet sur l'amplificateur et le promoteur de l'albumine (116). Cependant, lorsque des cellules sont traitées à l'EGF, une diminution de l'expression de l'AFP et de l'albumine est détectée par Northern (116), appuyant donc l'hypothèse de l'utilisation commune de l'amplificateur intergénique.

À l'aide d'une comparaison de séquences des régions en 5' de l'AFP démontrées amplificatrices chez le rat (112, 114), la souris (119) et l'humain (113, 120) le laboratoire a identifié une séquence de 183 nucléotides (de -2531 à -2713) qui possédait une bonne homologie dans les trois espèces (7). Des expériences de délétion de cette région homologue ont démontré que la majorité de l'activité de l'amplificateur était située dans celle-ci (7). Plusieurs sites de liaison de différents facteurs de transcription ont été identifiés dans l'amplificateur par empreinte à la DNase I. Tous étaient présents autant avec des extraits de foies fœtaux que de foies adultes (7). Parmi ces empreintes, trois régions, dont deux situées exactement à l'intérieur de la région de 183pb, contiennent des sites de liaisons pour le facteur de transcription C/EBP. Ces deux sites de liaison ont clairement été démontrés essentiels à l'activité maximale de l'amplificateur et suffisantes pour contenir l'activité de ce dernier (7). Ces sites de liaison pour C/EBP sont également conservés chez la souris et l'humain. Par homologie de séquences

consensus, parmi les autres empreintes à la DNase I, des sites potentiels de fixation pour des facteurs de transcription de type GATA ou Ebox sont retrouvés.

1.5.3 Le promoteur du gène de l'AFP

La région promotrice de l'AFP a été identifiée pour la première fois chez la souris par Scott et Tilghman (121), puis chez l'humain (122) et chez le rat (20). Ce promoteur est un promoteur typique des promoteurs transcrits par l'ARN polymérase II avec une boîte TATA parfaite située à environ 25pb en amont du site d'initiation de la transcription (123). Initialement déterminée comme une séquence d'environ 700pb (122), la région promotrice a été par la suite restreinte à une séquence minimale d'environ 150pb (-202 à -55) pouvant mener l'expression de l'AFP de façon hépatospécifique et subir une régulation négative de la part des hormones glucocorticoïdes (112). L'extrémité 5' de cette séquence minimale est délimitée par une série de AT ayant probablement comme fonction de maintenir le promoteur ouvert puisque de telles régions ont tendance à exclure les nucléosomes (124, 125) . Par la suite, la région essentielle à l'activité du promoteur a été de nouveau rétrécie à environ 70pb (-172 à -108) (figure 1.5) (7).

Les facteurs de transcription C/EBP (126), HNF1 (127), NF1 (128), c-jun (129) et FTF (7, 130) ont été démontrés aptes à lier des séquences présentes dans le promoteur de l'AFP. L'étude plus approfondie de ces facteurs a révélé cependant que seuls les facteurs HNF1, avec ses deux sites de liaison (7, 128, 131) (HNF1 β activant plus fortement que HNF1 α (132)) et FTF (7, 130) possédaient un effet inducteur sur la régulation du promoteur de l'AFP et cela de façon coopérative (130). Un facteur qui n'est pas encore identifié, appelé LF (« Linker Factor »), serait également impliqué dans cette régulation (7, 130), car lorsque sa séquence de liaison est mutée l'activité du promoteur est réprimée (7). Le facteur NF1 possède, quant à lui, un effet répresseur (7, 128, 132). Le facteur de transcription C/EBP possède un rôle uniquement dans l'amplificateur; lorsqu'un site de liaison de C/EBP présent dans cet amplificateur est enlevé, C/EBP n'a plus d'effet inducteur sur l'AFP indiquant que le site présent dans le promoteur n'est

pas utilisé (7). Le facteur c-jun lie une séquence située dans la séquence consensus de FTF. Mais pour obtenir cette liaison, l'utilisation d'une bonne quantité de c-jun purifié est nécessaire (129). Il est connu que c-jun réprime le promoteur de l'AFP (7), mais cette répression ne se fait probablement pas par sa liaison à l'ADN, car : 1) son site de liaison potentiel dans l'AFP est de faible affinité, 2) ce site est normalement occupé par FTF qui possède une plus forte affinité (129, 130) et 3) il a été démontré qu'un c-jun muté pour ne plus lier l'ADN est toujours capable de réprimer l'expression de l'AFP (133). Un dernier facteur nommé *nkx-2.8* (qui pourrait être l'équivalent du facteur PCF (134, 135)) est capable de lier le promoteur de l'AFP (et cela dans la séquence consensus de FTF). Cependant aucune activation n'est obtenue avec ce facteur dans des lignées hépatiques, seules les cellules HeLa ont répondu positivement (136).

1.5.4 Les mécanismes développementaux

L'expression de l'AFP au cours du développement débute très tôt chez l'embryon pour se terminer rapidement suite à la naissance. En fait, l'expression de l'AFP est initiée suivant l'apparition des premiers hépatocytes (1), apparition occasionnée par le rapprochement de l'endoderme et du mésenchyme cardiaque à environ 8,5 jours de la gestation chez la souris (4). Par la suite, l'AFP est exprimée tout au long de la gestation. Simultanément avec l'arrêt de la prolifération des hépatocytes (10), l'AFP voit son expression diminuer pour atteindre un niveau presque nul chez l'adulte. Ainsi, cette corrélation avec la prolifération implique la présence de mécanismes de régulation communs. Il faut cependant noter que la régulation de l'AFP ne se fera pas avec des facteurs stages spécifiques tels qu'un activateur foetal ou un répresseur adulte car tous les facteurs de transcription impliqués sont constitutivement présents dans les hépatocytes et qu'il n'y pas de variation dans les empreintes à la DNase I sur le promoteur faites avec des extraits provenant de foies foetaux ou adultes (7). Ainsi, cette régulation doit se faire avec ces facteurs dont l'activité subit des modifications développementale. Dans ce qui suit sont présentés deux mécanismes pouvant clarifier, mais pas entièrement expliquer, la régulation développementale et hormonale de l'AFP.

A) L'interrupteur biologique

Dans le promoteur de l'AFP, il existe, au niveau du site de liaison distal du facteur de transcription HNF1, un chevauchement avec le site de liaison pour le facteur de transcription NF1. Le facteur HNF1 est un inducteur du promoteur (7, 128, 131) alors que le facteur NF1 possède un effet répresseur (7, 128, 132). L'hypothèse de l'interrupteur biologique suppose donc que ce chevauchement occasionne soit une position ouverte pour l'expression (liaison de HNF1) soit une position fermée (liaison de NF1). Il a été démontré que la liaison de HNF1 et NF1 sur ce site est mutuellement exclusive (7) et que dans les tissus n'exprimant pas l'AFP NF1 est lié à cette séquence alors que dans les tissus exprimant l'AFP c'est HNF1 qui est retrouvé (7). De plus, la présence d'une mutation au niveau du site NF1 dans le génome d'une famille où une persistance chez l'adulte de l'expression de l'AFP est retrouvée appuie cette hypothèse (137). Par conséquent, au cours du développement, il pourrait y avoir une variation dans le ratio HNF1/NF1 en faveur de NF1 pour ainsi fermer le promoteur de l'AFP chez l'adulte. Il a été démontré que le promoteur de l'AFP est sensible aux variations de concentration du facteur HNF1. En effet, dans la lignée cellulaire Hep3B, l'acide rétinoïque amène une diminution de la transcription des facteurs HNF1 et HNF4 (HNF4 est un facteur impliqué dans la régulation de l'expression de HNF1 (138)), ce qui occasionne une répression de l'expression de l'AFP (139).

L'insertion dans le promoteur de l'AFP d'une mutation équivalente à la mutation causant la persistance héréditaire de l'expression de l'AFP a démontré que cette mutation augmentait effectivement l'activité du promoteur, qu'elle favorisait la liaison de HNF1 et empêchait la liaison de NF1, qu'elle bloquait la répression par NF1 et que dans une lignée cellulaire non permissive pour l'expression de l'AFP (H4IIECIII), elle permettait au promoteur de l'AFP de fonctionner (140). La génération de souris transgéniques avec comme transgène cette construction mutée devait alors amener une expression persistante chez l'adulte. Ceci n'a pas été le cas. Cette construction s'est avérée être réprimée dans

90% des cas. Toutefois, une persistance d'expression au niveau du rein a été détecté (140). Ainsi ce mécanisme d'interrupteur biologique s'avère fonctionnel en culture cellulaire, mais ne semble pas le seul mécanisme impliqué dans la régulation développementale *in vivo*. La persistance d'expression dans le rein amène la proposition que ce mécanisme d'interrupteur biologique ferait partie intégrante et serait une étape tardive d'un processus à plusieurs paliers impliqué dans la régulation développementale de l'AFP.

B) La régulation hormonale

Le gène de l'AFP est soumis au contrôle de différentes hormones. Il a été démontré que les hormones glucocorticoïdes, l'ACTH, la thyroxine, l'adrénaline et la progestérone possédaient un effet répresseur sur l'expression du gène de l'AFP (141-143). Par contre, l'insuline, le glucagon, la testostérone et l'estradiol n'ont aucun effet (141).

L'effet le plus impressionnant est celui de la dexaméthasone (DEX) (un analogue des glucocorticoïdes) qui possède un effet répresseur extrêmement rapide sur le promoteur de l'AFP; *in vivo*, après 30 minutes d'incubation en présence de DEX (ce qui correspond au temps que prend le récepteur des glucocorticoïdes (GR) pour migrer au noyau), il y a répression de la transcription de l'AFP (144). Même lorsque la synthèse protéique du foie est bloquée par la cycloheximide, rendant impossible l'induction de la synthèse d'un répresseur par GR, la répression par GR est maintenue (145). Il est démontré que cette répression se fait au niveau transcriptionnel (144, 146) sur le promoteur (110) et qu'elle est due à une interaction protéine-protéine de GR avec le complexe protéique liant le segment d'ADN correspondant à FTF et LF (140) (figure 1.5). *In vivo*, GR ne lie pas le promoteur, même si GR purifié le peut *in vitro* (147). De plus, le domaine de liaison de l'ADN (DBD) de GR est essentiel pour mener cette répression et lorsque ce DBD est muté pour ne plus lier l'ADN, mais pouvant toujours interagir avec d'autres protéines (148), il réprime toujours l'expression de l'AFP (140) confirmant que l'action de GR se fait par un contact protéine-protéine.

Finalement, il a été démontré que lors de la réapparition de l'AFP dans des tumeurs hépatiques, il y a perte, en partie ou en totalité, de la répression de la part des hormones glucocorticoïdes (9). Ainsi, la réexpression de l'AFP, lors du processus tumorigénique (15), pourrait être due à une perte du contrôle de la régulation transcriptionnelle normale, probablement via une variation des facteurs de transcription présents telle que la perte du facteur impliqué dans la répression via GR.

La répression hormonale peut être séparé de la répression développementale puisque des rats nouveau-nés surrenalectomisés subissent toujours la régulation développementale alors qu'ils n'expriment plus de glucocorticoïdes (9). Cependant, il est possible que la cible de ces deux mécanismes soit la même à savoir le segment FTF/LF. Ce segment pourrait donc être réprimé par les hormones de la même façon que par les facteurs impliqués dans la régulation développementale, soit en venant désactiver l'interaction positive existant entre FTF et LF. Comment bloquer cette interaction positive? Soit en venant interférer directement avec les sites de liaison de ces facteurs, soit en interagissant de façon négative avec l'une ou l'autre des deux protéines ou finalement en interagissant avec un cofacteur qu'utilise ces deux protéines. Par conséquent, il devient important de clarifier les interactions protéine-protéines entre FTF et LF.

1.6 Le récepteur nucléaire orphelin FTF

Le facteur de transcription FTF (Fetoprotein Transcription Factor) a été identifié et démontré impliqué dans la régulation de l'AFP par le laboratoire d'accueil. FTF fait partie de la grande famille des récepteurs nucléaires orphelins.

1.6.1 Les récepteurs nucléaires

L'implication des récepteurs nucléaires dans les processus de morphogenèse, de prolifération et de différenciation est clairement démontrée.

Leur fonction réceptrice leur permet de répondre rapidement à divers stimuli et ainsi d'enclencher ces différents processus. Les récepteurs nucléaires sont divisés en trois catégories. La première contient les récepteurs dont les ligands sont des stéroïdes (ER, GR, PR). La seconde contient les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR), de l'acide rétinoïque (RAR) et de la vitamine D (VDR). La troisième contient les récepteurs nucléaires dit orphelins, car leurs ligands ne sont pas encore identifiés (SF1, Nurr1, FTF, NGFI, etc.). Toutefois, certains de ces récepteurs orphelins ont vu leur ligand être identifié récemment (HNF4(149) et FXR(150-152)).

La structure typique d'un récepteur nucléaire se divise en 3 domaines majeurs possédant des fonctions distinctes. Tout d'abord, il y a le domaine N-terminal contenant la fonction activatrice 1 (AF-1) qui est indépendante de la liaison du ligand. Ensuite, il y a le domaine de liaison de l'ADN (DBD), qui est constitué de structures appelées doigts de zinc. Finalement, le troisième domaine est celui de la liaison du ligand (LBD) situé en C-terminal et qui possède, avec sa capacité de lier un ligand, une fonction activatrice (AF-2) dont l'activité est dépendante de la liaison du ligand (figure 1.6).

Le domaine N-terminal est celui le moins bien conservé de la famille des récepteurs nucléaires. Il possède une fonction d'activation menée par une région acide appelée AF-1 dont le rôle est de former des interactions positives soit avec la machinerie transcriptionnelle directement (153) ou avec des cofacteurs qui eux contactent cette machinerie (154-158). La séquence AF-1 est constitutivement active et ne nécessite pas la liaison du ligand au récepteur (159). Cependant, comme la plupart des récepteurs ont besoin du ligand pour se lier à leur séquence d'ADN, leur AF-1 ne peut exercer sa fonction qu'en présence du ligand. Tout récemment, pour certains récepteurs nucléaires, il a été démontré que la phosphorylation de l'AF-1 était essentielle à son bon fonctionnement (160, 161).



Figure 1.6. Structure générale des récepteurs nucléaires (RNG) et de FTF. Le domaine d'activation 1 (AF1) est responsable d'une activation de la transcription indépendante du ligand. Le domaine de liaison de l'ADN (DBD) possède deux structures appelées doigt de zinc, ces structures sont responsables de la liaison de l'ADN et de la dimérisation avec d'autres récepteurs nucléaires. Le domaine de liaison du ligand (LBD) est responsable de l'attachement du ligand et possède un domaine d'activation 2 (AF2) responsable d'une activation de la transcription dépendante de la liaison du ligand. Le récepteur nucléaire FTF ne possède pas le domaine AF1, ses deux autres domaines sont cependant standards. Les sites de phosphorylation indiqués ici ont été obtenus à l'aide du logiciel Prosearch et représentent des sites potentiels de phosphorylation pour différentes kinases (CKII = caséine kinase II, PKC = Protein Kinase C). Un domaine quasi-consensus pour un "zipper" de leucine (LZ) est également présent dans FTF. (Figure adaptée de **Umesono K. et Al.**, *Cell*, 7:1139-1146, 1989)

Certaines expériences de mutation de l'AF-1 ont démontré que celui-ci diminuait les liaisons non-spécifiques (162, 163) et qu'il était responsable d'un certain niveau d'induction (162). Cependant, la fonction activatrice 1 n'est pas essentielle car la présence rapprochée d'un activateur peut compenser pour ce manque (162). De plus, quelques récepteurs nucléaires (FTF (130), SF1 (164)) ne possèdent pas ce domaine et sont de bons activateurs.

Le domaine de liaison de l'ADN (DBD) est le domaine le plus conservé dans la famille des récepteurs nucléaires. C'est une région riche en acides aminés basiques, constituée de structures appelées doigts de zinc (figure 1.6). Les doigts de zinc sont un regroupement tridimensionnel d'acides aminés (4 cystéines pour les récepteurs nucléaires, 2 histidines et 2 cystéines pour d'autres facteurs (165)) ayant la capacité de lier un atome de zinc dans une configuration tétraédrique (figure 1.6) (166). Le DBD des récepteurs nucléaires est composé de deux doigts de zinc organisés en tandem (167). La structure en hélice α (168) et le contenu en acides aminés basiques de ces doigts permettent à ces derniers de contacter le sillon majeur de l'ADN (169). Le DBD reconnaît une séquence de liaison appelée site de réponse aux hormones (HRE) qui varie d'un récepteur à l'autre (170, 171). Ces HREs sont en général composés d'une paire palindromique de séquences hexamériques avec un espace variable entre les hexamères (170, 172).

La fonction de ce domaine est évidemment de lier l'ADN (173), mais il est également impliqué dans l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation avec d'autres récepteurs (148, 174, 175). En fait, le premier doigt de zinc du DBD est responsable de la reconnaissance spécifique et de la liaison avec l'ADN (176) alors que le second est impliqué majoritairement dans les interactions protéine-protéines (176). Toutefois, la présence des deux doigts de zinc est essentielle pour maintenir une bonne liaison à l'ADN (173, 176). Trois boîtes, auxquelles sont associées différentes fonctions, ont été identifiées dans le DBD. Tout d'abord il y a la boîte P, située à la fin du premier doigt de zinc, qui est responsable de la reconnaissance de la séquence d'ADN (d'un hexamère) sur laquelle le récepteur va se lier (148, 177). Il y a ensuite la boîte D, située au début du second doigt de zinc, qui est impliquée dans la dimérisation spécifique avec un autre récepteur nucléaire. Cette dimérisation serait responsable de la détermination de l'espace nécessaire entre la répétition des hexamères du site de liaison (148). Après le second doigt de zinc, se retrouve la boîte T, qui serait impliquée dans l'arrangement tête-à-queue des deux monomères liés à une séquence répétée inversée et cela en interagissant avec la face opposée de la seconde molécule du

dimère (178, 179). Finalement, une quatrième boîte, la boîte A, est présente chez les récepteurs se liant à l'ADN sous forme de monomère (FTZ-F1, NGFI-B, ROR, SF1, etc.). Elle est située immédiatement après la boîte T et est impliquée dans la reconnaissance d'un triplet de nucléotides situés avant l'unique hexamère caractéristique de ce type de récepteur (la boîte A de NGFI-B reconnaît TAA de la séquence TAAAGGTCA et celle de SF1 reconnaît le premier TCA de la séquence TCAAGGTCA) (178-180). Cette boîte serait impliquée dans la liaison du sillon mineur de l'ADN (179).

Le domaine de liaison du ligand ou de l'hormone (LBD ou HBD), qui est moyennement conservé entre les divers récepteurs, se divise en deux portions, soit une région hydrophobe responsable de la liaison du ligand (181) (formant une poche hydrophobe pouvant recevoir le ligand (182)) et une région acide possédant une action activatrice dépendante de la liaison de l'hormone (AF-2) (183-185). Ce domaine serait également impliqué dans la dimérisation (186). La liaison du LBD par le ligand occasionne un changement conformationnel chez le récepteur (187, 188) entraînant son activation via divers processus dont sa libération de HSP90 (189-192), sa translocation au noyau et sa phosphorylation (193). Ainsi activés, les récepteurs nucléaires sont capables de lier leur séquence de reconnaissance et d'activer la transcription. L'AF-2, qui est dépendant de la liaison du ligand, est impliqué dans cette activation via des interactions protéine-protéines avec divers coactivateurs (194-197) ou directement avec la machinerie transcriptionnelle (198).

Les récepteurs nucléaires sont ainsi des senseurs biologiques dont l'activation est impliquée dans plusieurs processus métaboliques. La présence d'un récepteur activé ne signifie pas nécessairement qu'il activera la transcription de gènes. Certains récepteurs sont capables d'induire des gènes et d'en réprimer d'autres c'est le cas entre autres de GR qui active l'expression de gènes tels que la tyrosine amino transférase (199) et qui réprime l'expression de l'insuline en se liant à l'ADN sur une séquence appelée nGRE (200). GR peut également réprimer

l'expression de gènes par un contact protéine-protéine avec d'autres facteurs de transcription tels que AP1 (201), NF κ B (202, 203) ou le complexe FTF/LF (dans le promoteur de l'AFP) (7, 112, 130). Tout comme GR, le récepteur Coup-TF1 peut activer ou réprimer l'activité de certains gènes (204-206). Les récepteurs nucléaires SHP (207) et Dax-1 (208) ne possèdent pas de DBD. Leur fonction est donc de se lier à d'autres récepteurs nucléaires afin de bloquer leur action. L'action des récepteurs nucléaires peut donc varier selon le contexte et selon les interactions protéine-protéines auxquels ils sont soumis. Ainsi, la connaissance de ces interactions est importante pour bien comprendre la régulation de l'expression des gènes.

1.6.2 La Famille FTZ-F1

FTF est un récepteur nucléaire orphelin appartenant à la famille du récepteur nucléaire de *drosophile* FTZ-F1. Le premier membre de cette famille à avoir été identifié est FTZ-F1 (209), un récepteur nucléaire présent dans l'embryon de *drosophila melanogaster* et qui serait impliqué dans sa métamorphose (209). FTZ-F1 a été identifié comme étant un inducteur de l'homéoprotéine FTZ (210, 211), un gène « pair-ruled » exprimé dans les segments de drosophiles et important dans la délimitation des parasegments (212). FTZ-F1 possède deux formes, soit FTZ-F1 α et FTZ-F1 β , qui ne possèdent pas le même patron d'expression, la forme α étant présente dans la phase précoce de l'embryogenèse et la forme β apparaissant dans la phase plus tardive et durant la métamorphose (209). Il existe un autre gène appelé également FTZ-F1 β ou DHR39 qui possède une bonne homologie avec FTZ-F1 (213) et qui compétitionne ce dernier pour la même séquence de liaison (214). FTZ-F1 a aussi été cloné chez le ver à soie *Bombyx mori* (215, 216); deux homologues ont également été identifiés chez les mammifères, SF1 (164) et FTF (130) et un chez la truite, tFZR1 (217). D'autres cibles pour FTZ-F1 ont également été identifiées telles que le gène de l'alcool deshydrogénase de drosophile (218) et le gène EDG84A (219).

Les membres de cette famille de gènes reconnaissent la séquence de liaison consensus YCAAGGYCR (220) qu'ils lient normalement sous forme de monomère (221). Ces récepteurs nucléaires sont tous exprimés au cours de l'embryogenèse. Ils ont donc probablement tous une implication dans la régulation du développement. L'absence de SF1 lors du développement de la souris entraîne des problèmes au niveau de la différenciation sexuelle et de la formation des tissus stéroïdogéniques primaires (222).

1.6.3 FTF : Fetoprotein Transcription Factor

Le récepteur nucléaire orphelin FTF ne fait pas exception aux membres de la famille FTZ-F1. Il est exprimé très tôt dans le développement, sa présence est détectée dans les cellules ES en culture (130) et des analyses d'hybridation *in situ* permettent d'affirmer que FTF est exprimé au moins au huitième jour de la gestation dans l'embryon de souris (223). Son rôle développemental est encore inconnu, mais il est fort probablement un élément important dans le développement hépatique. L'étude préliminaire de souris contenant une mutation ciblée de FTF (produite par une recombinaison homologue) montre que ce dernier est essentiel au développement de la souris car aucun embryon mutant ne dépasse 7.5 jours de gestation (224).

Au niveau de sa structure, FTF possède tous les domaines typiques des récepteurs nucléaires sauf le domaine N-terminal (figure 1.6). Ainsi FTF, tout comme son homologue SF1 (164), est privé du domaine d'activation 1 (AF-1) (130, 225) (figure 1.6). L'absence d'AF-1 laisse supposer que FTF pourrait être un activateur incomplet qui a vu sa structure évoluée de façon à diverger des mécanismes d'activation standards et ainsi lui permettre d'activer la transcription de gènes uniquement avec son AF-2. Il est également probable que ce manque d'AF-1 oblige FTF à effectuer des interactions protéine-protéines avec un autre facteur (tel que LF) pour mener une action activatrice complète (130).

Le DBD de FTF possède les deux doigts de zinc caractéristiques des récepteurs nucléaires. Les boîtes P, T et A sont homologues à 100% avec les membres de la famille FTZ-F1 (130), lui conférant la capacité de lier la séquence consensus : YCAAGGYCR (130). Cependant, au niveau de sa boîte D, FTF diverge des membres de sa famille (130). Le LBD de FTF est également standard contenant un domaine hydrophobique responsable de la liaison d'un ligand et un domaine d'activation AF-2 (130).

FTF possède une région riche en leucine, située immédiatement après le DBD, se rapprochant du consensus des protéines à « zipper » de leucine (L-X₆-L/I-X₆-L/I-X₆-L/I) (226, 227). De façon théorique, plusieurs sites potentiels de phosphorylation sont retrouvés sur FTF humain (figure 1.6). Dans la courte portion avant le DBD se situent des sites de phosphorylation pour la caséine kinase II (228) et pour la protéine kinase C (229). Dans le DBD, deux sites pour la caséine kinase II (228), deux sites pour la protéine kinase C (229) et un site pour la kinase cAMP et cGMP dépendante (230) sont retrouvés. Finalement, dans la portion extra-DBD sont localisés cinq sites pour la caséine kinase II (228) et un site pour la protéine kinase C (229). Aucun de ces sites cependant ne se retrouvent dans l'AF-2. Deux sites potentiels de N-glycosylation (un avant le DBD et l'autre dans l'extra-DBD) (231, 232) et trois sites de N-myristoylation (tous dans l'extra-DBD) (233, 234) sont également retrouvés sur FTF.

Plusieurs orthologues de FTF sont identifiés : chez l'humain (225, 235, 236), chez le rat (130), chez la souris (LRH-1) (130, 237), chez *Xenopus Laevis* (xFF1rA, xFF1rB) (238) et chez le zebrafish (zFF1A, zFF1B) (239). De plus, d'autres cibles ont été identifiées telles que le promoteur de HNF-3 β (223), de HNF1 (224), de CYP7A (235), de SHP (240) de même que le « core promoter » du virus de l'hépatite B dont la caractérisation est présentée dans cette thèse (chapitre 4).

1.7 Le virus de l'hépatite B

1.7.1 L'hépatite virale

L'hépatite est une dénomination pour toute inflammation du foie. Les lésions typiques lors d'une hépatite consistent en une infiltration du foie par des cellules monocellulaires (majoritairement des petits lymphocytes, mais également des cellules plasmiques et des éosinophiles), en la présence de nécrose hépatique, d'hyperplasie des cellules de Kupffer et de cholestase à des degrés variables. Les principaux dommages au foie consistent en une dégénération des cellules hépatiques, en un gonflement des hépatocytes et en l'apparition de nécrose (241). La présence de régénération hépatique est également détectée durant l'hépatite. Il existe deux formes d'hépatite, soit la forme aiguë ou la forme chronique. La forme aiguë peut être d'origine virale ou toxique. La forme chronique peut également être d'origine virale, mais aussi d'origine auto-immune ou héréditaire (maladie de Wilson). Les cas d'hépatite virale peuvent être causés par 6 virus différents (tableau 1.1). Il y a les virus de l'hépatite A (HAV), B (HBV), C (HCV), D (HDV), E (HEV) et G (HGV). Tous ces virus peuvent causer la forme aiguë alors que seuls HBV, HCV, HDV et HGV peuvent occasionner la forme chronique.

1.7.2 L'historique du virus de l'hépatite B

Dans les années 1950-60 les médecins classifiaient l'hépatite en deux catégories soient de type A et de type B. Le type A (HAV) était considéré comme transmis de façon prédominante par la route fécale-orale, alors que le type B (HBV) était transmis par le sérum et le sang (242).

En 1963, Baruch Samuel Blumberg découvre un antigène rare dans la population de l'Ouest mais présent dans le sérum d'aborigènes australiens, chez des Vietnamiens, des Micronésiens et des Taiwanais (243). Tout d'abord, il associe cet antigène, qu'il appelle antigène australien (au), à la leucémie. Puis, certains résultats l'amènent plutôt à associer la présence de cet antigène à des cas d'hépatites de type B. Il distribue alors son test de dépistage de « au » à plusieurs collaborateurs qui confirment tous cette hypothèse. En 1976, Blumberg a

reçu le prix Nobel pour cette découverte et tout ce qui s'en était découlé (incluant la création d'un vaccin par lui-même en 1971).

Tableau 1.1 Caractéristiques des différents virus pouvant causer une hépatite

	Famille	Particule	Génome	Transmission	Fulminance	Chronicité
HAV	Picornaviridae (Heparnaviridae)	27nm	ARN + sb 7500 nts Linéaire	Fécale – Orale	0,1%	Non
HBV	HepaDNAviridae	42nm	ADN sb/db 3,2 Kb Circulaire	Sanguine Périnatale Sexuelle	0,1-1%	Oui 8-10%
HCV	Flaviviridae	30-60nm	ARN + sb 9400 nts Linéaire	Sanguine Sexuelle?	0,1%	Oui (50%)
HDV	De type Viroïde	35-37nm	ARN – sb 1700 nts Circulaire	Sanguine Sexuelle	5-20%	Oui
HEV	Alphaviridae	32-34nm	ARN + sb 7600 nts Linéaire	Fécale – Orale	1-2%	Non
HGV	Flaviviridae	N/D	ARN + sb 9400 nts Linéaire	Sanguine Sexuelle?	0,1%	Oui

Description des caractéristiques des différents virus pouvant causer une hépatite virale. Sont présentés : leur famille, la taille de la particule, le type et la grandeur du génome, le mode de transmission, le pourcentage de fulminance et leur capacité ou non de causer une maladie chronique. (nm = nanomètre, N/D = Non disponible sb = simple brin, db = double brin, nts = nucléotides, ? = reste à démontrer).

En 1973, par microscopie électronique, D.S. Dane voit pour la première fois, dans le sérum de patients possédant l'antigène « au », le virus de l'hépatite B complet (HBV) (244). À ce moment, l'antigène « au » a été associé à l'antigène de

surface formant l'enveloppe de HBV et a été nommé alors HBsAg. Ensuite, plusieurs découvertes ont suivi, Kaplan et al. (245) ont découvert la polymérase virale alors que Robinson et al. (246, 247) ont analysé son génome. Le tout se poursuit pour arriver à la caractérisation des divers gènes du virus et à la compréhension de son cycle de vie (sections 1.7.5).

1.7.3 L'épidémiologie de HBV

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'hépatite B est une maladie représentant un problème mondial, avec plus de 75% de la population demeurant dans des zones où l'incidence de la maladie est considérée élevée (248, 249). Plus de 350 millions de personnes sont des porteurs chroniques du virus de l'hépatite B et plus de 2 milliards possèdent un historique de l'infection. L'OMS estime à environ 1 million le nombre de décès par année causés directement par HBV ou découlant de complications qui lui sont reliées (248, 249).

Aux États-Unis le nombre de porteurs chroniques est d'environ 1 million, et plus de 300 000 nouveaux cas sont déclarés par année, le tout occasionnant environ 5 000 décès annuellement. Selon Statistiques Canada, le nombre de porteurs chroniques au Canada est estimé à 100 000 et le nombre de nouveaux cas par année à environ 3 000.

1.7.4 La maladie, le traitement et la prévention de l'hépatite B

Le virus de l'hépatite B se propage par le sang et les autres fluides corporels. La transmission peut être verticale, c'est-à-dire que la mère enceinte peut le transmettre à son enfant *in utero* ou à la naissance (241). La transmission peut également être horizontale ce qui implique tout contact avec le sang de personnes infectées ou toutes relations sexuelles non protégées avec des personnes infectées. Les personnes à risque sont évidemment celles résidant avec des gens infectés, mais également les travailleurs du domaine de la santé, les personnes transfusées, les homosexuels, les utilisateurs de drogues intraveineuses, etc. (241).

L'infection par HBV peut être totalement asymptomatique. Toutefois, quand les symptômes apparaissent, ils sont typiques de l'hépatite virale, soit la présence de nausées, de vomissements, de fatigue extrême, de douleurs abdominales et le tout est suivi d'une jaunisse. La période d'incubation du virus avant l'apparition de ces symptômes peut varier de 2 à 5 mois. L'infection par HBV peut être aiguë et dans 1% des cas peut survenir une fulminance entraînant la mort du patient (tableau 1.1) (241). L'infection peut également devenir chronique. Chez 33% des adultes infectés se développera une jaunisse alors que seulement 5 à 10% deviendront des porteurs chroniques (241). Chez les enfants en bas de 7 ans c'est l'inverse, très rare sont ceux qui développeront une jaunisse, mais 25 à 30% d'entre eux deviendront des porteurs chroniques. Tandis que chez les enfants infectés avant l'âge d'un an, le pourcentage d'apparition de chronicité atteint les 90% (241). Statistiquement, il a été démontré que l'infection chronique augmente de 100 fois la possibilité de développement de carcinomes hépatocellulaires (250). L'incidence de cirrhose est également plus élevée chez les porteurs chroniques.

Pour la forme aiguë aucun traitement n'est disponible. Le médecin conseille du repos et de surveiller sa diète afin d'éviter de surtaxer le foie. Il faut donc éviter l'alcool, les médicaments, les drogues, les aliments gras, etc. Pour la forme chronique, le seul traitement approuvé est celui à l'interféron α (IF), appelé commercialement Interféron Alpha-2B ou Intron A, et dont l'efficacité est faible (40-50%) (251-253). Des études statistiques démontrent tout de même que l'IF diminue et ralentit l'incidence de CHC (254, 255).

Plusieurs autres produits sont également à l'étude. La plupart sont des analogues de nucléosides ou de nucléotides: Lamivudine (3TC, un analogue de cytidine), Lobucavir (un analogue de guanosine), Famciclovir (un analogue de guanosine), Adevfovir (un analogue de l'adénosine), L-FMAU (un analogue de thymine), etc. (256, 257). Des résultats encourageants ont été obtenus avec la Lamivudine et le Famciclovir qui sont présentement en test clinique de phase III

(258-260). Finalement, la combinaison de médicaments est une des voies les plus prometteuses. Présentement, des études ont démontré de bons résultats en combinant l'IF avec la Ribavarine, la Lamivudine ou le Famciclovir (253, 261).

Avec le faible rendement des traitements disponibles, la prévention devient la meilleure arme contre le virus. Le vaccin contre HBV est disponible commercialement (deux marques sont disponibles au Canada : l'Engerix-B de SmithKline Beecham et le Recombivax HB de Merck Sharp et Dohme) et plus de 100 pays l'ont inclus dans leur politique de vaccination des enfants et des personnes à risque. Le vaccin contient uniquement la protéine S (HBsAg) purifiée à partir de la surexpression de HBsAg dans la levure *Saccharomyces Cerevisiae* (pour l'Engerix-B). Ce vaccin possède une pénétrance (mesurée par la formation d'anticorps anti-HBsAg conformes) de 95% chez les enfants et de 90% chez les adultes (241). L'efficacité de ce vaccin pour contrer le virus est clairement démontrée et ce vaccin est considéré comme le premier vaccin anti-tumoral puisque les résultats des campagnes de vaccination démontrent une diminution de l'incidence de CHC (262).

1.7.5 La biologie moléculaire de HBV

● La structure du virus

Le virus de l'hépatite B fait partie de la famille des HepaDNAviridae. Cette famille de virus contient quelques autres membres, tous des homologues à HBV, mais infectant d'autres espèces. Il y a HBV qui infecte les humains et certaines espèces de singes. Il y a DHBV (Duck Hepatitis B Virus) qui infecte les canards, GSHV (Ground Squirrel Hepatitis Virus) qui infecte les écureuils, HHBV (Heron Hepatitis B Virus) qui infecte les hérons et pour terminer il y a WHV (Woodchuck Hepatitis Virus) qui infecte les marmottes. Tout récemment a été identifié un nouveau membre de cette famille infectant les orangs-outangs (263). Ces virus ont tous un génome d'ADN circulaire partiellement double brin. Ils utilisent la transcription inverse pour se répliquer et possèdent un tropisme principalement hépatique (264).

HBV possède donc un génome à ADN circulaire partiellement double brin d'une longueur de 3,2Kb. Il possède un brin d'ADN négatif complet et un brin d'ADN positif partiel variant en longueur. C'est un virus enveloppé formant une particule sphérique de 42nm appelée particule de Dane (« Dane's particle »). La nucléocapside, sans l'enveloppe, forme une particule de 27nm. Deux autres formes de particules virales, la forme sphérique (22nm) et la forme filamenteuse, sont détectées dans le sang de patients infectés. Ces particules proviennent de l'assemblage de protéines de l'enveloppe en surplus, sans noyau et sans ADN. Il existe différentes souches de HBV (adw, adr, ayw et ayr). Cette division est basée sur les différences présentes dans la séquence des protéines de surface, ce qui entraîne des variations d'immunogénicités (264).

A) L'enveloppe

L'enveloppe de HBV est sphérique et contient trois protéines toutes issues du même gène (figure 1.7). Il y a la protéine S majeure (S-HBsAg ou S), qui est la plus petite, possédant 226 acides aminés et qui représente environ 60 à 80% des protéines de l'enveloppe. La seconde protéine est la protéine S moyenne (M-HBsAg ou M) qui elle possède 281 acides aminés et qui représente environ 10 à 20% des protéines de l'enveloppe. La troisième protéine, c'est la protéine S large (L-HBsAg ou L) dont la taille varie entre 389 à 400 acides aminés dépendant de la souche du virus et qui représente également 10 à 20% des protéines de l'enveloppe. L'enveloppe contient environ 400 sous-unités protéiques au total. Ces protéines possèdent toutes deux variants de glycosylation faisant changer leur poids moléculaire. Ainsi, la protéine L possède des poids de 43KDa et de 46KDa, la protéine M possède des poids de 33KDa et de 36KDa et la protéine S possède des poids de 25KDa et de 28KDa (264).

Les protéines de l'enveloppe possèdent plusieurs fonctions. Leur fonction primaire est structurale et consiste évidemment à former l'enveloppe virale. Ces protéines sont également impliquées dans quelques autres fonctions essentielles

au virus. Les protéines S et L sont indispensables pour la formation de l'enveloppe complète (265) et les trois protéines, L, M et S, sont essentielles pour la sécrétion du virus (265-267). La présence de la protéine L est obligatoire pour l'assemblage de l'enveloppe (268, 269) et ses acides aminés en N-terminal (3 à 77) sont essentiels pour l'infection d'hépatocytes primaires en culture (270). De plus, certaines hypothèses mentionnent que la protéine L serait impliquée dans la liaison de récepteurs à la surface des hépatocytes (271). La myristylation de la protéine L est importante pour l'infectivité du virus, mais n'est pas impliquée dans la formation des particules virales (272). Les protéines S et L interagissent avec la protéine de la nucléocapside (protéine C) et cette interaction est impliquée dans l'encapsidation du virus (273). Il a été démontré que la protéine M, lorsqu'elle est tronquée à l'acide aminé 167 (MHBst167), possède une fonction coactivatrice puisqu'elle est capable d'induire la transcription sans toutefois se lier à l'ADN. Cette forme tronquée est fréquemment produite suite à l'intégration du virus dans le génome cellulaire au cours de l'infection chronique. Cependant, il faut noter que l'intégration n'est pas préalablement nécessaire à l'établissement de l'infection chronique. MHBst167 est capable d'augmenter l'induction d'un gène rapporteur contrôlé par NF κ B (274). Elle influence également l'activité de l'amplificateur I de HBV via ses sites pour les facteurs SP1, AP1 et NF κ B. Par contre, elle n'a aucun effet sur les autres éléments régulateurs du virus (275). Finalement, l'ARN messager codant pour la protéine S, lorsque raccourci aux nucléotides 129 à 620, possède un effet répresseur sur l'expression des gènes de HBV et cette répression pourrait être impliquée dans le contrôle de la réplication du virus (276).

B) La nucléocapside

La nucléocapside est composée à partir d'environ 180 sous-unités provenant d'une seule protéine, soit la protéine du noyau (HBcAg ou C), assemblée dans une symétrie icosaédrale (figure 1.7). Cette protéine possède une longueur de 185 acides aminés et un poids moléculaire de 21KDa (264).

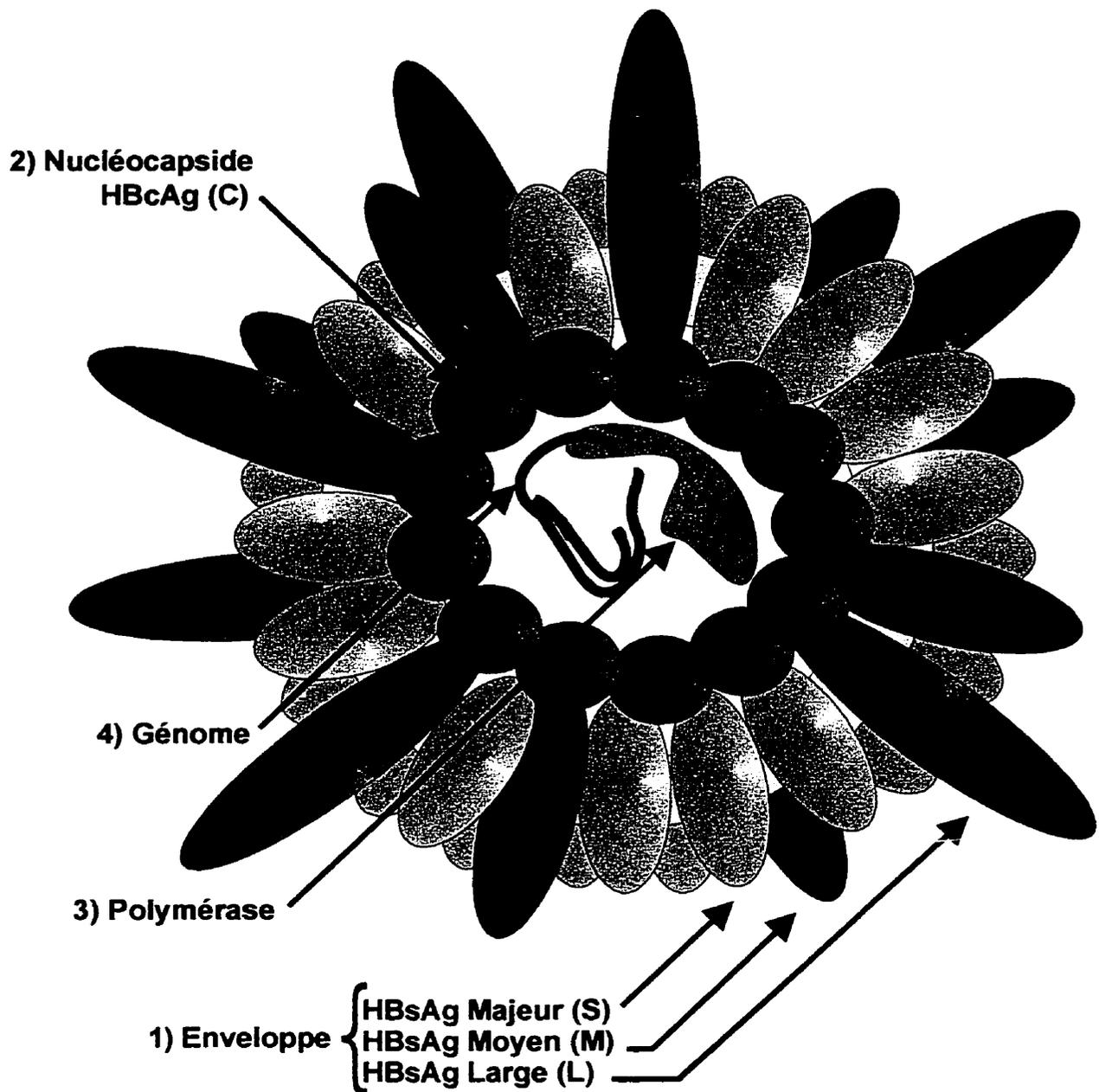


Figure 1.7. Schéma représentant les différentes protéines du virus de l'hépatite B. 1) l'enveloppe est constituée des protéines de surface majeures (S), moyennes (M) et larges (L); 2) la nucléocapside de forme icosaédrique est composée uniquement par la protéine C; 3) la polymérase virale demeure encapsidée suite à la répliation; 4) l'ADN génomique est circulaire et partiellement double brin. (Figure créée à partir des différentes références citées dans ce chapitre.)

La protéine C est une protéine phosphorylée sur plusieurs résidus sérines (ser-157, -164 et -172) (277). Elle possède une activité kinase d'autophosphorylation (278) et peut également être phosphorylée par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase protéine kinase (GAPD-PK) (279) et une nouvelle kinase appelée CAK (Core Associated Kinase) (280). La phosphorylation de la protéine C est une étape essentielle au cycle de vie du virus car sans celle-ci la migration du génome viral au noyau est impossible. Ainsi, lors de l'infection, le virus, pour se rendre au noyau, utilise le signal de localisation nucléaire présent dans la protéine C et si cette dernière n'est pas phosphorylée le signal n'est pas disponible et le virus demeure dans le cytoplasme (281). La phosphorylation et la déphosphorylation de la protéine C sont également impliquées dans l'encapsidation du messenger prégénomique et dans la réplication du génome. Ainsi, sans la phosphorylation de la protéine C (sur les ser-164 et ser-172) l'encapsidation de l'ARN prégénomique est impossible, de même si la protéine C n'est pas déphosphorylée suite à l'encapsidation, la réplication du génome n'est pas supportée (277).

Le rôle principal de la protéine C est évidemment de former la nucléocapside. La protéine C peut aussi contribuer au processus de réplication (277, 282), elle est également impliquée dans l'incorporation de l'ARN dans la nucléocapside (277) et dans la reconnaissance des protéines de l'enveloppe (280).

C) La protéine E

La protéine E (HBeAg) a été, pendant un certain temps, une protéine mystérieuse, jusqu'au moment où elle a été identifiée comme étant la protéine C à laquelle est additionnée une portion N-terminale (pre-C). Cette portion ajoutée contient un peptide signal entraînant la sécrétion de la protéine E (ou preC/C) dans le serum. HBeAg sert de marqueur, tout comme les protéines de surface, pour évaluer de façon clinique le stade d'infection du patient. Elle est produite sous la forme d'un précurseur contenant 212 acides aminés et ayant un poids moléculaire

de 24KDa. Puis, pendant sa maturation, le peptide signal est tronqué ainsi qu'une portion riche en arginine en C-terminale, le tout pour donner une protéine de 18KDa (264). Depuis sa découverte en 1972 (283), la fonction de la protéine E demeure énigmatique. Il a été démontré que cette protéine possède un rôle de régulation négative sur la réplication du virus (284, 285). De plus, elle aurait un rôle d'inducteur d'immunotolérance (286).

D) La polymérase virale

La polymérase constitue la plus grosse protéine du virus. Elle possède un poids moléculaire de 94KDa. Il s'agit d'une polymérase à ADN indépendante de l'amorce (elle utilise autant des amorces d'ARN que d'ADN) (282). Elle possède donc une fonction transcriptase inverse lui permettant de produire l'ADN génomique viral à partir du messenger pré-génomique. Elle possède également une fonction RNase H qui est responsable de la dégradation du messenger pré-génomique lorsque le brin négatif de l'ADN viral se fait synthétiser (264). En N-terminal de la polymérase se retrouve un polypeptide, appelé protéine terminale, qui s'attache à l'ARN pré-génomique pour servir d'amorce à la polymérase et permettre ainsi à la polymérase de rester attachée de façon covalente avec le nouveau brin synthétisé (287). La polymérase est essentielle à l'encapsulation du messenger pré-génomique dans la nucléocapside où se passe tout le processus de réplication (264).

E) La protéine X et les carcinomes hépatocellulaires

La protéine X (HBx) est la plus petite protéine produite par le virus. Il s'agit d'une protéine possédant 154 acides aminés et un poids moléculaire de 17KDa. Sa fonction principale est encore assez obscure, mais elle est essentielle à la réplication du virus (288). Elle est capable d'activer le sentier mitogénique de Ras (289-291) et de la protéine kinase C (PKC) (292). Elle est phosphorylée (293) et elle posséderait une activité serine/thréonine kinase (294). Elle possède également une fonction coactivatrice puisqu'elle est capable d'activer la transcription sans lier l'ADN (295, 296). Elle est donc capable de transactiver l'amplificateur I de HBV

(297), le « core promoter » (298) et elle protège ce dernier contre l'action répressive de p53 (299, 300). Elle est capable d'interagir avec des facteurs de la machinerie transcriptionnelle (301-303) et pourrait activer ou réprimer plusieurs gènes cellulaires (IGFI, IGFII, TNF α , c-myc, c-fos, MDR1, etc.) par des interactions protéine-protéines avec des facteurs de transcription (C/EBP, p53, AP1, NF κ B, NFAT, CREB/ATF2, etc.) (292, 297, 304-320).

Les personnes atteintes de façon chronique par HBV sont beaucoup plus susceptibles au développement de CHC. Parmi les mécanismes proposés pour expliquer cette augmentation, il y aurait la capacité de la polymérase virale de transcrire de façon inverse des messagers cellulaires (321). La propriété transactivatrice de la protéine de surface moyenne tronquée (MHBst167) pourrait également être impliquée dans l'apparition de CHC (274, 275). Toutefois, c'est la protéine X qui retient l'attention avec ses multiples interactions et ses effets activateurs ou répresseurs sur plusieurs gènes. Il est à noter que l'intégration du virus dans le génome cellulaire n'est pas essentielle au virus et ne se produit pas toujours, de plus lorsqu'elle se produit elle se fait de façon totalement aléatoire, par conséquent elle n'est pas considérée comme un mécanisme potentiel pour l'induction de CHC (322).

Il faut noter que l'effet oncogénique de HBx n'est pas aigu car, entre l'infection et l'apparition de CHC, il y a une longue période de latence (323). Des résultats controversés ont été obtenus avec la protéine HBx au niveau de son potentiel oncogénique. Alors que HBx est capable d'induire la transformation de certaines lignées cellulaires (324-327), dans d'autres lignées elle n'a aucun ou un léger effet (324, 328). Le même phénomène se produit également en transgénèse puisque certaines souris transgéniques surexprimant HBx voient se développer plusieurs tumeurs (329-331) alors que d'autres n'en développent aucune (332-335). Un point commun est cependant remarqué pour toutes les lignées transgéniques, elles sont toutes plus susceptibles aux hépatocarcinogènes (311, 336, 337). Ainsi la protéine X est probablement impliquée dans la formation de

CHC, mais l'arrivée d'un second événement oncogénique est probablement nécessaire.

Les fonctions de la protéine X les plus susceptibles d'être impliquées dans la formation de CHC sont : **I)** sa capacité de bloquer l'action de p53 (338-340), **II)** sa capacité d'induire des gènes contrôlant la croissance cellulaire tels que ras (289-291), PKC (292), AP1 (292, 304, 305, 310, 317) , c-myc (341), EGFR (epidermal growth factor receptor) (342) et les IGF1/II (insulin-like growth factor I et II) (343, 344), **III)** son action négative sur la machinerie de réparation de l'ADN (318, 340, 345), **IV)** ses interactions avec la machinerie transcriptionnelle (303, 346, 347) et **V)** ses influences sur l'apoptose (348-351).

● **Le processus infectieux**

Tout d'abord, il y a l'entrée du virus dans les hépatocytes (figure 1.8A). Le tropisme de HBV est majoritairement hépatocytaire. Néanmoins, il est connu que le virus peut se répliquer légèrement dans le pancréas (352). La trace de certaines protéines du virus ou de l'ADN viral est également détectée dans d'autres types cellulaires tels que la peau, les reins, les spermatozoïdes et les épithéliums biliaires (352, 353). Il est possible qu'il existe un récepteur spécifique à la surface des hépatocytes pour permettre la reconnaissance et l'incorporation spécifique de HBV. Cependant, aucun récepteur n'a encore été clairement identifié (354, 355). C'est d'ailleurs en raison de ce manque que l'hypothèse la plus répandue à l'heure actuelle mentionne que la spécificité hépatocytaire de HBV se ferait via sa régulation transcriptionnelle plutôt que par son intégration. Ainsi, le virus pourrait pénétrer dans plusieurs types cellulaires, mais se répliquer uniquement au foie via l'utilisation de facteurs hépatosécifiques. Les résultats en faveur de cette hypothèse sont : 1) la spécificité hépatique de la part des protéines virales surexprimées dans des souris transgéniques. Les gènes de ces protéines sont ainsi présents dans tout le génome, mais sont exprimés plus fortement dans le foie

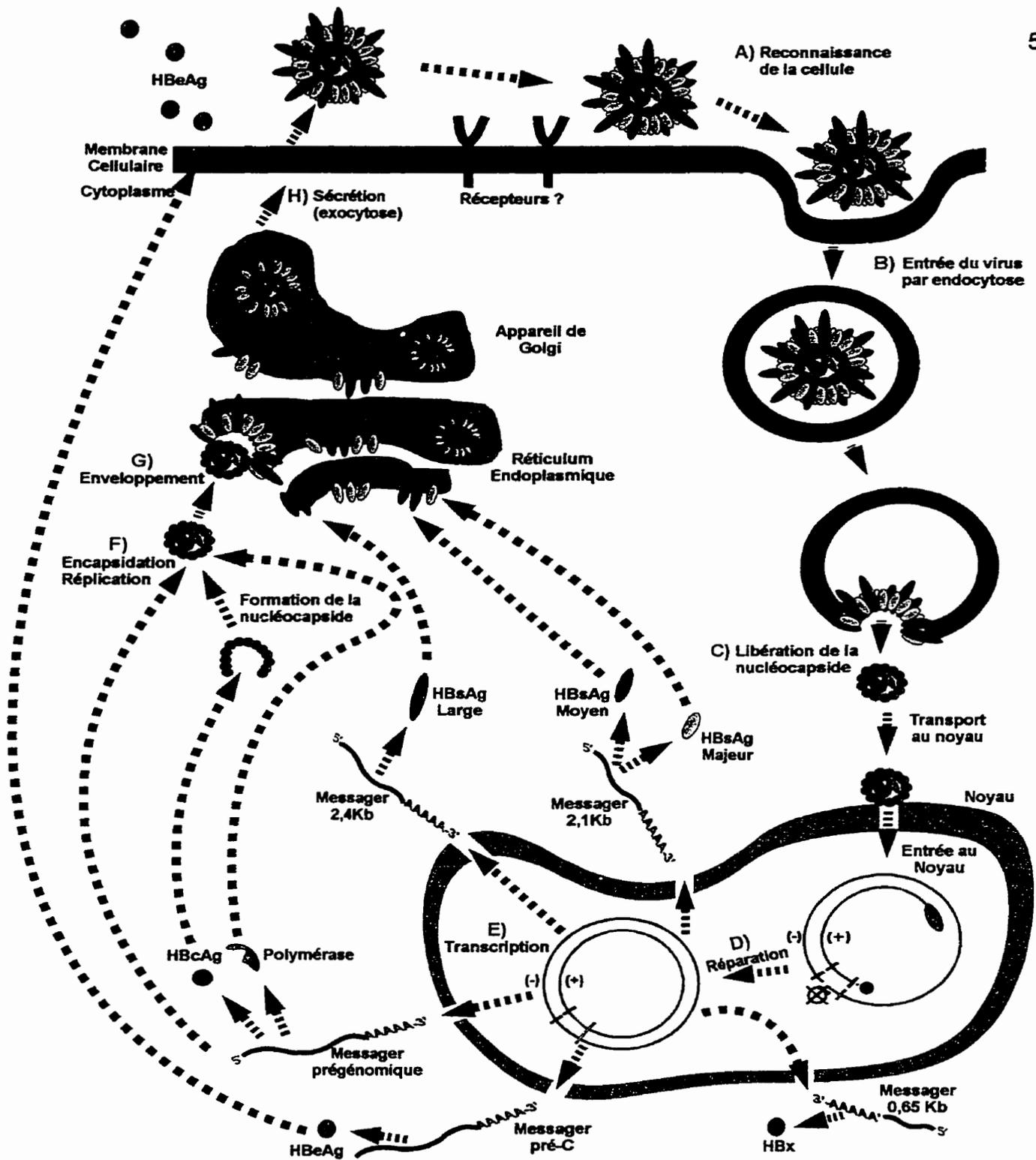


Figure 1.8. Schéma représentant le cycle de vie du virus. **A)** la reconnaissance de la cellule dont le mécanisme, encore inconnu, n'est probablement pas spécifique **B)** l'entrée du virus dans la cellule (par endocytose); **C)** la migration de la particule virale au noyau cellulaire via l'intermédiaire des signaux de localisation nucléaire présents dans les protéines de la nucléocapside; **D)** la réparation du génome pour son éventuelle transcription; **E)** la transcription des divers messagers produits par le virus; **F)** l'encapsidation primaire du messager pré-génomique et de la polymérase virale pour effectuer la réplication du virus; **G)** l'enveloppement de la particule virale mature; **H)** la sécrétion du virus hors de la cellule via le sentier de sécrétion standard de la cellule.(Figure créée à partir des différentes références citées dans ce chapitre.)

que dans tous les autres tissus (356-358), 2) la présence de protéines ou d'ADN viral en moindre quantité dans d'autres tissus lors d'une infection (352, 353) et 3) la perte de spécificité aux lignées hépatiques d'un virus dans lequel le « core promoter » a été remplacé par un promoteur étranger, celui de la métallothionéine IIa. Ce virus peut alors se répliquer dans une lignée cellulaire non hépatique (359).

L'entrée du virus se fait par endocytose (figure 1.8B) et, lors du transport à l'intérieur de la cellule, le virus perd ses protéines de surface exposant ainsi la nucléocapside et ses protéines C qui, elles, contiennent un signal de localisation nucléaire (360). L'exposition de ce signal a pour effet de diriger la vésicule de transport au noyau. Ainsi arrivé, le génome viral est libéré à l'intérieur du noyau (figure 1.8C) et est réparé pour prendre la forme d'un génome à ADN complètement double brin (figure 1.8D). C'est à cette étape que commence la transcription et la répllication du virus, ces deux processus reliés entre eux seront discutés plus en détail dans les sections suivantes. Mentionnons seulement qu'à ce moment tous les messagers du virus sont produits, que leurs protéines correspondantes sont synthétisées dans le cytoplasme et que le génome se réplique. Le tout se retrouve donc dans le cytoplasme (figure 1.8E) où il y a encapsidation (figure 1.8F) puis enveloppement du virus (figure 1.8G) qui est par la suite sécrété hors de la cellule (figure 1.8H). L'encapsidation se fait grâce au signal d'encapsidation présent dans la région preC du messenger pré génomique. À ce moment, les protéines C entourent le messenger pré génomique et l'enferment dans la capsid pour qu'il puisse être transcrit inversement par la polymérase virale. L'enveloppement se fait par une association entre les protéines C et les protéines de surface qui se retrouvent au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (figure 1.8F). Ainsi la nucléocapsid se rapproche des protéines de surface, crée une invagination du RE et se fait entourer de protéines de surface pour se retrouver à l'intérieur du RE (figure 1.8G). Par la suite, cette particule virale, maintenant complète, emprunte le sentier cellulaire de sécrétion. Elle passe donc par l'appareil de Golgi et est sécrétée hors de la cellule (figure 1.8H).

Au niveau sérique, lors d'une infection aiguë, les premières protéines détectées, après 1 mois d'infection, sont les protéines de surface. Puis 2 semaines plus tard, apparaît la protéine C (HBc) contre laquelle des IgM apparaissent immédiatement (1 semaine après). Au cinquième mois d'infection apparaissent les IgG anti-HBc suivis, environ 1 semaine plus tard, des IgG-antiHBs. À ce moment, les HBc et HBsAg ne sont plus présents dans le sérum et l'infection est résorbée. Lors d'une infection chronique, la synthèse de HBsAg ne s'arrête pas et se maintient assez élevée. En fait, une infection est considérée chronique lorsque les protéines de surface sont détectés pendant plus de 6 mois. De plus, peu ou pas d'anti-HBs sont détectés. Dans les deux cas d'infection toutefois, l'apparition de HBeAg indique une grande infectivité de la part du virus (241).

● La réplication

La réplication de HBV est assez surprenante pour un virus à ADN (figure 1.9). Elle nécessite la transcription du génome complet en ARN. Puis une transcription inverse similaire à celle des rétrovirus se produit via la polymérase virale pour synthétiser un génome d'ADN. Le messenger contenant le génome complet est appelé messenger pré-génomique. Il s'agit d'un messenger de 3,5Kb contrôlé par le « core promoter ». En plus de servir de gabarit pour la réplication, ce messenger code pour deux protéines soient la protéine C et la polymérase virale. Lorsque ce messenger est produit (figure 1.9C), il est prêt à entrer en réplication, il se retrouve alors encapsidé par les protéines de la nucléocapside en compagnie de la polymérase virale pour former une nucléocapside immature (figure 1.8F). La polymérase commence alors à synthétiser, par transcription inverse, le brin d'ADN négatif en utilisant comme amorce la protéine terminale et comme gabarit le messenger pré-génomique (figure 1.9D et E). La présence, en N-terminal de la polymérase, de la protéine terminale (l'amorce) assure qu'il y aura une encapsidation simultanée de la polymérase et du messenger pré-génomique. Une séquence redondante (R) a été identifiée dans le messenger pré-génomique. Elle est

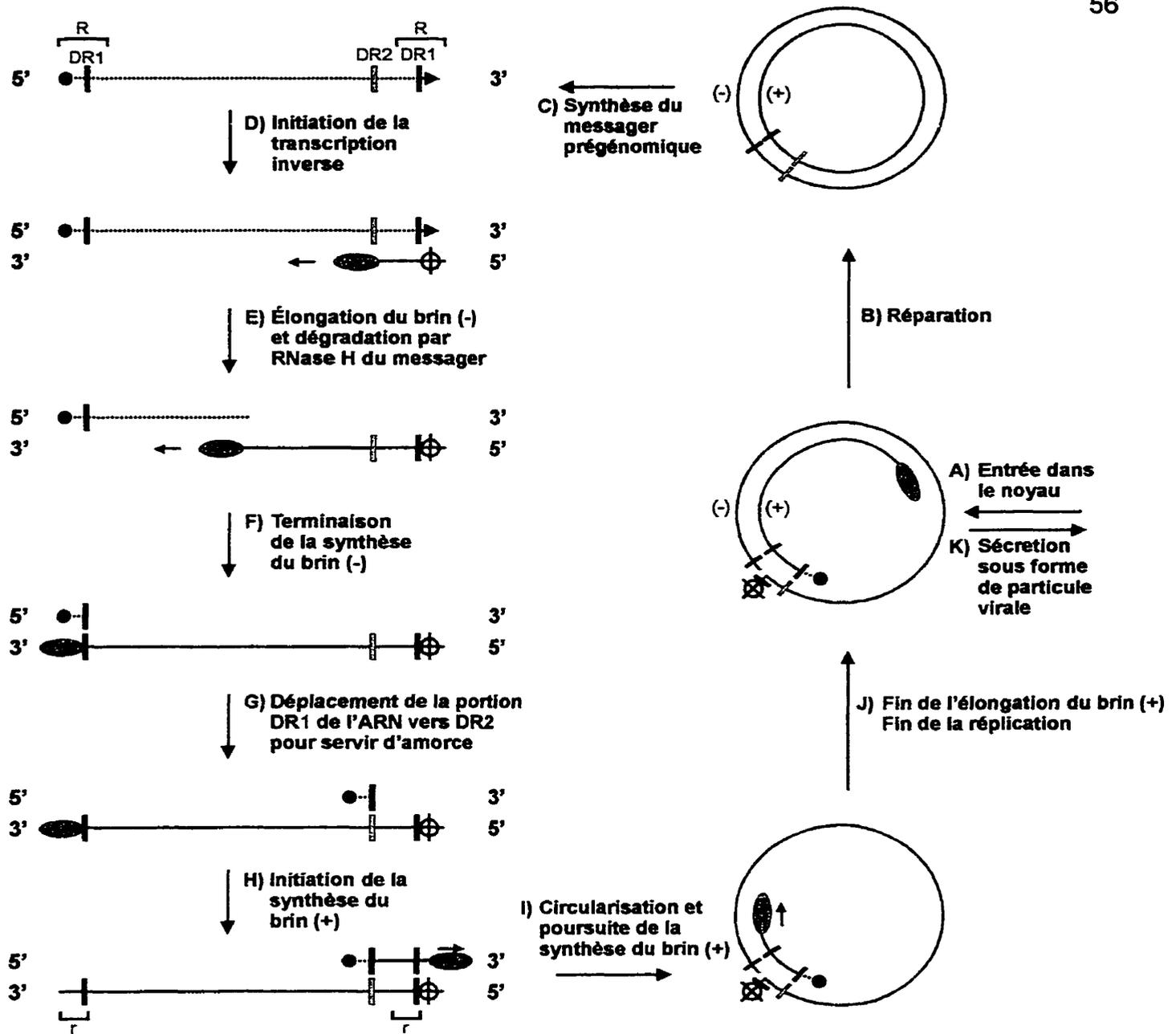


Figure 1.9. Représentation graphique de la réplication du génome du virus de l'hépatite B: **A)** entrée du génome au noyau; **B)** réparation du génome pour le rendre complètement double brin; **C)** transcription du messenger pré-génomique; **D)** lorsque le messenger pré-génomique est encapsidé avec la polymérase virale, il y a initiation de la réplication; **E)** élongation du brin (-) par la fonction de transcription inverse de la polymérase virale; **F)** Synthèse complète du brin (-) et dégradation par la fonction RNase H du messenger pré-génomique; **G)** déplacement de la portion de l'ARN pré-génomique correspondant à la région DR1 vers la région DR2 dans le but de servir d'amorce; **H)** initiation de la synthèse du brin (+) par la polymérase virale à l'aide de cette amorce d'ARN; **I)** dès que la polymérase dépasse la portion DR1, il y a circularisation du génome; **J)** synthèse partielle du brin (+); **K)** la particule virale est mature, elle est donc enveloppée et sécrétée hors de la cellule. (Figure adaptée à partir de : McLachlan, A. *Molecular Biology of the Hepatitis B virus*. CRC Press Boca Raton Ann Arbor Boston London 1991)

produite lors de la transcription de celui-ci; c'est-à-dire qu'au cours de la transcription du messenger prégénomique, la polymérase cellulaire dépasse quelque peu son site d'initiation créant ainsi une redondance à chaque extrémité du messenger. Par conséquent, dans les portions 5' et 3' du messenger, sont retrouvées deux séquences identiques appelées DR1 (Direct Repeat 1). De même, une séquence DR2, complémentaire à la séquence DR1, est retrouvée en 3' du messenger prégénomique. Au cours de la synthèse du brin négatif, la polymérase, grâce à son activité RNase H, dégrade le messenger prégénomique générant de petits fragments d'ARN (figure 1.9E et F). Le fragment de l'extrémité 5' du messenger prégénomique, qui possède le « cap » et qui contient une séquence DR1, se déplace par un mécanisme inconnu vers la séquence DR2 du brin négatif d'ADN (figure 1.9F et G). Ainsi déplacé, ce fragment sert d'amorce pour l'initiation de la synthèse du brin d'ADN positif (figure 1.9H). Au moment où la synthèse du brin positif atteint la seconde séquence DR1, une circularisation du génome se produit via le déplacement du brin nouvellement synthétisé vers la séquence DR1 de l'autre extrémité (figure 1.9I). Puis la synthèse partielle du second brin est effectuée (figure 1.9J) pour former une nucléocapside mature contenant le génome d'ADN partiellement double brin et la polymérase virale, qui est toujours présente dans la nucléocapside (figure 1.7). Ainsi, le virus est prêt à être enveloppé et sécrété hors de la cellule (figure 1.8H et 1.8K).

● La transcription des gènes de HBV

Au niveau de sa transcription le virus produit 5 types de messenger (figure 1.8) (264), il y a tout d'abord le messenger prégénomique de 3,5Kb, contrôlé par le « core promoter », qui est responsable de la production de la protéine C et de la polymérase virale et qui est également essentiel pour la réplication du génome viral. Par la suite, il y a le messenger pre-C/C de 3,55Kb contrôlé par le promoteur pre-C qui est retrouvé dans la région du « core promoter ». Ce messenger est responsable de la production de la protéine E (HBeAg) et probablement de polymérases virales (361). Un messenger de 2,4Kb, responsable de la production de la protéine S large, est également retrouvé. L'expression de ce dernier est

régulée par le promoteur SPI (S promoteur 1). Le quatrième messenger est celui de 2,1kb contrôlé par le promoteur SPII (S promoteur 2) et qui est responsable de la production des protéines S moyennes et majeures. Finalement, un transcrit de 0,65Kb est produit sous le contrôle du promoteur X (Xp), ce messenger est responsable de la production de la protéine X. Deux amplificateurs, activant tous deux la plupart des promoteurs viraux, ont été identifiés dans le génome du virus. Il s'agit des amplificateurs I et II (ce dernier se retrouvant dans la région du « core promoter »). Pour compléter le tout, un élément de régulation négative (NRE) a été localisé dans la région en aval du « core promoter » (figure 1.10).

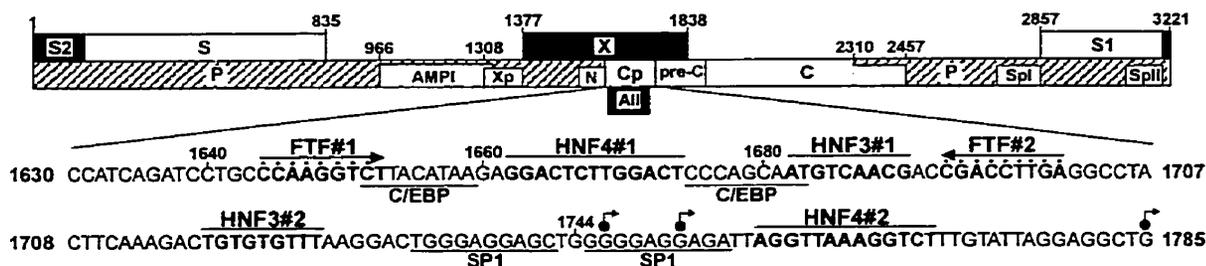


Figure 1.10. Le “core promoter” de HBV contient deux sites de haute affinité pour le récepteur nucléaire FTF. Ce schéma expose la structure principale et les éléments régulateur du génome de HBV. La séquence représente le “core promoter” (Cp): les points marquent les nucléotides présents dans la séquence de liaison consensus de FTF. S, S1, S2, Spi, SpII représentent les gènes de l’enveloppe et leurs deux promoteurs; X/Xp, X représentent le gène X et son promoteur; P correspond à la polymérase virale; C/preC représentent le gène de la nucléocapside et sa région ajoutée pour former l’antigène E; AMPI, AII sont les amplificateurs I et II; N correspond à une région de régulation négative (NRE); les flèches représentent les sites d’initiation de la transcription identifiée pour le “core promoter”(1745, 1751, 1818-1822) et pour le promoteur preC (1785-1793).

A) Les promoteurs X, SPI et SPII

Le promoteur de la protéine X chevauche la fin de l’amplificateur I (figure 1.10). Il n’a pas de boîte TATA et possède trois sites majeurs d’initiation de la transcription situés à 1310, 1332 et 1340 (362). Les facteurs de transcription impliqués dans sa régulation sont encore peu connus. Un site de liaison pour une protéine non-identifiée a été caractérisé dans une région de 16pb du Xp (de 1102 à 1117) et cette protéine est appelée X-PBP (X-Promoter Binding Protein) (363-

365). L'amplificateur I est essentiel pour l'activation du Xp (362, 366, 367). L'élément LSR, situé à la fin de l'amplificateur I, fait partie du promoteur X et les facteurs de transcription HNF3, HNF4 et RXR seraient impliqués dans sa régulation (368). La protéine X peut s'autoréguler et cette autorégulation passe par les éléments E et EP de l'amplificateur I qui sont essentiels pour l'activation maximale du Xp (365, 366, 369-371). Il a été démontré que p53 bloque l'action de la protéine X sur son promoteur (365).

Il existe également un second promoteur produisant une protéine X plus courte. Il se situe dans la portion codante de la protéine X (372). Deux facteurs liant ce promoteur ont été identifiés. Tout d'abord une protéine de 33KDa (p33) qui se lie plus en 5' et qui active ce promoteur et une protéine de 110KDa (p110) qui se lie plus en 3' et qui le réprime (373). De même, le facteur de transcription ATF-2 est capable d'activer ce second promoteur alors qu'il réprime Xp via le site AP1 de l'amplificateur I (374). Ainsi, il semble que ces deux promoteurs soient régulés de façon différentielle.

Les promoteurs SPI et SPII se situent respectivement aux alentours des nucléotides 2780 et 3152 dans le génome de HBV (figure 1.10) (375). SPI contient une boîte TATA alors que SPII, qui possède un élément initiateur, n'en contient pas. Cependant, il a été démontré que TBP était capable de lier une séquence de SPII similaire à la boîte TATA (TAAGAGA) (375-378). Plusieurs sites d'initiation de la transcription sont retrouvés dans SPI et trois le sont dans SPII. Les trois sites de SPII sont situés à 3196, 3216 et 5 (ou 3226, car le nucléotide 3221 est aussi le nucléotide 0). Celui à la position 5 produit un messager qui ne contient pas le premier ATG de la protéine S moyenne (M). Par conséquent, deux messagers sur trois sont aptes à produire les protéines S et M et un sur trois ne produit que la protéine S (379, 380).

Quelques facteurs de transcription impliqués dans la régulation de ces deux promoteurs ont été identifiés. Pour SPI, il a été démontré que ce promoteur

fonctionne uniquement dans des lignées d'hépatomes bien différenciés (381). Des sites de liaison pour les facteurs de transcription HNF1 et HNF3 ont été identifiés (382-384). Pour le promoteur SPII, les facteurs NF-I, NF-Y, Sp1 et CBF (CCAAT Binding Factor) sont impliqués dans sa régulation (376, 379, 385). Toutefois, il est connu que ce promoteur possède une activité largement restreinte aux hépatocytes, ainsi l'identification d'un site de liaison pour un facteur enrichi au foie, soit HNF3, a été importante pour la compréhension de sa régulation (385). La dexaméthasone (un analogue des hormones glucocorticoïdes) semble posséder un effet activateur de SPII via le site NF-1 (386). L'amplificateur I de même que la protéine X sont capables d'induire l'activité des deux promoteurs (375, 387). Finalement, la surexpression de la protéine S large (L) a pour effet d'induire le promoteur SPII et cette induction se ferait via l'intermédiaire de l'induction d'un stress causé par l'excès de protéine L sur le réticulum endoplasmique (388). Le virus aurait ainsi un mécanisme de contrôle permettant de produire plus de protéines moyennes et majeures lorsque la protéine L est en excès pour ainsi réguler la formation d'enveloppes virales complètes.

B) L'amplificateur I

L'amplificateur I (figure 1.10) possède un effet activateur sur tous les promoteurs du virus (389). Cet amplificateur fonctionne aussi bien dans les lignées hépatiques que dans les lignées non hépatiques (390, 391). Il est situé entre les nucléotides 966 à 1308 (figure 4.1) (392, 393). Il peut être divisé en trois parties, tout d'abord en 5' une partie modulatrice dans laquelle sont retrouvés des sites de liaison pour C/EBP. Ensuite, au centre, il y a la partie appelée noyau de l'amplificateur qui contient des sites pour NF-1, HNF3 α,β,γ , PBF (un facteur non-identifié enrichi au foie), EF-C/RFX-1/MIBP1, AP-1, CREB/ATF-2, eH-TF, HNF4, RXR α /PPAR, COUP-TF1 et C/EBP (297, 374, 390, 393-402). Finalement, il y a la portion 3' dont l'activité dans l'amplificateur I est faible. Cette portion serait plutôt impliquée dans une fonction promotrice pour le gène de la protéine X et contient des sites pour C/EBP et NF-1 (390, 394).

C/EBP fait partie de toutes les portions de l'amplificateur I. Cependant, seul le site présent dans le noyau de l'amplificateur semble être un activateur car lorsque C/EBP est présent en faible concentration il induit l'amplificateur I alors qu'en forte concentration il le réprime par compétition avec des facteurs importants pour l'induction tels que EF-C/RFX-1 et NF1 (390, 393, 394). Par mutagenèse dirigée, il a été démontré que NF1 est essentiel à l'activité de l'amplificateur I (395). Le récepteur nucléaire HNF4 induit l'amplificateur I de façon dépendante de la présence de EF-C (397), tandis que l'hétérodimère RXR α /PPAR, qui lie le même site, active l'amplificateur I de façon indépendante de EF-C (396-398). COUP-TF1, quant à lui, lie également ce site, mais réprime l'activité de l'amplificateur I (397, 398). La protéine p53 lie l'amplificateur I, mais possède un effet répresseur sur celui-ci et cet effet est dépendant de la présence de EF-C (403). Le facteur de transcription HNF3 β induit l'amplificateur I en collaboration avec PBF (399-402). Il a été démontré également que la protéine X est capable d'activer l'amplificateur I via les sites CREB/ATF-2 (297). La dexaméthasone possède un effet activateur sur l'amplificateur I via un site GRE situé aux nucléotides 341 à 370 de HBV (404). Ainsi, ce GRE n'est pas contenu dans l'amplificateur I, mais possède une action activatrice sur celui-ci. De plus, ce site GRE seul ne possède pas d'activité amplificatrice intrinsèque (404, 405). Finalement, l'interféron α combiné à l'interleukine-1 ou au TNF α réprime l'action de l'amplificateur I (406) alors que l'interleukine-6 l'active (407).

C) Le « core promoter », le promoteur pre-C, l'amplificateur II et le NRE.

Le « core promoter » est situé dans une région du virus où plusieurs éléments de régulation ont été localisés. Tout d'abord, deux promoteurs distincts contrôlant la transcription de deux messagers différents y sont retrouvés, soit le « core promoter » (figure 1.10) qui régule l'expression du messager pré-génomique (408) et le promoteur pre-C (figure 1.10) qui contrôle la transcription du messager minoritaire pre-C (409, 410) dont la fonction majeure est de produire l'antigène E (HBeAg). Ces deux promoteurs possèdent chacun leur boîte TATA et leur boîte CAAT (409, 410). La régulation du « core promoter » du virus de l'hépatite B est

essentielle au cycle de vie du virus. Plusieurs facteurs de transcription enrichis au foie ont été décrits comme étant impliqués dans sa régulation. Il y a le récepteur nucléaire HNF4 (411, 412) qui y possède deux sites de liaison soit le site #1 (figure 1.10) qui est restreint à HNF4 uniquement et le site #2 (figure 1.10) qui est plus permissif et qui permet la liaison de quelques autres récepteurs nucléaires tels que l'hétérodimère PPAR/RXR, COUPTF1, ARP1 et TR2 (409-412). Deux sites de liaison pour HNF3 (413, 414), 2 sites pour C/EBP (415-417), 3 sites pour SP1 (418) et deux sites de forte affinité pour FTF (qui sont démontrés importants au chapitre 4) y sont également retrouvés (figure 1.10). Le « core promoter » est également influencé par la protéine X du virus et cela via deux mécanismes distincts. Tout d'abord par un mécanisme de protection puisque HBx est capable, en se liant à p53, de bloquer l'action répressive de p53 sur le « core promoter » (300). Le second mode d'action de HBx consiste en une activation du « core promoter » et cela en se liant par un contact protéine-protéine avec C/EBP. Ce complexe HBx et C/EBP devient alors un inducteur fort (298). Tout récemment, un facteur de transcription de type bZIP appelé E4BP4 a été démontré comme étant un répresseur du « core promoter » et de l'amplificateur II, le tout probablement par interférence de liaison avec d'autres facteurs, dont FTF et HNF4 (419).

Il a été démontré que le promoteur pre-C et le « core promoter » répondent de manières différentes aux facteurs de transcription présents. Alors que HNF4 augmente la production du messenger prégénomique, il réduit la production du messenger pre-C (409, 410). En ce qui concerne TR2, il réprime le promoteur pre-C et n'a aucun effet sur le « core promoter » (410). C'est le contraire pour PPAR/RXR α qui n'a pas d'effet sur le promoteur pre-C, mais qui induit le « core promoter » (410). Cependant COUP-TF1 possède une activité répressive sur les deux promoteurs (410).

Dans cette région se situe également l'amplificateur II (nucléotides 1646 à 1774; figure 1.10) (420, 421) qui possède la capacité d'induire tous les autres promoteurs du virus sauf le « core promoter » et le promoteur pre-C (389).

Certains facteurs de transcription capables de lier cette région peuvent avoir des fonctions dans l'amplificateur II et/ou dans le « core promoter ». C'est le cas de C/EBP (non combiné à HBx) qui semble impliqué uniquement dans l'amplificateur II (416, 417) et pour HNF3 qui, lui, est impliqué dans les deux fonctions (413, 414).

Finalement, en 3' de cette région se retrouve un élément de régulation négative (NRE) (nucléotides 1403 à 1626; figure 1.10) qui serait impliqué dans le contrôle du « core promoter » (422, 423) et de l'amplificateur II (424). Ce NRE est divisé en trois parties (α , β et γ) et des facteurs encore non-identifiés ont été démontrés comme liant ces domaines (422-424).

1.8 Aperçu du projet

Il a été démontré, dans le laboratoire, que l'amplificateur intergénique, situé à environ 2,6 Kb en 5' du site d'initiation de la transcription de l'AFP, dont l'activité est stage-spécifique (ouvert uniquement dans le foie fœtal), est contrôlé entre autres par C/EBP (7, 111, 112). Cet amplificateur porte le nom d'amplificateur intergénique du fait qu'il est situé entre les gènes de l'albumine et de l'AFP et qu'il possède, en transfection, une activité inductrice sur ces deux gènes (65, 115, 116). Au moment de mon arrivée dans le laboratoire, l'étude du promoteur de l'AFP était en cours avec comme facteurs connus HNF1 et NF1 de même que deux facteurs à identifier, soient FTF et LF.

En plus de la connaissance de ces différents facteurs, le laboratoire croyait qu'il existait probablement en 3' du gène de l'AFP d'autres éléments régulateurs importants, responsables de l'ouverture initiale du locus. C'est pourquoi une marche sur le chromosome avait été entreprise pour découvrir à une dizaine de kilobase en aval de l'AFP un nouveau gène nommé alpha-albumine (21). Ce gène, tout comme l'AFP, code pour une protéine sérique membre de la famille de l'albumine, mais celle-ci est exprimée uniquement chez l'adulte avec un patron d'expression réciproque à celui de l'AFP. Dans les 10Kb d'ADN intergénique entre

l'AFP et ALF aucun élément régulateur autre que le promoteur de ALF n'a été identifié (140), annihilant l'hypothèse voulant que d'autres éléments régulateurs soient présents en 3' immédiat du gène de l'AFP. Cette marche sur le chromosome ayant été exécutée chez le rat, il était important de vérifier si ALF était également présent à la même position chez d'autres espèces. Les chapitres 2 et 3 de cette thèse présentent le clonage et l'identification de la localisation chromosomique de ALF humain et de souris ainsi qu'une brève caractérisation de ALF accompagnée d'une analyse de la régulation différentielle existant entre l'AFP et ALF.

Dans la poursuite de l'étude de la régulation du gène de l'AFP, FTF, encore inconnu, a été identifié dans le laboratoire. FTF est un nouveau récepteur nucléaire orphelin membre de la famille FTZ-F1 et exprimé principalement au foie et au pancréas (130). Cette identification ouvrait de nombreuses possibilités quant au rôle possible de FTF soit comme inducteur précoce et sélectif du programme de différenciation hépatique ou soit comme régulateur plus général de gènes hépatiques (ou pancréatiques). Ma contribution dans l'étude de la caractérisation de FTF s'est tout d'abord orientée vers la recherche de cibles potentielles pour FTF dans des promoteurs de gènes hépatiques adultes afin de savoir si FTF était fonctionnel dans le foie adulte. L'inspection de séquences promotrices a alors suggéré que FTF pouvait être impliqué dans la régulation d'un promoteur critique dans le cycle de vie du virus de l'hépatite B (HBV), soit le « core promoter ». Le chapitre 4 de cette thèse présente des résultats, soumis pour une publication, en ce qui concerne le rôle de FTF dans le contrôle du « core promoter » de HBV.

En parallèle, d'autres cibles pour FTF (HNF3, HNF4, HNF1) ont été identifiées dans le laboratoire, suggérant fortement que FTF joue un rôle prépondérant dans la cascade initiale d'événements moléculaires conduisant à la différenciation hépatique (224, 425). En plus, le laboratoire faisait la démonstration que FTF et/ou son facteur associé LF (encore inconnu à ce moment) était la cible directe de la répression du locus AFP par le récepteur des hormones

glucocorticoïdes (140). Le laboratoire s'est alors intéressé aux interactions fonctionnelles et physiques entre FTF et d'autres facteurs clés dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation hépatocellulaires, dont HNF1, HNF4, AP1 et GR. Au chapitre 5 de cette thèse est exposée la mise au point d'un protocole de rétention sur colonne (« pull down ») pour l'étude des interactions protéine-protéines avec FTF ainsi que la description des résultats obtenus de même qu'une étude préliminaire de l'action de coactivateurs sur FTF.

Chapitre 2

Identification du produit du gène de l'alpha-albumine de rat et clonage de l'ADNc de son orthologue humain

Note : Ma contribution à cet article consiste au criblage de l'ADN complémentaire de ALF humain à partir de la banque d'ADN complémentaire de foie humain. J'ai également effectué toute la séquence de cet ADNc. L'hybridation de type Northern ainsi que l'immunodétection ont été réalisés par M. Denis Allard qui est celui qui a généré les anticorps anti-ALF de rat. J'ai également participer au montage de l'article.

2.1 Résumé

L'ARN messenger de l'alpha-albumine de rat encode pour une protéine plasmatique de 80KDa (avec un taux sérique d'environ 20 µg/ml). L'ADNc de son orthologue humain montre une bonne homologie de séquence, cependant quelques divergences sont constatées dans la portion C-terminale de la protéine.

GENE 08534

Identification of rat α -albumin and cDNA cloning of its human ortholog*

(Liver; α_1 -fetoprotein; vitamin-D-binding protein; plasma ligand-binding glycoprotein)

Denis Allard, Stéphane Gilbert, Alain Lamontagne, Diane Hamel and Luc Bélanger

Le Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval, L'Hôtel-Dieu de Québec, Québec G1R 2J6, Canada

Received by C.M. Kane: 9 August 1994; Revised/Accepted: 13 September 1994; Received at publishers: 20 October 1994

SUMMARY

A rat α -albumin mRNA encodes an 80-kDa plasma protein (approx. 20 μ g/ml in adult rat serum). Its 2-kb human ortholog displays extensive ligand-binding core sequence homology, but striking divergence in the C-terminal domain.

We recently uncovered a new albumin-encoding locus 10 kb downstream from the α_1 -fetoprotein (AFP)-encoding gene on rat chromosome 14, and we identified a cognate mRNA transcript in rat, mouse and human liver (Bélanger et al., 1994). The new locus, α ALB for α -albumin, appeared phylogenetically closer to AFP than to albumin (ALB) and was predicted to encode a secreted glycoprotein of > 69 kDa. We have cloned a 408-nt rat α ALB cDNA fragment (aa 8 to 143, Fig. 1C) in prokaryotic expression vector pMAL-c (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Antisera against the α ALB hybrid protein detected an 81.77-kDa doublet in Western blots of adult rat serum (Fig. 1A), suggesting a heterogeneous secretion product more glycosylated than AFP. Semi-quantitative Western reactions indicated that α ALB circulates at approx. 20 μ g/ml in normal adult rat serum (Fig. 1A) (no α ALB was detected in fetal rat serum or rat amniotic fluid, consistent with developmental expression of the α ALB mRNA; Bélanger et al., 1994).

Correspondence to: Dr. L. Bélanger, Research Centre, L'Hôtel-Dieu de Québec, Québec G1R 2J6, Canada. Tel. (1-418) 691-5281; Fax (1-418) 691-5439; e-mail: 2020015@saphir.ulaval.ca

*On request, the authors will supply detailed experimental evidence for the conclusions reached in this Brief Note.

Abbreviations: aa, amino acid(s); AFP, α_1 -fetoprotein; AFP, gene encoding AFP; ALB, albumin; ALB, gene encoding ALB; bp, base pair(s); Humut, human chromosome 4 microsatellite DNA marker STS UT5137; kb, kilobase(s) or 1000 bp; nt, nucleotide(s); STS, sequence-tagged site(s).

A database search for rat α ALB sequence homologies retrieved a DNA marker (Humut5137) of ALB/AFP human chromosome 4 (Gerken et al., 1993). A 133-nt stretch of the 442-nt Humut marker matched the 133-nt third exon of the rat α ALB gene (Bélanger et al., 1994) with 81% nt identity and 89% aa similarity, strongly suggesting that the Humut sequence fell into the human α ALB gene ortholog. When used to probe Northern blots of human liver mRNA, the 133-nt Humut fragment also detected a single 2-kb band, at the same position with rat α ALB cDNA probes. The Humut probe was used to screen a human liver cDNA library, oligo(dT)-primed in the Uni- λ ZAP XR vector (Stratagene, La Jolla, CA, USA, Catalog No. 937224). Inserts were characterized from 53 positive clones: 48 inserts ranged from 1.95 to 2.05 kb, the others were shorter. Ten inserts were sequenced (as before; Bélanger et al., 1994) to a total cDNA length of approx. 1 kb and showed 76% nt identity with rat α ALB cDNA and 100% identity with the Humut probe. Five inserts were sequenced from their 5' end throughout double-loop domain 1 (aa 1 to 207, Fig. 1C; Peters, 1985): all five inserts started within 13 nt upstream from the start codon and they were 100% identical. Four inserts were sequenced from their 3' end, all starting from an approx. 18-A stretch through coding domain 3, also with 100% nt identity. The human cDNA inserts gave the same 2-kb signal with adult human liver mRNA in Northern blots and no signal with fetal-type HepG2 hepatoma cells (Fig. 1B).

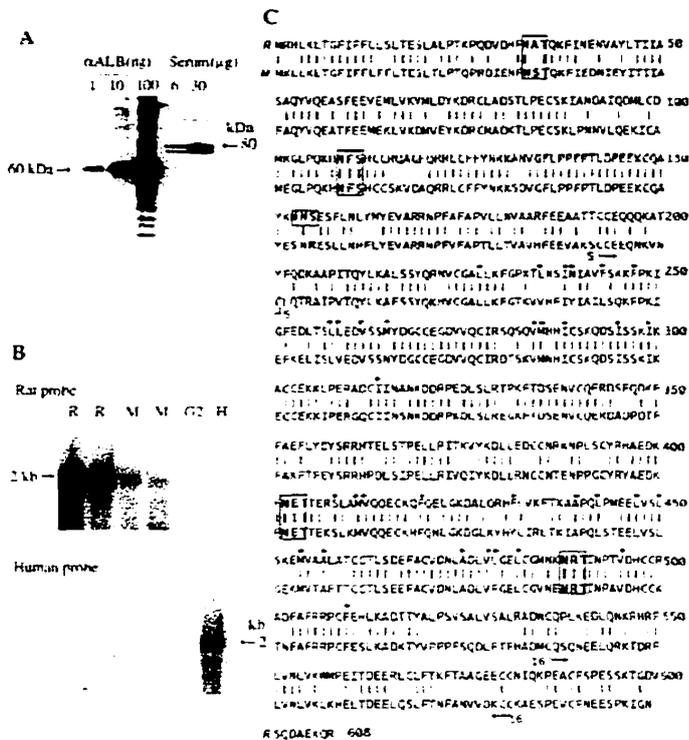


Fig. 1. Analysis of α ALB. (A) Western blot of bacterially expressed rat α ALB fusion protein (60 kDa) and normal adult Sprague-Dawley rat serum (0.1% sodium dodecyl sulfate-10% polyacrylamide gels, rabbit anti-rat α ALB antiserum and the Amersham enhanced chemiluminescence system). No reaction was observed with preimmune α ALB serum or anti-rat AFP serum (nor between anti-rat α ALB and adult mouse or human serum); anti-rat AFP gave a 73-70-kDa doublet in fetal rat serum and anti-rat ALB gave a 66-kDa band in adult rat serum. (B) Northern blot (1.2% agarose gels) of total RNA (20 μ g) from normal adult human (H), rat (R) and mouse (M) livers, and from high-AFP-producing human HepG2 hepatoblastoma cells (G2). The same filter was hybridized with a rat α ALB cDNA probe (top), or with a full-length human α ALB cDNA probe (bottom). (C) Alignment of rat α ALB (R) and its putative human ortholog (H) (Belanger et al., 1994; Gerken et al., 1993; Lichenstein et al., 1994; GenBank accession No. L35486). Asters mark the position of hydrophobic residues in the two ligand-binding cavities of albumin (He et al., 1992). Cys bridges 5 and 16 are indicated and potential Asn glycosylation sites are boxed.

Sequence and Northern analyses provide compelling evidence that Humut-derived cDNA is the human ortholog of rat α ALB. Recently, a sequence was presented of a human albumin-related cDNA, 2.3-kb long and detecting a 2.3-kb transcript in human liver mRNA (Lichenstein et al., 1994); that sequence matches our human α ALB cDNA with 100% nt identity (including the 173-nt 3'-noncoding segment), except for an extra 300-nt leader segment (Lichenstein et al., 1994). Technical grounds must be examined for these mRNA size discrepancies as it seems most unlikely that two human loci would encode the same gene product; also, rat α ALB is a single-copy gene, flanked by a typical liver promoter

with a TATA box 68 bp upstream from the open reading frame and matching a tight DNase I-hypersensitive domain in α ALB-active chromatin (Bélanger et al., 1994); and furthermore serum levels of human (Lichenstein et al., 1994) and rat (Fig. 1A) gene products are in the same range.

The predicted structure of the rat and human proteins (Fig. 1C) indicates stringent conservation of ligand-binding domains 2A/2B and 3A/3B (He et al., 1992) (74% aa identity with the same arrangements of hydrophobic pockets, Cys bridges and N-glycosylation sites) but striking differences outside these domains: two Cys bridges (5 and 16) are missing in rat α ALB, there are fewer N-glycan sites in the human protein, domain 3C drops to 44% aa identity with a 9-aa truncation at the human C terminus, and potentially reactive Trp, free thiol and His residues are not conserved. It has been argued that α ALB might be a phylogenetic progenitor of AFP (Bélanger et al., 1994). Divergences between α ALB orthologs may suggest vestigial or involuting loci, but conserved specificities of α ALB ligand-binding domains could reflect differential selective pressure and highly specialized functions for this low-level plasma component. It is perhaps significant that α ALB is devoid of N-glycan sites in ligand-binding pocket one (where AFP is glycosylated), whereas AFP is unglycosylated in pocket two (where α ALB presumably is).

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Medical Research Council of Canada.

REFERENCES

- Bélanger, L., Roy, S. and Allard, D.: New albumin gene 3'-adjacent to the α -fetoprotein locus. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 5481-5484.
- Gerken, S.C., Matsunami, N., Lawrence, E., Carlson, M., Moore, M., Ballard, L., Melis, R., Robertson, M., Bradley, P., Elsner, T., Tingey, A., Rodriguez, P., Albertsen, H., Lalouel, J.-M. and White, R.: Genetic and physical mapping of simple sequence repeat containing sequence tagged sites from the human genome. GenBank accession No. L16440, 1993.
- He, X. M. and Carter, D.C.: Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 358 (1992) 209-215.
- Lichenstein, H.S., Lyons, D.E., Wurfel, M.W., Johnson, D.A., McGinley, M.D., Leidli, J.C., Trollinger, D.B., Mayer, J.P., Wright, S.D. and Zukowski, M.M.: Afamin is a new member of the albumin, α -fetoprotein, and vitamin D-binding protein gene family. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 18149-18154.
- Peters Jr., T.: Serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 37 (1985) 161-245.

Chapitre 3

Analyse de la structure, de la fonction et de la régulation de l'alpha-albumine

Note : Ma contribution à ce travail est d'avoir produit des anticorps anti-ALF humains, d'avoir fait exprimer ALF humaine de façon procaryote et eukaryote, d'avoir fait le criblage et la séquence de l'ADNc de ALF de souris et d'avoir fait toutes les analyses théoriques sur la séquence protéique de ALF. L'identification du point isoélectrique de ALF et l'analyse de diverses pathologies ont été réalisées par Mme. Diane Hamel avec mon aide. L'analyse des conditions affectant l'expression de l'AFP ont été fait par M. Alain Lamontagne. Le FISH a été réalisé par le Dr. Achilles Dugaiczkyk et le gel à champ pulsé a été fait par Mme. Sylvie Roy avec ma collaboration pour l'hybridation.

Chapitre 3

Analyse de la structure, de la fonction et de la régulation de l'alpha-albumine

3.1 Introduction

La famille de l'albumine comporte quatre membres : l'albumine (ALB), l'alpha-foetoprotéine (AFP), la protéine de liaison de la vitamine D (VDBP) et le tout dernier membre identifié, l'alpha-albumine (ALF). La caractéristique majeure de cette famille de protéines sériques se situe au niveau de leur structure et consiste en la conservation d'un patron de cystéines responsables via la production de 17 ponts disulfures, de la formation de la structure quaternaire. La fonction majeure des protéines de cette famille est de lier différents ligands, de les transporter et de les distribuer aux différents organes les nécessitant.

L'alpha-albumine de rat a été découverte dans le laboratoire d'accueil en 1994 (21), grâce à une marche sur le chromosome en 3' de l'AFP. À la suite de cette découverte, le laboratoire s'est demandé si ALF était également conservée en 3' de l'AFP chez l'humain et chez la souris. De même, il s'est intéressé à sa fonction et à sa régulation. Il était également intéressant de savoir si l'expression de ALF affectait celle de l'AFP et pouvait ainsi être impliquée dans la régulation développementale de l'expression de l'AFP. Dans ce chapitre, sont présentés les résultats obtenus lors du criblage pour ALF de souris ainsi que des résultats sur la localisation chromosomique et la régulation de ALF. De plus, une brève caractérisation (évolution, pl, structure, etc.) de ALF est présentée.

3.2 Matériels et Méthodes

3.2.1 Clonage pour la surexpression de ALF à l'aide de systèmes de surexpression procaryotes et eukaryotes.

A) Production du sous-clone #101 à partir du clone #11 obtenu par criblage

La production du sous-clone #101 a été nécessaire pour la production ultérieure de plusieurs vecteurs. Le clone #11, qui provient du criblage de ALF humain (chapitre 2) et qui contient ALF humain au complet (426) a été digéré par *XhoI* et *EcoRI*, ce qui a extrait un fragment de 1,9Kb contenant l'ADNc de ALF en entier. Ce fragment a ensuite été rempli par le fragment large de la polymérase (klenow) pour générer des bouts francs et a été cloné dans pBluescript+ (SK+, Stratagene) au site *SmaI*, ce qui a généré le sous-clone #101.

B) Clonage dans pGEX-2T de ALF complet (pGEX-2T/ALF)

Le clone #11 a tout d'abord été digéré par *XhoI*, puis ce site a été rempli par la klenow. Par la suite, ce clone partiellement digéré a été digéré par *SmaI*, ce qui a généré un fragment de 1,9Kb franc, contenant tout l'ADNc de ALF. Ce fragment a ensuite été cloné dans pGEX-2T (Pharmacia) au site *SmaI*. Ceci insérait l'ADNc de ALF en phase avec la protéine GST (Glutathione-S-Transférase).

C) Clonage du fragment N-terminal de ALF dans pGEX-2T et dans pMAL-C

Le fragment contenant la portion N-terminal de ALF est un fragment de 500pb généré par une digestion *BamHI* du sous-clone #101. Ce fragment a donc été cloné soit dans le site *BamHI* de pGEX-2T (pGEX-2T/ALFs) ou de pMAL-C (New England Biolab) (pMAL-C/ALFs), l'insérant ainsi en phase des protéines respectives GST ou MBP (Maltose Binding Protein).

D) Clonage de ALF pleine longueur dans pSVK3 (pSVK3/ALF)

Le clone #11 a été digéré par *XbaI* et *XhoI*. Ceci a généré un fragment de 1,9Kb contenant l'ADNc complet de ALF. Celui-ci a été inséré dans les sites *XbaI* et *XhoI* du vecteur pSVK3 (Pharmacia). Ainsi, ALF se retrouvait sous le contrôle du promoteur des gènes précoces de SV40.

E) Clonage de ALF pleine longueur dans pRC/RSV (pRC/RSV/ALF)

Le sous-clone #101 a été digéré par *HinDIII*, puis rempli partiellement par deux nucléotides (A et G) via l'utilisation de la klenow. Ensuite, ce clone a été digéré par *SpeI*. Ceci a généré un fragment de 1,9Kb contenant l'ADNc complet de ALF. Ce fragment a été cloné dans pRC/RSV (Invitrogen) qui avait été digéré tout d'abord par *XbaI* puis rempli partiellement avec deux nucléotides (C et T) et ensuite digéré par *SpeI*. Ceci insérait donc l'ADNc de ALF sous le contrôle du LTR (long terminal repeat) du virus du sarcome de Rous.

F) Clonage de ALF pleine longueur dans pCI (pCI/ALF)

Le clone #11 a été digéré par *EcoRI* et *KpnI* pour obtenir un fragment de 1,9Kb contenant l'ADNc complet de ALF. Ce fragment a ensuite été inséré dans les sites *EcoRI* et *KpnI* de pCI (Promega). Ceci plaçait donc l'ADNc de ALF sous le contrôle du promoteur des gènes précoces de SV40 comme dans le cas du vecteur pSVK3, cependant pCI a l'avantage de fournir un intron entre le promoteur et le site de clonage, intron qui sera épissé et qui fournira ainsi une plus grande stabilité au messenger produit.

G) Génération du vecteur pCI/ALFA

La séquence de polyadénylation comprise dans l'ADNc de ALF cloné dans pCI a été enlevé, tout en conservant le signal d'arrêt de la traduction de ALF. Cette modification entraîna l'utilisation du signal de polyadénylation de SV40 fournit dans le plasmide. Le vecteur pCI/ALF a donc été digéré par *SmaI* et *PvuII*, rempli par la klenow et recircularisé pour obtenir le clone pCI/ALFA. Par conséquent, un fragment d'environ 240pb a été enlevé au vecteur pCI/ALF.

H) Génération du vecteur pCI/ALFAK

La séquence Kozak fournie par l'ADNc de ALF dans le vecteur pCI/ALFA a été modifiée par une séquence Kozak optimale (427). Deux oligonucléotides, un complémentaire à ALF (5'-TTCCTTCTGGCAACTTC-3') et un oligonucléotide correspondant à la séquence Kozak de ALF, mais mutée pour obtenir une séquence Kozak parfaite (5'-CAGGAATTCTGGCACGAGCCACCATGAAACTAC-3') ont été synthétisés. Un PCR a ensuite été exécuté avec les conditions suivantes : activation: 94°C 2min, puis 25 cycles de dénaturation à 94°C 40sec., d'appariement à 45°C 40sec. et d'élongation à 72°C 40sec. le tout suivi par une période de 10min à 72°C. Le fragment de PCR obtenu a ensuite été digéré par *EcoRI* et *BamHI* et cloné dans le vecteur pCI/ALFA préalablement digéré par *EcoRI* et partiellement par *BamHI*.

I) Transfert du fragment ALFAK de pCI à pCINeo

Dans le but d'augmenter la sélection lors des transfections stables, le fragment ALFAK a été cloné dans le vecteur pCINeo (Promega). Pour obtenir le fragment ALFAK, le vecteur pCI/ALFAK a été digéré par *NotI* et *EcoRI* et ce fragment a ensuite été inséré dans le vecteur pCINeo digéré par *NotI* et *EcoRI*.

3.2.2 Surexpression via les systèmes procaryotes

Pour la surexpression dans les systèmes procaryotes, le processus est identique pour tous les systèmes utilisés dans cette thèse. Tout d'abord, il faut à chaque fois inoculer la culture qui sera induite avec une culture bactérienne fraîche, telle une culture de nuit des bactéries contenant le vecteur à surexprimer. Un volume X de LB est inoculé avec X/100 volume de cette culture de nuit (exemple : 500 ml de culture seront induits avec 5ml de la culture de nuit). Ces inoculats sont ensuite incubés à 37°C sous agitation le temps nécessaire pour que la culture atteigne une densité optique, à 600nm, entre 0,4 et 0,7. À ce moment, un millilitre de culture est prélevé et servira de contrôle avant induction (T0) puis la production de la protéine de fusion est induite en

ajoutant au milieu de culture de l'IPTG pour obtenir une concentration de 0,1mM. et la culture est incubée le temps désiré.

Une fois l'induction terminée, les bactéries sont centrifugées à basse vitesse (1500 RPM) une dizaine de minutes pour séparer les bactéries du milieu de culture. Ensuite, c'est l'étape de l'extraction. Celle-ci peut être faite de plusieurs façons. Il y a tout d'abord le gel-dégel à répétition. Il s'agit d'incuber, en alternance, les bactéries, qui ont été resuspendues dans du PBS 1X, 5 minutes dans un bain de glace sèche – éthanol et 5 minutes dans un bain à 37°C et cela 3 à 4 fois, dans le but de faire éclater les membranes bactériennes pour qu'elles libèrent leur contenu protéique. Le second procédé est d'utiliser les lysozymes qui digèrent la membrane bactérienne afin de libérer le contenu protéique de la bactérie. Les lysozymes sont dilués par un facteur 1/100 à partir d'une solution préparée à 5µg/ml, la réaction se fait à 4°C pendant environ 10 minutes. Régulièrement l'utilisation des lysozymes est combinée à l'ultrasonication qui peut également s'effectuer seule. L'ultrasonication consiste à faire éclater les membranes bactériennes par l'utilisation d'ultrasons en utilisant la microsonde, à sa limite maximale d'utilisation pendant 10 secondes.

Une fois l'extraction terminée, l'étape suivante c'est la migration sur gel. La plupart du temps des gels SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate – polyacrilamid gel electrophoresis) de 8,5% ou de 10% ont été utilisés, avec un gel d'empilement de 3%. La migration s'effectue à 100 volts dans le tampon d'électrode (25mM tris-base, 200mM glycine, 0,1% SDS). Après la migration, le gel est démoulé puis fixé 5 minutes (fixateur : 40% méthanol, 10% acide acétique), pour être coloré par la suite au bleu de Coomassie 15% pendant une vingtaine de minutes et décoloré suffisamment de temps pour bien distinguer les protéines (décolorant : 10% méthanol ou éthanol, 10% acide acétique).

3.2.3 Purification de la protéine de fusion GST/ALFs

La purification de la protéine de fusion GST/ALFs a été assez ardue car celle-ci demeurait dans la portion insoluble de l'extrait. Ainsi, de grandes quantités d'extraits bactériens induits ont été déposées sur des gels SDS-PAGE préparatifs à 8,5% (avec un gel d'empilement de 3%) et de 1,5mm d'épaisseur migrés à 100mA. Par la suite, les gels étaient colorés au CuCl_2 0,3M pendant 30min. et décolorés 4 x 30min. dans le tampon de décoloration (0,25M Tris pH9.0 et EDTA 0,25M). La bande correspondant à la protéine GST/ALFs était ensuite découpée et homogénéisée dans le tampon d'éluion (50mM Tris/HCl pH8.0; 0,15M NaCl; 0,1% SDS) et maintenue à 4°C toute la nuit sous agitation. Par la suite, les protéines purifiées subissaient une dialyse de 4 x 1 heure dans 1 litre de PBS, puis, celles-ci étaient concentrées sur des centricones (Millipore).

3.2.4 Production de l'anticorps anti-ALF humain

À l'aide des protéines de fusion GST/ALFs purifiées, des anticorps anti-ALF humain ont été générés en immunisant un lapin. Ce dernier a donc été immunisé avec 100 μg de protéines purifiées lors de la première injection et avec 200 μg les quatre injections suivantes, et les injections se faisaient en présence d'adjuvant de Freund complet. Chacune des injections a été exécutée avec un intervalle de trois semaines.

3.2.5 L'immunodétection (le « western »)

Les conditions des différentes immunodétections sont en général semblables. Pour les sérums, 5 μl d'une dilution 1/25 étaient déposés sur des gels SDS-PAGE migrés à 100 volts. Les gels étaient ensuite transférés sur des membranes de Nylon (immobilon P, Millipore) par électrotransfert dans le tampon de transfert (25mM tris, 0,2M glycine, 0,02% SDS et 20% méthanol) pendant une nuit à 20 volts (ou 2 à 3 heures à 75 volts) avec réfrigération. Les membranes étaient ensuite asséchées pendant une dizaine de minutes à l'air libre. Une fois sèches, ces dernières étaient réactivées par une incubation de 5min dans le méthanol et ensuite par 3 incubations de 3min dans le TBS-tween

(20mM Tris-base, 20mM Tris/HCl, 0,2M NaCl et 0,1% Tween20). Par la suite, les membranes étaient bloquées 1 heure dans le TBS-tween additionné de 0,5% de lait en poudre (TBS-tween+lait). Ensuite, les membranes étaient incubées dans le TBS-tween+lait pour une période d'au moins 2 heures en présence d'une dilution 1/10 000 de l'anticorps anti-ALF humain ou rat. Après cette incubation, les membranes étaient lavées dans le TBS-tween 4 x 20min puis elles étaient incubées 1 heure dans le TBS-tween+lait en présence d'une dilution 1/10 000 d'un second anticorps, un anti-IgG de lapin couplé à la peroxidase (Amersham). Finalement, les membranes étaient à nouveau lavées 4 x 20min dans le TBS-tween et étaient révélées à l'aide d'une trousse de chemiluminescence (Renaissance ou Dupont).

3.2.6 Transfections stable et transitoires

La culture des cellules a été effectuée dans les mêmes conditions pour toutes les lignées cellulaires utilisées (Morris 7777v.7-6, H4IIECIII, HepG2, HeLa, 293). Elles ont toutes été cultivées dans du milieu de culture « DMEM low glucose » (Gibco) avec 10% de sérum de bœuf fœtal (FBS, Wisent) et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco), à 37°C dans 5% de CO₂. Lors des expériences de surexpression de ALF en milieu minimal, aucun sérum n'était ajouté au milieu de culture toutefois 25nM d'insuline et 3,3nM d'EGF (epidermal growth factor) étaient ajoutés.

Les transfections transitoires et stables ont été réalisées par la technique du précipité calcium-phosphate tel que décrit auparavant par Guertin et Al. (144). Toutes les transfections transitoires ont été exécutées avec 5µg ou 10µg de la construction à exprimer et 2,5µg de pRSVlacZ comme standard interne pour évaluer l'efficacité de transfection. Dans les transfections transitoires les cellules étaient étalées à 2,5x10⁶ par flasque de 75cm². L'expression de protéines et l'activité CAT étaient mesurées 48 à 72 heures après la transfection avec un lavage à l'Hepes 10mM après 16 heures.

Pour les transfections stables, les cellules étaient étalées à $0,5 \times 10^6$ par flasque de 75cm^2 . Les transfections stables se faisaient avec $10\mu\text{g}$ du vecteur contenant le gène de résistance à la néomycine (Neo) et le gène à exprimer. Lorsque le vecteur ne contenait pas le gène Neo, il était cotransfecté en ajoutant, à $20\mu\text{g}$ du vecteur contenant le gène à exprimer, $0,4\mu\text{g}$ de pRC/RSV. Les clones stables ont été sélectionnés en ajoutant du G418 (Gibco) dans le milieu de culture à une concentration de $350\mu\text{g/ml}$ pour les Hela et les H4IIECIII, de $250\mu\text{g/ml}$ pour les Morris 7777v.7-6 et de $500\mu\text{g/ml}$ pour les 293. La sélection durait en moyenne une dizaine de jours.

3.2.7 Le criblage de ALF de souris

Une banque d'ADNc de foie de souris mâle Balb/c cloné dans $\lambda\text{gt}11$ de Clonetech (ML 1001B, Lot #7801) (qui a été fournie par le Dr. Robert Tanguay) a été criblée avec une sonde provenant de l'ADNc de ALF de rat (S22; 1,6Kb,(21)). Un total de 120 000 pfu ont été criblées dans cette première ronde et 8 clones ont été obtenus dont 2 différents (1,6Kb et 850pb). Un deuxième criblage a été entrepris avec cette même banque 480 000 pfu ont été criblées avec une nouvelle sonde (w3) extraite des clones issus du premier criblage et contenant les exons 3 à 5 de ALF de souris, 2 clones identiques ont ainsi été obtenus (1,6kb). Le dernier criblage a été exécuté exactement comme le précédent 558 000 pfu ont été criblées et 7 clones (tous identiques aux 2 clones de la ronde précédente) ont été obtenus. Au total, 3 criblages différents ont été exécutés où 1 158 000 pfu ont été criblées, 17 clones ont été obtenus et 3 se sont révélés différents. Cependant aucun de ces clones ne s'est avéré contenir le gène de ALF de souris complet et tous étaient en fusion avec un autre gène.

3.2.8 FISH – Hybridation sur chromosomes mécaniquement allongés

Le FISH a été réalisé par le Dr Achilles Dugaiczky et le tout est décrit dans la publication : Nishio et Al. 1996, *J. Mol. Bio* **259**(1), p.113-9.

3.2.9 Gel à champ pulsé

La migration, sur gel à champ pulsé, d'ADN génomique, a pour avantage de permettre de bien séparer les fragments d'ADN de grande taille. Pour procéder, il faut tout d'abord digérer l'ADN par des enzymes de restriction ne coupant pas trop fréquemment dans le génome de l'espèce étudiée. Dans ce cas-ci, les enzymes de restriction : *BssHI*, *BstEI*, *NarI* et *SstI* ont été utilisées. La digestion se fait dans des blocs d'agarose LMP (low melting point) à 1% dans lesquels est ajouté 80µg d'ADN génomique. Les blocs d'agarose sont traités à la protéinase K pendant 36 heures à 55°C puis lavés 30min à 55°C sous agitation dans du TE+PMSF (0.1mM) suivi de 4 à 5 lavages de 20min dans le TE seul à 55°C. Par la suite, les blocs sont incubés dans le tampon de restriction correspondant à l'enzyme de restriction qui sera utilisé, pendant 30min à 4°C. Puis le tampon est changé, 50U de l'enzyme de restriction désiré sont ajoutées et le tout est incubé à la température recommandée pour cet enzyme pendant une nuit (16 heures). La réaction est ensuite arrêtée avec 100mM EDTA. Ensuite, les blocs sont mis dans un gel d'agarose LMP de 1% migré à 200 volts avec des pulsations variant entre 0.2 et 1.3 sec. durant 24 heures à 14°C. Par la suite, le gel est transféré comme pour un Southern (428) et hybridé avec les sondes désirées.

3.2.10 Logiciels utilisés pour les analyses d'homologie, de phylogénie et leur présentation.

Pour les comparaisons de séquence, deux logiciels ont été utilisés, soit clustalW 1.7 (429) et Lalign (<http://vega.igh.cnrs.fr/bin/lalign-guess.cgi>). Pour la présentation de la comparaison, le logiciel Boxshade 3.2 (disponible sur le site web <http://mic7.hensa.ac.uk/mirrors/iubio/molbio/align/boxshade/>) a été utilisé. Pour l'arbre phylogénique, la compilation a été effectuée à l'aide de deux logiciels soit clustalW 1.7 (429) et Phylip 3.5 ((430) disponible : <ftp://ftp.bio.indiana.edu/molbio/evolve/phylip3.5/>) et pour la présentation de l'arbre le logiciel Drawtree a été utilisé via le site web Biology Workbench 3.1Beta (<http://sif.ncsa.uiuc.edu/>).

3.2.11 Calcul du point isoélectrique

Le calcul des points isoélectriques théoriques a été effectué avec le logiciel pI du GCG 8.0. Pour les valeurs expérimentales, une électrophorèse bidimensionnelle a été exécutée. Un échantillon de sérum humain (1,5 μ l) ou de rat (1,5 μ l) a tout d'abord été déposé sur des carottes de 3.3% d'acrylamide. Ces carottes étaient d'une longueur et d'un diamètre de 10cm et de 2mm respectivement, elles contenaient 4% d'ampholine allant du pH 3 à 10. Ces expériences ont été faites en présence ou en absence d'urée (9M). Ces carottes, qui avaient préalablement subi une pré-électrophorèse de 15min. à 200 volts et de 45min. à 300 volts, ont donc migrées toute la nuit à 250 volts avec comme tampon supérieur du NaOH 0,02N et comme tampon inférieur de l'acide phosphorique 0,01M. Pour la migration dans la seconde dimension, les carottes (équilibrées auparavant dans le tampon d'électrophorèse) étaient déposées sur un gel SDS-PAGE de 8,5% avec un gel d'empilement de 3%. Puis, le tout a migré à 150 volts environ 3 à 4h. Ces gels ont ensuite été démoulés et une immunodétection et une coloration standard ont été effectuées.

3.3 Résultats

3.3.1 Surexpression de ALF dans des systèmes procaryotes

Les différents clones obtenus lors du criblage de l'ADNc de ALF humaine ont été décrits au chapitre 2. Dans cette section, sont présentées les constructions effectuées avec ces clones afin d'obtenir une surexpression de l'alpha-albumine.

Différents clonages ont été effectués pour surexprimer ALF humaine à l'aide de systèmes de surexpression procaryote, dans le but d'obtenir une protéine pure afin de générer des anticorps anti-ALF humain. Et si la quantité surexprimée le permettait, faire quelques essais préliminaires pour caractériser la fonction de ALF. Le gène ALF pleine longueur a donc été inséré dans plusieurs vecteurs commerciaux, soit : pTRCHis, pGEX-2T, pMal-C, pMAL-P et pET15b. Parmi ces vecteurs, la production d'une protéine complète n'a été détectée qu'avec le vecteur pGEX-2T mais en très faible quantité et accompagnée de beaucoup de dégradation (figure 3.1A). Alors, ALF a été tronquée (ALFs) pour surexprimer uniquement sa portion N-terminale (les 150 premiers acides aminés) puisque l'efficacité de la surexpression bactérienne est inversement proportionnelle à la taille de la protéine surexprimée. Ainsi, plus la protéine à exprimer sera petite plus sa production sera bonne. La portion N-terminale a donc été clonée dans les vecteurs pMAL-C, pMAL-P et pGEX-2T. À la figure 3.1, il est possible de voir une bonne surexpression pour pGEX-2T/ALFs (figure 3.1B) et pMAL-C/ALFs (figure 3.1D,E). Dans les deux cas cependant, les protéines de fusion demeuraient, lors de l'extraction, dans la portion insoluble. Cette insolubilité des protéines de fusion serait due à la présence dans celles-ci du peptide signal de ALF qui est très hydrophobe. Malgré plusieurs variations dans la méthode d'extraction, ces protéines demeuraient toujours bloquées dans les membranes bactériennes. C'est pourquoi la protéine a été purifiée mécaniquement, en déposant de grandes quantités d'extrait induit sur des gels

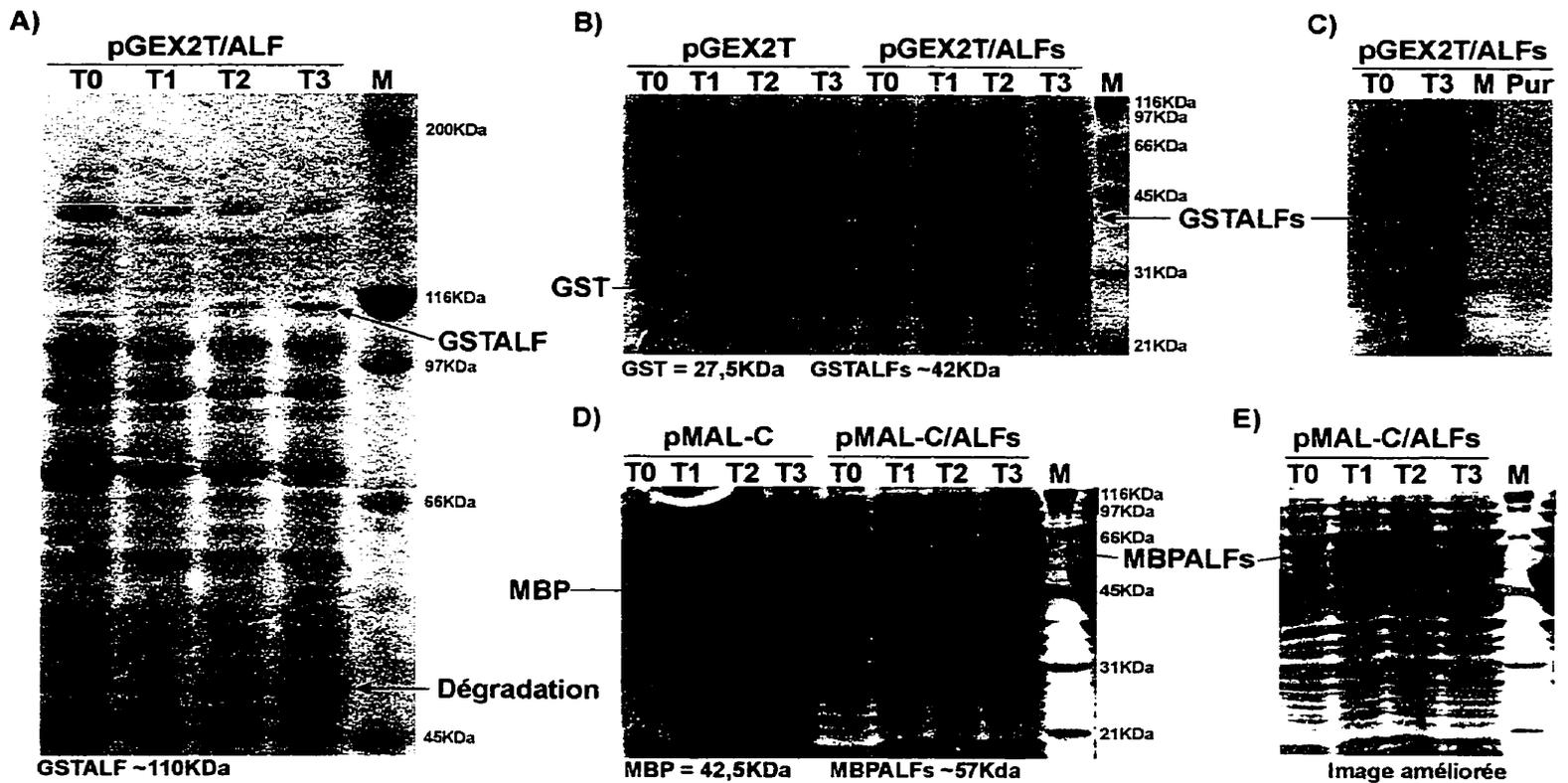


Figure 3.1. Surexpression de la protéine ALF complète ou partielle via l'utilisation de systèmes d'expression procaryote et purification de la forme partielle. **A)** Surexpression de GST/ALF complet à partir du vecteur pGEX-2T/ALF. Une légère expression de ALF complet est détectée à environ 110KDa et beaucoup de dégradation à environ 50KDa. T0, T1, T2 et T3 correspondent aux temps 0, 1, 2 et 3 heures après l'induction et M correspond au marqueur de poids moléculaire. **B)** Surexpression de GST comme contrôle de surexpression et de GST/ALFs qui contient un fragment N-terminal de ALF fusionné à GST. La production de protéines à 27,5KDa pour GST et à 42KDa pour GST/ALFs est détectée confirmant la surexpression du fragment N-terminal de ALF. **C)** Purification de GST/ALFs à partir du temps 3 heures (T3). La purification est bonne puisque aucune autre protéine n'est présente et qu'aucune trace de dégradation n'est décelée (piste: Pur). **D)** Surexpression de MBP comme contrôle d'expression et de MBPALFs produit par le vecteur pMAL-C/ALFs. La surexpression est bonne pour MBPALFs qui ne contient qu'une portion N-Terminale de ALF. En **E)** est présentée une image traitée par ordinateur pour permettre une meilleure illustration de l'expression de MBPALFs.

préparatifs et en découpant la bande de protéine correspondant à la protéine de fusion visualisée grâce à une coloration au CuCl_2 . Par la suite, les protéines que contenait cette bande étaient homogénéisées, dialysées et concentrées. Le choix de purifier la protéine de fusion GSTALFs (soit celle obtenue à partir de pGEX2T-ALFs) plutôt que celle provenant de pMAL-C/ALFs a été fait pour deux raisons. Premièrement parce que la portion de fusion GST est plus petite (27,5Kda) que celle de pMAL (MBP=42,5-Kda) ce qui était préférable pour l'immunisation et deuxièmement parce que ce système (GST) était avantageux pour d'éventuelles expériences de liaison. Le résultat de cette purification est présenté à la figure 3.1C. La protéine de fusion n'est pas dégradée et elle est bien purifiée car aucune autre protéine n'est présente. Un lapin a donc été immunisé avec cette protéine afin d'obtenir des anticorps anti-ALF humain.

3.3.2 Mise au point de l'immunodétection avec les anticorps anti-ALF humain

Après 3 injections avec 100 μg de protéines pour la première et 200 μg pour les injections suivantes, une première saignée provenant du lapin immunisé a été testée en ce qui a trait à la présence d'anticorps polyclonaux anti-ALF humain. Avec cette saignée ont été mis au point les conditions pour effectuer des immunodétections avec les anticorps qu'elle contenait (figure 3.2A). Une première immunodétection a été faite en déposant sur les gels des sérums de rat (R) et d'humain (H), de la protéine de fusion ALF (P) et un contrôle négatif (N) (consistant en un extrait protéique de cellules de la lignée Morris 7777v.7-6). Plusieurs dilutions de la première saignée ont été utilisées et deux dilutions du sérum pré-immun. Les anticorps contenus dans le sérum du lapin immunisé reconnaissent bien la protéine de fusion, ils n'hybrident pas avec des protéines non spécifiques dans le contrôle négatif et ils reconnaissent de façon spécifique ALF humaine car ALF de rat n'est pas reconnu (figure 3.2A). Ainsi les anticorps de cette première saignée peuvent être utilisés avec une dilution de 1/3000 pour obtenir une immunodétection claire et précise. Avec le sérum pré-immun aucune

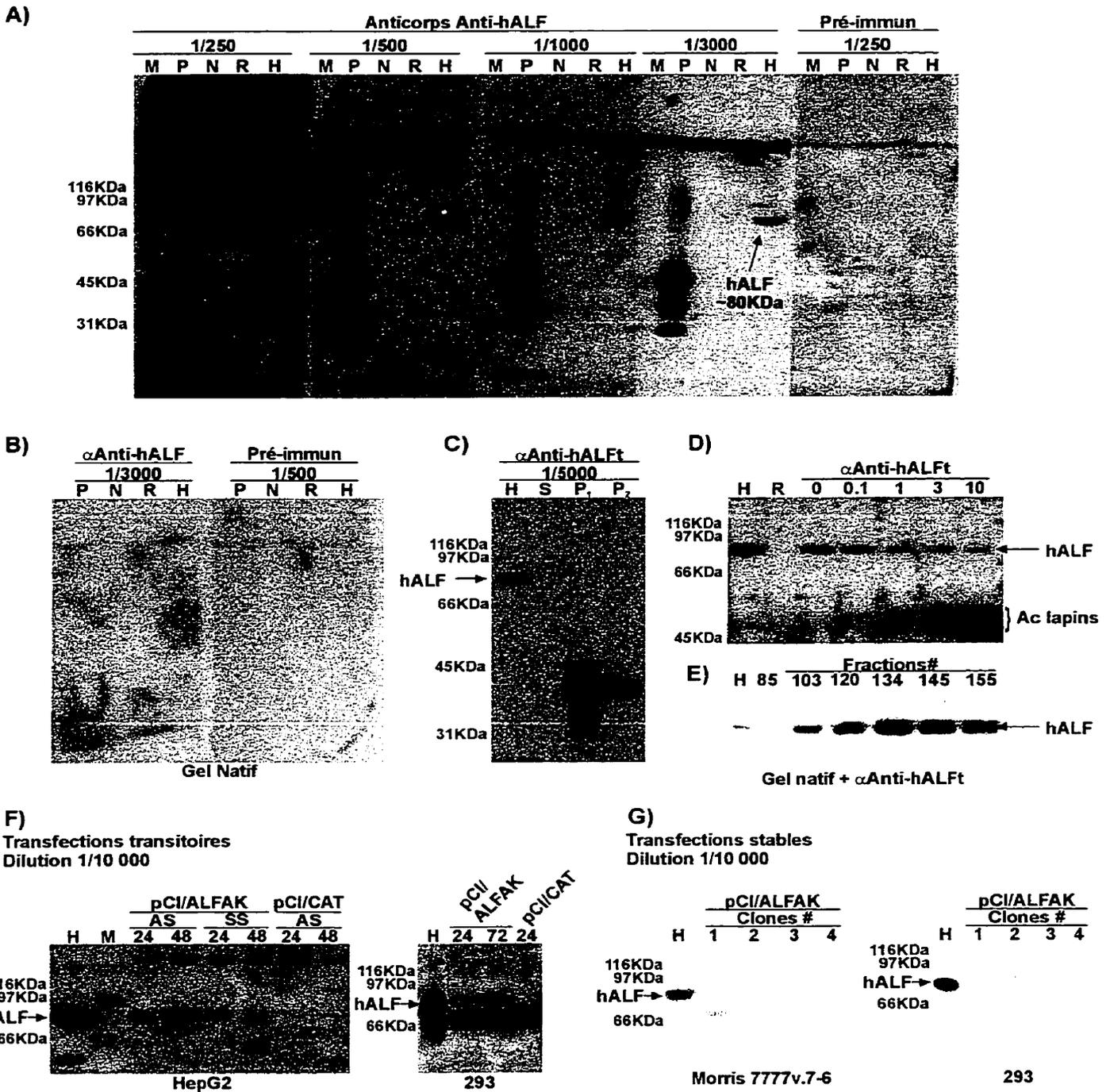


Figure 3.2

réaction n'est détectée à une dilution de 1/250, confirmant la spécificité des anticorps (figure 3.2A). En regardant ALF humaine, il est possible de remarquer que cette dernière ne possède qu'une seule forme, possédant un poids moléculaire d'environ 77KDa, alors que chez le rat deux formes sont présentes (figure 1A du chapitre 2) avec des poids d'environ 77 et 81KDa. Les anticorps de cette première saignée sont cependant incapable de reconnaître la forme native de ALF (figure 3.2B).

L'immunisation du lapin a donc été poursuivie avec deux injections supplémentaires, puis une saignée totale du lapin a été exécutées. Une vérification à savoir si ces nouveaux anticorps étaient encore spécifiques, s'ils étaient plus concentrés et s'ils avaient plus d'affinité a été exécutée. Ces anticorps sont encore très spécifiques à ALF humaine (figure 3.2C,D) car aucune immunodétection ne se fait avec ALF de rat ou de souris. Ils sont également plus concentrés car des dilutions de l'anticorps de 1/5000 et même de 1/10000 suffisent pour la visualisation de ALF de façon claire et précise (figure 3.2C,F,G). En condition native, les anticorps provenant de cette saignée totale sont capables de reconnaître la forme native de ALF en solution lors d'immunoprécipitation (figure 3.2D) et en immunodétection sur le sérum humain et plus fortement sur des fractions enrichies par chromatographie sur colonne de ConA sépharose (figure 3.2E). Ainsi les anticorps provenant de cette saignée totale sont encore spécifiques, plus concentrés et possèdent une plus grande affinité pour ALF. Par conséquent, les conditions optimales pour une immunodétection de ALF humaine sont d'utiliser un gel de SDS-PAGE de 8,5% avec un gel d'empilement de 3%, de migrer et de transférer de façon standard. Pour l'immunodétection, tout le protocole est standard et l'utilisation d'une dilution 1/10000 de l'anti-ALF humain provenant de la saignée totale est conseillée pour une exposition de 30 secondes à 1 minute.

3.3.3 Surexpression de ALF humain dans des cellules eukaryotes

Ces anticorps anti-ALF humain sont alors devenus un outil de vérification important pour la poursuite du projet qui était de surexprimer ALF humain en culture cellulaire dans le but de la purifier afin de faire des analyses de liaison avec différents ligands. Pour ce faire, l'ADNc complet de ALF humaine a été inséré dans plusieurs vecteurs d'expression eukaryote. Tout d'abord, il a été inséré dans pSVK3, ce qui le plaçait sous le contrôle du promoteur des gènes précoces de SV40. Des transfections transitoires et stables respectivement dans la lignée HepG2 et dans les lignées Morris 7777v.7-6 et Hela ont été faites avec ce vecteur. Aucune de ces transfections n'a permis la surexpression de ALF. L'ADNc de ALF a donc été cloné dans un autre vecteur soit pRC/RSV, ce qui le mettait sous le contrôle du LTR (Long terminal repeat) du virus du sarcome de Rous. Des transfections ont été effectuées dans les mêmes lignées que précédemment sans toutefois obtenir plus d'expression.

Le vecteur pCI, dans lequel l'ADNc de ALF humain est inséré sous le contrôle du promoteur des gènes précoces de SV40 a été utilisé. À la différence de pSVK3, pCI possède un intron situé entre le promoteur de SV40 et le site de clonage multiple. L'ajout de cet intron augmente la stabilité et la durée de vie du messenger produit car la présence de celui-ci entraîne une prise en charge du messenger produit par la machinerie d'épissage. Le vecteur pCI/ALF a été transfecté de façon transitoire dans les HepG2 et de façon stable dans les Morris 7777v.7-6. Toutefois, encore aucune expression détectable n'a été obtenue. Pour poursuivre, le signal de polyadénylation de ALF a été enlevé afin d'utiliser celui fourni par le vecteur pCI et ainsi obtenir le vecteur pCI/ALFA. Ce vecteur a été transfecté de façon stable et transitoire sans obtenir de surexpression. Par la suite la séquence Kozak du cDNA de ALF n'étant pas optimale (427) une mutation de celle-ci a été effectuée, pour la remplacer par une séquence parfaite (427) et ainsi obtenir le vecteur pCI/ALFAK. Entre temps, la lignée 293 originant de cellules de rein embryonnaire transformées et démontrées comme étant la meilleure lignée pour l'expression avec pCI (Promega Notes #49) était obtenue

par le laboratoire. Ce nouveau vecteur a donc été transfecté de façon transitoire dans les HepG2 et les 293 et de façon stable dans les Morris 7777v.7-6, les Hela, les H4IIECIII et les 293. Finalement, une expression a été détectée lors des transfections transitoires dans les lignées HepG2 et 293 (figure 3.2F), alors que de façon stable aucune expression n'a été détectée (figure 3.2G). Une ultime modification a donc été faite pour tenter une dernière fois d'exprimer ALF de façon stable. Le fragment ALFAK a été transféré de pCI à pCINeo pour ainsi augmenter l'efficacité de la sélection des clones stables. Toutefois, aucune expression n'a été obtenue et les tentatives de surexpression en culture cellulaire ont été arrêtées.

3.3.4 Criblage de l'ADNc pour ALF de Souris

Le criblage d'une banque d'ADNc de foie de souris a été effectué pour obtenir ALF de souris. 120 000 pfu ont tout d'abord été criblés avec une sonde correspondant à ALF de rat (s22) (21) et 8 clones dont deux différents ont été obtenus. Un second et un troisième criblage ont été exécuté, avec une sonde issue des clones du premier criblage. Un total de 1 038 000 pfu ont été criblés dans ces deux autres criblages et 19 clones identiques ont été obtenus. Néanmoins, ces clones identiques étaient différents de deux autres clones obtenus auparavant. Au total, 3 clones différents ont donc été obtenus. Toutefois, aucun de ces 3 clones n'était pleine longueur et ces ADNc étaient tous en fusion avec des ADNc encodant d'autres gènes. Avec ces 3 clones 80% de la séquence de ALF de souris a pu être déterminée. Au niveau de la séquence protéique, il ne manque que les 55 premiers acides aminés et un fragment interne de 50 acides aminés situé entre les acides aminés 245 et 294 inclusivement (figure 3.3). Deux années plus tard, soit en 1998, la séquence complète de ALF de souris a été soumise à la GenBank (numéro d'accèsion :AJ011080). La séquence protéique complète de ALF de souris est présentée à la figure 3.3, dans celle-ci sont soulignées les portions obtenues lors

Clivage
↓

1 MRHLKLTGFIFFLPLTESLALPTKPDVDHF~~NAT~~OKFIDENTAYLAI IA 50

51 FSQYVQEASFDEVETLVKVMLDYRDRCWADNTLPECSKTANDAIQDMLCD 100

101 MEGLPOKH~~NFS~~HCCGKAGFPRRLCFFYNKKANVGFLPPFPFLDPEEKCOA 150

151 YK~~N~~KS~~E~~SFLHLYMYEVARRNPFVFA~~P~~VLLAVA~~A~~WFEEAATTCCEQQOKAT 200
N G

201 CFQAKAAPITQYLKASSSYQRNVC~~G~~ALIKFGPKVLNSINVAVFSK~~K~~FPKI 250

251 GFKDLTTLLEDVSSMYEGCCEGDVVHCIRSQSQVENHICSKQDSISSKIK 300

301 VCCEKKT~~L~~EREACIINANKDDRPEGLSLREAKFTESENVCOERDSDPKF 350

351 FAEFIYEYSRRHPDLSTPRLRLITKVYMDFLEDCCSREN~~P~~AGCYRHVEDK 400
E

401 ~~E~~NETTORS~~L~~AMVQOECNOFOELGKDTLORHFLVKFTKAAPOLPMEELVSL 450
T K

451 SKEMVAALTTCC~~T~~LSDEFACVDNLADLVLGELCGVNT~~NRT~~INPAVDH~~C~~CK 500

501 TDFAFRRHCFEHLKADTTYALPSVSALVSALHTDWCOPRKEDLQNK~~K~~HRF 550

551 LVNLV~~K~~WMPGITDEEWL~~C~~LFTKFTAAREECSEVOEPESCFSPESSKTGDE 600

601 SQATENKITDQ 611
KQR* 608

Figure 3.3. Séquence protéique de ALF de souris. Les segments soulignés correspondent aux portions de ALF commune entre ma séquence et la séquence soumise à la GenBank (numéro d'accèsion: AJ011080). Les acides aminés sous la séquence indiquent les quelques différences entre les séquences. Les sites potentiels de N-glycosylation (N-x-S/T où x n'est pas une proline) sont encadrés. Les tryptophanes sont en gras et la cystéine libre est identifiée par un astérisque. Le site de clivage potentiel du peptide signal pendant la sécrétion est également indiqué.

de la séquence des clones issus des criblages et les quelques variations d'acides aminés existant entre les deux séquences sont également indiquées. La différence majeure entre celles-ci se situe à la fin de la protéine. La séquence obtenue prédit une protéine de 608a.a., alors que la séquence publiée présente une protéine de 611a.a. (figure 3.3). Il semble que cette variation est due à une différence au niveau de la séquence nucléotidique représentant deux formes différentes de la protéine.

3.3.5 Localisation de ALF en 3' de L'AFP chez l'humain et la souris

Sachant que ALF, chez le rat, est situé en 3' de l'AFP sur le chromosome 14, il était important de savoir s'il était conservé en 3' de l'AFP chez l'humain et la souris. Ainsi, le Dr Achilles Dugaiczky, a fait une hybridation sur chromosome allongé (FISH) avec ALF humaine, l'albumine et l'AFP (figure 3.4A-B). Il est clair que ALF est bel et bien située en 3' de l'AFP qui, elle, est située en 3' de l'ALB (Figure 3.4A). La polarité de ALF est également la même que chez le rat car lorsque des sondes ALF 5' (ALF9) et ALF 3' (ALF15) sont utilisées, il est possible de voir que ALF9 se situe plus près de l'AFP que ALF15 confirmant ainsi la polarité 5'→3' de ALF (figure 3.4B). Pour la souris, ALF se situe également en 3' de l'AFP et ceci a été démontré à l'aide de gels à champ pulsé (figure 3.4C). L'hybridation de ces gels avec des sondes pour l'AFP et pour ALF montre que des fragments de restriction communs sont hybridés. Ainsi, un fragment *Bst*EI de 38,7Kb contient des portions codant pour ALF et l'AFP (figure 3.4C). Également un fragment de 9,8Kb obtenu par digestion avec *Sst*I cohybride avec les sondes ALF et AFP (figure 3.4C). Par conséquent, il est possible d'affirmer que ALF se situe à une distance d'un maximum de 10 Kb de l'AFP et que ALF se situe en 3' de l'AFP car les sondes utilisées ne pourraient pas cohybrider des fragments aussi petits que 38,7 et 10 kb, si ALF était située en 5' de l'AFP. De plus, il est connu que c'est l'albumine qui se retrouve en 5' de l'AFP chez la souris. Ainsi ALF est située en 3' de l'AFP sur le chromosome 14 du rat, 4 chez l'humain et 5 chez la souris.

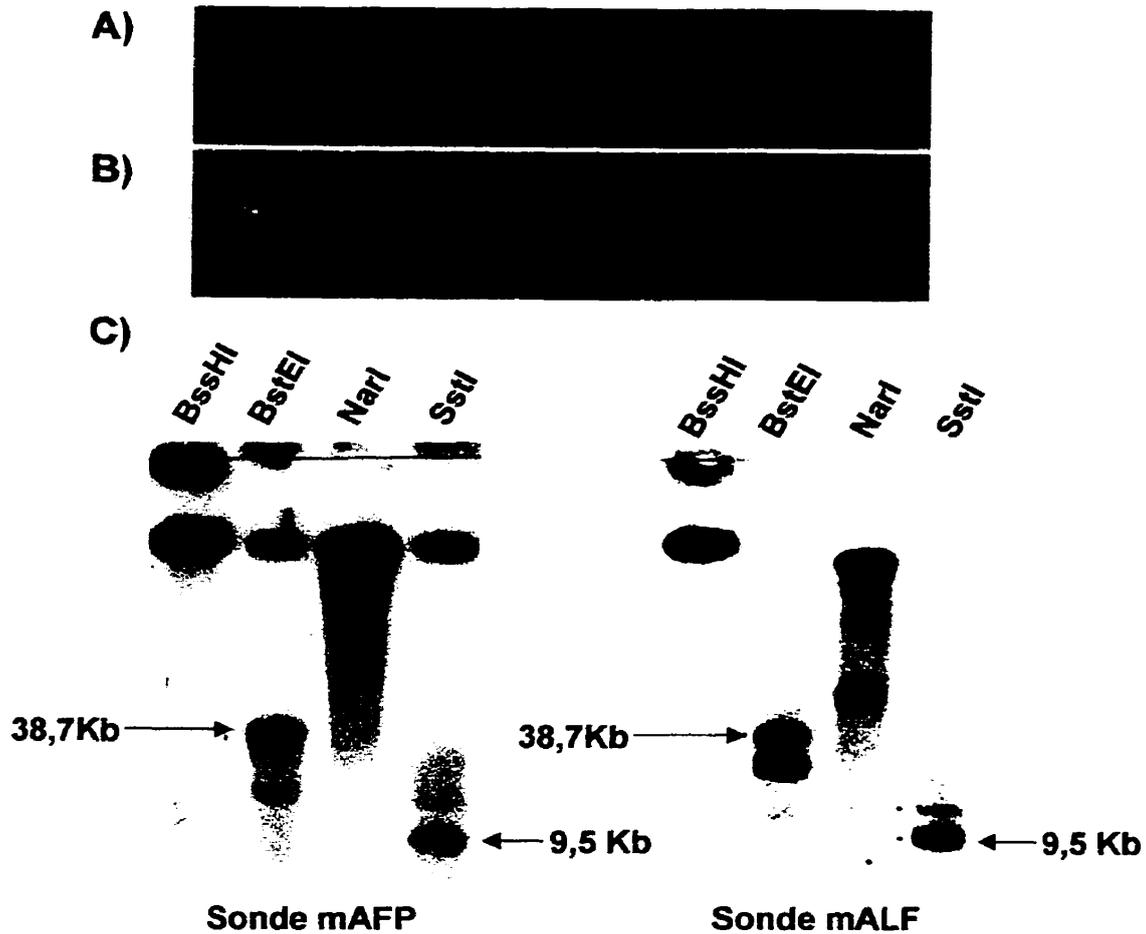


Figure 3.4. Démonstration de la liaison sur le chromosome entre l'AFP et ALF chez l'humain et la souris. A-B) images digitales de clones λ fluorescents hybridés à des chromosomes mécaniquement étirés. (tiré de la publication: Nishio et Al. 1996, *J. Mol. Bio* **259**(1), p.113-9) **A)** Hybridation des sondes λ ALB 5 (rouge), AFP 41 (rouge et verte = jaunâtre) et ALF 2 (verte). **B)** Hybridation des sondes λ AFP 41 (rouge et verte = jaunâtre), ALF 9 (rouge) et ALF 15 (verte). **C)** Gel à champ pulsé généré à partir de digestions avec les enzymes de restriction *BssHI*, *BstEI*, *NarI* et *SstI* d'ADN génomique de souris. Les sondes utilisées sont: une sonde correspondant aux exons 9 à 13 de l'AFP de souris (sonde mAFP) et une sonde correspondant aux exons 3 à 5 de ALF de souris (sonde mALF).

3.3.6 Comparaison des séquences des différents membres de la famille

Regardons maintenant les séquences protéiques de ALF chez l'humain, le rat et la souris et comparons les entre elles et avec celles des autres membres de la famille. Au niveau de l'homologie, ALF possède une homologie plus forte avec l'AFP (35,2% en moyenne dans les trois espèces) suivi de l'ALB (en moyenne 32,7% dans les trois espèces), puis avec VDBP (en moyenne 19,9% dans les trois espèces) (tableau 3.1). Ainsi, l'AFP et ALF seraient les gènes les plus rapprochés de façon évolutive. Ces pourcentages d'homologie sont faibles pour une famille de gène, mais il faut se remémorer que c'est une homologie structurale qui caractérise cette famille. Cette homologie structurale provient de la formation des ponts disulfures conférant la structure quaternaire adéquate à la protéine. Ainsi, chez ALF de rat 15 des 17 ponts disulfures sont présents, alors que chez la souris et l'humain sont retrouvés respectivement 16 et 17 ponts (tableau 3.2). ALF est le seul membre de la famille dont le nombre de ponts disulfures varie avec les espèces, alors que dans toutes les espèces l'ALB possède 17 ponts, l'AFP en a 15 et VDBP en a 13 (tableau 3.2).

Tableau 3.1. Comparaison des pourcentages d'identité en acide aminé des différents membres de la famille de l'albumine chez l'humain, le rat et la souris

	Humain (%)	Rat (%)	Souris(%)	Moyenne(%)
ALF vs AFP	39,5	32,7	33,4	35,2
ALF vs ALB	35,3	30,2	32,7	32,7
AFP vs ALB	40,0	32,6	34,7	35,8
ALF vs VDBP	20,7	19,7	19,4	19,9
AFP vs VDBP	19,4	21,7	22,4	21,2
ALB vs VDBP	23,3	23,0	22,2	22,8

Chez les membres de la famille de l'albumine deux structures appelées les poches hydrophobes sont retrouvées celles-ci apparaissent dans leur structure quaternaire et sont responsables de la liaison de plusieurs ligands (23). Trente-trois acides aminés hydrophobes ont été identifiés comme étant impliqués dans la formation de ces poches hydrophobes (23). ALF humaine et de rat possèdent 31 de ces 33 a.a. alors que ALF de souris n'en possède que 30

(figure 3.6, tableau 3.2). Pour l'albumine et la VDBP le nombre d'acides aminés hydrophobes est conservé entre les espèces soit respectivement 33 et 13. Chez l'AFP, les variations sont du même ordre que chez ALF, c'est-à-dire que 30 des 33 a.a. sont retrouvés chez l'humain, 31 chez le rat et 29 chez la souris (tableau 3.2). Au niveau de la glycosylation, il est bien connu que l'albumine n'est pas une protéine glycosylée, mais ce n'est pas le cas pour les autres membres de la famille. Sur ALF humaine 4 sites potentiels de N-glycosylation sont retrouvés (figure 3.5) alors que 5 sont présents sur ALF de rat et de souris (tableau 3.2, figure 3.3). Chez l'AFP et VDBP le nombre de site potentiel de N-glycosylation est le même, la forme humaine en possède 1 alors que 2 sont retrouvés chez le rat et la souris (figure 1.3, 1.4 et tableau 3.2).

Tableau 3.2. Caractéristiques protéiques des membres de la famille de l'albumine chez l'humain, le rat et la souris

	Longueur (a.a.)	Ponts S-S (/17)	A.A. Hydrophobe (/ 33)	Glycosylation	Autres
ALF					
Humain	599	17	31	4	0 Cys, 0 Trp
Rat	608	15	31	5	3 Cys, 2 Trp
Souris	608 ou 611	16	30	5	2 Cys, 5 Trp
ALB					
Humain	609	17	33	0	1 Cys, 1Trp
Rat	608	17	33	0	1 Cys, 1Trp
Souris	608	17	33	0	2 Cys, 1Trp
AFP					
Humain	609	15	30	1	2 Cys, 1 Trp
Rat	611	15	31	2	2 Cys, 0 Trp
Souris	605	15	29	2	2 Cys, 1 Trp
VDBP					
Humain	474	13	12	1	2 Cys, 1 Trp
Rat	476	13	12	2	2 Cys, 0 Trp
Souris	476	13	12	2	2 Cys, 0 Trp

Présentation de quelques caractéristiques protéiques des membres de la famille de l'albumine chez l'humain, le rat et la souris: la longueur de leur protéine, le nombre de ponts disulfures conservés, le nombre d'acides aminés hydrophobes conservés, le nombre de sites potentiels de N-glycosylation et le nombre de cystéines libres et de tryptophanes présents dans la protéine.

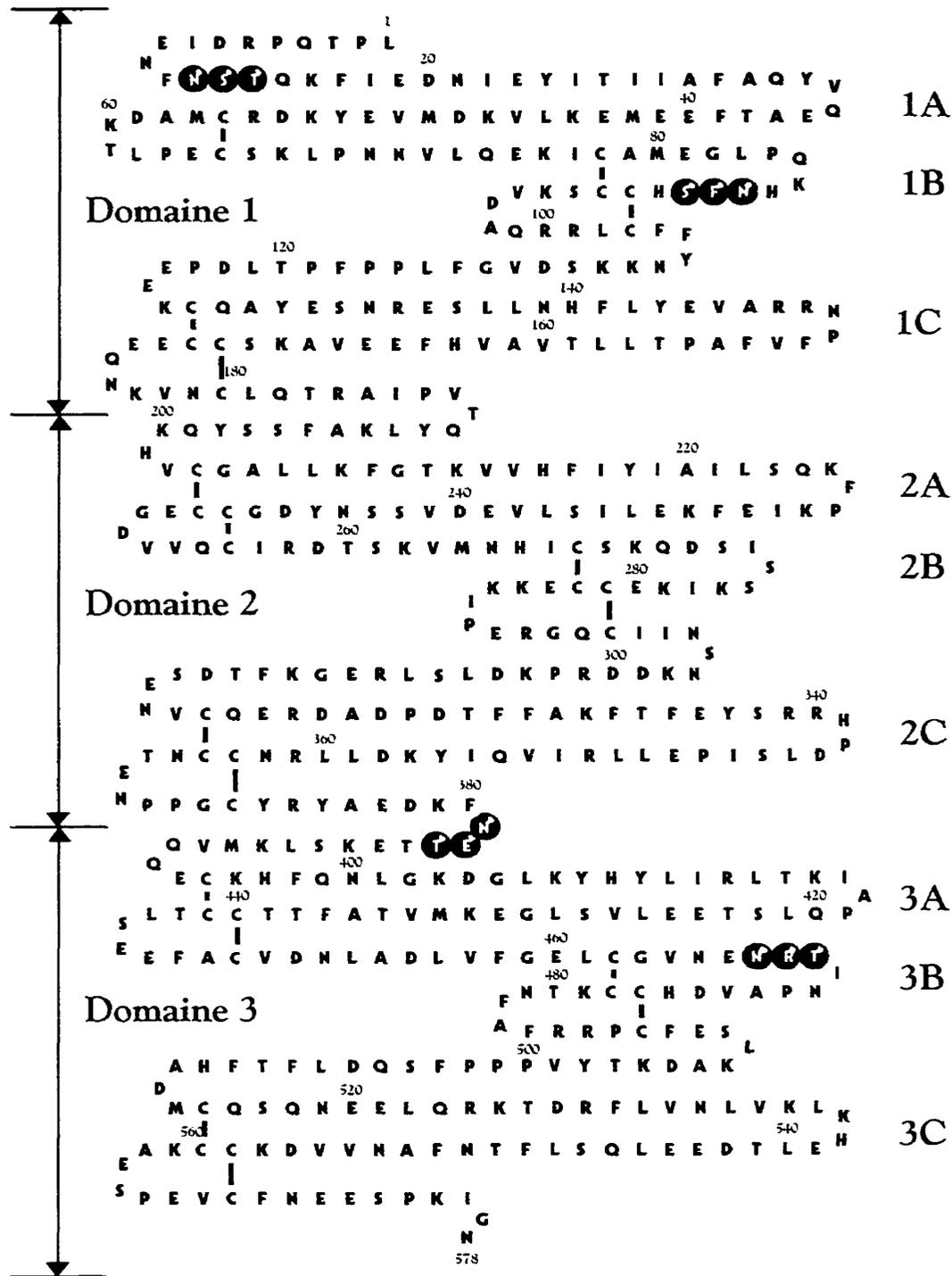


Figure 3.5. Représentation schématique de l'alpha-albumine humaine sous forme de serpent. La localisation des différents domaines (1, 2 et 3) et des différents sous-domaines (1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B et 3C) est indiquée. Les acides aminés en noir correspondent aux sites potentiels de N-glycosylation. Les traits noirs représentent les ponts disulfures. (Figure adaptée de : Peters, T., Jr. *Adv Protein Chem.* 37:161-245, 1985 avec la séquence protéique provenant de la GenBank, numéro d'accèsion: #NM_001133)

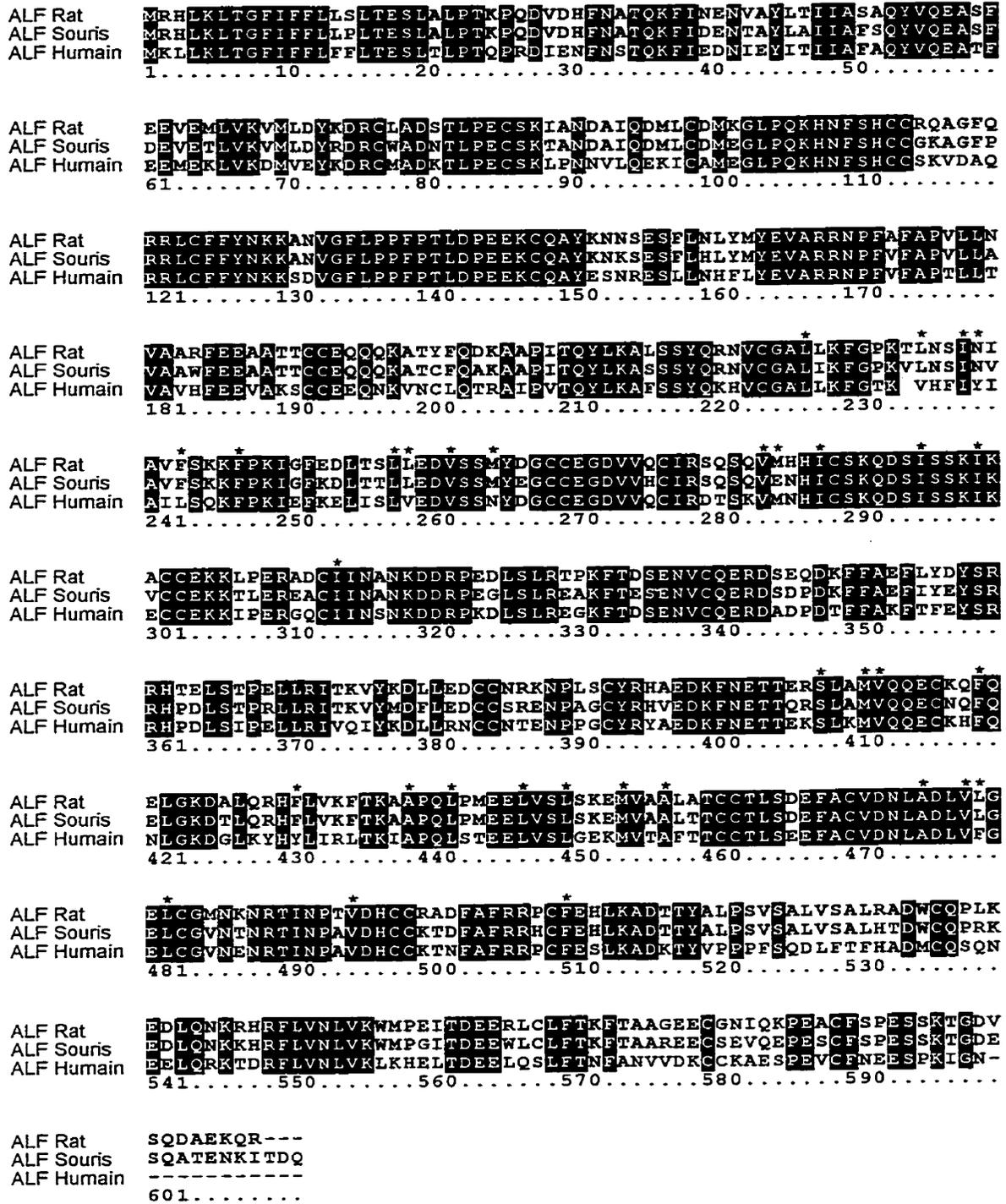


Figure 3.6. Comparaison inter-espèce des séquences protéiques de ALF. Cette comparaison a été générée, pour l'alignement, par le logiciel clustalW 1.7(6) et pour la présentation, avec le logiciel Boxshade 3.2. Les portions en noir correspondent aux acides aminés identiques et les portions en gris correspondent à une identité de 66% (2/3) des acides aminés. (Numéro d'accésion de la GenBank pour ALF humaine :NM_001133; ALF de rat :X76456; ALF de souris :AJ011080)

Les membres de la famille de l'albumine possèdent une homologie structurale comprenant trois domaines (1, 2, 3) pouvant être subdivisé en trois sous-domaines (a, b, c) (figure 3.5). La comparaison de ces différents domaines et sous-domaines entre les espèces indique quels domaines sont les plus conservés au travers de l'évolution et par le fait même lesquels sont probablement les plus importants au niveau fonctionnel pour la protéine. Ainsi, au niveau de l'homologie interne de ALF chez le rat, la souris et l'humain (tableau 3.3) il est possible de voir une bonne variation entre l'humain par rapport au rat et à la souris avec une conservation de seulement 67,9% et 67,3% respectivement (figure 3.6, tableau 3.3). Ces pourcentages semblent faibles pour un même gène à travers les espèces, mais les pourcentages d'homologie pour l'AFP sont similaires et même inférieurs (tableau 3.3). Toutefois, l'ALB et

Tableau 3.3. Pourcentage d'identité en acide aminé entre l'humain, le rat et la souris pour les différents membres de la famille de l'albumine

		Dom.			Sous-Domaine			Dom.			Sous-Domaine			Poche		
		Complet	1	1a	1b	1c	2	2a	2b	2c	3	3a	3b	3c	#1	#2
Hum. vs Rat	ALB	73,2	72,2	77,8	76,9	60,3	72,4	64,1	75,0	78,1	76,0	75,4	81,4	71,2	76,1	75,2
	AFP	65,0	56,6	56,3	56,4	57,1	64,1	63,5	61,5	67,2	74,5	72,3	70,0	80,8	59,1	68,6
	VDBP	77,2	82,5	87,2	87,7	84,1	68,8	80,6	64,1	61,7	73,2	---	---	73,2	74,4	---
	ALF	67,9	67,9	69,1	73,8	60,3	73,4	71,9	81,3	67,2	62,6	68,8	69,1	50,0	73,9	73,7
Hum. vs Sour.	ALB	72,5	69,9	72,8	76,9	58,7	74,5	70,3	73,4	79,7	74,8	75,4	77,1	71,8	78,4	72,4
	AFP	65,4	59,0	55,0	61,3	61,9	66,7	65,1	67,7	67,2	73,6	59,0	66,7	73,6	64,7	64,8
	VDBP	77,7	84,5	84,6	89,2	90,0	73,6	85,5	68,8	66,7	70,7	---	---	70,7	77,8	---
	ALF	67,3	67,0	65,4	75,4	60,3	72,9	70,3	78,1	70,3	63,6	67,2	75,0	48,5	70,5	76,7
Rat vs Sour.	ALB	89,8	88,6	92,7	87,7	84,1	89,1	87,5	82,8	96,9	91,3	95,6	94,3	84,5	86,4	94,3
	AFP	82,0	75,6	64,2	90,2	76,2	81,8	84,1	80,0	81,3	88,8	90,8	85,7	89,0	78,4	86,7
	VDBP	90,7	92,1	92,3	93,8	79,4	89,2	90,3	85,9	91,7	90,2	---	---	90,2	87,8	---
	ALF	86,3	89,0	86,4	92,3	88,9	82,8	89,1	81,3	78,1	86,9	93,8	88,2	79,7	84,1	91,4

Comparaison en acide aminé des protéines complète, par domaine (dom.), par sous domaine ainsi que par poches hydrophobes (poche). Les --- sont dus à l'absence de domaines 3a et 3b dans VDBP. Hum = Humain, Sour = Souris

VDBP ont de meilleurs pourcentages de conservation inter-espèces (tableau 3.3). Évidemment, lorsque les versions de rat et de souris sont comparées les pourcentages d'homologies sont beaucoup plus élevés. Cependant, l'AFP et ALF demeurent les deux protéines les moins bien conservées. Au niveau de la

famille, le gène qui se conserve le plus au travers des espèces est la VDBP, suivie par l'ALB, ALF et l'AFP. Au niveau des domaines, celui le plus conservé chez ALF entre les formes humaine et murines est le domaine 2 et surtout le sous-domaine 2b, tandis qu'entre le rat et la souris le domaine le mieux conservé est le premier et le sous-domaine 3a est celui le plus conservé (tableau 3.3). Notons également que le sous-domaine 3c de ALF est celui qui est le plus dégénéré de toute la famille de l'albumine (tableau 3.3). Pour l'AFP et l'ALB au travers des espèces, le domaine 3 est le plus conservé. Cependant, il y a quelques variations au niveau du sous-domaine. Chez ALB, le sous-domaine 3b est le mieux conservé entre l'humain et les formes murines, alors que le sous-domaine 2c est le mieux conservé entre le rat et la souris. Pour l'AFP, le sous-domaine 3c est le plus conservé, entre l'humain et les formes murines, alors que le sous-domaine 3a est le mieux conservé entre le rat et la souris. Finalement, entre toutes les espèces le domaine et le sous-domaine les mieux conservés pour VDBP sont le domaine 1 et le sous domaine 1b (tableau 3.3).

Certains acides aminés tels que la cystéine et le tryptophane, lorsqu'ils sont présents dans une protéine, sont des acides aminés réactifs et susceptibles d'interagir avec d'autres acides aminés ou divers ligands. Chez ALF de rat 3 cystéines libres et 2 tryptophanes sont retrouvés. Chez la souris seulement 2 cystéines sont libres mais 5 tryptophanes sont présents, alors que chez l'humain aucune cystéine n'est libre et aucun tryptophane n'est présent (tableau 3.2 et figure 3.6). En 1998, une publication a démontré que ALF humaine était en fait une protéine identifiée auparavant à partir de gel de protéine sérique (431), soit l' α_1 T-glycoprotéine originalement nommé tryptophan-poor α_1 -protein (432).

3.3.7 Phylogénie de la famille de l'albumine

Au niveau de l'évolution, d'après ces homologues de séquence, il semble que ALF et l'AFP sont les gènes les plus rapprochés et qu'ils doivent être apparus à partir d'un ancêtre commun différent de l'albumine. VDBP est celui qui s'est dupliqué le premier de l'ancêtre commun aux membres de la famille de

l'albumine ce qui explique sa plus faible homologie avec les autres membres de la famille et sa perte de deux exons internes. Ainsi, en utilisant les séquences protéiques humaines, de rats et de souris de tous les membres de la famille de l'albumine pour les compiler à l'aide d'un logiciel de phylogénie (Phylip 3.5 et Clustalw 1.7), il est possible de créer un schéma évolutif. Ce schéma montre bien que VDBP s'est dupliqué en premier, puis une seconde duplication a donné naissance à l'albumine et à un ancêtre commun à l'AFP et ALF. Finalement, cet ancêtre commun s'est dupliqué un dernière fois pour donner ALF et AFP (figure 3.7).

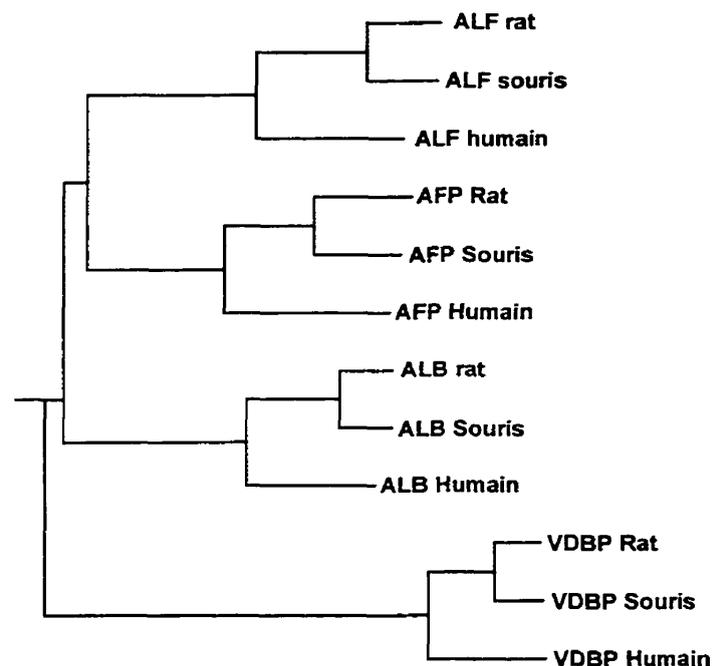


Figure 3.7. Arbre phylogénique de toute la famille de l'albumine réalisé à partir des séquences protéiques incluant toutes les séquences de la famille provenant de l'humain, du rat et de la souris. Cet arbre démontre que l'AFP et ALF se sont dupliqués à partir d'un ancêtre commun différent de l'albumine. Cet arbre a été généré à partir des logiciels clustalW 1.7 (6) et Phylip 3.5 (7) puis la présentation a été effectuée avec le logiciel Drawtree.

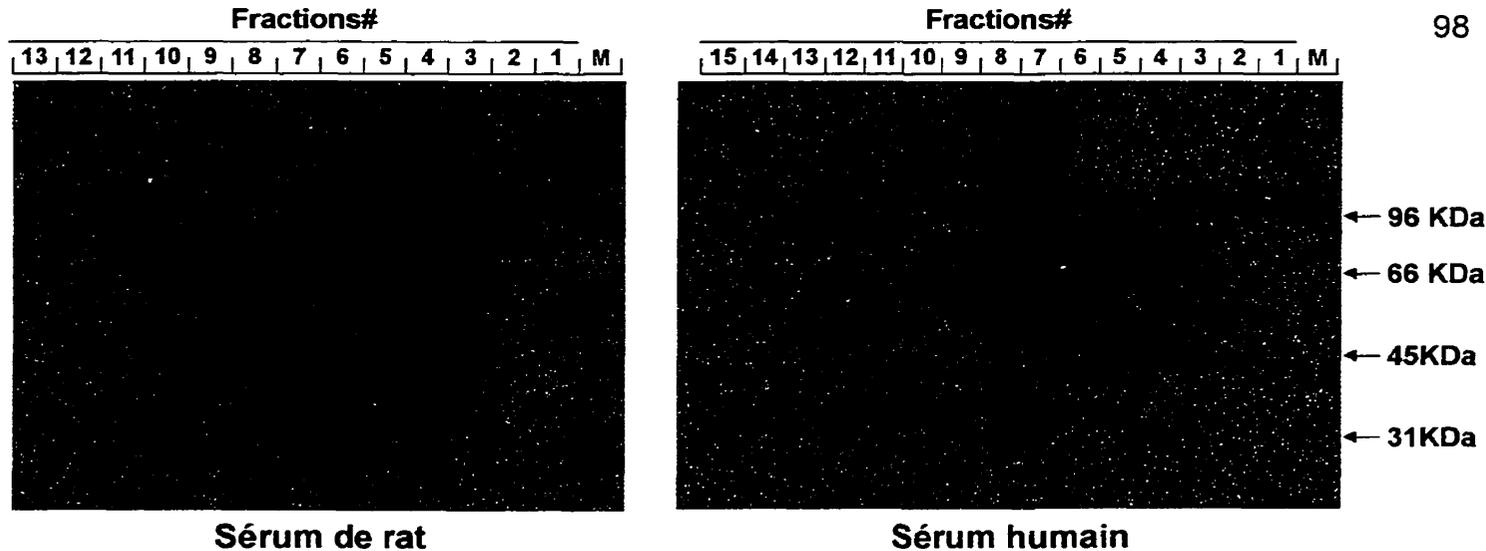


Figure 3.8. Calcul des points isoélectriques pour ALF de rat et humaine en présence de 9M d'urée. Ces images sont obtenues par la superposition de la membrane ayant servi à l'immunodétection colorée au bleu de coomassie avec l'autoradiogramme de l'immunodétection obtenu avec cette même membrane, permettant ainsi d'illustrer sur la même image ALF et l'ALB. Les fractions correspondent à des portions de 5mm de la carotte utilisée. Le pH de ces fractions ayant été mesuré ceci permet d'attribuer un point isoélectrique à ALF et ALB. M = marqueur de poids moléculaire. Le pi obtenu pour ALF de rat est de 6.4 alors que pour ALF humaine il est de 5.0.

Tableau 3.4. Compilation des points isoélectriques théoriques, publiés et expérimentaux

	Théorique^a	Littérature	Expérimentale
ALF humain	5,8	----	5,24 (5,0)
ALF rat	6,1	----	5,35 (6,4)
ALB humain	6,4	4,8 (6,1) ^b	(5,8)
ALB rat	6,4	5,5 ^c	(6,6)
AFP humain	6,2	4,75 (5,2) ^d	----
AFP rat	5,5	4,8 (4,8; 5,05) ^e	----
VDBP humain	5,3	4,8 ^f	----
VDBP rat	5,9	5,2 ^g	----

Tableau compilant les points isoélectriques calculés, des pi parus dans la littérature et des pi obtenus dans cette thèse pour les différents membres de la famille de l'albumine. Les données entre parenthèse correspondent aux points isoélectriques mesurés en présence d'urée (9M). **a)** points isoélectriques théoriques calculés avec le logiciel isoelectric du GCG 8.0 **b)** Candiano G., Ghiggeri G.M., Delfino G., Queirolo C., Vecchio G., 1986, *J. Chromatogr.* **374**(2) p279-88 **c)** Pardridge V.M., Triguero D., Buciak J., Yang J., 1990, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **255**(2) p.893-9 **d)** et **e)** Bélanger, L. & Dufour, D., Étude de la microhétérogénéité de l'AFP du rat, p25-56 in Masseyeff, R. (ed.) C.R. Conf. Int. L'Alpha-foetoprotéine, INSERM Paris, 1974, **f)** Imawari M., Kida K., Goodman D.S., 1976, *J. Clin. Invest.*, **58**(2) p514-23 **g)** Cooke, N.E., 1986, *J. Biol. Chem.*, **261**(7) p3441-50.

3.3.8 Détermination du point isoélectrique de ALF

La détermination du point isoélectrique (pI) de ALF humaine et de rat a tout d'abord été réalisé en conditions dénaturantes (en présence de 9M d'urée), un pI de 5,0 a été obtenu pour ALF humaine et de 6,4 pour ALF de rat (figure 3.8 et tableau 3.4). Avec les mêmes gels, un pI de 5.8 a été obtenu pour l'ALB humaine et de 6.6 pour l'ALB de rat (figure 3.8 et tableau 3.4). Dans la littérature, le point isoélectrique de l'ALB humaine en condition dénaturante est de 6,1 (433) (tableau 3.4), corrélant avec notre résultat. En condition native (en absence d'urée), un pI de 5,24 a été obtenus pour ALF humaine et de 5.35 pour ALF de rat.

3.3.9 Analyses de diverse pathologies

Grâce aux anticorps anti-ALF humaine et de rat, un criblage du niveau sérique de ALF dans plusieurs sérums normaux et dans différentes pathologies humaines a été entrepris en collaboration avec Mlle. Diane Hamel. Dans les sérums de personnes en santé, il n'y a pas de variation du niveau de ALF (figure 3.9A). Suite à l'obtention de sérum provenant de plusieurs patients atteints de différentes maladies, des immunodétections ont été exécutées afin de vérifier si une variation de l'expression de ALF pouvait être associée à ces diverses pathologies. Des sérums provenant de patients atteints de leucémie, de colite, d'hyper- et d'hypo-thyroïdisme et d'insuffisance rénale ont été obtenus. Seule une légère baisse a été aperçue dans plusieurs cas d'insuffisance rénale (figure 3.9B).

Par la suite, il était intéressant de vérifier si ALF variait dans l'analbuminémie. L'absence de sérum de gens analbuminémiques a amené l'utilisation de sérums provenant de plusieurs rats Nagase, qui sont des rats analbuminémiques (434). Le taux sérique de ALF est augmenté dans le sérum de ces rats (figure 3.9C), mais cette augmentation n'est pas suffisamment substantielle pour être considérée importante car chez ces rats

analbuminémiques toutes les protéines sériques sont quelques peu augmentées (435) et ALF ne fait pas exception.

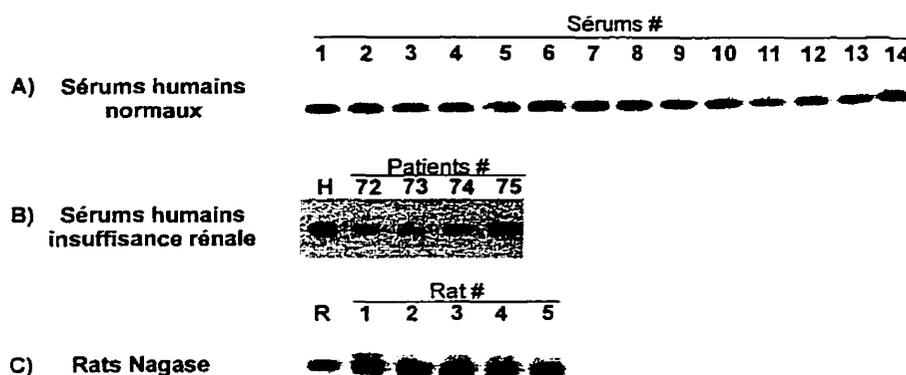


Figure 3.9. Études de la variation de ALF dans différentes conditions chez l'humain et le rat. **A-C)** Immunodétection avec 5 μ l des sérums de rat ou humain dilués 1/25, et avec l'anti-ALF humain ou de rat utilisé à une dilution 1/10000 **A)** Sérums humains normaux. Les chiffres correspondent chacun à une personne normale qui nous a fourni du sang. Aucune variation significative du taux sérique de ALF n'est détectée. **B)** Sérums provenant de patients atteints d'insuffisance rénale. Les numéros correspondent au numéro de chaque patient. Une légère baisse du taux sérique de ALF est détectée chez certains patients. **C)** Sérums provenant de 5 rats Nagase qui sont des rats analbuminémiques (12). L'augmentation du taux sérique de ALF n'est pas significative puisque toutes les protéines sériques de ces rats sont légèrement plus élevées.

L'expression au cours du développement de l'AFP et de ALF possède un patron réciproque, à savoir que lorsque l'AFP s'éteint (quelque jours après la naissance) ALF, pour sa part voit son expression débiter pour atteindre son maximum au moment où l'AFP a presque entièrement disparue. Pour vérifier si cette réciprocité pouvait être due au fait que l'AFP et ALF utilisent des éléments de régulations communs, tel que l'amplificateur intergénique ou des facteurs de transcription communs dont les concentrations disponibles seraient limitées, une hépatectomie partielle chez des rats adultes et le traitement de rats nouveau-nés à la dexaméthasone, deux conditions ayant pour effet de faire varier l'expression

de l'AFP, ont été exécutés par Alain Lamontagne. Suite à l'hépatectomie partielle ALF, tout comme l'ALB et contrairement à l'AFP (13), voit tout d'abord son expression diminuer pour, par la suite, revenir à son niveau normal et un peu plus élevé, alors qu'il est connu que l'expression de l'AFP est réactivée lors de la réinitiation de prolifération hépatique (12, 13). Finalement, il est bien démontré que la DEX réprime le promoteur de l'AFP (110, 130, 141, 144, 146). Par contre elle n'a pas d'effet sur l'expression de ALF.

3.4 Discussion

L'alpha-albumine est le tout dernier membre de la famille de l'albumine à avoir été identifié et cela dans le laboratoire d'accueil (21, 426). À mon arrivée dans le laboratoire, seule ALF de rat avait été identifiée. Il était alors intéressant d'aller cloner la forme humaine de ALF. C'est dans ce but qu'a été entrepris le criblage d'une banque d'ADNc de foie humain (chapitre 2). Ensuite, à l'aide des clones obtenus, la surexpression de ALF dans des systèmes procaryotes et eukaryotes a été tentée. Une expression du gène complet de ALF a été obtenue avec le système procaryote GST (pGEX-2T/ALF, figure 3.1A) et avec des transfections transitoires dans les lignées cellulaires eukaryotes HepG2 et 293 avec le vecteur pCI/ALFAK (figure 3.2F). Les quantités de protéines exprimées dans les deux cas étaient toutefois trop faibles pour penser à les purifier afin de faire des analyses fonctionnelles. Pour obtenir une quantité suffisante de ALF pure, il faudrait améliorer la production à partir des systèmes procaryotes en utilisant des systèmes plus permissifs pour l'expression de longues protéines tels que les systèmes n'ajoutant que 6 histidines en fusion avec la protéine à exprimer. Cependant, l'expression dans de tels systèmes est un peu risquée pour faire des études fonctionnelles puisqu'il a été démontré que l'AFP de rat produit chez *E.coli* n'est plus capable de lier l'estradiol et ceci serait occasionnée par la formation d'une mauvaise structure quaternaire (mauvais appariement des ponts disulfures) (436). Pour éviter ce problème, il faudrait améliorer les systèmes d'expression eukaryotes utilisés pour ainsi obtenir des protéines produites dans une lignée hépatique, assurant ainsi la bonne fonctionnalité de ALF. Récemment, le laboratoire a obtenu un système d'expression bicistronique (437). Ce système a pour avantage d'augmenter le nombre de clones stables positifs car le gène de résistance est situé sur le même messager que le gène à surexprimer. Ainsi lors de la sélection, les cellules résistantes sont celles exprimant de façon stable le gène de résistance donc exprimant également le gène désiré. Ce système pourrait donc être une option à envisager pour tenter de surexprimer ALF. L'utilisation des systèmes de surexpression chez la levure

qui sont des systèmes produisant de grandes quantités de protéines pourrait également être envisagée. Il a été démontré que l'AFP produit dans ces systèmes est totalement fonctionnelle (436). Toutefois, l'AFP est une protéine faiblement glycosylée, alors que ALF possède plusieurs sites potentiels de N-glycosylation et il est connu qu'il y a des différences au niveau de la glycosylation en ce qui concerne la composition et le nombre de sucre d'un tissu à l'autre et d'une espèce à une autre (123). Ainsi, il serait possible que ces systèmes fournissent une grande quantité de protéines dont les fonctions seraient quelque peu différentes de celles produites de façon endogène par le foie. Il en va de même avec des systèmes plus productifs tels que les Baculovirus (438), qui produisent des protéines à partir de cellules d'insecte. Par conséquent, si ces systèmes sont employés, l'étude devra être faite avec beaucoup de précaution.

Avec les systèmes d'expression procaryotique, une grande quantité de la portion N-terminale de ALF, soit les 150 premiers acides aminés fusionnés à GST a été exprimée. Avec ces protéines de fusion, des anticorps anti-ALF humain ont été produits via l'immunisation d'un lapin. La caractérisation de ces anticorps permet d'affirmer qu'ils sont capables de reconnaître les formes dénaturées et natives de ALF et cela de façon spécifique ne reconnaissant que la forme humaine sans hybridation croisée avec ALF de rat (figure 3.2A,D) ou de souris (figure 3.2C). Ces anticorps sont donc devenus un outil de vérification indispensable lors des tentatives de surexpression. De plus, grâce à ceux-ci, un criblage préliminaire de différentes pathologies a été entrepris dans le but de déceler une corrélation entre des variations de l'expression de ALF et une maladie. Pour l'instant, quelques pathologies ont été testées et dans certains cas d'insuffisance rénale l'expression de ALF est plus basse (figure 3.9B). Toutefois avant de poursuivre un tel criblage, il serait important de mettre au point un test de type R.I.A. (428) pour ainsi posséder un test quantitatif du taux sérique de ALF et par conséquent obtenir des corrélations fiables qui pourraient servir pour dépister ou pour suivre la progression de ces pathologies. Un tel test permettrait d'approfondir la corrélation avec l'insuffisance rénale. Dans le cas de

l'insuffisance rénale, il a été démontré que le niveau de l'albumine est diminué (439). mais celle-ci n'est pas un marqueur fiable (440). Toutefois, les petites protéines glycosylées avec une courte demi-vie seraient de bons marqueurs du métabolisme protéique au cours de l'insuffisance rénale (441). Afin de continuer ce criblage, d'autres pathologies devraient être ciblées telles que toutes complications reliées au foie : l'hépatite, la cirrhose, l'hépatocarcinome, la tyrosinémie héréditaire, la maladie de Wilson etc. En prenant en considération que les membres de la famille de l'albumine possèdent tous comme fonction de transporter divers ligands, tels que les acides gras et la bilirubine, il serait également intéressant d'étudier des pathologies telles que, entre autres, l'hyperlipidémie, l'adenoleukodystrophie, l'hyper-cholesterolémie et la jaunisse. Pour l'instant, environ 150 sérums différents ont été testés et tous contenaient ALF. Cet échantillon est trop petit pour affirmer que ALF est toujours présente donc essentielle chez l'adulte, mais cela abonde en ce sens.

Deux formes (77Kda et 81Kda) de ALF de rat sont visualisées par immunodétection (figure 1A du chapitre 2). Ces deux formes sont fort probablement des variants de glycosylation car : 1) le poids moléculaire calculé (69,3Kda) de ALF ne correspond pas à son poids moléculaire réel (~77Kda ou 81Kda) (donc environ 10% de son poids provient des carbohydrates) 2) lors d'une chromatographie sur une colonne de concanavalin A (ConA) sépharose (qui a pour propriété de retenir les protéines glycosylées) ALF est retenue (figure 3.2E). Lorsque ALF humaine est détectée par immunodétection (figure 3.2), contrairement à son orthologue de rat, elle ne possède qu'une seule forme et celle-ci correspond à la forme de 77Kda. Cette différence est probablement due au fait que la forme humaine ne possède que 4 sites potentiels de N-glycosylation, soit un de moins que le rat (figure 3.5). Ainsi chez le rat, le cinquième site doit subir une glycosylation partielle, amenant une glycosylation à 4 ou 5 endroits sur la protéine. Par conséquent, la conservation de seulement 4 sites chez l'humain et l'utilisation partielle d'un cinquième site chez le rat laisse croire que les quatre sites conservés sont essentiels à la fonction de ALF.

La comparaison de séquences de tous les membres de la famille de l'albumine ensemble et entre leurs orthologues d'humains, de rats et de souris, amène la conclusion que ALF et l'AFP sont les gènes les plus rapprochés, que ce soit au niveau de leur homologie de séquence protéique (tableau 3.1) ou promotrice (car le promoteur de ALF a plus d'homologie avec celui de l'AFP qu'avec celui de l'ALB) (figure 1.5) ou au niveau de la conservation des acides aminés formant leurs poches hydrophobes (tableau 3.2). La compilation des différentes séquences de la famille et la génération d'un arbre phylogénique démontrent ce lien évolutif entre l'AFP et ALF (figure 3.7). Ainsi, au cours de l'évolution, suite à la duplication des domaines 1, 2 et 3 ayant mené à la formation de l'ancêtre commun à toute la famille (24), il y aurait eu une première duplication. Celle-ci aurait donné naissance à VDBP, qui ne subira aucune autre duplication par la suite, et à une albumine ancestrale. Cette première duplication aurait eu lieu il y a environ 560 millions d'années (24). Par la suite, cette albumine ancestrale aurait subi une duplication donnant naissance à l'albumine et à une alpha-albumine ancestrale (ancêtre de ALF et AFP). En considérant que l'AFP aurait divergé de l'albumine il y a environ 280 millions d'années (24), il est alors fort probable que cette seconde duplication donnant naissance à cette alpha-albumine ancestrale a eu lieu peu de temps avant. Toutefois, cette alpha-albumine ancestrale a dû subir une duplication assez rapidement après son apparition pour donner naissance à l'AFP et à l'alpha-albumine car les divergences existant entre l'AFP et l'ALB (qui ont servi à estimer ce temps) sont à peu près équivalentes à celles entre ALF et l'ALB. Il est estimé que l'AFP est apparue après la séparation entre les amphibiens et les reptiles (24). ALF est donc aussi apparue suite à cette division, par conséquent, le couple ALF/AFP ne devrait pas être retrouvé dans les espèces issues des amphibiens, mais uniquement dans les espèces issues de la branche des reptiles. Ceci est démontré pour l'AFP: alors que l'AFP est détectée dans les oiseaux (442), les poissons (443) et les mammifères (444), il n'en est pas retrouvé chez les grenouilles (445) qui contiennent cependant de l'albumine (24, 445).

L'expression réciproque entre l'AFP et ALF au cours du développement amène l'hypothèse que la duplication de l'alpha-albumine ancestrale a eu lieu pour permettre à ALF et à l'AFP de partager certaines fonctions chez l'embryon et chez l'adulte. L'apparition, dans la branche des reptiles, du sac vitellin (446) pourrait avoir créé une demande énergétique plus élevée. L'apparition de l'AFP est alors venue améliorer le transport des nutriments chez l'embryon pour ainsi contribuer à combler cette demande. Après la duplication, l'AFP aurait donc évolué de façon à voir son expression devenir uniquement embryonnaire. Ainsi, son promoteur, qui à ce moment devait être équivalent à celui de ALF, a vu apparaître certains éléments régulateurs couplant sa régulation à la prolifération cellulaire, restreignant ainsi son expression à l'embryon (7, 130, 144). Si l'ALF et l'AFP partagent des fonctions des régions homologues devraient être retrouvées dans la séquence des deux protéines. Plusieurs segments protéiques dont l'homologie atteint les 60% sont retrouvés. De plus, deux segments de la protéine situés à la fin de la première poche hydrophobe sont très bien conservés chez toutes les espèces présentées (7/7 et 8/9 a.a. identiques). Ainsi, ces deux segments pourraient être des sites de liaisons pour des ligands communs entre ALF et AFP. Il est intéressant de noter que chez l'AFP humaine se retrouve qu'un seul site potentiel de N-glycosylation et que celui-ci se situe dans la première poche hydrophobe (figure 1.4), alors que chez ALF humaine se retrouvent 4 sites potentiels de N-glycosylation, dont 2 situés dans la seconde poche hydrophobe et aucun dans la première (figure 3.5). Il est alors possible que la glycosylation crée un encombrement stérique atténuant l'activité des poches hydrophobes puisque la seconde poche hydrophobe de l'AFP, celle non glycosylée, est la plus active quant à la liaison de différents ligands (88, 447). Par conséquent, ALF aurait évolué de façon à maintenir son expression chez l'adulte et aurait conservé une ou des fonctions de la première poche hydrophobe alors que les fonctions menées par sa seconde poche ne seraient plus essentielles chez l'adulte, d'où sa glycosylation. La comparaison de ALF au travers les espèces montre que son domaine 2 (qui contient la première poche

hydrophobe) est le domaine le mieux conservé entre l'homme et les formes murines (tableau 3.3). De même, le sous-domaine 3c de ALF est très dégénéré entre les espèces (tableau 3.3), alors que chez l'AFP ce sous-domaine est le plus conservé (tableau 3.3). Ainsi, ALF aurait divergé de l'AFP pour maintenir les fonctions de la première poche hydrophobe. La comparaison des sites de liaison connus pour l'AFP et pour l'ALB dans cette première poche hydrophobe par rapport à ALF, montre que cette dernière conserve les sites de liaison pour la bilirubine et pour les acides gras (28). Également, le faible taux sérique de ALF chez l'adulte (~20µg/ml) par rapport à l'AFP chez l'embryon (~3mg/ml) s'expliquerait par le fait que les fonctions communes à l'AFP et à ALF n'ont pas besoin d'une grande concentration de protéines pour être exécutées. Ces fonctions pourraient être de transporter des ligands de faible concentration qui ne peuvent demeurer libres dans le sérum adulte. De plus, de façon indépendante, ALF pourrait avoir évoluée une fonction de transport d'un ligand spécifique transporté par aucun autre membre de la famille, comme c'est le cas pour VDBP (liaison de la vitamine D et de l'actine (71, 74)).

Il a été démontré que l'AFP était le gène de la famille qui évoluait le plus rapidement (24, 38). ALF doit sûrement évoluer aussi rapidement que l'AFP car les pourcentages d'identité de ALF inter-espèces sont aussi faibles que ceux de l'AFP (tableau 3.1). De plus, plusieurs différences majeures sont retrouvées entre ALF de souris et de rat qui sont deux espèces assez rapprochées : ALF de souris et de rat ne possèdent pas la même longueur, n'ont pas le même nombre de ponts disulfures et possèdent un nombre différent d'acides aminés réactifs (tableau 3.2).

Il est connu que les AFP de rat et de souris sont capables de lier l'estradiol, alors que l'AFP humaine ne le peut pas (100). Au niveau de l'homologie inter-espèce de l'AFP (tableau 3.3) entre la forme humaine et les formes murines, le sous-domaine 3c est le sous-domaine le mieux conservé, alors qu'entre les deux formes murines, le sous-domaine 3a est le mieux

conservé. Il a été démontré que le site de liaison de l'estradiol se situe justement dans ce sous-domaine 3a (97). Ainsi, les différences d'homologies qui existent chez ALF entre la forme humaine et les formes murines ainsi qu'entre les formes murines entre elles (le domaine 2 est le domaine le mieux conservé entre humain et murin, alors que le domaine 1 est le mieux conservé entre les formes murines (tableau 3.3)) pourraient laisser croire que ALF murin possède également des fonctions différentes de ALF humain.

Au niveau de la régulation de l'expression de ALF, Alain Lamontagne démontre dans ses travaux que l'expression de ALF est régulée positivement par HNF1 et C/EBP et qu'il n'existe pas d'amplificateur, dans la région 5' du locus, régulant son promoteur (140). Ainsi, il était intéressant de vérifier si l'expression de ALF ne pouvaient pas influencer la régulation de l'AFP et vice-versa, soit en partageant certains facteurs de transcription qui seraient en quantité limitée ou en partageant des éléments de régulation communs tels que l'amplificateur intergénique. L'intoxication au CCL₄ a pour effet d'induire, après 48 heures de traitement, l'apparition de l'AFP (12) alors que l'expression de ALF n'est pas affectée par ce traitement (140). Par conséquent, si les facteurs de transcription communs à l'AFP et à ALF (HNF1 et C/EBP) étaient en quantité limitée, une baisse de l'expression de ALF au moment de la réexpression de l'AFP aurait été détectée, ce qui n'est pas le cas. Dans le même ordre d'idée, l'hépatectomie partielle a pour effet de réinitier la prolifération hépatique, ce qui occasionne la réouverture du locus AFP (12). Ainsi, lors de la régénération hépatique suite à une hépatectomie partielle, l'AFP est réexprimée, ce qui devrait avoir pour effet, si ALF et AFP utilisent des facteurs de transcription communs présents en quantité limitée, de réprimer l'expression de ALF. Mais ce n'est pas le cas non plus (140). Ainsi les promoteurs de ALF et de l'AFP ne s'influencent pas quant à l'utilisation de facteurs de transcription. La même conclusion est obtenue lorsque l'AFP est réexprimée chez les rats Buffalo atteints d'un hépatome. Car malgré la réexpression de l'AFP, le niveau de ALF se maintient. Il restait à savoir si l'amplificateur intergénique était capable d'influencer le promoteur de ALF.

L'injection de dexaméthasone à des rats nouveau-nés a pour effet de réprimer l'expression de l'AFP via la fermeture du site DHI qui correspond au promoteur de l'AFP. Cependant le site DHII, qui correspond à l'amplificateur intergénique, demeure ouvert et est donc disponible pour d'autres promoteurs (130, 144, 146). Ainsi, si cet amplificateur possède une action positive sur l'expression de ALF, dans ces conditions, une augmentation de l'expression de cette dernière devrait être détectée. Ce n'est pas le cas, l'expression de ALF n'a pas été induite par le traitement à la DEX et celle-ci est même légèrement réprimée. Ainsi, les locus AFP et ALF sont régulés de façon indépendante. Le maintien, dans toutes les espèces testées, de la présence de ALF en 3' de l'AFP au cours de l'évolution n'est donc pas dû à une pression sélective impliquant un partage d'éléments régulateurs comme cela est proposé pour l'ALB et l'AFP (21), qui eux partagent probablement l'amplificateur intergénique (65).

Chapitre 4

The Hepatitis B viral core promoter is strongly activated by the liver nuclear receptor fetoprotein transcription factor (FTF) or by ectopically expressed steroidogenic factor 1 (SF1)

Note : Ce projet était mon projet principal de doctorat, j'ai donc fait toute la recherche bibliographique ainsi que la planification des expériences. J'ai fait la plupart des expériences présentées dans ce papier. J'ai eu de l'aide de Mme. Sylvie Roy pour les mutations et les gels de retardements. La mise en évidence de la présence de SF1 dans la lignée cellulaire HepG2 a été faite par M. Luc Galarneau. Les transfections avec FTF Δ LBD ont été réalisées par M. Alain Lamontagne. J'ai fait la rédaction complète de la première version du manuscrit et participer à la lecture critique des versions suivantes.

Résumé

Le récepteur nucléaire orphelin FTF a été précédemment identifié comme étant un régulateur spécifique du gène de l'alpha-foetoprotéine durant le développement hépatique précoce et dans la réponse aux signaux hormonaux (**Galarneau, L., J.-F. Paré, D. Allard, D. Hamel, L. Lévesque, J. D. Tugwood, S. Green, and L. Bélanger.** 1996, *Mol. Cell. Biol.* **16**:3853-3865). Une analyse fonctionnelle des interactions de FTF avec le promoteur de la nucléocapside de HBV est présentée dans ce manuscrit. Des gels de retardement montrent que le « core promoter » de HBV contient deux sites de liaison de haute affinité pour FTF et un troisième, de faible affinité, partagé avec d'autres récepteurs. L'utilisation en transfection, dans les lignées d'hépatomes HepG2, Hep3B et PLC/PRF/5, d'un gène rapporteur CAT sous le contrôle du « core promoter », avec ou sans l'amplificateur I, montre que FTF est un activateur potentiel de ce promoteur et cela plus efficacement que HNF4 α , HNF3 α , HNF3 β ou C/EBP α . Le facteur stéroïdogénique 1 (SF1), un homologue de FTF liant le même motif d'ADN et exprimé de façon ectopique dans les HepG2, semble posséder un effet inducteur supérieur à FTF. Des mutations dirigées des sites de liaison de FTF indiquent que FTF utilise directement ces séquences pour activer le promoteur et qu'il utilise ces deux sites pour l'obtention d'une interaction productive entre le « core promoter » et l'amplificateur I. Des essais de coexpression indiquent que FTF et HNF4 α sont les partenaires les plus efficaces pour la coactivation du « core promoter », ce qui pourrait être largement impliqué dans le tropisme hépatique et dans l'amplification précoce de l'infection de HBV. Un FTF tronqué en C-terminal possède une fonction dominante négative qui désactive fortement les interactions du « core promoter » avec l'amplificateur I : ceci suggère une nouvelle voie pour interférer avec l'infection de HBV.

**The Hepatitis B viral core promoter is strongly activated by the liver
nuclear receptor fetoprotein transcription factor (FTF)
or by ectopically expressed steroidogenic factor 1 (SF1)**

Stéphane Gilbert, Luc Galarnau, Alain Lamontagne, Sylvie Roy, and Luc Bélanger*

Le Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval, L'Hôtel-Dieu de Québec, Département de biologie médicale, Faculté de Médecine, Québec G1R 2J6, Canada

Running title : Nuclear receptor FTF controls the HBV core promoter

*Corresponding author : Dr. Luc Bélanger
Cancer Research Centre
L'Hôtel-Dieu de Québec
Québec G1R 2J6 Canada
Tel. : (418) 691-5543
Fax : (418) 691-5489
E-mail : luc.belanger@crhdq.ulaval.ca

ABSTRACT

Orphan nuclear receptor FTF was previously identified as a specific regulator of the α_1 -fetoprotein gene during early liver development and in response to hormonal signals (Galarneau, L., J.-F. Paré, D. Allard, D. Hamel, L. Lévesque, J. D. Tugwood, S. Green, and L. Bélanger. 1996. *Mol. Cell. Biol.* **16**:3853-3865). Here we report a functional analysis of FTF interactions with the HBV nucleocapsid promoter. DNA/protein-binding assays show that the HBV core promoter contains two high-affinity FTF-binding sites, and a third lower-affinity site shared with other receptors. Transfections in HepG2, Hep3B and PLC/PRF/5 hepatoma cells, using CAT reporter genes with the nucleocapsid promoter linked or not to enhancer I, indicate that FTF is a potent activator of the HBV core promoter, more efficient than HNF4 α , HNF3 α , HNF3 β or C/EBP α . Steroidogenic factor 1 (SF1), a close FTF homolog which binds to the same DNA motif and is expressed ectopically in HepG2 cells, seems a yet stronger inducer than FTF. Point mutations of the FTF-binding sites indicate direct FTF activatory effects on the core promoter, and the use of both high-affinity sites for productive interaction between the core promoter and enhancer I. Coexpression assays further indicate that FTF and HNF4 α are the most efficient partners for coactivation of the pregenomic core promoter, which may largely account for the hepatic tropism and the early amplification of HBV infection. Carboxy-terminus-truncated FTF behaves as a dominant negative mutant to compete all three FTF sites and strongly deactivate core promoter interactions with enhancer I: this suggests possible new ways to interfere with HBV infection.

INTRODUCTION

Viral hepatitis B is a leading cause of liver disease and primary hepatocellular carcinoma (HCC), and a leading cause of cancer deaths in endemic populations of HBV carriers (3,7,24). Vaccination has proven remarkably effective in preventing HBV infection (and hence HCC) in some high-risk communities (9), but efforts are also pursued towards pharmacological and other means of controlling the virus. Molecular biological studies have advanced considerably our understanding of how the HBV genome operates, providing important new clues on the natural history of HBV-related diseases, and potentially new therapeutical avenues. The HBV genome (Fig. 1) consists of ≈ 3.2 kb of circular DNA encoding four overlapping reading frames driven by promoter and enhancer elements which operate in a highly liver-restricted manner. The HBV nucleocapsid promoter has been especially targeted for detailed molecular analysis, for its pivotal role in the hepatotropism and early life cycle of HBV. The nucleocapsid promoter contains a basic core segment which carries two genetically distinguishable promoters, the preC and core pregenomic promoters, coordinately activated by an upstream regulatory domain (devoid of intrinsic promoter activity) extending from nt 1636 to 1744 (44,47). The cumulative data on the nucleocapsid promoter (and other HBV promoter and enhancer elements as well) clearly indicate that HBV hepatotropism basically reflects the combined need of several liver-enriched transcription factors in order for the HBV genome to replicate efficiently: HBV transgenes are transcribed mostly in liver (1,2,23), transfected HBV transcribes and replicates better in well differentiated hepatocellular lines (8,19,37,39), and some especially virulent strains of HBV contain mutations that convert nucleocapsid promoter sequences into novel, high-affinity sites for liver-type transcription factors (15,20,26,33); chronic HBV hepatitis culminating in HCC (11) also implies that HBV makes sustained efficient use of liver transcription factors.

Like for the HBV genome, expression of the albumin-related genes is highly restricted to hepatocytes. Amongst its close relatives of this four-member family (5), the α_1 -fetoprotein (AFP) gene is also differentially regulated in response to developmental and hormonal signals (4,6,13). In our analysis of AFP-specific gene regulation, we have pinpointed a critical promoter element, absent from the other albumin genes and activated by the "Fetoprotein Transcription Factor" (FTF)¹ (6,13,14), a nuclear receptor expressed selectively in liver, pancreas and intestine (13,35). FTF is a novel member of the *drosophila fushi tarazu* F1 (FTZ-F1) family of orphan receptors, and a close homolog of steroidogenic factor 1 (SF1) expressed in steroidogenic cell lineages (17). FTF is part of a transcriptional liver differentiation cascade that involves HNF3 β (35), HNF4 α and HNF1 α (32), and FTF emerges as the key rate-limiting factor for AFP gene activation in response to liver growth and metabolic signals.

In our initial survey of potential FTF gene targets (13), we noted that the HBV nucleocapsid promoter contained two apparent high-affinity FTF-binding sites (FTF#1 and FTF#2 in Fig. 1). This seemed of particular interest to us regarding FTF reactivity to developmental signals in a different promoter context, and also because HBV functions might perhaps be down-regulated using FTF-directed strategies. The results presented here indicate indeed that FTF is a potent activator of the HBV pregenomic core promoter. Furthermore, molecular hindrance at the FTF binding sites strongly interferes with HBV promoter-enhancer functions, suggesting possible new opportunities to antagonize HBV replication.

¹ *The FTF gene symbol has been approved by the Genome Database Nomenclature Committee (accession number GDB:9837397); in a recently proposed nomenclature, FTF corresponds to NR5A2 (Nuclear Receptors Nomenclature Committee. 1999. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. Cell 97: 161-163).*

MATERIALS AND METHODS

Electromobility shift assays

EMSA analyses were conducted as described previously (6,13), using total nuclear protein extracts and ³²P-labelled HBV-FTF#2 oligonucleotide ¹⁶⁸⁹CGACCGACCTTGAGGCCTA¹⁷⁰⁷ (with *Eco*RI overhangs) as a probe. Unlabelled oligonucleotides (with *Eco*RI overhangs) HBV-FTF#2 and HBV-FTF#1 (¹⁶³⁸TCCTGCCCAAGGTCTTACAT¹⁶⁵⁷), the AFP promoter FTF-binding sequence TGTTCAAGGACA (FTF α) or its nonbinding mutant TGTTCAATGAAA (FTFm) (13) and the HBV-HNF4#2 sequence ¹⁷⁵⁷AGGTTAAAGGTCT¹⁷⁶⁹ or its mutant AAATTA¹⁷⁵⁷AAAATCT were used as competitors in EMSA reactions. Supershift assays (13) used human FTF (14) antiserum raised in rabbits against the hFTF extra-DBD C-terminal domain (hFTF-GST fusion protein; Pharmacia pGEX-4T3); anti-SF1 antibodies were obtained from Upstate Biotech Inc.

Gene constructs

HBV DNA segments from luciferase vectors ABluc and ABluc Δ e (29) (kindly provided by Dr. Aleem Siddiqui) were transferred into pBluescriptSK+ CAT-expression vector SKCAT (Stratagene; CAT insert at *Hin*DIII/*Bam*HI). The 522-nt *Ava*I fragment (blunted) of ABluc Δ e (containing the HBV core promoter) was inserted at the *Hin*DIII site (blunted) of SKCAT, to yield HBV promoter-CAT construct HP. The 343-nt HBV enhancer I DNA segment of ABluc was amplified by PCR, fitted with 5' *Kpn*I and 3' *Sal*I sites, and cloned into vector HP digested with *Kpn*I and *Sal*I, to generate HBV enhancer/promoter-CAT construct HEP.

Point mutations were introduced into HBV promoter sequences FTF#1, FTF#2 and HNF4#2 using PCR-directed mutagenesis (PFU polymerase protocol of Stratagene). Nucleotide changes were inserted at G-contact points needed for FTF binding to its AFP promoter site (13). Mutations m1 (¹⁶⁴⁴CCAATATTT¹⁶⁵²), m2 (¹⁷⁰¹TCAATATTG¹⁶⁹³) and m4 (¹⁷⁵⁷AAATTAAAAATCT¹⁷⁶⁹) were introduced into vectors HP and HEP at either FTF#1 (HPm1, HEPm1), FTF#2 (HPm2,

HEPm2) or HNF4#2 (HPm4) sites, or at both FTF sites (HPm12, HEPm12) or at all three FTF and HNF4#2 sites (HPm124, HEPm124); mutations were confirmed by sequencing. The core promoter domain was further dissected into a 127-nt DNA segment (see Fig. 3, vector HP Δ) leaving out the FTF#1 and HNF4#2 sequences and the major initiation sites for the C (1818-1822) and preC (1785-1793) mRNA transcripts (42,44) but keeping two upstream C promoter initiation sites mapped by Siddiqui's group (29) (see Fig. 1): synthetic oligonucleotides overlapping within the targeted DNA region were annealed, filled with Klenow, fitted with 5'-*Sall* and 3'-*HinDIII* ends, and cloned into *Sall/HinDIII*-digested SKCAT; vector HP Δ m2, carrying FTF#2 mutation m2 (above) was obtained by the same strategy.

To obtain human expression vector pClhFTF, full-length human FTF cDNA (3.8 kb) was retrieved from a UniZAP-XR library (Stratagene) (14), released from the cloning vector by digestion with *EcoRI* and *XhoI*, and transferred into *EcoRI/Sall*-digested vector pCl from Promega. Carboxy-terminus-truncated FTF vectors pClmFTF Δ AF2 and pClrFTF Δ LBD are mouse FTF/LRH-1 and rat FTF constructs pf Δ 2 and pf Δ 3 in ref. 13.

Transfections

Transient transfection assays were conducted in human hepatoma cell lines HepG2, Hep3B and PLC/PRF/5, or in HeLa cells (all lines obtained from American *Type Culture* Collection), using the calcium phosphate procedure previously described (6, 13). Cells (1.5 to 2.5×10^6 in 10-cm petri dishes) were maintained at 37° with 5% CO₂ in low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO) containing 10% fetal bovine serum (Wisent) and 1% penicillin/streptomycin. Cells were cotransfected with 5 μ g of HBV-CAT reporter construct, 10 μ g of transcription factor expression vector, and 2.5 μ g of pRSVlacZ to control for transfection efficiency (in our assay conditions, titrations with 0.1 to 30 μ g of transcription factor expression vectors have shown that

maximal activatory effects are generally obtained with 5-10 μg of vector). Cells were washed with Hepes 10 mM 16 h after transfection. CAT activities were measured by thin-layer chromatography and phosphorimaging (Storm 860 Molecular Dynamics system equipped with the Imagequant software) 48 h (HepG2, Hep3B, HeLa) or 72 h (PLC/PRF/5) after transfection. Expression vectors for transcription factors used viral enhancer/promoter elements from MSV (C/EBP α), RSV (HNF1 α), and CMV (FTF, FTF Δ AF2, FTF Δ LBD, HNF4 α , HNF3 α , HNF3 β , SP1, SF1).

RESULTS

The HBV core promoter contains two high-affinity FTF-binding sites

A computer search for FTF recognition sequences in the HBV genome (using the GCG Wordsearch software) retrieved only the two candidate sequences we had noted (13) in the upstream regulatory region of the basic core promoter, one matching the FTF consensus binding site T/CCAAGGTCA/G (HBV-FTF#2), the other with one mismatch (HBV-FTF#1, CCAAGGTct) (see Fig. 1). To test these sequences for FTF binding *in vitro*, electromobility shift assays were carried with an oligonucleotide probe encompassing HBV-FTF#2, and total nuclear protein extract from Hep3B cells. Retarded protein/DNA complexes formed as expected for human FTF variants (13), and they were efficiently displaced with 20-fold molar excess of cold oligo HBV-FTF#1, HBV-FTF#2, or AFP-FTF (FTF α) (Fig. 1, lanes 3, 5, 7) but not by 100-fold excess of mutant AFP-FTF oligo FTFm (Fig. 1, lane 8); furthermore, the specific bands were supershifted by anti-FTF antibodies, with no effect by antibodies against the closely related SF1 protein (Fig. 1, lanes 9-10). These results confirmed that the HBV core promoter contained two high-affinity FTF-binding sequences, in the close vicinity of binding sites for other liver-enriched transcription factors (C/EBP, HNF3 and HNF4) (see Fig. 1). The HBV-FTF#2 site displayed greater affinity for FTF than the HBV-FTF#1 site or even the strong AFP-FTF site ($K_d \approx 0.3$ nM) (13), as shown in Fig. 1 by bandshift displacements at low excess of competitor (lanes 2, 4 and 6). Similar EMSA results were obtained using nuclear protein extracts from PLC/PRF/5 cells (data not shown). EMSA analysis of HepG2 cells, however, revealed that HepG2 cells contain relatively little FTF and instead, ectopically express abundant amounts of steroidogenic factor 1 (SF1): this was shown in reactions using specific anti-FTF or anti-SF1 antibodies (Fig. 1, lanes 12 and 13; see also Fig. 9A in ref. 13), and confirmed by RT-PCR analyses (our unpublished results). As expected from their identical DNA-binding protein domains (13), FTF and SF1 had similar specificity and affinity for HBV-FTF#1 or HBV-FTF#2.

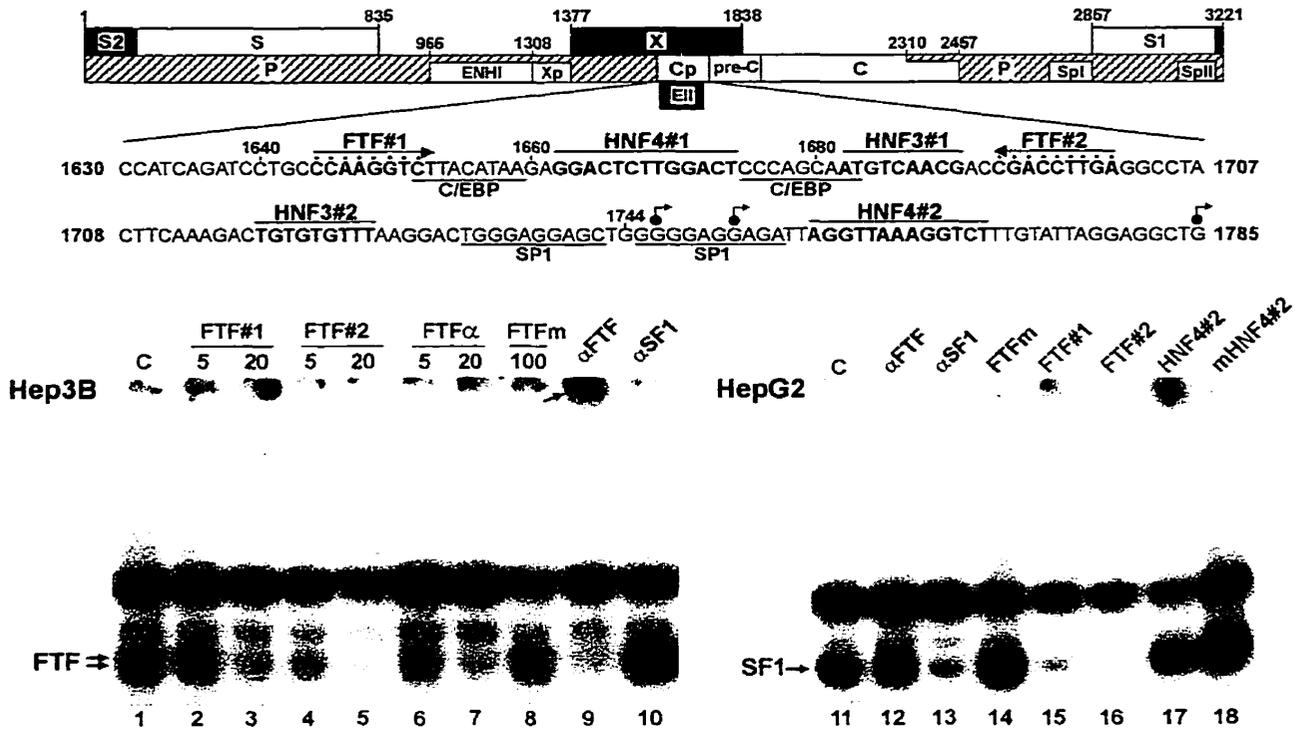


Figure 1 : The HBV core promoter contains two high-affinity binding sites for nuclear receptor FTF (or its close relative SF1). The upper diagram displays the main structural and regulatory components of the HBV genome, and a partial nucleotide sequence of the core promoter (Cp): dots mark nucleotides present in the consensus FTF binding site. S, S1, S2, Spl, SplII: envelope genes and promoters; X/Xp, X gene and promoter; P, DNA polymerase; C/preC, nucleocapsid gene and upstream region; ENH I, EII: enhancers I and II; angled arrows, transcription initiation sites reported for the C (1745, 1751, 1818-1822) and preC (1785-1793) mRNA transcripts (29,42,44). Autoradiograms show electromobility shift assays conducted with 3 μ g of total nuclear proteins from Hep3B or HepG2 cells, using a ³²P-labelled HBV-FTF#2 oligonucleotide probe. Numbers above the lanes are fold molar excess of competing cold oligonucleotide; HepG2 reactions used 50-fold molar excess of competitors; FTF and FTFm: native and mutant FTF sites from the AFP gene promoter; HNF4#2 and mHNF4#2: wild-type and mutant HBV sequence 1757-1769; C, no competitor. Lanes FTF and SF1 show supershift reactions using antibodies against FTF or SF1: note in the Hep3B reactions that FTF completely displaces the specifically retarded complexes towards an upper band (arrow, lane 9), whereas displacement is negligible with the HepG2 extract (lane 12) (a faint supershifted band was visible in other assays); conversely, specific bandshifts are strongly decreased by SF1 in the HepG2 extract (lane 13) and not in the Hep3B extract (lane 10). These assays indicate highly specific occupancy of FTF#2 segment 1689-1707 by FTF or SF1, and that FTF#1 has slightly less affinity for FTF/SF1 than FTF#2, and HNF4#2 less affinity than FTF#1.

FTF (or SF1) strongly activates the nucleocapsid promoter

The putative FTF regulatory effect on HBV core promoter activity was assessed by transient transfection assays in hepatoma cells HepG2, Hep3B and PLC/PRF/5, three human lines known to support transcription of the HBV genome (8, 19, 21, 37). We first tested the nucleocapsid promoter in a natural 0.5-kb context of contiguous DNA, without enhancer I sequences (reporter construct HP, Fig. 2). In all three hepatoma lines, cotransfection of HP with the FTF expression vector resulted in marked stimulation of HP activity (4.5 to 6.5 fold, Fig. 2, lane 8). Transfection of SF1 resulted in yet stronger induction (Fig. 2, lane 9), especially in HepG2 cells (16 fold) where ectopic SF1 is already abundant (Fig. 1). Other transcription factors were then tested for coregulatory effects with FTF. Transcription factor HNF4 α produced 4-fold enhancement of HP reporter activity in Hep3B or HepG2 cells, which is consistent with previous studies (16, 34), and in both lines activation by FTF and HNF4 α was additive (Fig. 2, lanes 7, 8 and 10). In PLC/PRF/5 cells (less differentiated than Hep3B or HepG2) the HP construct reacted poorly to HNF4 α or to FTF + HNF4 α (Fig. 2, lanes 7 and 10), and in HeLa cells only marginal stimulatory effects were observed with FTF and/or HNF4 α (Fig. 2, lanes 7, 8, 10); a well differentiated hepatocytic environment seems therefore needed for efficient use of FTF and HNF4 α . Factors C/EBP α , HNF1 α and HNF3 α were tested in HepG2 and Hep3B cells, and factors HNF3 β and SP1 were tested in Hep3B cells. C/EBP α , HNF3 α and HNF3 β had some stimulatory effects (2 fold, Fig. 2, lanes 2,5,6), but none of the tested factors added significantly to the activation effect of FTF or HNF4 α (Fig. 2, lane 11, and data not shown); instead, they generally resulted in lower activation by FTF and/or HNF4 α (Fig. 2, lane 12, and data not shown). Thus, FTF and HNF4 α were clearly the most efficient partners in coactivating the nucleocapsid promoter, which suggests productive cooccupation of their tandem binding sites (Fig. 1).

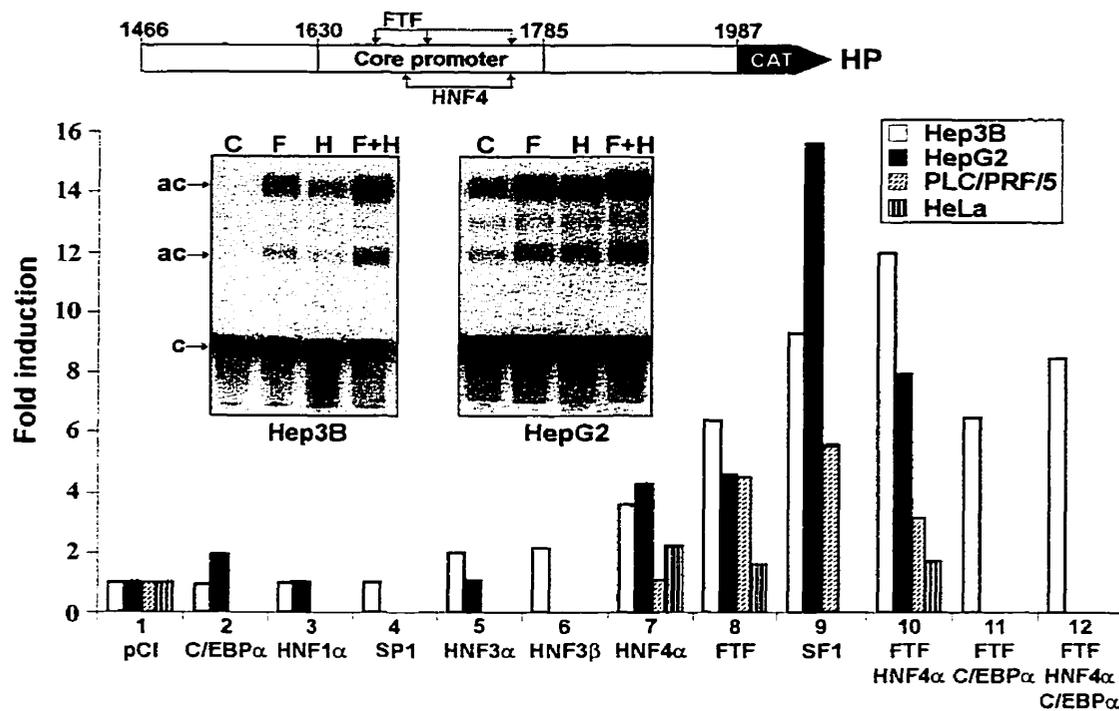


Figure 2 : Transient transfection assays using CAT reporter construct HP (5 μ g) cotransfected with transcription factor expression vectors (each at 10 μ g). Results are averages of three or four sets of duplicate or triplicate transfections, referred to control vector pCI run in parallel in each experiment and given a value of 1. Autoradiograms show CAT assays from HP cotransfection with void vector pCI (C) or expression vectors FTF (F), HNF4 (H) or FTF+HNF4 (F+H) (c, chloramphenicol; ac, acetylated products) (basal HP activity in Hep3B cells, lane C, was easily detected with longer exposure).

FTF directly activates the core promoter

To establish if FTF (or SF1) induced the core promoter via sequences FTF#1 and/or FTF#2, we used mutant reporter constructs HPm1, HPm2 and HPm12. In Hep3B cells, basal promoter activity of HPm1 or HPm2 was not significantly reduced, whereas HPm12 was inhibited by 30%. In HepG2 cells, HPm1 was unaffected while HPm2 was reduced by 50% and HPm12 by 80%. These results confirmed the use of FTF/SF1 by the core promoter in basal cell conditions, indicating a more active role for FTF#2, and the use of both FTF#1 and FTF#2 for optimal core promoter function. Mutation of FTF#1 or FTF#2 also reduced HP activation by exogenous FTF in Hep3B cells, while activation of HPm2 was slightly reduced in HepG2 cells, and double mutation of FTF#1 and FTF#2 inhibited the response to FTF by 65% in Hep3B cells and 45% in HepG2 cells (Fig. 3, lanes 2-3-4). These results indicated again that FTF#1 and FTF#2 sites had to be simultaneously occupied for maximal activation by FTF, and also that FTF induction resulted largely from direct FTF action at its two promoter binding sites (with only one FTF site intact, the core promoter response to exogenous FTF was clearly less affected in HepG2 cells than in Hep3B cells: this might relate to abundant endogenous SF1 in HepG2 cells, allowing for greater saturation of a single site and perhaps more efficient use of SF1 coactivators present in HepG2; as noted, SF1 induces the core promoter far more efficiently than FTF in HepG2 cells) (compare lanes 8-9 in Fig. 2). While residual basal activity of HPm12 was easily explained by its composite promoter activation domain, residual inducibility of HPm12 by FTF (Fig. 3, lane 4) suggested that FTF might also be acting indirectly via other promoter regulators, or that vector HP contained other functional FTF promoter sites. The most likely candidate for the latter was HNF4#2, a DR1 hormone response element (AGGTCA repeat with a 1-nt spacer): near canonical DR1 motifs such as HNF4#2 form avid binding sites for HNF4 and several other nuclear receptors (34, 45), but they are also recognized by FTF (EMSA reactions indicated about 10-fold lower affinity of HNF4#2 for FTF or SF1, compared to FTF#1; see Fig. 1, lane 17). We then

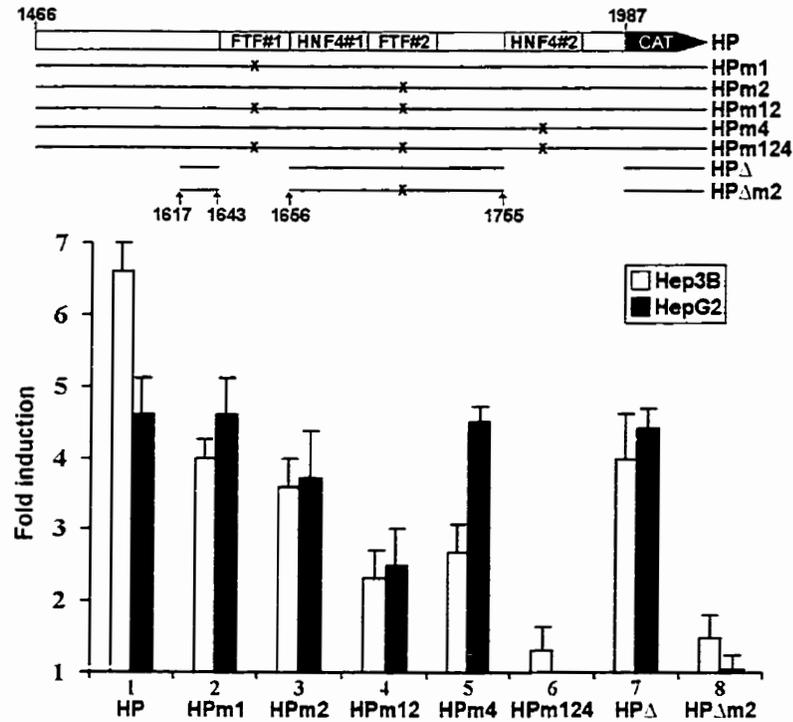


Figure 3 : Transient cotransfection assays using 10 μ g of FTF expression vector and 5 μ g of core promoter reporter constructs. Results are averages \pm 1 SD from three sets of duplicate or triplicate transfections, referred to control cotransfections with vector pCI given a value of 1.

tested HP vectors mutated in HNF4#2 (HPm4) or in FTF#1, FTF#2 and HNF4#2 (HPm124). Basal activity of HPm4 was reduced by 40% in Hep3B cells and 85% in HepG2 cells, and HPm124 was reduced by 60% in Hep3B cells and to undetectable level in HepG2 cells. Induction of HPm4 by coexpressed FTF was also reduced by 60% in Hep3B cells (Fig. 3, lane 5) and FTF coexpression had only negligible effect on HPm124 in Hep3B cells and no effect in HepG2 cells (Fig. 3, lane 6). We further tested a minimal (1617-1755) upstream promoter construct lacking FTF#1 and HNF4#2 (HP Δ , Fig. 3). HP Δ responded to FTF like construct HPm1 (Fig. 3, lanes 2 and 7); when HP Δ was further mutated at the FTF#2 site (HP Δ m2), all induction by FTF was again essentially eliminated (Fig. 3, lane 8). These combined results confirmed the importance of FTF#2 and they were consistent with significant use of HNF4#2 by FTF/SF1 when FTF is overexpressed and especially when its higher affinity sites are unavailable (HPm12). In our assay conditions, it then appeared that all core promoter activation by FTF could be accounted for by its direct interaction with three FTF-binding sequences. The exact physiological role of FTF binding to HNF4#2 remains to be seen, given the abundance and higher affinity of alternate receptors competing for the DR1 motif in steady-state conditions (34,45).

FTF effect on core promoter interactions with enhancer I

FTF effects were also examined in the context of genomic transactions between the core promoter and its cognate enhancer I domain (19,36,38). While basal activity of construct HEP was about 10-fold higher than HP (in HepG2 or Hep3B cells) (autoradiograms in Fig. 2 and in Fig. 4), FTF induction of HEP or HP was essentially the same (5-6 fold) (Fig. 4, lane 1 vs Fig. 2, lane 8): this suggested that FTF induction of HEP was entirely due to FTF binding at the core promoter. Mutations of FTF#1 and/or FTF#2 also reduced HEP induction by FTF (Fig. 4, lanes 2-3-4), indicating that both FTF#1 and FTF#2 participated in the interaction between the core promoter and enhancer I. Contrasting with FTF, coexpression of HNF4 α resulted in 3-4 fold activation of HEP or its FTF sites mutants (Fig. 4,

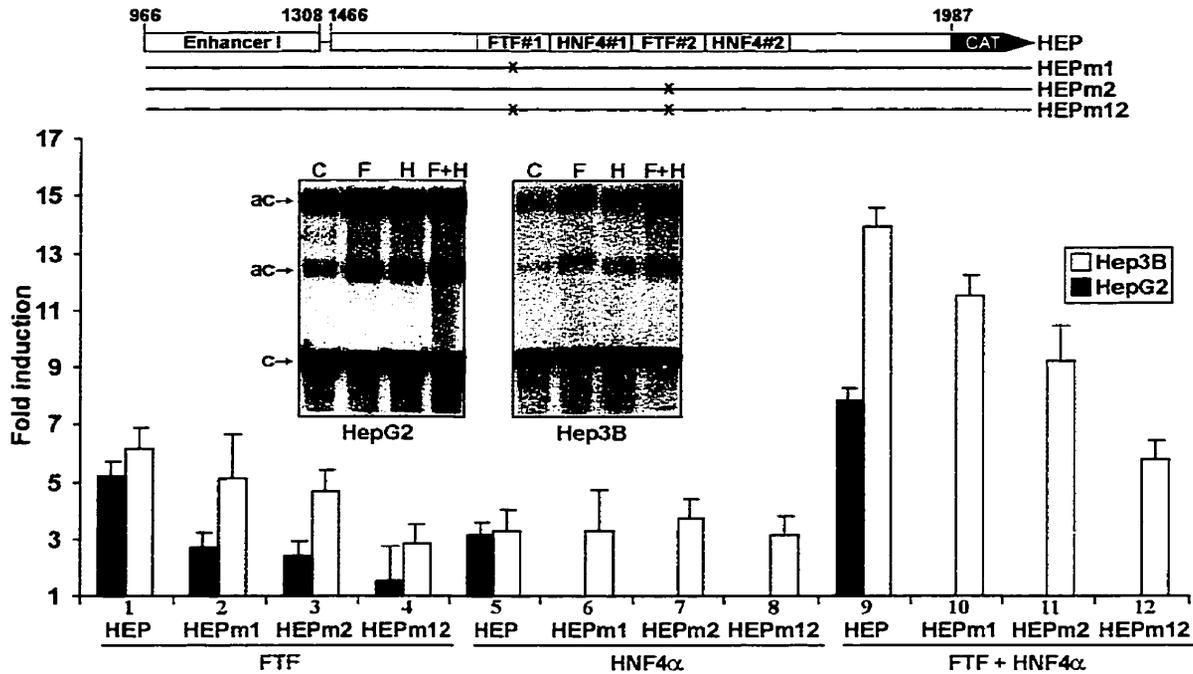


Figure 4 : FTF effects on HBV core promoter/enhancer I activity. HEP reporters (5 μ g) were cotransfected with 10 μ g of FTF and/or 10 μ g of HNF4 α expression vectors (HNF4 α with HEP mutants was tested in Hep3B only; lanes 6-8 and 10-12). Results are averages \pm 1 SD from three sets of duplicate or triplicate transfections, referred to pCI transfection given a value of 1. Inset autoradiograms illustrate CAT activities recovered from HEP cotransfection with pCI (C), FTF (F) and/or HNF4 α (H) (c, chloramphenicol; ac, acetylated products).

lanes 5 to 8); additive effects of FTF+HNF4 α were also proportionately maintained with all HEP constructs (Fig. 4, lanes 9 to 12): these results clearly showed that HNF4 α induction of the core promoter can proceed independently from FTF/SF1. The induction by HNF4 α was similar for HEP and HP constructs (Fig. 4, lanes 5 and 9; vs Fig. 2, lanes 7 and 10), also suggesting that HNF4 α , like FTF, has little effect (direct or indirect) on the enhancer I segment: this is consistent with previous conclusions (34). While cotransfected FTF+HNF4 α raised HEP activity two logs over basal HP activity, it is noteworthy that double FTF sites mutation m12 (reducing basal HP activity by as much as 80%) had little effect on the basal enhancer-promoter activity of HEP (less than 1.4-fold decrease): it is apparent that without FTF/SF1, HBV can still mount highly productive transactions with enhancer I using other core promoter factors.

AF2-truncated FTF deactivates the core promoter

The carboxy-terminus region of the FTF protein (the activation function 2 domain) contains the hexameric amino acid motif LLIEML found in many other nuclear receptors and critical for their activation. Previously, we found that AF2-truncated FTF (FTF Δ AF2, diagrammed in Fig. 5) strongly suppresses AFP promoter activity in transfection assays (presumably by competing out endogenous FTF with the transcriptionally inert FTF mutant) (13). FTF Δ AF2 was tested for similar dominant negative effects on basal HEP activity. In HepG2, Hep3B or PLC/PRF/5 cells, FTF Δ AF2 strongly inhibited HEP activity, down to less than 10% (Fig. 5A-B-C). To assess competitive effects of FTF Δ AF2 at the FTF binding sites, further assays were conducted with HEPm1, HEPm2 and HEPm12. At a concentration of FTF Δ AF2 decreasing HEP activity by 70% in HepG2 cells, double FTF site mutant HEPm12 was repressed only 20% (Fig. 5B); in Hep3B cells, FTF Δ AF2 (20 μ g) reduced HEP activity more than 90%, whereas HEPm12 activity was reduced less than 30% (Fig. 5B). These data thus support a competitive mechanism for deactivation of the nucleocapsid promoter,

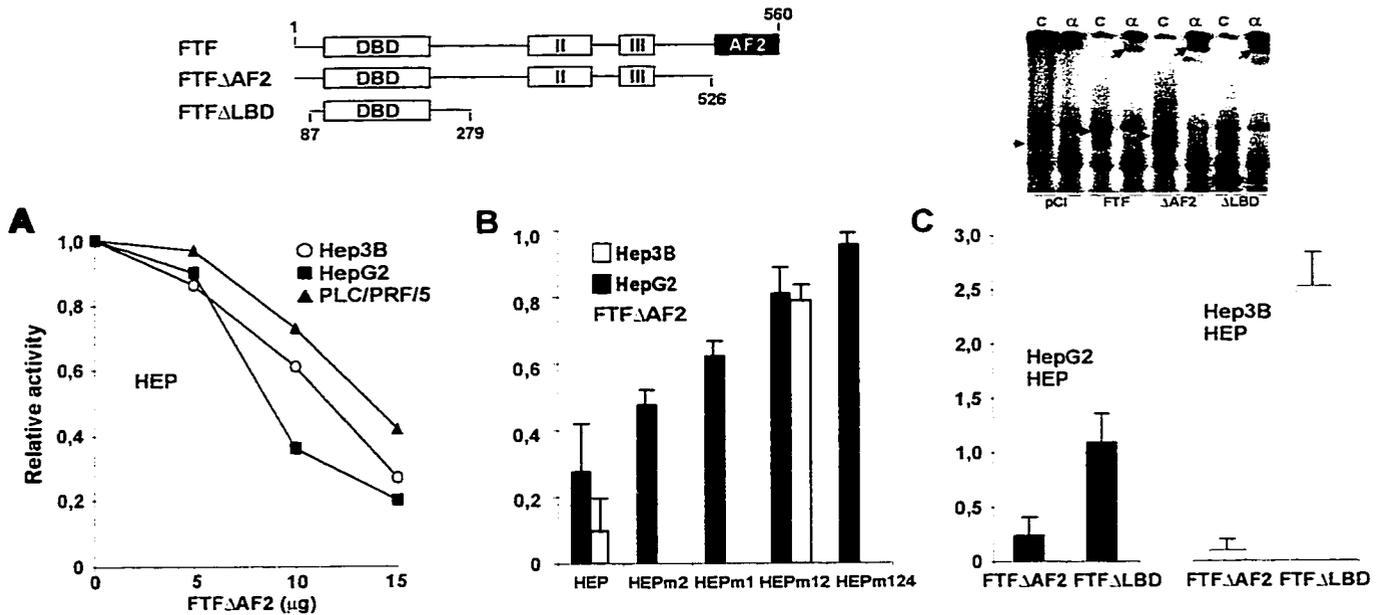


Figure 5 : Repression of HBV enhancer-promoter activity by AF2-truncated FTF (FTF Δ AF2 in upper diagram: DBD, DNA-binding domain; II, III, receptor homology regions II and III; AF2, activation function 2). **(A)** Reporter construct HEP (5 μ g) was cotransfected with 30 μ g of control pCI vector (reference 1.0) or with increasing amounts of expression vector pCI Δ FTF Δ AF2 complemented to 30 μ g with pCI; results are average CAT activities recovered from three sets of duplicate transfections. **(B)** HepG2 cells were cotransfected with 5 μ g of HEP constructs and 10 μ g of pCI Δ FTF Δ AF2 or 10 μ g of pCI (reference value of 1.0); Hep3B cells were cotransfected with 5 μ g of HEP and 20 μ g of pCI Δ FTF Δ AF2 or pCI. Results are average CAT activities \pm 1 SD from three triplicate transfections. **(C)** Cotransfections in HepG2 or Hep3B cells using 5 μ g of HEP vector and 20 μ g of pCI Δ FTF Δ AF2 or pCI Δ FTF Δ LBD or pCI (reference value of 1.0): results are averages \pm 1SD from two sets of triplicate transfections. The autoradiogram shows bandshift assays conducted with the FTF#2 probe and nuclear protein extracts from Hep3B cells transfected with control or HA-tagged FTF-expression vectors; lanes C, reactions without antibodies; lanes α , reactions with anti-FTF antibodies (upper arrows point supershifted bands; the leftmost arrow points endogenous FTF, other arrows point the exogenous FTF products).

substituting endogenous SF1/FTF with transcriptionally non functional FTF Δ AF2 bound to the core promoter. Residual repression of HEPm12 by FTF Δ AF2 further suggested that FTF Δ AF2 might also compete out activators from the HNF4#2 site : this was tested in HepG2 cells with vector HEPm124, which had low (\approx 3% of HEP) but measurable basal activity, and it showed no significant repression by FTF Δ AF2 (Fig. 5B). Remarkably, deactivation of HEP by FTF Δ AF2 appeared unsaturated in our assay conditions (Fig. 5A) and it clearly exceeded the effect expected by eliminating FTF/SFI from enhancer-promoter transactions (as noted from marginal change in basal levels of HEP vs HEPm12). Our interpretation is that defective FTF brought onto the core promoter disrupts alternative interactions of other promoter factors with enhancer I: steric hindrance more than DNA-binding *per se* seems to be at play, since a shorter FTF deletion mutant (FTF Δ LBD) had no repressive effect and even enhanced HEP activity (Fig. 5C).

DISCUSSION

This study identifies nuclear receptor FTF as one component operating the HBV nucleocapsid promoter, using two high-affinity FTF-binding sites for basal core promoter activity and its productive interaction with enhancer I. This is in line with early findings (47) that basal activation of the core promoter is mainly provided by DNA segment 1636-1703 (carrying the two FTF sites), and that removing segments FTF#1 (1648-1668 or 1645-1656) or FTF#2 (1687-1703 or 1679-1719) markedly reduces basic core promoter activity (10,29,47). Other evidence supporting the use of both FTF#1 and FTF#2 sites includes the observation that HBV strain variants seem to never mutate FTF#2, while FTF#1 is also rarely mutated and segment 1644/1666 (carrying FTF#1) is frequently duplicated (15,33): this clearly indicates a selective advantage to keep or amplify the two FTF sites. [It can also be noted that in HCC samples obtained from endemic HBV populations, the most common gain of genetic material ($\approx 75\%$ of the cases) occurs by amplification of chromosome 1q (22, 41), carrying the FTF locus (14, 28): maintaining or enhancing FTF gene expression plausibly provides an advantage to HBV in neoplastic progression.] Recently, another group found that FTF#2 is footprinted by a liver-enriched nuclear factor, which led to the independent cloning of human FTF, and to transfection assays concluding that FTF#2 is the sole element used by FTF to activate the nucleocapsid promoter (28): these experiments, however, used a HBV reporter construct from which FTF#1 was deleted and also, they used HeLa cells in which transfected FTF may not make efficient use of its lower-affinity site (HNF4#2). Independent hFTF expression cloning was also achieved in a yeast one-hybrid screening with HBV segment 1640-1663 (carrying the FTF#1 motif), and transfection assays conducted in hepatoma cells were also consistent with activation of the 1640-1663 segment by FTF (18).

Among other factors tested here, HNF4 α was clearly the most efficient FTF partner for costimulation of the core promoter: these two single factors, highly

expressed together only in hepatocytes, may thus largely account for the hepatotropism of HBV infection. However, the core promoter also clearly needs other liver factors since FTF + HNF4 α were poorly effective in HeLa cells. The other factors tested had low activatory effects and in fact reduced the action of FTF and/or HNF4 α . As suggested by others (29), this may reflect protein displacement from overlapping chromatin domains, and suboptimal use of the stronger FTF/HNF4 activatory sites: spacing between their four high-affinity binding sites would predictably avoid binding interference between FTF and HNF4, but not between most other combinations of factors tested (see Fig. 1).

FTF action could then be exerted on three functional domains intertwined in the 1630-1820 HBV segment, the C and preC promoters and enhancer II (see Fig. 2) (30,39,43,46). Ting's group (47) has shown that DNA region 1636-1703 coordinately enhances the synthesis of preC and C transcripts: therefore, it seemed likely that FTF would activate both the C and preC promoters, and this was recently borne out in HBV/FTF cotransfection experiments conducted in HuH7 cells (18). One functional difference between the preC and C promoter domains is that the preC promoter is repressed by HNF4 (presumably because HNF4#2 overlaps with the preC TATA-like sequence) (45). Additive effects of FTF and HNF4 α might thus be taken as FTF being principally involved with pregenomic core promoter function, and playing a particularly important role in the early life cycle and systemic load of HBV. This would also be consistent with the apparent lack of FTF recognition sequences in other HBV regulatory domains, and would not preclude that the core promoter could use alternate factors at later stages of infection to avoid excessive squelching of FTF or because new viral products would favor other factors (10). The enhancer II issue is also intricate. Although evidence has been produced (46) for full enhancer II effects using segments 1646-1668 and 1704-1715 (i.e. bypassing FTF, HNF4 and HNF3 sites), enhancer II has more generally been defined as carrying one or the two FTF recognition sequences (30,37,39,43); furthermore, point mutations have indicated that HNF3#2 is essential both to core promoter activity and to

enhancer II effects on a heterologous promoter (27). It thus seemed reasonable to think that FTF might likewise serve both core promoter and enhancer II functions, and again recent differential analyses of HBV transcripts following HBV/FTF cotransfections indicate that such is the case (18).

The present work adds to growing evidence that HBV regulatory domains can use alternate sets of factors to adapt efficiently to changing hepatocytic states. It also illustrates some limits of HBV transfection analyses using hepatoma cells. Here, double FTF site promoter mutants were only marginally affected in the presence of enhancer I, which may be quite misleading on the actual role of FTF with intact functional sites at preneoplastic stages. Also, high SF1 with low C/EBP α (12) in HepG2 cells might mimic high pregenomic activity at early viral stages, whereas a lower FTF to C/EBP α ratio in Hep3B cells could rather mimic viral load conditions favoring alternate core activators, or enhancer II activity. The very finding of SF1 in HepG2 cells also illustrates how aberrant gene expression in tumor cells may obscure homeostatic processes occurring in hepatocytes. In spite of these intricacies, the bulk of current data seems to make a compelling case for a preponderant role of HNF4 and FTF in tightly controlling the pregenomic core promoter and hence early amplification of HBV infection. In that regard, aggressive strains of HBV frequently convert HNF4#2 to a high-affinity HNF1 site (15,20,26), also showing the selective advantage of a genetic element that escapes potential negative regulators of HNF4#2 (45).

Whether receptor signalization pathways reaching HNF4 or FTF can now be effectively manipulated against HBV infection remains a challenging prospect at this time, considering how HBV could switch activators and adapt to new liver conditions. Also, while specific signals conveyed by FTF to the AFP promoter might plausibly be sensed by the HBV core promoter, certainly not all FTF-dependent AFP functions are reproduced in the HBV context: glucocorticoids in particular inhibit AFP via FTF (13) but had no discernible FTF-dependent effects on our HBV constructs. The increasing diversity of FTF inducible genes

(25,31,32,35) also suggests that FTF may well respond to different signals to optimize its action at a given locus, none of which signals however may be sufficient to quench FTF activity if interrupted. The present work would also predict limited success of antisense or similar strategies simply removing FTF from action. More encouraging results were obtained here with mutant FTF Δ AF2, causing dramatic inhibition of HBV enhancer-promoter functions. This effect clearly differs from simply removing FTF/SF1 from action since no comparable decrease was incurred in basal HEP activity by mutation eliminating the two high-affinity FTF binding sites. Notably, the shorter FTF Δ LBD mutant did not repress HBV whereas it totally suppressed AFP promoter activity (13) (presumably because FTF at the AFP locus is essential to couple the AFP promoter with its distal enhancer) (6,40). Our interpretation favors steric hindrance whereby the longer FTF mutant occupies the HBV core promoter as an inert complex that also hinders alternative protein interactions with the enhancer domain. Dominant negative factors may thus create new opportunities to tackle functional redundancies of HBV regulatable functions; liver cells might also be spared from deleterious dominant negative effects by alternating HBV target sites. Conceivably, adenoviral or adeno-associated viral vectors could serve to drive dominant negative effectors into hepatocytes *in vivo*; a recently described preclinical murine model of HBV infection (23) might be particularly useful to address this type of therapeutical strategy.

Acknowledgements

This work was supported by a studentship (SG) and grant MT-6478 (LB) from the Medical Research Council of Canada. We thank Drs. A. Siddiqui, R. Costa, F. Sladek, M. V. Govindan, J. Milbrandt and A. Anderson for providing expression plasmids, Lise Lévesque and Julie Vézina for collaboration, Dr. Manuel Caruso for helpful discussions, and Marie-France Voyer and Denise Rioux for excellent secretarial assistance.

REFERENCES

1. **Araki, K., J.-I. Miyazaki, O. Hino, N. Tomita, O. Chisaka, K. Matsubara, and K.-I. Yamamura.** 1989. Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:207-211.
2. **Babinet, C., H. Farza, D. Morello, M. Hadchouel, and C. Pourcel.** 1985. Specific expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in transgenic mice. *Science* **230**:1160-1163.
3. **Beasley, R. P., L. Y. Hwang, C. C. Lin, and C. S. Chien.** 1981. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* **ii**:1129-1133.
4. **Bélanger, L., D. Hamel, L. Lachance, D. Dufour, M. Tremblay, and P. M. Gagnon.** 1975. Hormonal regulation of α_1 foetoprotein. *Nature* **256**:657-659.
5. **Bélanger, L., S. Roy, and D. Allard.** 1994. New albumin gene 3' adjacent to the α_1 -fetoprotein locus. *J. Biol. Chem.* **269**:5481-5484.
6. **Bernier, D., H. Thomassin, D. Allard, M. Guertin, D. Hamel, M. Blaquière, M. Beauchemin, H. LaRue, M. Estable-Puig, and L. Bélanger.** 1993. Functional analysis of developmentally regulated chromatin-hypersensitive domains carrying the α_1 -fetoprotein gene promoter and the albumin/ α_1 -fetoprotein intergenic enhancer. *Mol. Cell. Biol.* **13**:1619-1633.
7. **Blumberg, B. S.** 1997. The current state of the prevention of HBV infection, the carrier state and hepatocellular carcinoma. *Res. Virol.* **148**:91-94.
8. **Chang, C., K.-S. Jeng, C.-P. Hu, S. J. Lo, T.-S. Su, L.-P. Ting, C.-K. Chou, S.-H. Han, E. Pfaff, J. Salfeld, and H. Schaller.** 1987. Production of hepatitis B virus *in vitro* by transient expression of cloned HBV DNA in a hepatoma cell line. *EMBO J.* **6**:675-680.
9. **Chang, M. H., C. J. Chen, M. S. Lai, H. M. Hsu, T. C. Wu, M. S. Kong, D. C. Liang, W. Y. Shau, and D. S. Chen.** 1997. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan childhood hepatoma study group. *N. Engl. J. Med.* **336**:1855-1859.

10. **Choi, B. H., G. T. Park, and H. M. Rho.** 1999. Interaction of hepatitis B viral X protein and CCAAT/enhancer-binding protein α synergistically activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter. *J. Biol. Chem.* **274**:2858-2865.
11. **Dunsford, H. A., S. Sell, and F. V. Chisari.** 1990. Hepatocarcinogenesis due to chronic liver cell injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Cancer Res.* **50**:3400-3407.
12. **Friedman, A. D., W. H. Landschulz, and S. L. McKnight.** 1989. CCAAT/enhancer binding protein activates the promoter of the serum albumin gene in cultured hepatoma cells. *Genes Dev.* **3**:1314-1322.
13. **Galarneau, L., J.-F. Paré, D. Allard, D. Hamel, L. Lévesque, J. D. Tugwood, S. Green, and L. Bélanger.** 1996. The α_1 -fetoprotein locus is activated by a nuclear receptor of the *Drosophila* FTZ-F1 family. *Mol. Cell. Biol.* **16**:3853-3865.
14. **Galarneau, L., R. Drouin, and L. Bélanger.** 1998. Assignment of the fetoprotein transcription factor gene (FTF) to human chromosome band 1q32.11 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **82**:269-270.
15. **Günther, S., N. Piwon, A. Iwanska, R. Schilling, H. Meisel, and H. Will.** 1996. Type, prevalence, and significance of the core promoter/enhancer II mutations in hepatitis B viruses from immunosuppressed patients with severe liver disease. *J. Virol.* **70**:8318-8331.
16. **Guo, W., M. Chen, T. S. B. Yen, and J.-H. Ou.** 1993. Hepatocyte-specific expression of the hepatitis B virus core promoter depends on both positive and negative regulation. *Mol. Cell. Biol.* **13**:443-448.
17. **Ikeda, Y., D. S. Lala, X. Luo, E. Kim, M.-P. Moisan, and K. L. Parker.** 1993. Characterization of the mouse *FTZ-F1* gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol. Endocrinol.* **7**:852-860.
18. **Ishida, H., Ueda, K., Ohkawa, K., Kanazawa, Y., Hosui, A., Nakanishi, F., Mita, E., Kasahara, A., Sasaki, Y., Hori, M., and Hayashi, N.** 2000. Identification of multiple transcription factors, HLF, FTF, and E4BP4, controlling hepatitis B virus enhancer II. *J. Virol.* **74**:1241-1251.

19. **Jameel, S., and A. Siddiqui.** 1986. The human hepatitis B virus enhancer requires *trans*-acting cellular factor(s) for activity. *Mol. Cell. Biol.* **6**:710-715.
20. **Kidd-Ljunggren, K., M. Öberg, and A. H. Kidd.** 1997. Hepatitis B virus X gene 1751 to 1764 mutations: implications for HBeAg status and disease. *J. Gen. Virol.* **78**:1469-1478.
21. **Knowles, B. B., C. C. Howe, and D. P. Aden.** 1980. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**:497-499.
22. **Kusano, N., K. Shiraishi, K. Kubo, A. Oga, K. Okita, and K. Sasaki.** 1999. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in hepatocellular carcinomas: their relationship to clinicopathological features. *Hepatology* **29**:1858-1862.
23. **Larkin, J., M. Clayton, B. Sun, C. E. Perchonock, J. L. Morgan, L. D. Siracusa, F. H. Michaels, and M. A. Feitelson.** 1999. Hepatitis B virus transgenic mouse model of chronic liver disease. *Nat. Med.* **5**:907-912.
24. **Lee, W. M.** 1997. Hepatitis B virus infection. *N. Engl. J. Med.* **337**:1733-1745.
25. **Lee, Y.-K., K. L. Parker, H.-S. Choi, and D. D. Moore.** 1999. Activation of the promoter of the orphan receptor SHP by orphan receptors that bind DNA as monomers. *J. Biol. Chem.* **274**:20869-20873.
26. **Li, J., V. E. Buckwold, M.-W. Hon, and J.-H. Ou.** 1999. Mechanism of suppression of hepatitis B virus precore RNA transcription by a frequent double mutation. *J. Virol.* **73**:1239-1244.
27. **Li, M., Y. Xie, X. Wu, Y. Kong, and Y. Wang.** 1995. HNF3 binds and activates the second enhancer, ENII, of hepatitis B virus. *Virology* **214**:371-378.
28. **Li, M., Y.-H. Xie, Y.-Y. Kong, X. Wu, L. Zhu, and Y. Wang.** 1998. Cloning and characterization of a novel human hepatocyte transcription factor, hB1F, which binds and activates enhancer II of hepatitis B virus. *J. Biol. Chem.* **273**:29022-29031.
29. **López-Cabrera, M., J. Letovsky, K.-Q. Hu, and A. Siddiqui.** 1990. Multiple liver-specific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic

- promoter: trans-activation and repression by CCAAT/enhancer binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:5069-5073.
- 30. López-Cabrera, M., J. Letovsky, K.-Q. Hu, and A. Siddiqui.** 1991. Transcriptional factor C/EBP binds to and transactivates the enhancer element II of the hepatitis B virus. *Virology* **183**:825-829.
- 31. Nitta, M., S. Ku, C. Brown, A. Y. Okamoto, and B. Shan.** 1999. CPF: an orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:6660-6665.
- 32. Paré, J.-F., Roy, S., & Bélanger, L.** 1999. Characterization of the mouse Fetoprotein Transcription Factor (FTF) gene promoter and identification of HNF1 and HNF4 promoters as FTF targets, abstr. 10, p.10. *In Abstracts of the 8th Biennial International Congress on Liver Development, Gene Regulation and Disease 1999, Orvieto, Italia.*
- 33. Pult, I., T. Chouard, S. Wieland, R. Klemenz, M. Yaniv, and H. E. Blum.** 1997. A hepatitis B virus mutant with a new hepatocyte nuclear factor 1 binding site emerging in transplant-transmitted fulminant hepatitis B. *Hepatology*. **25**:1507-1515.
- 34. Raney, A. K., J. L. Johnson, C. N. A. Palmer, and A. McLachlan.** 1997. Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J. Virol.* **71**:1058-1071.
- 35. Rausa, F., L. Galarneau, L. Bélanger, and R. Costa.** 1999. The nuclear receptor Fetoprotein Transcription Factor is coexpressed with its target gene HNF-3 β in the developing murine liver intestine and pancreas. *Mech. Develop.* **89**:185-188.
- 36. Shaul, Y., W. J. Rutter, and O. Laub.** 1985. A human hepatitis B viral enhancer element. *EMBO J.* **4**:427-430.
- 37. Su, H., and J.-K. Yee.** 1992. Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:2708-2712.
- 38. Tognoni, A., R. Cattaneo, E. Serfling, and W. Schaffner.** 1985. A novel expression selection approach allows precise mapping of the hepatitis B virus enhancer. *Nucleic Acids Res.* **13**:7457-7472.

- 39. Wang, Y., P. Chen, X. Wu, A.-L. Sun, H. Wang, Y.-A. Zhu, and Z.-P. Li.** 1990. A new enhancer element, ENII, identified in the X gene of hepatitis B virus. *J. Virol.* **64**:3977-3981.
- 40. Wen, P., N. Crawford, and J. Locker.** 1993. A promoter-linked coupling region required for stimulation of α -fetoprotein transcription by distant enhancers. *Nucleic Acids Res.* **21**:1911-1918.
- 41. Wong, N., P. Lai, S.-W. Lee, S. Fan, E. Pang, C.-T. Liew, Z. Sheng, J. W.-Y. Lau, and P. J. Johnson.** 1999. Assessment of genetic changes in hepatocellular carcinoma by comparative genomic hybridization analysis. Relationship to disease stage, tumor size, and cirrhosis. *Am. J. Pathol.* **154**:37-43.
- 42. Yaginuma, K., Y. Shirakata, M. Kobayashi, and K. Koike.** 1987. Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:2678-2682.
- 43. Yee, J. K.** 1989. A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus. *Science* **246**:658-661.
- 44. Yu, X., and J. E. Mertz.** 1996. Promoters for synthesis of the pre-C and pregenomic mRNAs of human hepatitis B virus are genetically distinct and differentially regulated. *J. Virol.* **70**:8719-8726.
- 45. Yu, X., and J. E. Mertz.** 1997. Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoters of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily. *J. Virol.* **71**:9366-9374.
- 46. Yuh, C.-H., and L.-P. Ting.** 1991. C/EBP-like proteins binding to the functional box- α and box- β of the second enhancer of hepatitis B virus. *Mol. Cell. Biol.*, **11**:5044-5052.
- 47. Yuh, C.-H., Y.-L. Chang, and L.-P. Ting.** 1992. Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus. *J. Virol.* **66**:4073-4084.

Chapitre 5

FTF et ses interactions protéine-protéines

Note : Ce dernier chapitre comprend mes derniers travaux au laboratoire. Ma contribution est donc entière. La construction AFTF a été réalisée en collaboration avec le Dr. M. V. Govindan; le gel de retardement et la protéine de fusion GSTGR Δ AF1 ont été fait par Mme. Sylvie Roy.

Chapitre 5

FTF et ses interactions protéine-protéines

5.1 Introduction

L'étude des interactions protéine-protéines de FTF avec différents facteurs de transcription ou avec différents cofacteurs est une voie prometteuse pour la clarification des processus impliqués dans la régulation développementale et hormonale du gène de l'AFP. Le facteur LF, qui est encore inconnu, possède la capacité d'interagir physiquement avec FTF. Cette interaction est démontrée par empreinte à la DNase I puisque la compétition des empreintes, avec un oligonucléotide correspondant uniquement au site de liaison de FTF, fait disparaître celles de FTF et de LF (7). De plus, le récepteur des glucocorticoïdes exerce son action répressive par le segment d'ADN correspondant aux sites de liaison de FTF et de LF (FTF/LF) (140). La présence de LF est essentielle à cette régulation puisque dans le « core promoter » du virus de l'hépatite B sont retrouvés deux sites de forte affinité pour FTF sans site LF et que ce promoteur, qui est activé par FTF, n'est pas réprimé par les hormones glucocorticoïdes (chapitre 4). Ainsi, l'identification de LF est importante pour la compréhension de la régulation hormonale du gène de l'AFP.

Ces analyses d'interactions protéine-protéines de FTF avec d'autres facteurs pourraient également amener une meilleure compréhension du développement hépatique puisqu'il est connu, maintenant, que FTF est essentiel au développement (car les souris mutantes pour FTF meurent vers 7,5 à 8,5 jours de gestation (224)). Ainsi, la connaissance des facteurs avec lesquels interagit FTF est importante pour bien comprendre son implication dans ce processus. Au niveau de la différenciation hépatique, il est connu que celle-ci s'initie au moment où l'endoderme se rapproche du mésenchyme cardiaque, vers le 8,5^{ème} jour de la gestation (4). L'implication de FTF dans la différenciation hépatique n'est pas démontrée, mais la mortalité des souris mutantes coïncide

avec l'initiation de l'hépatogénèse (224). Il est connu que c-jun est important dans le développement hépatique car la mutation ciblée de celui-ci entraîne une malformation hépatique et la mort des embryons (448). De même, HNF4 (449, 450) et HNF3 (451) sont des facteurs importants dans la différenciation hépatique. FTF interagit-il avec ces différents facteurs? Coopèrent-ils ensemble pour initier ou prolonger la différenciation? Autant de questions auxquelles ce chapitre tentera d'amener quelques éléments de réponse.

Il est démontré ici que FTF est capable d'interagir avec c-jun, mais pas avec HNF4 α et plusieurs autres facteurs (RXR α , Coup-TF1, GATA-6, etc.), qu'il interagit également avec lui-même, avec GR, avec ER et que ces interactions se font via son DBD. Il est démontré également que FTF est un activateur incomplet et qu'il est possible de créer un activateur plus fort en lui ajoutant une portion N-terminale contenant un domaine d'activation 1 (AF-1). Finalement, il est démontré qu'en transfection Rip140 et SRC-1 sont des coactivateurs potentiels pour FTF.

5.2 Matériels et méthodes

5.2.1 Constructions plasmidiques

A) GST/DBD-FTF

La construction GST/DBD-FTF provient tout d'abord d'un clonage de FTF de souris complet dans le vecteur pGEX-4T3 (Pharmacia). Le clone de FTF de souris a été digéré par *EcoRI* et *XhoI* et inséré dans le vecteur pGEX-4T3 digéré par les mêmes enzymes de restriction. Ceci insérait donc FTF pleine longueur en phase avec la protéine GST pour donner le vecteur GST/FTF (figure 5.1). Par la suite, ce vecteur a été digéré par *StuI* et *XhoI*, puis les deux extrémités ont été remplies par le large fragment de la polymérase (klenow). Les fragments ont été séparés sur gel d'agarose et le vecteur a été recircularisé pour obtenir le vecteur GST/DBD-FTF (figure 5.1). La protéine de fusion générée par ce vecteur contient la courte portion N-terminale de FTF, son DBD et les 40 acides aminés suivants.

B) GST/LBD-FTF

Ce vecteur a été produit également à partir de la construction GST/FTF en digérant cette dernière par *BamHI* et *StuI* et en remplissant avec la klenow les extrémités, pour être par la suite recircularisé. Ceci mettait en phase, suivant la GST, les 318 acides aminés C-terminales de FTF contenant le LBD et l'AF-2 (figure 5.1).

C) GST/c-jun

Le vecteur SK/c-jun a été digéré par *PmlI* et *NotI* pour ainsi purifier un fragment d'environ 1.2Kb contenant toute la séquence codante pour c-jun. Ce fragment a ensuite été inséré dans le vecteur pGEX-4T3 digéré préalablement par *SmaI* et *NotI*. Ce qui plaçait donc c-jun en phase avec la protéine GST.

D) GST/GR Δ AF1

Le vecteur SKDBDGR Δ AF1 fournit par le Dr M. V. Govindan a été digéré par *EcoRI* et *XhoI*. Cette digestion a généré un fragment de 1Kb contenant le DBD

de GR. Ce fragment a donc été purifié et a été inséré dans pGEX-4T3 préalablement digéré par *EcoRI* et *XhoI* pour générer le vecteur GST/GR Δ AF1 contenant le DBD de GR en phase avec la GST.

E) Hybride FTF et GR/AF-1 : AFTF

Un fragment *BamHI* et *EcoRV* (contenant les acides aminés 1-420 de GR) provenant de SKGR (fournit par le Dr M. V. Govindan) a été inséré dans le vecteur pCIFTF préalablement digéré par *BglII* (rempli par la klenow) et par *BamHI*. Ceci entrait donc en phase les 420 premiers acides aminés de GR (contenant l'AF-1) devant le DBD de FTF.

5.2.2 Purification des protéines GST

L'expression des protéines de fusion a été exécutée telle que décrit à la section 3.2.2 du chapitre 3. L'extraction et la purification diffèrent quelque peu cependant. Avant l'extraction, le culot de bactéries est tout d'abord lavé à l'Hepes 20mM/NaCl 200mM, puis centrifugé à nouveau. Le culot est ensuite resuspendu dans le tampon A (Hepes 20mM pH7.5; PMSF 1mM; Benzamidine 0,1mM; Leupeptine 1,5 μ M; Aprotinine 1%; β -mercaptoéthanol 10mM; NaCl 200mM) puis congelé dans l'azote liquide et transféré à -80°C pour la nuit. Le lendemain, la suspension est dégelée et les lysozymes lui sont ajoutés pour obtenir une concentration finale de 0,5mg/ml. Le tout est incubé 10 minutes à 4°C. Par la suite, du NonidetP40 est ajouté pour obtenir une concentration finale de 0,1% et la suspension est soniquée 10 secondes. Celle-ci est ensuite centrifugée 15 minutes à 15 000 rpm et le surnageant est conservé. Du triton X-100 est ensuite ajouté pour obtenir une concentration finale de 1%. Par la suite, la résine de glutathione sépharose (1/1000 du volume d'induction) préalablement préparée à 50% volume/volume dans du tampon A est ajoutée. Le tout est mis sous rotation deux heures à 4°C. Suite à ces deux heures, la préparation est centrifugée (1500g, 5 minutes, 4°C) et les billes de sépharose sont lavées deux fois avec du tampon A puis resuspendues à 50% volume/volume dans le tampon

A auquel est additionné 0,02% de sodium azide. Cette préparation est conservée à 4°C.

5.2.3 Gels de retardement

Le gel de retardement a été exécuté dans les conditions décrites auparavant (130). Les protéines utilisées pour le gel de retardement proviennent de la purification sur glutathione sépharose de la protéine de fusion GST/DBD-FTF. Les sondes utilisées sont la sonde O17 qui contient la région -173 à -132 du promoteur de l'AFP et la sonde O17 double FTF (O17d) qui, elle, possède un second site FTF dans la même sonde. Les oligonucléotides compétiteurs utilisés sont : FTFa qui correspond au site FTF du promoteur de l'AFP (chapitre 4) et FTFm qui correspond au site FTF du promoteur de l'AFP, muté pour ne plus être lié par ce dernier (chapitre 4).

5.2.4 Synthèse de protéines marquées in vitro

La synthèse protéique in vitro a été exécutée avec la trousse de réticulocytes TNT de Promega. Le protocole est le suivant :

25µl	TNT Lysat de réticulocytes
2µl	TNT Tampon de réaction
1µl	TNT ARN polymérase (T7 ou T3 selon le vecteur)
1µl	Mélange d'acides aminés sans méthionine
4µl	Méthionine marquée au ³⁵ S (10mCi/ml)
1µl	RNAsin, Inhibiteur de ribonucléase (40U/µl)
2µl	Vecteur contenant la protéine à produire (contenant au maximum 2µg d'ADN)
14µl	H ₂ O sans nucléase

Le tout possède un volume final de 50µl et est incubé 2 heures à 30°C. Puis la qualité des protéines produites est vérifiée en déposant ces dernières sur un gel SDS-PAGE (voir section 3.2.2 du chapitre 3). Le gel est mis à sécher et exposé pour une autoradiographie toute la nuit. Les plasmides qui ont été utilisés

sont : SK/GR, SK/dGR, SK/hER, SK/GATA-6, pCI/hFTF, pCI/CEBP α , SK/c-j μ n, SK/HNF4 α , pCI/c-fos, pCI/pF Δ 3, pSG5/RXR α , pSG5/Coup-TFI, SK/HNF1 (figure 5.1E).

5.2.5 Expériences de rétention sur colonne (« Pull Down »)

Les rétentions étaient toutes effectuées selon le même protocole. La seule variable a été la quantité de NaCl présente dans le tampon A, variant de 100 à 300mM. Quarante microlitre d'une suspension 50% volume de tampon/volume de résine contenant la protéine de fusion désirée étaient déposés dans un tube à microfuge. Ensuite, le tube était centrifugé, puis le surnageant enlevé pour conserver les 20 μ l de résine. À ces 20 μ l, était ajoutés entre 2 et 5 μ l d'extrait de protéines marquées produites par le système des réticulocytes et le volume était complété pour obtenir un volume de 40 μ l avec du tampon A possédant la concentration de NaCl désirée. Ce mélange était ensuite incubé 3 heures à 4 $^{\circ}$ C sous rotation. Par la suite, le tout était centrifugé quelques secondes à 12 000 rpm. Le surnageant était conservé et le culot lavé 4 fois avec le tampon A contenant la concentration de NaCl désirée. Finalement, 10 μ l du culot resuspendu 50% volume/volume dans le tampon A et 10 μ l du surnageant conservé étaient déposés sur un gel SDS-PAGE (voir section 3.2.2 du chapitre 3). Le gel était mis à sécher puis exposé toute la nuit pour autoradiographie.

5.2.6 Transfections transitoires

Toutes les transfections transitoires ont été effectuées telles que décrites dans les sections matériels et méthodes des chapitres 3 et 4. Les plasmides rapporteurs utilisés sont : le vecteur 5200, qui contient les 5200pb avant le site d'initiation de la transcription du gène de l'AFP placées devant le gène CAT (112), le vecteur HP qui correspond au « core promoter » du virus de l'hépatite B (chapitre 4) placé devant le gène CAT, le vecteur mUP qui contient 3 copies des nucléotides -171 à -114, provenant du promoteur de l'AFP, placés devant le segment TK40-CAT (130) et le vecteur 1.1TK40 qui correspond au site de liaison de FTF multimérisé devant le segment TK40-CAT (130). Les plasmides

contenant les facteurs de transcription sont pCI (Promega), pRSVGR (452), pRSV/c-jun, pCI/hFTF (chapitre 4) et pCI/AFTF (section 5.2.1E). Tous les plasmides contenant les coactivateurs (pCMVSR-1, pCMVRip140 et pCMVGRIP170) ont été fournis par le Dr M. V. Govindan.

5.3 Résultats

5.3.1 Préparation des rétentions sur colonne

Pour arriver à mettre au point des essais de rétention sur colonne (« pull down ») il a tout d'abord fallu produire des protéines de fusion GST en quantité suffisante. Sur la figure 5.1A-C sont illustrées les productions et les purifications des protéines de fusion qui seront utilisées, soit GST seul (figure 5.1A), GST/LBD-FTF (figure 5.1A), GST/DBD-FTF (figure 5.1A), GST/c-jun (figure 5.1B) et GST/GR Δ AF1 (figure 5.1C). Toutes ces protéines possèdent un bon niveau d'expression et leur purification est bonne (la purification de GST/GR Δ AF1 n'est pas présentée en raison du manque de bonnes images, mais la purification était également bonne).

Par la suite, il a été vérifié si le DBD de FTF purifié dans ces conditions demeurait fonctionnel. Le gel de retardement (figure 5.1D) montre que la protéine de fusion GST/DBD-FTF est capable de lier les sondes O17 et O17d. Ces liaisons sont compétitionnées par l'ajout d'un oligonucléotide correspondant au site FTF de l'AFP (FTFa), mais pas par un oligonucléotide possédant un site FTF muté (FTFm). Ainsi, la protéine GST/DBD-FTF est fonctionnelle. Par conséquent, les interactions protéine-protéines obtenues avec cette protéine ont eu lieu avec un DBD possédant la bonne conformation pour lier de façon spécifique son site de reconnaissance. Comme toutes les autres protéines de fusion ont été purifiées dans les mêmes conditions, il est probable que celles-ci soient également dans la bonne conformation pour mener leur action.

Finalement, avant toutes expériences de rétention sur colonne, il faut vérifier la qualité des protéines produites en système de réticulocytes. À la figure 5.1E sont présentées les différentes protéines marquées à la méthionine³⁵S utilisées. Pour la grande majorité, la qualité est très bonne (C/EBP α , c-jun, c-fos, HNF4 α , FTF, HNF1, RXR α , pF Δ 3). Pour d'autres, cependant, il y a un peu de

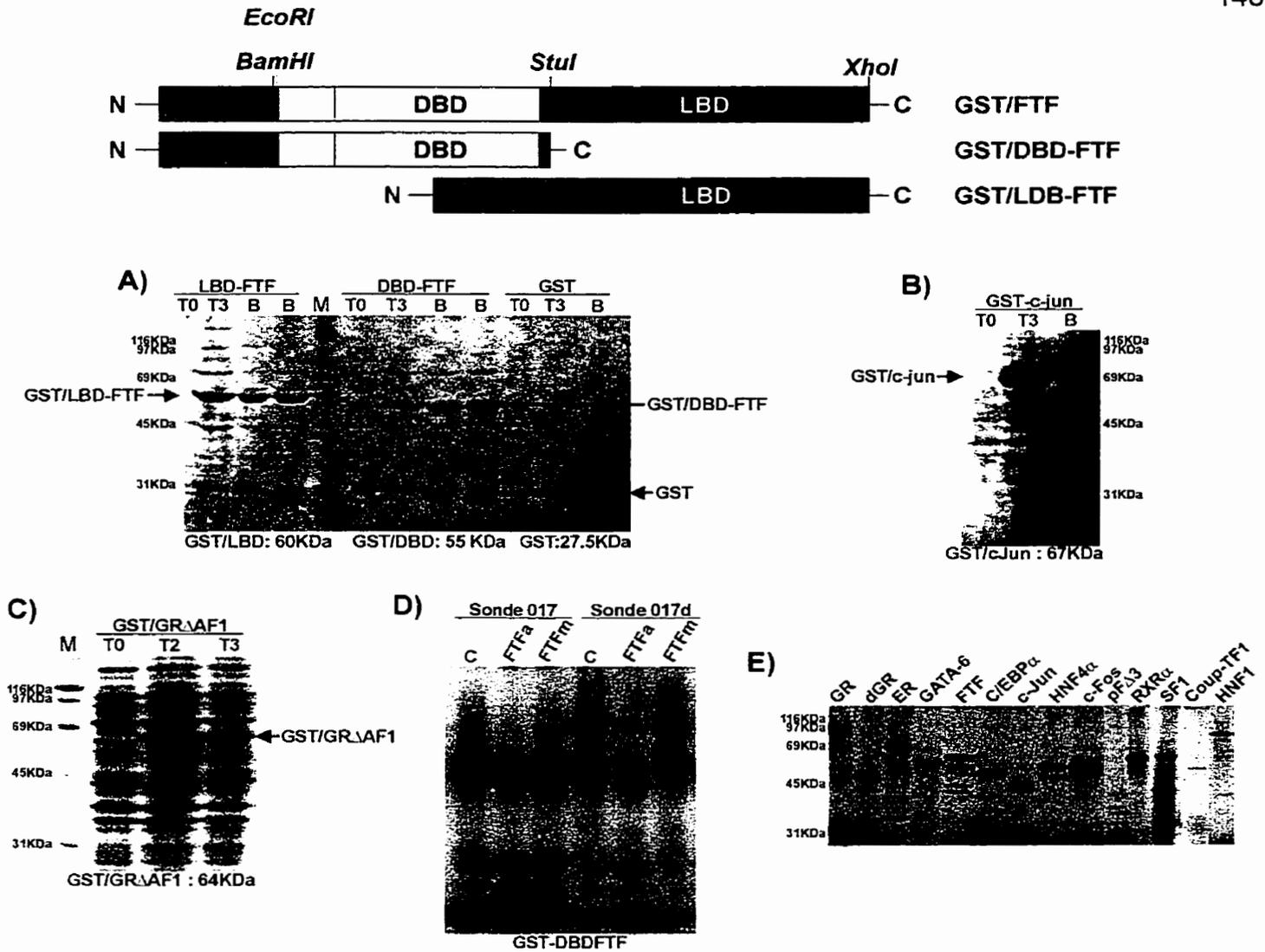


Figure 5.1. Préparation pour les rétentions sur colonne. Le schéma représente les protéines de fusion utilisées pour les rétentions avec des portions de FTF. DBD = Domaine de liaison de l'ADN; LBD= Domaine de liaison du ligand. **A)-C)** Gels SDS-PAGE de 8,5% contenant les protéines de fusion surexprimées qui seront utilisées pour les rétentions. T0 = avant induction, T3 = 3 heures d'induction, B = billes de sépharose-glutathione sur lesquelles la protéine de fusion purifiée est liée, M = marqueur de poids moléculaire. **A)** Production et purification de LBD-FTF, DBD-FTF et GST. **B)** Production et purification de GST-c-jun. **C)** Production de GST/GRΔAF1. **D)** Gel de retardement démontrant que le DBD de FTF en fusion avec GST peut lier sa séquence consensus. Les deux sondes sont 017 et 017d. La protéine de fusion GST/DBD-FTF purifiée a été utilisée et les compétiteurs sont FTFa qui correspond au site FTF du promoteur de l'AFP et FTFm qui correspond au même site, mais muté pour ne plus être lié. **E)** Vérification des différentes protéines produites par le système de synthèse *in vitro* de réticulocytes. Ces protéines seront celles utilisées dans les expériences de rétention. DGR = DBD de GR, pFΔ3 = DBD de FTF.

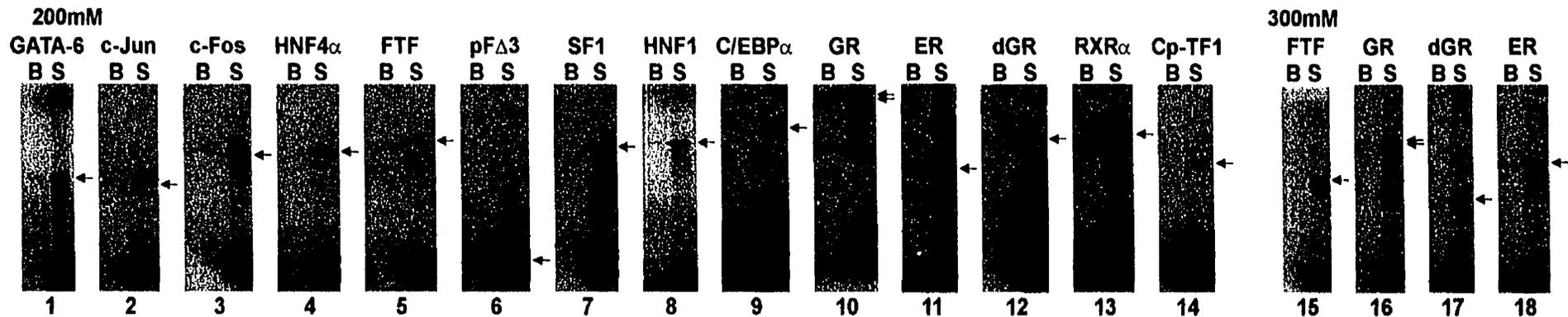
dégradation (GR, dGR, ER, SF1) ou une production plutôt restreinte (GATA-6, Coup-TFI). Toutefois, la qualité et la quantité de ces protéines sont satisfaisantes pour effectuer des expériences de rétention.

5.3.2 Les rétentions sur colonne (« pull down »)

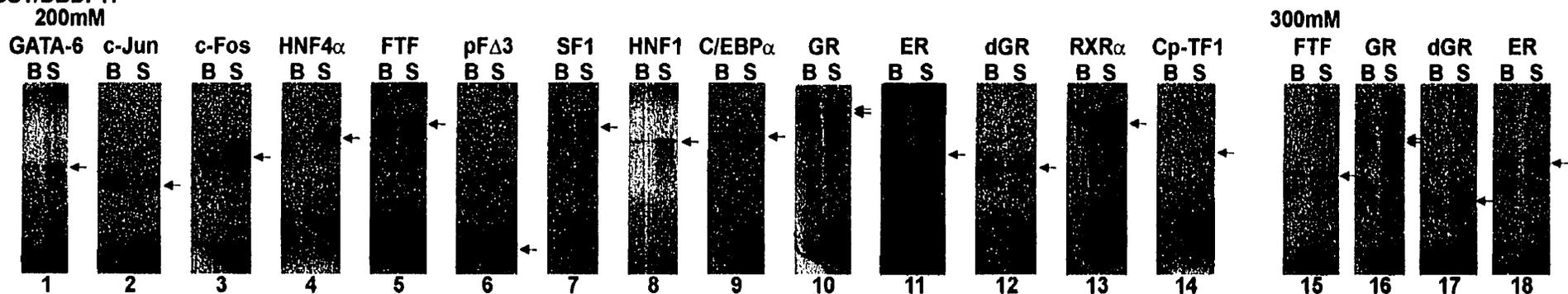
Les premières protéines essayées dans les expériences de rétention étaient toutes des candidates pour la protéine LF. Les caractéristiques attendues pour qu'une protéine soit une candidate pour LF sont qu'elles interagissent avec FTF et GR, qu'elles soient capables de lier le promoteur AFP dans la séquence LF et qu'elles induisent ce promoteur.

GATA-6 a tout d'abord été testé. Cette protéine est membre de la famille GATA qui est composée de 6 facteurs de transcription à doigt de zinc (GATA-1 à 6). Les GATAs sont des protéines possédant un rôle majeur dans la différenciation cellulaire au cours du développement des vertébrés (453). Ces protéines sont exprimées dans plusieurs tissus. Au niveau du foie, la présence de GATA-2 (454) et de GATA-6 (455) a été démontrée. L'intérêt envers les gènes GATAs vient tout d'abord de la présence dans la séquence reconnu par LF (figure 1.5) d'une séquence consensus pour ceux-ci (WGATAR) (456). La connaissance de la régulation du promoteur de FTF par des gènes de type GATA (224) a également augmenté la possibilité que GATA puisse interagir avec FTF. De plus, il a été démontré que l'activité de GATA-1 peut être bloquée par le récepteur des glucocorticoïdes, et cela par une interaction protéine-protéine avec ce dernier (457). Ainsi il a été vérifié si GATA-6 pouvait interagir avec FTF. GATA-6 n'interagit pas avec le DBD (figure 5.2B,1) ou le LBD (figure 5.2C,1) de FTF. De plus, en transfection, les gènes GATAs n'ont pas démontré d'effet inducteur sur le promoteur de l'AFP (140). Ainsi les gènes GATAs ne possèdent pas les propriétés attendues pour le facteur LF.

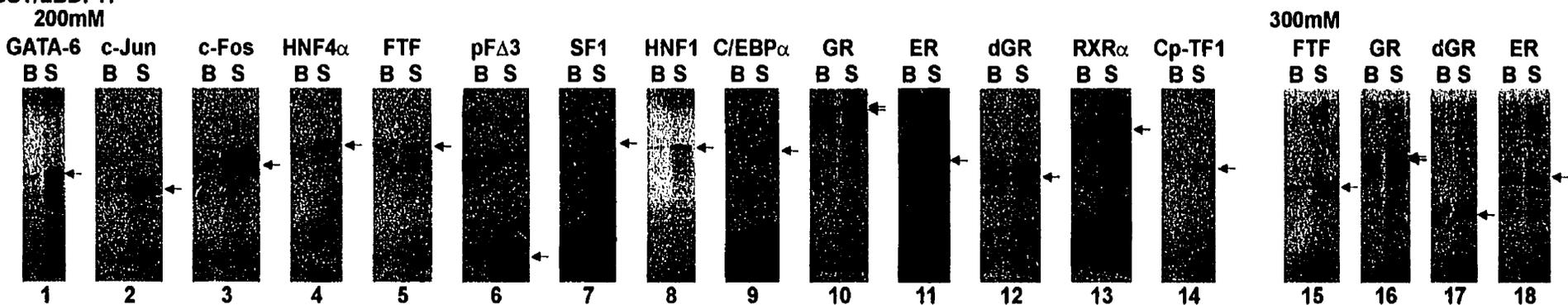
A) GST-seul



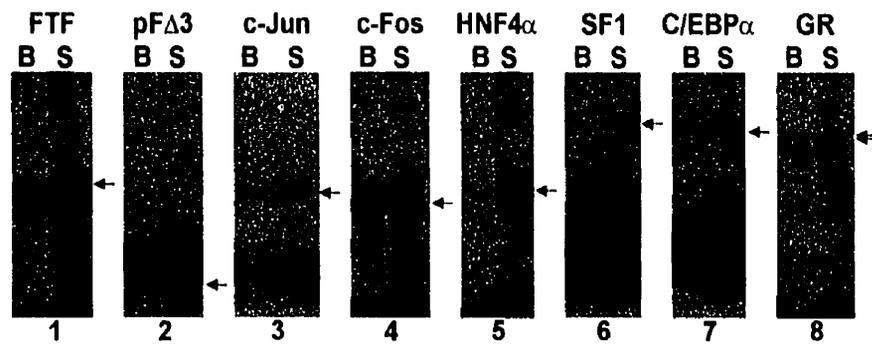
B) GST/DBDFTF



C) GST/LBDFTF



D) GST/c-Jun 200mM



E) GST/GR Δ AF1 200mM

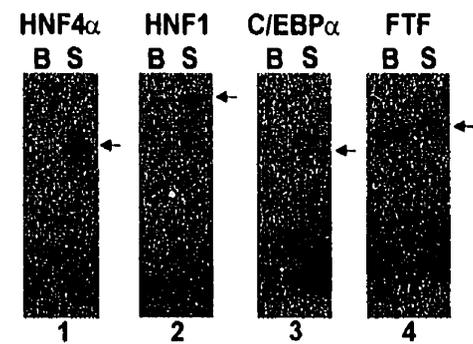


Figure 5.2

Le candidat suivant a été AP1 qui est composé d'un hétérodimère des protéines c-jun et c-fos. AP1 est impliqué dans la prolifération cellulaire et son activité est reliée à diverses stimulations de croissance provenant des voies de signalisation (458, 459). Les protéines c-jun et c-fos appartiennent à la famille des gènes bZIP qui possèdent une région basique pour lier l'ADN et un « zipper » de leucine pour dimériser (460). L'intérêt envers AP1 dans la régulation du gène de l'AFP vient tout d'abord de la présence dans LF (figure 1.5) d'une séquence quasi consensus pour la liaison de ce facteur (séquence consensus de AP1 : TGACTCA (461, 462) et dans LF : TGACCCC; figure 1.5). Un autre intérêt pour le facteur AP1 vient du fait que sa corrélation avec la prolifération cellulaire suit le même patron que celle de l'AFP (463-465). De plus, il est bien connu que le récepteur des glucocorticoïdes, via son DBD, réprime l'action d'AP1 par un contact protéine-protéine avec c-jun et/ou c-fos (466-468). Tous ces éléments faisaient d'AP1 un excellent candidat pour LF. Dans les expériences de rétention, le DBD de FTF (figure 5.2B,2), et non le LBD (figure 5.2C,2), est capable d'interagir avec c-jun alors que c-fos ne lie ni l'un ni l'autre (figure 5.2B,3 et 5.2C,3). L'expérience inverse montre que GST/c-jun peut interagir avec FTF complet (figure 5.2D,1) ou avec pF Δ 3 (figure 5.2D,2) qui ne contient que le DBD de FTF (130). De plus, c-jun (figure 5.2D,3) et c-fos (figure 5.2D,4) lient bel et bien GST/c-jun, confirmant que les expériences de rétention se font dans de bonnes conditions. Donc c-jun et FTF sont capables d'interagir ensemble et cela via le DBD de FTF. Toutefois, lorsque AP1 est testé en transfection, il ne se révèle pas être activateur de l'AFP, mais plutôt répresseur (140). Sur tous les promoteurs induits par FTF testés ici en transfection, c-jun a toujours un effet répresseur (figure 5.3A;3,7,11). Il est donc possible que la répression par c-jun du promoteur de l'AFP est due à son interaction protéine-protéine avec le DBD de FTF, bloquant probablement l'accès de ce dernier à l'ADN.

Suite à AP1, la possibilité que le facteur de transcription HNF4 puisse être associé à LF a été étudiée. HNF4 est un membre de la famille des récepteurs nucléaires qui était orphelin, mais dont un ligand a été identifié récemment (149). Ce ligand consiste en des acides gras sous forme d'acyl-CoA (149). L'expression de HNF4 au niveau de l'embryon se situe tout d'abord au niveau des structures extraembryonnaires sans expression dans les tissus embryonnaires (469). La première apparition de HNF4 au niveau des tissus embryonnaires (dans l'endoderme) coïncide avec l'apparition des premiers hépatocytes (469). La mutation ciblée de HNF4 entraîne un phénotype de létalité chez les embryons de souris qui meurent tôt au cours du développement à la suite de problèmes au niveau des structures extraembryonnaires (449). HNF4 était un candidat pour deux raisons. Premièrement, une séquence pouvant être liée par HNF4 se retrouve dans LF (LF = AGCACA G GGGTCA (figure 1,5); HNF4 = AGGTCA N AGGTCA (470)). Deuxièmement, en transfection HNF4 α est capable d'induire le promoteur de l'AFP (figure 5.3B,4). Ainsi, en transfection, l'action de FTF et de HNF4 α s'additionne pour donner une plus grande activation du promoteur de l'AFP (figure 5.3B,6), activation équivalente à l'addition de FTF et HNF1 (figure 5.3B,5). Toutefois, HNF4 α et HNF1 ne peuvent pas additionner leur action pour suractiver ce promoteur (figure 5.3B,7). Lorsque HNF1 et HNF4 α sont présents, un seul des deux facteurs pourrait exercer sa fonction (figure 5.3B,7,8). Il faut mentionner que la séquence de liaison proposée pour HNF4 est très rapprochée de celle de HNF1. Ainsi HNF1 et HNF4 α peuvent induire le promoteur de l'AFP, mais probablement de façon exclusive. Pour ce qui est des interactions entre FTF et HNF4 α , elles sont complètement nulles. HNF4 α ne lie ni le DBD (figure 5.2B,4) ni le LBD (figure 2C,4) de FTF tout comme il ne lie pas c-jun (figure 5.2D,5) ni GR (figure 5.2E,1).

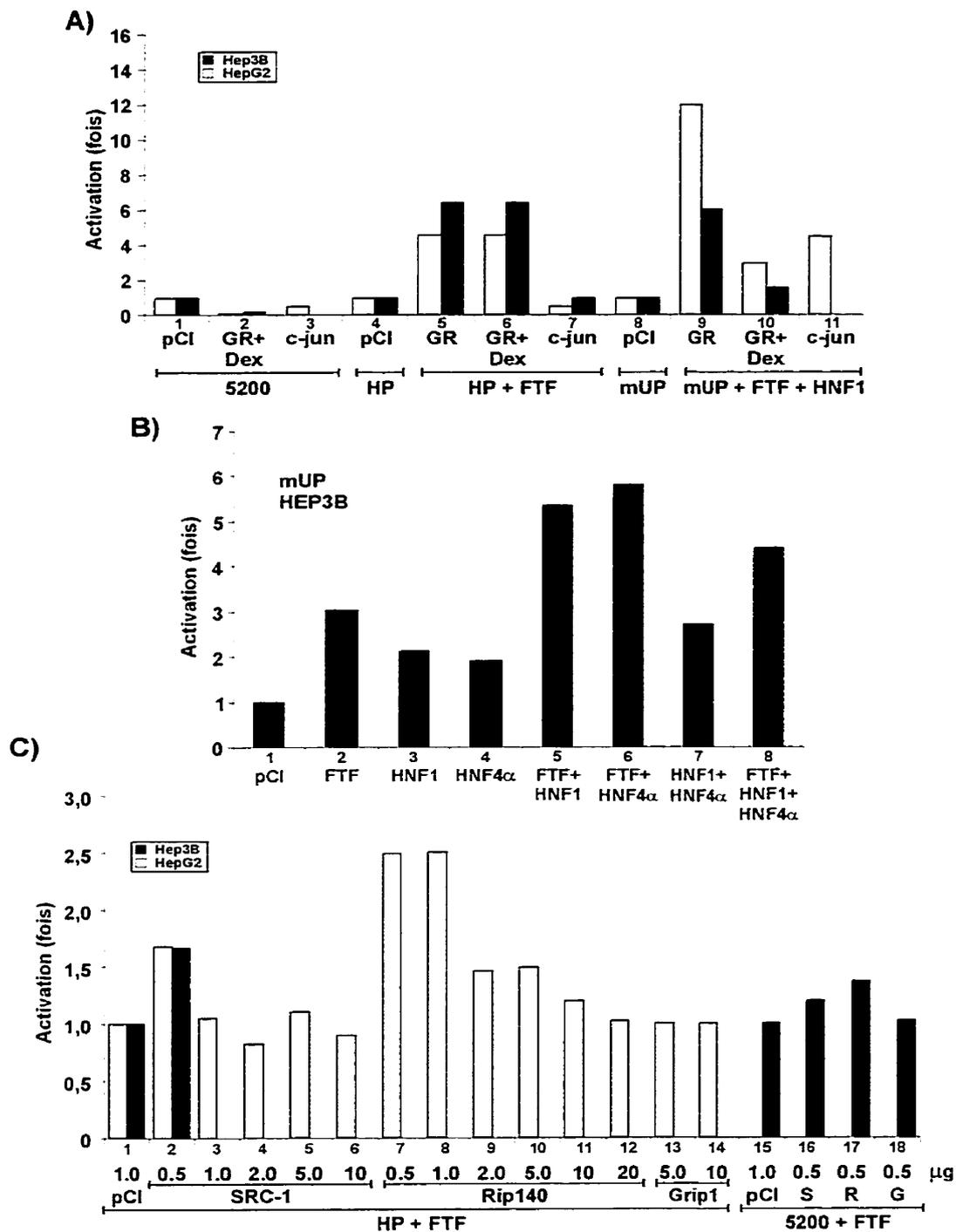


Figure 5.3. Analyses par transfection de l'effet de différents facteurs de transcription et de cofacteurs sur l'action de FTF. **A)** Transfection dans les HepG2 et les Hep3B avec 5 μ g de la construction rapporteuse (5200, HP ou mUP) et 10 μ g des cotransfectants (pCl, GR, c-jun, FTF, HNF1). Dex = dexaméthasone utilisée à 1 μ M final dans le milieu de culture. **B)** Transfection dans les Hep3B pour caractériser l'effet de HNF4 sur le promoteur de l'AFP (mUP). Les transfactions ont également été exécutées avec 5 μ g de la construction rapporteuse (mUP) et 10 μ g des cotransfectants (pCl, FTF, HNF1, HNF4). **C)** Vérification de l'effet des coactivateurs sur l'activation menée par FTF. Les transfactions dans les HepG2 et les Hep3B se faisaient avec 5 μ g de la construction rapporteuse (HP ou 5200) à laquelle était ajoutée 5 μ g de FTF combiné à une quantité variable (en μ g) de coactivateurs (S = SRC-1, R= Rip140 et G= Grip1).

Il est connu que les facteurs membres de la famille FTZ-F1 (dont fait partie FTF) ont pour propriété de lier l'ADN sous forme de monomère, et aucune raison porte à croire que FTF ferait exception à cette règle (130). Toutefois, il a été tout de même vérifié si FTF pouvait former des homodimères en solution, pour démontrer qu'effectivement FTF était capable d'interagir avec lui-même. Cette interaction se fait par son DBD (figure 5.2B,5) car aucune interaction n'est aperçue avec le LBD (figure 5.2C,5) et que pF Δ 3 est également capable de lier le GST/DBD-FTF (figure 5.2B,6) et non GST/LBD-FTF (figure 5.2C,6). De plus, à plus forte stringence (300mM NaCl), cette homodimérisation se maintient et continue de se faire uniquement avec le DBD (figure 5.2B,15 vs 5.2C,15). Il était alors intéressant de vérifier si SF1, un homologue de FTF, pouvait également interagir avec FTF. SF1 n'est pas capable de faire d'interactions avec le DBD (figure 5.2B,7), ni avec le LBD de FTF (figure 5.2C,7). Une seconde différence entre FTF et SF1 se situe au niveau de l'interaction avec c-jun, alors que FTF est capable d'interagir, SF1 en est incapable (figure 5.2D,6).

Ensuite, il a été vérifié si FTF pouvait interagir avec HNF1 et C/EBP α , deux facteurs impliqués dans la régulation de l'AFP. HNF1 est une homéoprotéine possédant un domaine « pou » (471) qui a une action activatrice dans plusieurs promoteurs, dont tous ceux des membres de la famille de l'albumine (figure 1,5). L'intérêt de vérifier si FTF et HNF1 pouvaient interagir ensemble vient de la coopérativité d'activation remarquée en transfection entre FTF et HNF1 sur le vecteur mUP (figure 5.3A,9). Il est cependant clair que FTF et HNF1 n'interagissent pas ensemble (figure 5.2B,8 et 5.2C,8) et que HNF1 n'interagit pas avec GR (figure 5.2E,2). C/EBP α fait partie de la famille des protéines bZIP (460) et est impliqué dans l'activation de plusieurs promoteurs (472, 473) et amplificateurs (7, 393). L'intérêt de vérifier si FTF peut interagir avec C/EBP α est dû au fait que C/EBP α est la composante majeure de l'activation de l'amplificateur intergénique (7). Selon les hypothèses, les éléments d'un amplificateur viennent aider les facteurs présents au promoteur dans leur

activation soit en interagissant avec des coactivateurs communs ou directement avec ces facteurs (474). C/EBP et FTF peuvent interagir fortement ensemble et cette interaction se fait via le DBD (figure 5.2B,9) et non le LBD de FTF (figure 5.2C,9). C/EBP fait également une faible interaction avec c-jun (figure 5.2D,7) et avec GR (figure 5.2E,3) comme cela a déjà été démontré (475, 476).

Il est connu que GR réprime l'activité du promoteur de l'AFP (141, 144) (figure 5.3A,1-2;9-10). Il a été démontré également que GR est capable d'inhiber l'activité d'AP1 en faisant des interactions protéine-protéines avec c-jun ou c-fos (466-468). Les rétentions démontrent ici que GR et ER sont capables de lier FTF sur son DBD (figure 5.2B,10-11) et sur son LBD (figure 5.2C,10-11). Pour GR, cette action est menée en partie par son DBD car la protéine dGR (qui ne contient que le DBD de GR) lie également le DBD (figure 5.2B,12) et le LBD (figure 5.2C,12) de FTF. Ces expériences ont également été effectuées en condition plus stringente car dans les contrôles, aux conditions précédentes, un peu de liaison de GR et de ER avec la GST-seule était observée (figure 2A,10-11), alors qu'aucune autre protéine testée ne fait de telles interactions (figure 5.2A). Alors, en haussant la concentration de NaCl à 300mM, GR, dGR et ER continuent de lier les DBD (Figure 5.2B 16-18) et LBD (figure 5.2C,16-18) de FTF alors que la GST-seule n'est plus liée (figure 5.2A,16-18). Ainsi il peut y avoir une interaction protéine-protéine entre GR ou ER et FTF et pour GR, cette interaction passe par son DBD. De même, FTF est capable de lier GST/GR Δ AF1 (figure 5.2E,4). Ces rétentions montrent également que GR lie c-jun (figure 5.2D,8) comme cela a déjà été démontré (468).

Finalement, deux autres récepteurs nucléaires ont été testés soit RXR α (figure 5.2B,13 et 5.2C,13) et Coup-TFI (figure 5.2B,14 et 5.2C,14) et aucun des deux ne possède d'interaction avec FTF.

5.3.3 L'effet des coactivateurs SRC-1, Rip140 et Grip1

Quelques expériences préliminaires en transfection ont été exécutées, avec le « core promoter » de HBV, quant à l'effet potentiel des coactivateurs SRC-1, GRIP1 et Rip140 sur l'action de FTF. Les transfusions ont été faites ainsi : le gène rapporteur HP était transfecté en compagnie d'une petite quantité de FTF (5 μ g) (pour s'assurer que l'activation n'était pas saturée), puis était ajoutées des quantités variables de coactivateurs. Ces transfusions montrent que Rip140 (figure 5.3C,7-12) en faible concentration est capable d'aider FTF à activer plus fortement HP (environ 2,5x; figure 5.3C,7-8). C'est le cas également pour SRC-1 (figure 5.3C,1-6) dont l'activation est cependant un peu moins forte (1,7x dans le HepG2 et dans le Hep3B; (figure 5.3C,2)). Pour ce qui est de Grip1, il ne possède aucune action sur FTF (figure 5.3C,13-14). Sur la construction contenant le promoteur et l'amplificateur de l'AFP (5200), l'effet des coactivateurs est moins fort, mais toujours présent. Ainsi Rip140 active environ 1,4x (figure 5.3C,17), SRC-1 active environ 1,3x (figure 5.3C,16) et GRIP1 n'a pas d'effet.

5.3.4 Le FTF chimérique active plus fortement

Un FTF chimérique a été généré par l'ajout de la portion N-terminale de GR (contenant l'AF-1) à FTF pour ainsi obtenir le vecteur AFTF (schéma, figure 5.4). Le but de cette expérience était de vérifier si FTF possédait dans sa protéine tous les éléments nécessaires pour activer ses cibles ou si l'ajout d'un AF-1 allait augmenter son activité. FTF est un activateur incomplet car l'ajout de l'AF1 de GR a pour effet de conférer à FTF une action suractivatrice. Dans tous les promoteurs testés, AFTF est plus fort que FTF (figure 5.4,1-9) et il est actif autant dans la lignée cellulaire Hep3B que PLC/PRF/5 (figure 5.4,4-6). AFTF est également capable d'activer le vecteur 1.1TK40 (figure 5.4,12) qui ne contient que la séquence consensus pour FTF multimérisée, alors que FTF en est incapable (figure 5.4,11).

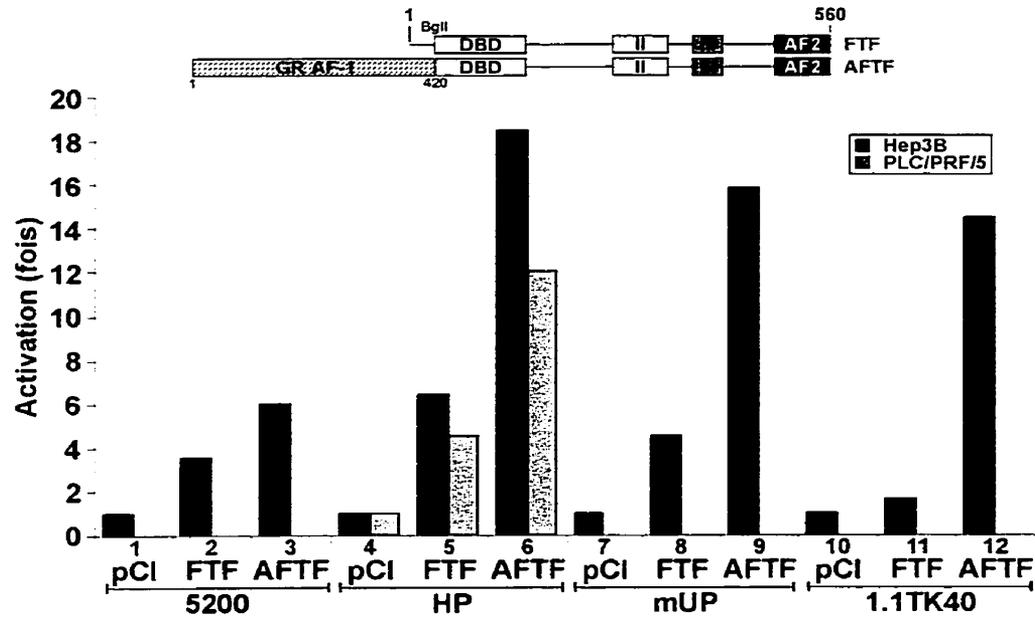


Figure 5.4. Analyses par transfection de l'action d'un FTF auquel la portion N-terminale de GR (l'AF-1) a été ajoutée: AFTF (schéma). Il est démontré que le facteur hybride AFTF est un activateur plus fort tout en étant aussi spécifique que FTF. Les transfections ont été faites dans les Hep3B et le PLC/PRF/5 avec 5 μ g de la construction rapporteuse (5200, HP, mUP ou 1.1TK40) et 10 μ g des cotransfectants (pCI, FTF ou AFTF).

5.4 Discussion

Les résultats présentés dans ce chapitre sur les interactions protéine-protéines impliquant FTF et différents facteurs de transcription ou cofacteurs ne sont que préliminaires et nécessiteront une confirmation via d'autres méthodes. Toutefois à partir de ces résultats certaines hypothèses peuvent être proposées pour expliquer la régulation développementale et hormonale de l'expression du gène de l'AFP.

Tout d'abord, la recherche de l'identité du facteur LF qui est le facteur clé pour la compréhension de la régulation hormonale et probablement de la régulation développementale du gène de l'AFP a été entreprise. Des expériences de rétention sur colonne avec plusieurs candidats pour LF ont donc été exécutées. Le premier a été GATA-6. Ce dernier était un bon candidat à cause de son expression précoce au cours du développement (453), de la présence d'une séquence consensus pour GATA-6 dans la séquence que lie LF ((456) et figure 1.5), de la démonstration que GATA-1 pouvait interagir avec GR (457), de sa présence dans le foie (455) et de son implication dans la régulation du promoteur de FTF (224). Cependant aucune interaction entre GATA-6 et FTF (figure 2, tableau 5.1) n'a été détectée. De plus, aucune transfection n'a démontré d'effet activateur des GATA-1 à 6 sur le promoteur de l'AFP (140). Ainsi, la seule implication des gènes GATAs dans la régulation de l'AFP provient de son effet inducteur sur le promoteur de FTF (224). Il est également possible que des facteurs GATAs soient impliqués dans l'activation de l'amplificateur intergénique.

Le second candidat étudié est le complexe protéique AP1 qui est composé de deux protéines, soit c-fos et c-jun. Au cours du développement ainsi que dans les hépatocytes en culture, l'expression d'AP1 corrèle avec la prolifération cellulaire (463, 465) et avec l'expression de l'AFP (464).

Tableau 5.1. Résumé des interactions protéine-protéines testées

	GST-seul	GST/DBDFTF	GST/LBDFTF	GST-c-jun	GST/GRDAF1
200mM NaCl					
c-fos	-	-	-	++	N/A
c-jun	-	+	-	+	N/A
FTF	-	+	-	+	+
SF1	-	-	-	-	N/A
C/EBPa	-	++	-	+	+/-
HNF4a	-	-	-	-	-
HNF1	-	-	-	N/A	-
RXR	-	-	-	N/A	N/A
Coup-TF1	-	-	-	N/A	N/A
GATA-6	-	-	-	N/A	N/A
pFD3	-	+	-	+	N/A
dGR	-	+	+	+/-	+
GR	+/-	+	+	+/-	N/A
ER	+	+	+	+	N/A
300mM NaCl					
FTF	-	+	-	N/A	N/A
GR	-	+	+	N/A	N/A
dGR	-	+	+	N/A	N/A
ER	-	+	+	N/A	N/A

Tableau récapitulatif des résultats obtenus lors des expériences de rétention. Un moins (-) = pas d'interaction, un plus et un moins (+/-) = une faible interaction, un plus (+) = une bonne interaction, deux plus (++) = une interaction forte, N/A = pas vérifié.

En 1991, Zhang et al. ont démontré qu'une bonne quantité de c-jun purifié pouvait lier le promoteur de l'AFP sur un site chevauchant le site FTF et que cette liaison était probablement impliquée dans l'activation de l'AFP et dans la répression par le récepteur des glucocorticoïdes (129). Cependant, *in vivo*, ce site est de trop faible affinité pour être occupé par c-jun. De plus, les expériences de transfections démontrent que c-jun n'est pas un inducteur de l'AFP, mais plutôt un répresseur. Néanmoins, il était possible qu'un second site potentiel pour la liaison de AP1 existe, situé dans la séquence de LF (figure 1.5). Toutefois, les résultats de transfections (figure 5.3A) et de gels de retardement (140) démontrent que ce site n'est pas lié par AP1 et qu'AP1 réprime toujours l'activité du promoteur de l'AFP. Il a été démontré en 1995, par Bois-Joyeux et

al., que c-jun, et non c-fos, peut réprimer l'activité du promoteur de l'AFP par un contact protéine-protéine avec un facteur présent dans ce promoteur, car un c-jun muté pour ne plus lier l'ADN réprime tout de même le promoteur de l'AFP (133). Les résultats de rétention démontrent que ce facteur ciblé par c-jun est probablement FTF et que l'interaction entre c-jun et FTF se fait via le DBD de FTF (tableau 5.1). De plus, c-fos ne peut pas lier FTF (tableau 5.1). Il est donc possible que l'interaction entre c-jun et FTF bloque le DBD de ce dernier et l'empêche ainsi d'exercer sa fonction. Dans l'article de Bois-Joyeux et al. il est mentionné que cette interaction de c-jun avec un facteur inconnu se fait par la portion activatrice N-terminale de c-jun et que c-jun réprime plus fortement que JunB ou JunD (133). Il serait donc intéressant, dans l'avenir, de vérifier si FTF interagit avec cette portion de c-jun et si FTF est capable d'interagir avec JunB ou JunD.

Cette interaction entre FTF et c-jun est probablement importante pour la régulation développementale de l'AFP. Il est démontré que c-fos est induit par différents stimuli mitogéniques et que cette induction est forte et transitoire (458). Dans une cellule en croissance, la présence de c-fos et des membres de sa famille (fosB, fra-1 et fra-2) est détectée, mais ceux-ci sont absents des cellules non stimulées (458, 459). Pour ce qui est de c-jun, il est induit par les mêmes stimuli mitogéniques (458, 459) en corrélation avec l'induction de c-fos (465). Toutefois, dans les cellules non stimulées un niveau basal de c-jun et de tous les membres de sa famille (JunB et JunD) est détecté (458). De plus, il est connu que l'homodimère c-jun est le constituant majeur du AP1 présent dans les hépatocytes non prolifératifs (477). Un modèle intéressant serait qu'au cours de la prolifération hépatique, c-jun n'est pas disponible pour venir bloquer FTF car il est complexé avec c-fos et est impliqué dans la prolifération. Cependant, à la fin de la prolifération c-fos disparaît et c-jun deviendrait alors disponible pour interagir avec FTF et bloquer ainsi son action positive sur le promoteur de l'AFP. Ceci pourrait expliquer la corrélation entre l'expression de l'AFP et la prolifération cellulaire. La répression de l'expression du gène de l'AFP par Ha-Ras (478) peut

alors s'expliquer par l'induction via Ha-Ras de c-jun préférentiellement à c-fos (479). Il est également démontré que c-jun est un facteur essentiel pour le développement hépatique puisque sa mutation dirigée mène à une malformation hépatique (448). Ainsi, l'interaction entre FTF, qui est vraisemblablement impliqué dans le développement hépatique (224), et c-jun fait probablement partie des mécanismes de communication essentiels au bon développement hépatique. Dans cette optique, une étude plus approfondie de leur interaction pourrait être intéressante; il serait intéressant de vérifier si l'expression de l'AFP est affectée dans le sac vitellin des souris mutées pour c-jun ou dans le foie des souris mutées pour c-fos.

Dans la poursuite de la recherche de l'identité du facteur LF, le récepteur nucléaire HNF4 α a été testé. L'action de HNF4 α sur le promoteur de l'AFP est intrigante. Tout d'abord en transfection, HNF4 α active le promoteur de l'AFP (figure 5.3B,4) et son action s'additionne à celle de FTF (figure 5.3B,6). Cette activation combinée à la présence d'une séquence ressemblant à la séquence consensus pour HNF4 (470) dans la séquence de LF (figure 1,5) faisait de HNF4 α un bon candidat pour LF. Ainsi, une interaction protéine-protéine entre FTF et HNF4 α était possible. Cependant aucune interaction entre ces deux facteurs n'est détectée (tableau 5.1). De plus, aucune addition entre l'action de HNF4 α et HNF1 n'est obtenue en transfection (figure 5.3B,7) et l'addition remarquée en présence de FTF, HNF1 et HNF4 α (figure 5.3B,8) ne correspond qu'à l'addition de FTF et HNF1 (figure 5.3B,5) ou FTF et HNF4 α (figure 5.3B,6) uniquement. Les sites de liaison de ces deux facteurs sont très rapprochés et pourraient probablement entrer en compétition ne permettant qu'à l'un ou l'autre des facteurs de lier l'ADN. Ainsi HNF4 α pourrait être un facteur auxiliaire de l'activation de l'AFP en réponse à une élévation du niveau d'acide gras car il vient d'être démontré que HNF4 lie des acides gras sous forme d'acyl-CoA et que cette liaison augmente son activité (149). Il est donc possible que l'augmentation de la concentration en acides gras active HNF4 qui vient alors activer l'expression de l'AFP afin que cette dernière transporte ce surplus (85).

Dans ce chapitre est démontré que FTF diverge quelque peu de la famille des récepteurs nucléaires FTZ-F1 puisqu'il est capable de former des homodimères en solution. Néanmoins, FTF ne lie probablement pas sa séquence palindromique contenue dans le promoteur de l'AFP sous forme d'homodimère mais plutôt sous forme de monomère car : 1) sa séquence de liaison est consensus à celle des membres de la famille FTZ-F1 qui la lient sous forme de monomère (220), 2) FTF possède quatre variants initiés à quatre méthionines différentes dans sa séquence. Par conséquent, si un homodimère liait cette séquence dans le promoteur de l'AFP, il ne serait pas possible de voir quatre bandes spécifiques en gel de retardement (130), mais un flou spécifique. Cependant, en solution, FTF peut exister sous forme d'homodimère (tableau 5.1) et cette propriété n'est pas partagée avec SF1, son homologue (tableau 5.1). Il est intéressant de noter que la différence majeure entre FTF et SF1, dans leur DBD, se situe au niveau de la boîte D (conservation de 2 nucléotides sur 5 entre FTF et SF1, (130)) qui est impliquée, chez les récepteurs nucléaires, dans la dimérisation. Ainsi, FTF aurait subi une évolution, par la modification de la séquence de son DBD au niveau de sa boîte D, lui conférant la possibilité d'homodimériser.

Il est possible que LF soit en fait un second FTF. Dans la séquence de LF se retrouve un site de liaison très dégénéré mais ressemblant quelque peu à la séquence consensus de FTF. Il serait donc possible que l'homodimère FTF ne se lie pas à une seule séquence, mais à deux séquences séparées. Par conséquent, la liaison de FTF à son site de forte affinité pourrait entraîner l'arrivée, via la formation d'un homodimère, d'un second FTF qui se lierait à la séquence présente dans LF.

FTF n'est pas capable d'hétérodimériser avec les récepteurs nucléaires RXR α (RXR est impliqué dans l'hétérodimérisation avec plusieurs autres récepteurs nucléaires (480-483)), Coup-TFI et HNF4 α . Cependant, il

hétérodimérise en solution avec GR et ER. Le récepteur de glucocorticoïdes est impliqué dans la régulation hormonale du gène de l'AFP. En réponse aux hormones glucocorticoïdes, GR migre au noyau et vient rapidement réprimer l'expression de l'AFP (144) (figure 5.3A,1-2;9-10). La plupart des tumeurs hépatiques qui réexpriment l'AFP (14, 15) ne répondent plus ou partiellement plus aux hormones glucocorticoïdes (9). Ainsi, il y a probablement dans ces tumeurs la perte d'un facteur couplant GR à la régulation de l'AFP. Cette répression de la part de GR nécessite la présence de son DBD mais n'oblige pas sa liaison à l'ADN (140). De plus, cette action se fait via le segment d'ADN FTF/LF du promoteur de l'AFP (figure 1.5) (140). Dans le promoteur de l'AFP, FTF ne peut pas être l'unique cible de GR, car ce dernier ne réprime pas l'action de FTF dans le « core promoter » de HBV (figure 5.3A,5-6). Comme aucune séquence équivalente à celle de LF n'est retrouvée dans le « core promoter » de HBV, le complexe FTF/LF se doit d'être la cible de GR dans le promoteur de l'AFP et non FTF seul. C'est donc l'interaction entre FTF et LF ou entre un coactivateur et le complexe FTF/LF qui est brisée par l'arrivée de GR au noyau. Ainsi, l'interaction physique en solution entre FTF et GR (tableau 5.1) ne peut pas expliquer à elle seule la répression hormonale de l'expression de l'AFP. Ce qui est appuyé par l'obtention d'une interaction entre FTF et ER, ce dernier n'ayant aucun effet sur l'expression de l'AFP.

Il est connu que le récepteur nucléaire HNF4 interagit, via son AF2, avec l'homéoprotéine HNF1 (484), de même qu'il est démontré que FTZ-F1 est capable d'interagir avec l'homéoprotéine FTZ (485). Comme HNF1 est impliqué dans l'induction du promoteur de l'AFP et que son action coopère avec celle de FTF ((130) et figure 5.3A,9), il était intéressant de vérifier si FTF et HNF1 pouvaient interagir ensemble. Toutefois, FTF et HNF1 n'interagissent pas ensemble (tableau 5.1) et donc leur coopération doit passer par d'autres facteurs tels que LF. Il serait intéressant de vérifier si FTF peut interagir avec d'autres types d'homéoprotéines, tout comme SF1 qui interagit avec l'homéoprotéine Ptx1 (486). Oct-1, une homéoprotéine capable d'interagir avec GR (487), pourrait

être une bonne candidate pour LF. De même, un autre candidat pour LF est Nkx-2.8, un autre type d'homéoprotéine qui possède une activité inductrice sur le promoteur de l'AFP (136). Les auteurs qui ont démontré cette activation mentionnent que le site d'action de Nkx-2.8 se situe dans le site de liaison pour FTF (136). Toutefois, il existe également une séquence de liaison pour ce facteur dans la séquence LF (136). Il est également possible de penser qu'un membre de la famille Ptx, qui serait présent au foie (aucun n'a encore été identifié dans le foie cependant), puisse interagir avec FTF.

La dernière interaction en solution tentée a été exécutée avec le facteur de transcription C/EBP α qui est impliqué dans l'activation de l'expression de l'AFP via l'amplificateur intergénique (7). Le mode d'action proposé pour un amplificateur serait que ce dernier se rapproche du promoteur par un recourbement de l'ADN via l'intermédiaire d'interactions protéine-protéines avec soit les facteurs directement impliqués dans le promoteur ou avec les cofacteurs de ceux-ci, pour de cette façon aider au recrutement de la machinerie transcriptionnelle (474). Il a donc été vérifié si C/EBP α et FTF pouvaient faire des interactions positives et ainsi permettre à l'amplificateur de se rapprocher du promoteur de l'AFP. C/EBP α est capable de lier fortement le DBD de FTF (tableau 5.1) et cette interaction est la plus forte parmi toutes celles obtenues. Par conséquent, FTF et C/EBP α doivent interagir ensemble pour recruter la machinerie transcriptionnelle au promoteur de l'AFP. Le récepteur de glucocorticoïdes peut interagir avec C/EBP ((476) et figure 5.2E,2), alors une partie de l'action négative de GR sur l'expression de l'AFP pourrait être de bloquer cette interaction positive entre FTF et C/EBP α . Cette interaction entre C/EBP α et FTF pourrait également être impliquée dans la régulation du virus de l'hépatite B; FTF induisant le « core promoter » de HBV (chapitre 5) et C/EBP activant l'amplificateur I de HBV (393).

L'interaction entre FTF et C/EBP ou c-jun se fait via le DBD de FTF. FTF possède immédiatement à la sortie de son DBD, une séquence protéique

s'apparentant au « zipper » de leucine (130, 225-227). Cette région est présente dans la protéine GST/DBD-FTF servant aux expériences de rétention. Il serait alors possible que cette région de FTF interagisse avec le « zipper » de leucine de C/EBP et de c-jun. De plus, il est connu que le « zipper » de leucine de c-jun est important dans la liaison de c-jun à GR (468). Il serait intéressant de vérifier cette possibilité en enlevant le simili « zipper » de leucine de la protéine de fusion GST/DBD-FTF.

La poursuite de l'identification du facteur LF n'a pas encore abouti et l'explication de la régulation hormonale n'est pas encore complète. Le procédé le plus simple pour aboutir à l'identification de LF serait de faire un criblage par deux hybrides d'une banque de foie avec comme sonde FTF et GR. Ainsi, toutes protéines liant ces deux facteurs seraient de bonnes candidates pour LF.

L'interaction entre FTF et des coactivateurs est également intéressante. Il est possible que la connaissance de LF ne soit pas suffisante pour expliquer totalement la régulation hormonale car il est probable que la présence de coactivateurs joue un rôle important. Il a été démontré que FTZ-F1 de *Bombyx Mori* utilisait deux cofacteurs, MBF1 et MBF2, pour mener à bien sa fonction de recrutement de la machinerie transcriptionnelle (488, 489). Il est connu que TIF1 β est lié par C/EBP et par GR (490). Ainsi, si FTF et C/EBP pouvaient lier TIF1 β , un GR activé pourrait alors venir enlever ce cofacteur et réprimer l'expression de l'AFP. FTF et LF pourraient également partager un cofacteur que GR viendrait enlever pour réprimer le promoteur de l'AFP.

En transfection, les cofacteurs Rip140 et SRC-1 sont potentiellement impliqués dans la régulation de l'activité de FTF. Rip140 a tout d'abord été identifié comme un cofacteur de ER qu'il stimule lorsqu'il est en basse concentration et qu'il réprime lorsque sa concentration est plus élevée (197). Le comportement de Rip140 envers FTF est sensiblement le même, à savoir qu'à faible concentration, il stimule son activité (figure 5.3C,7-8) alors qu'en plus

haute concentration, il n'a pas d'effet sur l'activité de FTF (figure 5.3C,9-12). Il a été démontré que Rip140 possédait un effet répresseur sur l'action positive ou négative de GR et que cette répression est compétitionnée par un autre coactivateur, soit TIFII (491). Ainsi, une portion de la répression hormonale régissant l'expression de l'AFP pourrait passer par Rip140 qui est connu pour interagir avec GR (491). L'action de Rip140 sur ER est dépendante du contexte du promoteur, il active ER seul mais lorsque ce dernier est lié à Pit-1, il le réprime (492). Ainsi, l'activité de Rip140 pourrait varier dépendant des facteurs de transcription présents. Il est alors possible que la différence dans l'activation par Rip140 du « core promoter » du virus de l'hépatite B (figure 5.3C,7) par rapport au promoteur de l'AFP (figure 5.3C,17) est due au fait que FTF est seul dans le « core promoter », alors qu'il est complexé avec LF dans l'AFP.

Le coactivateur SRC-1 possède également une action activatrice sur FTF (figure 5.3C,2) qui est cependant moins forte que celle produite par Rip140 (figure 5.3C,7). SRC-1 est un cofacteur impliqué dans l'activation de plusieurs récepteurs nucléaires (GR, ER, TR, etc.) (197). SRC-1 interagit avec le domaine AF2 de HNF4 (493), tout comme avec deux portions de SF1, soit l'AF-2 et un domaine situé après son DBD (acides aminés 187 à 245) (494). Il n'est donc pas surprenant que FTF puisse être activé, tout comme son homologue SF1, par SRC-1 et cette interaction doit se faire via son AF2 également. GRIP1, quant à lui, ne semble pas influencer l'action de FTF (figure 5.3C,13-14).

Ainsi, FTF n'est pas exempt de la possibilité de faire des interactions avec des cofacteurs et l'approfondissement de ce champ d'étude serait important pour bien caractériser la fonction de FTF et son implication dans les processus développementaux. De même que l'identification des cofacteurs avec lesquels FTF interagit pourrait permettre de clarifier la régulation de l'expression du gène de l'AFP. Plusieurs autres cofacteurs pourraient être testés quant à leur action sur l'activité de FTF (TIF1 β , TIFII, PBP, etc.). Il faudrait également mieux caractériser l'interaction de FTF avec Rip140 et SRC-1 en transfection; des

expériences de rétention sur colonne permettraient de vérifier si FTF interagit physiquement en solution avec ces coactivateurs.

Le domaine AF-1 des récepteurs nucléaires était considéré comme un domaine activateur simple, indépendant des ligands. Il est de plus en plus évident que ce domaine peut être la cible des sentiers métaboliques via sa phosphorylation. PPAR α est activé par la phosphorylation de son domaine AF-1, alors que PPAR γ est réprimé (158). Il semblerait que le domaine AF-1 non phosphorylé de PPAR α soit occupé par des corépresseurs et que sa phosphorylation l'en libère (158). Il a été démontré également que le domaine AF-1 de ER β recrute SRC-1 seulement s'il est phosphorylé (161). FTF ne possède pas de domaine AF-1, ce qui peut faire de FTF un récepteur nucléaire moins fort, incomplet, par rapport aux autres récepteurs. Les transfections démontrent que c'est effectivement le cas puisque l'ajout d'un AF-1, soit l'AF-1 de GR, à FTF (AFTF, figure 5.4) confère à ce dernier un effet suractivateur sur tous les promoteurs qu'il contrôle (figure 5.4). FTF n'est pas capable d'activer une construction contenant sa séquence consensus multimérisée (figure 5.4,11), alors que AFTF, en est capable (Figure 5.4,12), ce qui amène la conclusion que FTF (et SF1 probablement) aurait évolué pour être incomplet et avoir besoin de la présence d'autres facteurs (tel que LF) pour pouvoir bien exercer sa fonction. Ceci est démontré lorsque le domaine AF-1 de ER est coupé; celui-ci fonctionne moins bien, mais cette perte peut être compensée par l'ajout d'une séquence de liaison pour d'autres facteurs de transcription (AP1 et NF1) près du site de ER (162). AFTF pourrait se révéler utile pour l'identification des cibles de FTF et pour la caractérisation de la fonction de FTF au cours du développement. Tout d'abord, le fait d'avoir un suractivateur permettra de voir avec cet AFTF en transgénèse de plus grandes variations dans l'expression de ses gènes cibles qu'avec un FTF normal, permettant alors de les identifier plus aisément. Il serait également intéressant de transférer de façon stable AFTF dans les cellules ES et de vérifier si leur différenciation *in vitro* est affectée.

SF1, qui ne possède pas de domaine N-terminal tout comme FTF, possède cependant un domaine d'activation, que certains nomment AF-1, qui est différent de l'AF-2 et qui se situe après le DBD (acides aminés 187 à 245). Tout récemment, il a été démontré que ce domaine subissait une phosphorylation sur la sérine-203 et que cette phosphorylation affectait le recrutement des cofacteurs (160). La comparaison de FTF et SF1 dans cette région montre une homologie faible (53% par rapport à 62% pour les protéines entières). Néanmoins, deux sous-régions plus conservées (81% et 68%) se retrouvent dans ce domaine. Au niveau des sites de phosphorylation théoriques pour FTF, dans cette région se retrouvent deux sites potentiels de phosphorylation pour la caséine kinase II (CKII), dont un situé dans la première sous-région conservée et dont la sérine phosphorylée correspond à la sérine-203 de SF1 (sérine-233 de FTF). Il serait donc possible que FTF possède un tel domaine activateur et que celui-ci soit phosphorylé comme pour SF-1.

Tous les résultats des interactions protéine-protéines présentés ici, sont des résultats préliminaires en attente d'une confirmation. En effet, dans toutes expériences tentant d'identifier des interactions protéine-protéines, il faut toujours confirmer les résultats par une seconde méthode. Dans ce cas-ci, il serait possible de confirmer les interactions entre FTF et C/EBP, c-jun, GR ou ER (tableau 5.1) en transfection par double hybride ou en immunoprécipitation. Pour ce qui est des interactions avec les cofacteurs, il faudra approfondir l'interaction probable entre FTF et Rip140 ou SRC-1 par des analyses de liaison et par des transfusions supplémentaires. Il pourrait être intéressant de connaître quelle portion de FTF est impliquée dans ces interactions. Il serait également intéressant de tester d'autres cofacteurs. De même, un criblage par deux hybrides avec FTF pourrait fournir d'autres candidats pour LF et d'autres cofacteurs. Finalement, la construction d'un FTF suractivateur (AFTF) n'est qu'une première étape vers une analyse approfondie des cibles potentielles pour FTF et de la fonction de FTF dans le développement. En ce qui concerne la régulation de l'AFP, ces résultats, mêmes préliminaires, ont apporté des

éclaircissements substantiels quant à l'implication de FTF et de LF, quant à l'effet de c-jun sur le promoteur et quant à la possible implication de cofacteurs dans la régulation de l'AFP.

Chapitre 6

Conclusion et perspectives

Chapitre 6

Conclusion et perspectives

Il y a autant de façon de réguler l'expression d'un gène qu'il y a de gènes dans le génome. Liaison, compétition, amplification, répression, activation, interaction, coopération sont tous des termes qui décrivent cette diversité mécanistique. Par sa complexité, la régulation du gène de l'alpha-fœtoprotéine s'incorpore parfaitement à cette multitude. Le travail présenté dans cette thèse apporte plusieurs éclaircissements quant à la compréhension de cette régulation. De plus, il améliore nos connaissances sur la famille de l'albumine et sur la fonction du récepteur nucléaire orphelin FTF.

6.1 Les implications sur la régulation de l'AFP

L'AFP est une protéine embryonnaire qui voit son expression corrélée avec la prolifération et la différenciation hépatiques (9, 10). Le contrôle de cette expression est effectué majoritairement par l'amplificateur intergénique et par son promoteur. Dans le chapitre 3, il est démontré que la régulation de l'alpha-albumine n'influence en aucun cas l'expression de l'AFP, malgré le patron d'expression développementale réciproque existant entre ces deux gènes. Il est également connu que les éléments du promoteur de l'AFP sont suffisants pour contrôler son expression développementale (115, 118). Ainsi, les facteurs de transcription présents dans ce promoteur et les interactions entre eux sont les principaux acteurs de cette régulation.

L'existence d'un interrupteur biologique constitué des facteurs HNF1 et NF1 est un des mécanismes de fermeture du promoteur. Ce mécanisme, cependant, fait probablement partie d'une étape tardive de la fermeture du promoteur lors du développement. Une mutation du promoteur de l'AFP dans le site de liaison du facteur NF1, empêchant la fixation de ce dernier à l'ADN, n'entraîne pas de persistance de l'expression d'un gène rapporteur présent dans

le foie de souris transgéniques. Toutefois, dans cette même souris transgénique, au niveau du rein, où l'expression de HNF1 est beaucoup plus élevée, il y a persistance de l'expression (140). Ceci suggère donc que cet interrupteur, n'étant pas l'initiateur de la fermeture du locus au niveau du foie, est tout de même important pour sa fermeture complète. Il faut donc imaginer que la fermeture du promoteur de l'AFP, de façon simultanée avec l'arrêt de la prolifération, résulte tout d'abord d'un premier événement répresseur qui entraîne le blocage de la liaison de FTF, LF et de HNF1 ce qui favoriserait alors l'arrivée de NF1 sur son site de liaison. NF1 viendrait ainsi compléter la fermeture du promoteur. Par la suite, le promoteur serait méthylé et l'expression serait bloquée.

Une portion de cette thèse s'est donc intéressée à identifier cet événement initiateur. Le récepteur nucléaire orphelin FTF, nouvellement identifié dans le laboratoire et démontré essentiel pour l'activation de l'AFP (130), s'est avéré le candidat le plus susceptible à subir cette régulation. Ce récepteur nucléaire possède un facteur accessoire, LF, encore non identifié qui serait également important dans la régulation de l'expression de l'AFP (7, 130). Le récepteur FTF est une cible de choix de par sa nature réceptrice. Ainsi, il est probable que la présence d'un ligand spécifique à FTF soit amené à varier avec la prolifération cellulaire affectant son activité; de même qu'il est possible que FTF soit la cible de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation, etc.) en parallèle avec la prolifération cellulaire modifiant ainsi son activité. Toutefois, au chapitre 4, les expériences démontrent que FTF est essentiel à l'expression maximale d'un messager exprimé uniquement chez l'adulte, soit le messager pré-génomique du virus de l'hépatite B. Ainsi, si FTF subit une modification (soit post-traductionnelle ou par perte de son ligand) chez l'adulte, celle-ci n'affecte en rien sa capacité d'activer le « core promoter » de HBV (chapitre 4). Néanmoins, cette modification pourrait être très minime et n'affecter que très légèrement l'activité de FTF. Cette légère différence ne serait alors pas ressentie dans un promoteur standard contrôlé par deux sites FTF tel

que le « core promoter », mais affecterait un promoteur dont le contexte est fragile et sous tension. Ainsi, pour maintenir l'expression de l'AFP, FTF pourrait avoir besoin de toute son activité et une simple diminution de son affinité pour l'ADN pourrait suffire pour créer un déséquilibre dans le promoteur et ainsi ne plus permettre à FTF de collaborer avec LF et HNF1, ce qui ouvrirait la voie à NF1 pour venir fermer l'interrupteur et ainsi clore le promoteur.

Une autre hypothèse est que la répression développementale de l'AFP pourrait être dépendante de l'interaction de FTF avec LF ou avec un cofacteur. Ainsi, l'initiateur de la répression développementale pourrait tout simplement être un facteur de transcription ou un corépresseur, apparaissant à la fin de la prolifération, qui viendrait bloquer l'interaction entre FTF et LF ou entre FTF et un cofacteur. Ce blocage créerait alors un déséquilibre dans le promoteur, libérerait HNF1 et permettrait à NF1 de venir se lier pour fermer le promoteur. Il semblerait que la régulation hormonale use de ce principe puisque cette dernière est perdue lorsque FTF et LF sont absents, mais demeure si l'un ou l'autre est présent (140). De plus, l'action répressive du récepteur des glucocorticoïdes se fait par contact protéine-protéine et non en liant l'ADN (140). Par conséquent, GR pourrait venir bloquer l'interaction constructive entre FTF et LF et ce blocage pourrait résulter en une répression de l'expression de l'AFP. Ainsi, l'étude des interactions protéine-protéines entre FTF et diverses protéines est une voie prometteuse dont quelques résultats préliminaires sont présentés au chapitre 5 de cette thèse.

Parmi les premières interactions obtenues, notons que le domaine de liaison de l'ADN (DBD) de FTF est capable d'interagir avec c-jun, un des constituants, avec c-fos, du complexe protéique AP1 dont la présence est associée à la prolifération cellulaire (458, 459). Les transfections démontrent que c-jun est un répresseur du promoteur de l'AFP (chapitre 5). Il serait donc possible que c-jun, lors de la prolifération, soit uniquement complexé avec c-fos qui, lorsque la prolifération cesse, voit son expression s'arrêter (458). De cette

façon, c-jun est libéré et se retrouve seul dans la cellule. Il est alors capable d'homodimériser et de mener une action comparable à AP1, mais légèrement moins forte (459). Toutefois, une portion de ce c-jun pourrait également hétérodimériser avec FTF et ainsi venir bloquer son interaction avec LF et par conséquent réprimer l'expression de l'AFP. Ainsi, pourrait s'expliquer la corrélation de cette dernière avec la prolifération cellulaire. De même, le « core promoter » de HBV est également réprimé par c-jun, appuyant l'hypothèse d'un effet répresseur de c-jun sur FTF. Il est alors possible de se demander pourquoi le « core promoter » de HBV fonctionne chez l'adulte si FTF est bloqué par c-jun. Une réponse possible est que la protéine X du virus est capable d'interagir avec c-jun (292, 317) ce qui pourrait l'empêcher d'interagir avec FTF. Ceci pourrait également expliquer la corrélation entre l'expression de l'AFP et l'apparition de carcinomes hépatocellulaires dépendants de HBV (495, 496).

Il devenait donc essentiel d'identifier le facteur accessoire (LF) à FTF puisque la connaissance de ce facteur allait permettre de mieux comprendre les mécanismes affectant l'association entre FTF et LF et, par le fait même, affectant la régulation développementale et/ou hormonale du gène de l'AFP. Parmi les candidats étudiés plusieurs ont été éliminés : les gènes de type GATA, le complexe AP1 et le récepteur nucléaire HNF4 (Chapitre 5). Deux candidats demeurent cependant. Il y a tout d'abord l'homéoprotéine NKx-2.8 qui est capable d'activer le promoteur de l'AFP (136). Une interaction entre FTF et cette homéoprotéine est tout à fait possible puisque que FTZ-F1, un homologue à FTF, est capable d'interagir avec FTZ, une homéoprotéine (485). Il serait intéressant de vérifier si FTF et NKx-2.8 additionnent leur action en transfection et vérifier par rétention sur colonne si ces deux protéines peuvent former des interactions protéine-protéines. Il est également possible que d'autres types d'homéoprotéines, telles que Oct-1 ou un homologue humain à FTZ, puissent interagir avec FTF.

Le second candidat est FTF lui-même puisque au chapitre 5 il est démontré qu'il est capable de former des homodimères en solution. Cette hypothèse peut sembler assez surprenante puisque tous les autres membres de la famille FTZ-F1 lient l'ADN sous forme de monomère (179, 180, 221). De plus, tout porte à croire que FTF lie également sa séquence de liaison consensus, présente dans le promoteur de l'AFP (figure 1.5), sous forme de monomère (130). Ainsi FTF doit bel et bien lier sa séquence consensus sous forme de monomère. Toutefois, la présence dans la séquence LF d'un site de liaison de faible affinité pour FTF pourrait amener la liaison d'un second FTF. Il est alors possible d'imaginer que FTF se lie sur son site de forte affinité et qu'une fois lié, il attire un second FTF par une interaction protéine-protéine. Ce second FTF se lierait alors à la séquence de faible affinité présente dans LF. Il est également possible que la présence d'un ligand de FTF au cours du développement entraîne une légère augmentation de l'affinité de FTF pour sa séquence de liaison, lui permettant ainsi de venir se lier sur ce site de faible affinité, en plus de se lier sur son site consensus. La présence d'un second FTF se liant sur un site de faible affinité de façon dépendante de la présence d'un second FTF ou de la présence d'un ligand, contribuerait à créer dans le promoteur de l'AFP un contexte sensible aux variations qui surviennent au cours du développement. Ainsi, toutes perturbations de l'interaction entre les deux FTF pourraient entraîner une répression de l'AFP. C'est ainsi que l'hétérodimérisation de c-jun avec FTF pourrait mener à une répression de l'expression de l'AFP au cours du développement. Il est mentionné au chapitre 5 que l'interaction obtenue entre FTF et GR ne devait probablement pas être l'unique responsable de la répression hormonale puisque le « core promoter » de HBV n'était pas réprimé par la dexaméthasone (chapitre 4). Toutefois, dans un contexte où deux FTF interagissent ensemble pour activer la transcription de l'AFP ceci pourrait être différent. Ainsi, l'action de GR n'affecte pas FTF dans le « core promoter » parce que dans celui-ci, malgré ses deux sites de liaison, FTF se retrouve sous forme de monomère. Tandis que dans l'AFP, la liaison de GR avec FTF bloquerait

l'interaction positive avec le second FTF et empêcherait ainsi l'activation de l'expression du gène de l'AFP.

Dans le chapitre 5, il est également démontré que FTF est capable d'interagir avec le facteur de transcription C/EBP. Ce dernier est essentiel à la fonction de l'amplificateur intergénique (7). Ainsi, il est possible qu'une autre fonction de FTF dans le promoteur de l'AFP soit d'interagir avec C/EBP pour permettre à l'amplificateur intergénique de se rapprocher du promoteur et d'exercer son action d'amplification sur la transcription. Ainsi, ce rapprochement de l'amplificateur pourrait être dépendant de la présence de deux FTF dans le promoteur et, par conséquent, la dissociation de l'interaction entre ces deux FTF pourrait bloquer l'action positive de l'amplificateur sur le promoteur.

6.2 La famille de l'albumine

Dans les chapitres 2 et 3, un nouveau membre de la famille de l'albumine est caractérisé, soit l'alpha-albumine. L'identification de l'existence de ce quatrième et probablement dernier membre à la famille de l'albumine a permis de bien délimiter le locus de la famille avec dans l'ordre chez l'humain et la souris : 5'- l'albumine, l'AFP, et ALF- 3'. De plus, tous ces gènes possèdent la même polarisation d'expression 5' → 3'. La connaissance de la séquence de ces différents gènes chez la souris, le rat et l'humain a permis de faire une étude phylogénique plus détaillée, permettant de mieux comprendre l'évolution de cette famille. Ainsi, l'AFP et ALF viennent d'un ancêtre commun distinct de l'ALB dont l'apparition par duplication a donné naissance à cet ancêtre commun. L'AFP et ALF ont divergé au niveau de leur régulation de façon opposée probablement pour permettre à l'un de remplacer l'autre au cours du développement. Cette réciprocity d'expression implique que les portions les plus conservées au niveau des deux protéines sont probablement celles impliquées dans des fonctions communes. Il est possible de supposer que tout comme l'AFP, ALF est capable de transporter des acides gras et la bilirubine puisque certains sites de liaison

pour ces deux ligands, identifiés sur l'ALB et l'AFP, sont conservés sur ALF (chapitre 3). ALF pourrait également avoir évolué, tout comme VDBP, pour lier un ligand très spécifique présent en petite quantité dans le sérum puisque ALF est le membre de la famille dont le taux sérique maximal est le plus bas. L'étude de ALF a également permis de déterminer que l'expression de cette dernière est régulée de façon totalement autonome et que cette régulation n'influencait aucunement l'expression du gène de l'AFP.

6.3 Le virus de l'hépatite B

La démonstration de l'implication du récepteur nucléaire FTF dans la régulation du « core promoter » du virus de l'hépatite B est doublement intéressante. Premièrement, elle a permis de s'assurer de la fonctionnalité de FTF dans le foie adulte. Ainsi la démonstration que FTF est essentiel et qu'il confère la plus forte induction jamais démontrée de la part d'un facteur de transcription sur le « core promoter » a permis de savoir que FTF était fonctionnel dans le foie adulte. Deuxièmement, l'intérêt même d'identifier un régulateur fort de l'expression du messenger pré-génomique du virus de l'hépatite B possède une forte implication clinique potentielle. La régulation de ce messenger est essentielle pour l'exécution du cycle de vie du virus puisqu'il est impliqué dans la réplication du génome (chapitre 1 section 1.7.5). Au chapitre 4 il est démontré que le « core promoter » qui contrôle l'expression de ce messenger est régulé de façon positive par deux sites de forte affinité pour FTF. De plus, l'action de FTF s'additionne à celle de HNF4 pour suractiver ce promoteur. Également, des mutations des sites FTF abolissent l'action de FTF dans ce promoteur. Finalement, l'utilisation d'un facteur FTF dominant négatif peut réprimer le « core promoter » et cela par interférence de liaison avec les autres facteurs l'entourant.

L'action de FTF dans le virus de l'hépatite B est probablement plus importante que le seul contrôle de l'expression du messenger pré-génomique. FTF

pourrait être impliqué dans le tropisme hépatique du virus. En fait, l'absence de l'identification de récepteurs membranaires pouvant expliquer le tropisme hépatique du virus a amené l'hypothèse que ce dernier s'effectuerait plutôt au niveau de la régulation des gènes du virus. Ainsi, le virus pourrait pénétrer dans la plupart des tissus mais ne réussir à se répliquer qu'uniquement dans les tissus où l'on retrouve la combinaison des récepteurs nucléaires FTF et HNF4. Le seul tissu où se retrouve ces deux facteurs en quantité abondante est le foie, ce qui expliquerait alors pourquoi HBV se réplique uniquement dans ce tissu. De même, un peu de réplication du virus est retrouvée dans le pancréas (352) qui est un tissu possédant beaucoup de FTF (130) et un peu de HNF4 (497). Par conséquent, FTF et HNF4 pourraient être importants dans l'initiation de la réplication virale durant le stade précoce de la transcription et leur absence pourrait empêcher le virus d'initier sa réplication. Ainsi, au moment où le virus entre dans la cellule et que son génome se retrouve dans le noyau, FTF et HNF4 sont immédiatement utilisés pour produire le messager prégénomique. Pendant ce temps, les autres messagers sont produits et cette production pourrait également être influencée par FTF via une fonction possible de ce dernier dans l'amplificateur II. Par la suite, l'activation du « core promoter » peut être poursuivie par C/EBP en combinaison avec la protéine X nouvellement synthétisée ou par HNF3 et le cycle de vie du virus se poursuit (298).

Il a été démontré que l'amplificateur I de HBV possède plusieurs sites C/EBP (390, 394). Ainsi, FTF pourrait, tout comme pour le promoteur de l'AFP, interagir avec ces C/EBP (chapitre 5) et aider l'amplificateur à exercer son action. De plus, d'après les résultats du chapitre 4, le site FTF#1 du « core promoter » pourrait être impliqué dans une telle interaction car lorsqu'il est muté dans une construction sans l'amplificateur I (HPm1), il n'y a pratiquement pas de perte d'activité (figure 3 du chapitre 4). Cependant en présence de l'amplificateur I (HEPm1), la mutation de ce site est beaucoup plus ressentie (figure 4 du chapitre 4).

6.4 Les perspectives

Toutes études doctorales doivent s'achever un jour, mais un projet n'est jamais totalement complété. C'est pourquoi vous trouverez dans cette section différentes expériences qui pourraient être faites dans l'avenir en ce qui concerne les différents projets présentés dans cette thèse.

6.4.1 La suite de la caractérisation de ALF

La fonction précise de l'alpha-albumine est encore inconnue. Il est donc facile de proposer un projet dont le but serait d'identifier cette ou ces fonctions. Il est logique de croire que la fonction de ALF est de transporter des ligands comme le font tous les membres de la famille de l'albumine. La purification de ALF est une étape importante pour permettre l'identification des différents ligands qu'elle pourrait transporter. Ainsi, l'obtention d'une protéine pure pourrait permettre de faire des analyses de liaison avec différents ligands. Une alternative serait de purifier ALF à partir du sérum et d'analyser par spectroscopie de masse quels sont les ligands qu'elle contient suite à cette purification. Également, l'identification de certains ligands pouvant être liés par ALF pourrait mener à une caractérisation de la localisation sur la protéine des sites de liaison pour ces derniers.

Il serait également intéressant de continuer la vérification à savoir s'il existe une corrélation entre ALF et différentes pathologies. Si une telle corrélation est identifiée, il faudra alors vérifier si cette dernière peut être un indicateur précoce de la maladie ou un traceur de l'évolution de celle-ci. Pour ce faire, la mise au point d'un essai quantitatif (R.I.A.) serait essentielle. Au niveau de l'évolution de la famille de l'albumine, il serait bien de confirmer les hypothèses en vérifiant si ALF est présent chez les oiseaux et vraiment absent chez les amphibiens.

6.4.2 L'implication de FTF dans la régulation du « core promoter » de HBV

Plusieurs points supplémentaires seraient à vérifier quant à l'implication de FTF dans la régulation du virus de l'hépatite B. Tout d'abord, il serait intéressant d'approfondir l'implication de FTF au niveau de la régulation de l'expression des gènes de HBV. La région du « core promoter » de HBV contient un second promoteur, soit le promoteur pre-C, dont la régulation n'est pas essentiellement équivalente à celle du « core promoter ». Il est connu que HNF4 qui active le « core promoter » réprime l'activité du promoteur pre-C (409, 410). Ainsi, il serait profitable de savoir si FTF active ou réprime ce second promoteur. Dans cette région se retrouve également l'amplificateur II. Ce dernier possède une action activatrice sur tous les promoteurs du virus outre le « core promoter » et le promoteur pre-C (389). Il est connu que C/EBP seul, qui n'active pas le « core promoter », active cet amplificateur II (416, 417). Il serait pertinent de vérifier si FTF est également un inducteur de celui-ci. Finalement, il existe une région de régulation négative (NRE) située en 3' du « core promoter » ayant pour effet de réprimer l'action de ce dernier (422, 423). Ainsi, il serait intéressant de vérifier si ce NRE possède une quelconque influence sur l'action de FTF.

Au niveau d'une intervention clinique, il serait très important de vérifier l'effet de la présence d'un FTF dominant négatif sur l'infection du virus. Une étude, en culture cellulaire, dans laquelle l'infection de cellules hépatiques par HBV serait mesurée en présence ou en absence de ce dominant négatif serait intéressante. Également, l'intérêt de la démonstration que deux récepteurs nucléaires (FTF et HNF4) sont essentiels pour l'activation maximale du « core promoter » attire notre attention vers l'utilité de la découverte d'éventuels antagonistes pour ces récepteurs. Ces antagonistes pourraient alors servir dans le traitement de la maladie, surtout au niveau de la chronicité.

L'identification du « core promoter » du virus de l'hépatite B, comme une cible du récepteur nucléaire FTF, n'était qu'une étape vers l'identification de cibles cellulaires pour FTF. Jean-François Paré dans ses travaux a caractérisé

quelques autres cibles pour FTF, soit HNF4 et HNF1 alors que dans ses travaux Luc Galarnau a montré que le promoteur de HNF3 β est aussi une cible de FTF. Il serait intéressant d'identifier d'autres cibles pour FTF telles que des gènes spécifiques au pancréas puisque FTF y est fortement exprimé (130). Pour ce faire, l'utilisation du récepteur FTF hybride, AFTF, qui possède une activité plus grande et une spécificité semblable à FTF, serait avantageuse. Une surexpression de ce récepteur hybride en transgénèse, combinée à des méthodes telles que la fabrication de banques soustractives, pourrait permettre d'identifier d'autres gènes cibles.

6.4.3 Les interactions protéine-protéines

Tout d'abord, pour poursuivre l'analyse des interactions protéine-protéines entre FTF et d'autres facteurs de transcription, il faudrait mettre au point une seconde méthode pour vérifier toutes les interactions obtenues telle que l'immunoprécipitation ou le deux hybrides dirigés. Cette seconde vérification ayant pour but de confirmer que ces interactions sont véritablement spécifiques et ne se produisent pas seulement en solution en présence d'excès des deux protéines.

Au niveau des interactions elles-mêmes, plusieurs expériences pourraient être attrayantes. Pour commencer, l'interaction physique entre FTF et certaines protéines à homéodomaine (NKx-2.8, OCT-1) pourrait être vérifiée. Récemment, une répression du promoteur de l'AFP par le facteur de transcription HNF6 a été obtenue en transfection. Il pourrait être intéressant de vérifier si ce dernier peut interagir avec FTF. Dans HBV, il a été démontré que p53 pouvait réprimer le « core promoter » en inhibant l'action d'un facteur de transcription dont le site de liaison correspond au site FTF#1 (300). Il pourrait alors être pertinent de vérifier par rétention sur colonne si FTF et p53 peuvent interagir ensemble.

Les mêmes expériences d'interaction pourraient être faites avec des portions plus raccourcies du domaine de liaison de l'ADN (DBD) de FTF. Ainsi, il

serait possible de déterminer les régions impliquées dans les interactions obtenues. Le DBD de FTF pourrait être tronqué ou les doigts de zinc pourraient être séparés afin de vérifier quelles portions sont importantes pour l'interaction entre FTF et C/EBP ou c-jun. Des mutations dirigées pourraient également être effectuées pour vérifier leur implication sur ces interactions. Il serait également intéressant d'ajouter dans nos réactions de rétention le segment d'ADN correspondant aux séquences FTF et LF du promoteur de l'AFP et vérifier si cet ajout augmente l'affinité déjà démontrée entre deux FTF.

Finalement au niveau des coactivateurs, quelques-uns ont été testés en transfection et cela démontre que FTF peut être modulé par leur action. Toutefois, ces expériences n'étaient que préliminaires et demanderaient une étude plus approfondie. Le criblage deux hybrides serait également une approche à envisager pour identifier les cofacteurs interagissant avec FTF et même pour identifier LF.

6.5 Conclusion

Tous les travaux exécutés dans cette thèse ont amené des éclaircissements dans la compréhension des différents domaines auxquels ils s'affiliaient. Le but de l'étude des mécanismes de régulation impliqués dans l'expression de l'AFP était de mieux comprendre ceux-ci et de connaître les facteurs impliqués afin de pouvoir, par la suite, tenter d'induire la différenciation dans des cellules hépatiques cancéreuses rétrodifférenciées et ainsi contrecarrer le phénotype malin. Par conséquent, la démonstration de la fonctionnalité de FTF chez l'adulte par les études du « core promoter », chez le virus de l'hépatite B, combinée à la démonstration par Jean-François Paré que FTF est essentiel au développement de la souris, porte à croire que FTF serait un des facteurs pouvant être utilisés dans de telles tentatives. Les facteurs HNF3 et AP1 seraient également de bons candidats pour tenter d'inverser la rétrodifférenciation de tumeurs hépatiques. De plus, un facteur hybride tel que AFTF pourrait être un

outil important pour de telles expériences où la force de l'induction sera importante. La poursuite de l'identification des interactions protéine-protéines entre FTF et d'autres protéines via le protocole mis au point dans cette thèse ou par deux hybrides pourrait également révéler d'autres facteurs de transcription ou coactivateurs impliqués dans les mécanismes de prolifération et de différenciation hépatiques. L'identification de ces protéines serait alors utile pour atteindre le but ultime qui est de réussir à conférer un phénotype différencié non malin à une cellule cancéreuse rétrodifférenciée.

Bibliographie

1. Shiojiri, N., Lemire, J. M., and Fausto, N. Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development, *Cancer Res.* 51: 2611-20, 1991.
2. Dziadek, M. Modulation of alphafetoprotein synthesis in the early postimplantation mouse embryo, *J Embryol Exp Morphol.* 46: 135-46, 1978.
3. Parsa, I. and Flancbaum, L. Long term organ culture of rat liver rudiment in a synthetic medium: morphological and biochemical development, *Dev Biol.* 46: 120-31, 1975.
4. Cascio, S. and Zaret, K. S. Hepatocyte differentiation initiates during endodermal-mesenchymal interactions prior to liver formation, *Development.* 113: 217-25, 1991.
5. Le Douarin, N. M. An experimental analysis of liver development, *Medical Biology.* 53: 427-455, 1975.
6. Houssaint, E. Differentiation of the mouse hepatic primordium. I. An analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation, *Cell Differ.* 9: 269-79, 1980.
7. Bernier, D., Thomassin, H., Allard, D., Guertin, M., Hamel, D., Blaquiére, M., Beauchemin, M., LaRue, H., Estable-Puig, M., and Belanger, L. Functional analysis of developmentally regulated chromatin-hypersensitive domains carrying the alpha 1-fetoprotein gene promoter and the albumin/alpha 1-fetoprotein intergenic enhancer, *Mol Cell Biol.* 13: 1619-1633, 1993.
8. Tilghman, S. M. The structure and regulation of the alpha-fetoprotein and albumin genes, *Oxf Surv Eukaryot Genes.* 2: 160-206, 1985.
9. Belanger, L., Baril, P., Guertin, M., Gingras, M. C., Gourdeau, H., Anderson, A., Hamel, D., and Boucher, J. M. Oncodevelopmental and hormonal regulation of alpha 1-fetoprotein gene expression, *Adv Enzyme Regul.* 21: 73-99, 1983.

10. Tilghman, S. M. and Belayew, A. Transcriptional control of the murine albumin/alpha-fetoprotein locus during development, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79: 5254-7, 1982.
11. Ruoslahti, E. alpha-Fetoprotein in cancer and fetal development, *Adv Cancer Res.* 29: 275-346, 1979.
12. Nayak, N. C., Mital, I., Dhar, A., Chopra, P., and Das, P. K. Increase in serum alpha foetoprotein level in hepatic regeneration of the rat. Effects of age and of magnitude of regenerative activity, *Br J Exp Pathol.* 56: 113-8, 1975.
13. Petropoulos, C., Andrews, G., Tamaoki, T., and Fausto, N. alpha-Fetoprotein and albumin mRNA levels in liver regeneration and carcinogenesis, *J Biol Chem.* 258: 4901-6, 1983.
14. Sell, S. and Dunsford, H. A. Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma, *Am J Pathol.* 134: 1347-63, 1989.
15. Abelev, G. I., Perova, S., Khramkova, N. I., Postnikova, Z. A., and Irlin, I. Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatoma, *Transplant. Bull.* 1: 174-180, 1963.
16. Lynch, R. G. Differentiation and cancer: the conditional autonomy of phenotype, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 647-8, 1995.
17. Marks, P. A. and Rifkind, R. A. Erythroleukemic differentiation, *Annu Rev Biochem.* 47: 419-48, 1978.
18. Strickland, S. and Mahdavi, V. The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid, *Cell.* 15: 393-403, 1978.
19. De Luca, L. M. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia, *Faseb J.* 5: 2924-33, 1991.
20. Chevrette, M., Guertin, M., Turcotte, B., and Belanger, L. The rat alpha 1-fetoprotein gene: characterization of the 5'-flanking region and tandem organization with the albumin gene, *Nucleic Acids Res.* 15: 1338-9, 1987.
21. Belanger, L., Roy, S., and Allard, D. New albumin gene 3' adjacent to the alpha 1-fetoprotein locus, *J Biol Chem.* 269: 5481-4, 1994.

22. Carter, D. C. and Ho, J. X. Structure of serum albumin, *Adv Protein Chem.* 45: 153-203, 1994.
23. He, X. M. and Carter, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin [published erratum appears in *Nature* 1993 Jul 22;364(6435):362], *Nature.* 358: 209-15, 1992.
24. Haefliger, D. N., Moskaitis, J. E., Schoenberg, D. R., and Wahli, W. Amphibian albumins as members of the albumin, alpha-fetoprotein, vitamin D-binding protein multigene family, *J Mol Evol.* 29: 344-54, 1989.
25. Gray, J. E. and Doolittle, R. F. Characterization, primary structure, and evolution of lamprey plasma albumin, *Protein Sci.* 1: 289-302, 1992.
26. Nishio, H., Heiskanen, M., Palotie, A., Belanger, L., and Dugaiczyk, A. Tandem arrangement of the human serum albumin multigene family in the sub-centromeric region of 4q: evolution and chromosomal direction of transcription, *J Mol Biol.* 259: 113-9, 1996.
27. Pardridge, W. M. Plasma protein-mediated transport of steroid and thyroid hormones, *Am J Physiol.* 252: E157-64, 1987.
28. Peters, T., Jr. Serum albumin, *Adv Protein Chem.* 37: 161-245, 1985.
29. Savu, L., Benassayag, C., Vallette, G., Christeff, N., and Nunez, E. Mouse alpha 1-fetoprotein and albumin. A comparison of their binding properties with estrogen and fatty acid ligands, *J Biol Chem.* 256: 9414-8, 1981.
30. Spector, A. A. and Fletcher, J. E. Disturbances in lipid and lipoprotein metabolism, p. 229-248. Rockville, MD: Am. Physiol. Soc., 1978.
31. Faerch, T. and Jacobsen, J. Kinetics of the binding of bilirubin to human serum albumin studied by stopped-flow technique, *Arch Biochem Biophys.* 184: 282-9, 1977.
32. Jacobsen, J. Studies of the affinity of human serum albumin for binding of bilirubin at different temperatures and ionic strength, *Int J Pept Protein Res.* 9: 235-9, 1977.
33. Hsia, J. C., Er, S. S., Tan, C. T., and Tinker, D. O. Human serum albumin: an allosteric domain model for bilirubin binding specificity. An enantiomeric spin label study, *J Biol Chem.* 257: 1724-9, 1982.

34. Lau, S. J., Kruck, T. P., and Sarkar, B. A peptide molecule mimicking the copper(II) transport site of human serum albumin. A comparative study between the synthetic site and albumin, *J Biol Chem.* 249: 5878-84, 1974.
35. Masuoka, J. and Saltman, P. Zinc(II) and copper(II) binding to serum albumin. A comparative study of dog, bovine, and human albumin, *J Biol Chem.* 269: 25557-61, 1994.
36. Glennon, J. D., Hughes, D. W., and Sarkar, B. Nickel(II) binding to glycylglycyl-L-tyrosine-N-methyl amide, a peptide mimicking the NH₂-terminal nickel(II)-binding site of dog serum albumin: a ¹H- and ¹³C-nuclear magnetic resonance investigation, *J Inorg Biochem.* 19: 281-9, 1983.
37. Watkins, S., Madison, J., Galliano, M., Minchiotti, L., and Putnam, F. W. A nucleotide insertion and frameshift cause analbuminemia in an Italian family, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 2275-9, 1994.
38. Minghetti, P. P., Ruffner, D. E., Kuang, W. J., Dennison, O. E., Hawkins, J. W., Beattie, W. G., and Dugaiczky, A. Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4, *J Biol Chem.* 261: 6747-57, 1986.
39. McLeod, J. F. and Cooke, N. E. The vitamin D-binding protein, alpha-fetoprotein, albumin multigene family: detection of transcripts in multiple tissues, *J Biol Chem.* 264: 21760-9, 1989.
40. Cereghini, S., Blumenfeld, M., and Yaniv, M. A liver-specific factor essential for albumin transcription differs between differentiated and dedifferentiated rat hepatoma cells, *Genes Dev.* 2: 957-74, 1988.
41. Tronche, F., Rollier, A., Bach, I., Weiss, M. C., and Yaniv, M. The rat albumin promoter: cooperation with upstream elements is required when binding of APF/HNF1 to the proximal element is partially impaired by mutation or bacterial methylation, *Mol Cell Biol.* 9: 4759-66, 1989.
42. Wu, K. J., Wilson, D. R., Shih, C., and Darlington, G. J. The transcription factor HNF1 acts with C/EBP alpha to synergistically activate the human

- albumin promoter through a novel domain, *J Biol Chem.* 269: 1177-82, 1994.
43. Rey-Campos, J., Chouard, T., Yaniv, M., and Cereghini, S. vHnf1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with Hnf1, *Embo J.* 10: 1445-57, 1991.
 44. Jose-Estanyol, M., Poliard, A., Foiret, D., and Danan, J. L. A common liver-specific factor binds to the rat albumin and alpha- foetoprotein promoters in vitro and acts as a positive trans-acting factor in vivo, *Eur J Biochem.* 181: 761-6, 1989.
 45. Cereghini, S., Raymondjean, M., Carranca, A. G., Herbomel, P., and Yaniv, M. Factors involved in control of tissue-specific expression of albumin gene, *Cell.* 50: 627-38, 1987.
 46. Mantovani, R., Pessara, U., Tronche, F., Li, X. Y., Knapp, A. M., Pasquali, J. L., Benoist, C., and Mathis, D. Monoclonal antibodies to NF-Y define its function in MHC class II and albumin gene transcription, *Embo J.* 11: 3315-22, 1992.
 47. Wuarin, J., Mueller, C., and Schibler, U. A ubiquitous CCAAT factor is required for efficient in vitro transcription from the mouse albumin promoter, *J Mol Biol.* 214: 865-74, 1990.
 48. Maire, P., Wuarin, J., and Schibler, U. The role of cis-acting promoter elements in tissue-specific albumin gene expression, *Science.* 244: 343-6, 1989.
 49. 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: 1538-52, 1991.
 50. Friedman, A. D., Landschulz, W. H., and McKnight, S. L. CCAAT/enhancer binding protein activates the promoter of the serum albumin gene in cultured hepatoma cells, *Genes Dev.* 3: 1314-22, 1989.
 51. Friedman, A. D. and McKnight, S. L. Identification of two polypeptide segments of CCAAT/enhancer-binding protein required for transcriptional activation of the serum albumin gene, *Genes Dev.* 4: 1416-26, 1990.

52. Angrand, P. O., Rousset, J. P., and Weiss, M. C. Cell phenotype, binding affinity and promoter structure modulate transactivation by HNF1 and LAP, *J Cell Sci.* *103*: 1083-92, 1992.
53. Barrera-Hernandez, G., Wanke, I. E., and Wong, N. C. Effects of diabetes mellitus on hepatocyte nuclear factor 1 decrease albumin gene transcription, *J Biol Chem.* *271*: 9969-75, 1996.
54. Mueller, C. R. The down-regulation of albumin transcription during regeneration is due to the loss of HNF-1 and the D-site transcription factors, *DNA Cell Biol.* *11*: 559-66, 1992.
55. Trautwein, C., Rakemann, T., Pietrangelo, A., Plumpe, J., Montosi, G., and Manns, M. P. C/EBP-beta/LAP controls down-regulation of albumin gene transcription during liver regeneration, *J Biol Chem.* *271*: 22262-70, 1996.
56. Hida, D., Nakata, K., Shima, Y., Migita, K., Nakao, K., Kato, Y., Ishii, N., and Eguchi, K. Suppression of albumin and alpha-fetoprotein gene expression by butyrolactone I, a selective inhibitor of the cdk family, in HuH-7 human hepatoma cells, *Anticancer Res.* *18*: 4317-22, 1998.
57. Yamada, Y., Shidoji, Y., Fukutomi, Y., Ishikawa, T., Kaneko, T., Nakagama, H., Imawari, M., Moriwaki, H., and Muto, Y. Positive and negative regulations of albumin gene expression by retinoids in human hepatoma cell lines, *Mol Carcinog.* *10*: 151-8, 1994.
58. Herbst, R. S., Friedman, N., Darnell, J. E., Jr., and Babiss, L. E. Positive and negative regulatory elements in the mouse albumin enhancer, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *86*: 1553-7, 1989.
59. Pinkert, C. A., Ornitz, D. M., Brinster, R. L., and Palmiter, R. D. An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice, *Genes Dev.* *1*: 268-76, 1987.
60. Frain, M., Hardon, E., Ciliberto, G., and Sala-Trepat, J. M. Binding of a liver-specific factor to the human albumin gene promoter and enhancer, *Mol Cell Biol.* *10*: 991-9, 1990.

61. Bossard, P., McPherson, C. E., and Zaret, K. S. In vivo footprinting with limiting amounts of embryo tissues: a role for C/EBP beta in early hepatic development, *Methods*. *11*: 180-8, 1997.
62. Jackson, D. A., Rowader, K. E., Stevens, K., Jiang, C., Milos, P., and Zaret, K. S. Modulation of liver-specific transcription by interactions between hepatocyte nuclear factor 3 and nuclear factor 1 binding DNA in close apposition, *Mol Cell Biol*. *13*: 2401-10, 1993.
63. Bossard, P. and Zaret, K. S. GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation, *Development*. *125*: 4909-17, 1998.
64. Hu, J. and Isom, H. C. Suppression of albumin enhancer activity by H-ras and AP-1 in hepatocyte cell lines, *Mol Cell Biol*. *14*: 1531-43, 1994.
65. Jin, J. R., Wen, P., and Locker, J. Enhancer sharing in a plasmid model containing the alpha-fetoprotein and albumin promoters, *DNA Cell Biol*. *14*: 267-72, 1995.
66. Witke, W. F., Gibbs, P. E., Zielinski, R., Yang, F., Bowman, B. H., and Dugaiczyk, A. Complete structure of the human Gc gene: differences and similarities between members of the albumin gene family, *Genomics*. *16*: 751-4, 1993.
67. Cooke, N. E. and Haddad, J. G. Vitamin D binding protein (Gc-globulin), *Endocr Rev*. *10*: 294-307, 1989.
68. Haddad, J. G., Hu, Y. Z., Kowalski, M. A., Laramore, C., Ray, K., Robzyk, P., and Cooke, N. E. Identification of the sterol- and actin-binding domains of plasma vitamin D binding protein (Gc-globulin), *Biochemistry*. *31*: 7174-81, 1992.
69. Daiger, S. P., Schanfield, M. S., and Cavalli-Sforza, L. L. Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25- hydroxyvitamin D, *Proc Natl Acad Sci U S A*. *72*: 2076-80, 1975.
70. Williams, M. H., Van Alstyne, E. L., and Galbraith, R. M. Evidence of a novel association of unsaturated fatty acids with Gc (vitamin D-binding protein), *Biochem Biophys Res Commun*. *153*: 1019-24, 1988.

71. Van Baelen, H., Bouillon, R., and De Moor, P. Vitamin D-binding protein (Gc-globulin) binds actin, *J Biol Chem.* 255: 2270-2, 1980.
72. Lees, A., Haddad, J. G., and Lin, S. Brevin and vitamin D binding protein: comparison of the effects of two serum proteins on actin assembly and disassembly, *Biochemistry.* 23: 3038-47, 1984.
73. Goldschmidt-Clermont, P. J., Van Baelen, H., Bouillon, R., Shook, T. E., Williams, M. H., Nel, A. E., and Galbraith, R. M. Role of group-specific component (vitamin D binding protein) in clearance of actin from the circulation in the rabbit, *J Clin Invest.* 81: 1519-27, 1988.
74. Haddad, J. G. Human serum binding protein for vitamin D and its metabolites (DBP): evidence that actin is the DBP binding component in human skeletal muscle, *Arch Biochem Biophys.* 213: 538-44, 1982.
75. Cleve, H. The variants of the group-specific component. A review of their distribution in human populations, *Isr J Med Sci.* 9: 1133-46, 1973.
76. Mikkelsen, M., Jacobsen, P., and Henningsen, K. Possible localization of Gc-System on chromosome 4. Loss of long arm 4 material associated with father-child incompatibility within the Gc- System, *Hum Hered.* 27: 105-7, 1977.
77. Guha, C., Osawa, M., Werner, P. A., Galbraith, R. M., and Paddock, G. V. Regulation of human Gc (vitamin D-binding) protein levels: hormonal and cytokine control of gene expression in vitro, *Hepatology.* 21: 1675-81, 1995.
78. Egawa, T., Ito, H., Nakamura, H., Yamamoto, H., and Kishimoto, S. Hormonal regulation of vitamin D-binding protein production by a human hepatoma cell line, *Biochem Int.* 28: 551-7, 1992.
79. Cooke, N. E. Rat vitamin D binding protein. Determination of the full-length primary structure from cloned cDNA, *J Biol Chem.* 261: 3441-50, 1986.
80. Ray, K., Wang, X. K., Zhao, M., and Cooke, N. E. The rat vitamin D binding protein (Gc-globulin) gene. Structural analysis, functional and evolutionary correlations, *J Biol Chem.* 266: 6221-9, 1991.

81. Song, Y. H., Ray, K., Liebhaber, S. A., and Cooke, N. E. Vitamin D-binding protein gene transcription is regulated by the relative abundance of hepatocyte nuclear factors 1alpha and 1beta, *J Biol Chem.* 273: 28408-18, 1998.
82. Chung, J. H., Whiteley, M., and Felsenfeld, G. A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*, *Cell.* 74: 505-14, 1993.
83. Orkin, S. H. Regulation of globin gene expression in erythroid cells, *Eur J Biochem.* 231: 271-81, 1995.
84. Morinaga, T., Sakai, M., Wegmann, T. G., and Tamaoki, T. Primary structures of human alpha-fetoprotein and its mRNA, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80: 4604-8, 1983.
85. Benassayag, C., Vallette, G., Delorme, J., Savu, L., and Nunez, E. A. High affinity of nonesterified polyunsaturated fatty acids for rat alpha-fetoprotein (AFP), *Oncodev Biol Med.* 1: 27-36, 1980.
86. Uriel, J. The physiological role of alpha-fetoprotein in cell growth and differentiation, *J Nucl Med Allied Sci.* 33: 12-7, 1989.
87. Uriel, J., Naval, J., and Laborda, J. alpha-Fetoprotein-mediated transfer of arachidonic acid into cultured cloned cells derived from a rat rhabdomyosarcoma, *J Biol Chem.* 262: 3579-85, 1987.
88. Berde, C. B., Nagai, M., and Deutsch, H. F. Human alpha-fetoprotein. Fluorescence studies on binding and proximity relationships for fatty acids and bilirubin, *J Biol Chem.* 254: 12609-14, 1979.
89. Calvo, M., Naval, J., Lampreave, F., Uriel, J., and Pineiro, A. Fatty acids bound to alpha-fetoprotein and albumin during rat development, *Biochim Biophys Acta.* 959: 238-46, 1988.
90. Carlsson, R. N., Estes, T., Degroot, J., Holden, J. T., and Ruoslahti, E. High affinity of alpha-foetoprotein for arachidonate and other fatty acids, *Biochem J.* 190: 301-5, 1980.
91. Deutsch, H. F. Some biological roles for alpha-fetoprotein-unsaturated fatty acid complexes, *Ann N Y Acad Sci.* 417: 39-48, 1983.

92. Haourigui, M., Thobie, N., Martin, M. E., Benassayag, C., and Nunez, E. A. In vivo transient rise in plasma free fatty acids alters the functional properties of alpha-fetoprotein, *Biochim Biophys Acta*. 1125: 157-65, 1992.
93. Lampreave, F., Calvo, M., Naval, J., and Pineiro, A. Long-chain fatty acids bound to alpha-fetoprotein and to serum albumin from fetal and adult pig, *Comp Biochem Physiol [B]*. 73: 823-7, 1982.
94. Nishihira, J., Koyama, Y., Sakai, M., and Nishi, S. The fatty acid binding site of human alpha-fetoprotein, *Biochem Biophys Res Commun*. 196: 1049-57, 1993.
95. Parmelee, D. C., Evenson, M. A., and Deutsch, H. F. The presence of fatty acids in human alpha-fetoprotein, *J Biol Chem*. 253: 2114-9, 1978.
96. Uriel, J., Bouillon, D., Aussel, C., and Dupiers, M. Alpha-fetoprotein: the major high-affinity estrogen binder in rat uterine cytosols, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73: 1452-6, 1976.
97. Nishi, S., Matsue, H., Yoshida, H., Yamaoto, R., and Sakai, M. Localization of the estrogen-binding site of alpha-fetoprotein in the chimeric human-rat proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88: 3102-5, 1991.
98. Keel, B. A. and Abney, T. O. The kinetics of estrogen binding to rat alpha-fetoprotein, *Experientia*. 40: 503-5, 1984.
99. Herve, F., Gentin, M., Rajkowski, K. M., Cittanova, N., Wong, L. T., and Hsia, J. C. Study on estrogen binding by rat alpha-fetoprotein (AFP) isoforms: evidence for the lack of binding-site heterogeneity, *Steroids*. 52: 343-4, 1988.
100. Aussel, C. and Masseyeff, R. Comparative binding properties of rat and human alpha-fetoproteins for arachidonic acid and estradiol, *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 42: 261-9, 1983.
101. Versee, V. and Barel, A. O. Interactions of rat alpha-foetoprotein with bilirubin, *Biochem J*. 179: 705-7, 1979.
102. Bansal, V., Kumari, K., Dixit, A., and Sahib, M. K. Interaction of human alpha fetoprotein with bilirubin, *Indian J Exp Biol*. 28: 697-8, 1990.

103. Ruoslahti, E., Estes, T., and Seppala, M. Binding of bilirubin by bovine and human alpha-fetoprotein, *Biochim Biophys Acta*. 578: 511-9, 1979.
104. Garreau, B., Vallette, G., Adlercreutz, H., Wahala, K., Makela, T., Benassayag, C., and Nunez, E. A. Phytoestrogens: new ligands for rat and human alpha-fetoprotein [published erratum appears in *Biochim Biophys Acta* 1991 Dec 3;1133(1):113], *Biochim Biophys Acta*. 1094: 339-45, 1991.
105. Ingvarsson, B. I. and Carlsson, R. N. Binding of fatty acids and tryptophan to alpha-fetoprotein from fetal pigs, *Biochim Biophys Acta*. 537: 507-9, 1978.
106. Herve, F., Grigorova, A. M., Rajkowski, K., and Cittanova, N. Differences in the binding of thyroid hormones and indoles by rat alpha 1-fetoprotein and serum albumin, *Eur J Biochem*. 122: 609-12, 1982.
107. Herve, F., Rajkowski, K. M., Martin, M. T., Dessen, P., and Cittanova, N. Drug-binding properties of rat alpha-foetoprotein. Specificities of the phenylbutazone-binding and warfarin-binding sites, *Biochem J*. 239: 451-8, 1986.
108. Belanger, L., Belanger, M., and Larochelle, J. Existence d'alpha1-foetoprotéine circulante chez 8 patients souffrant de tyrosinémie héréditaire, *Union Med. Can*. 101: 877-878, 1972.
109. Tratner, I., Nahon, J. L., Sala-Trepat, J. M., and Venetianer, A. Albumin and alpha-fetoprotein gene transcription in rat hepatoma cell lines is correlated with specific DNA hypomethylation and altered chromatin structure in the 5' region, *Mol Cell Biol*. 7: 1856-64, 1987.
110. Turcotte, B., Guertin, M., Chevrette, M., LaRue, H., and Belanger, L. DNase I hypersensitivity and methylation of the 5'-flanking region of the alpha 1-fetoprotein gene during developmental and glucocorticoid-induced repression of its activity in rat liver, *Nucleic Acids Res*. 14: 9827-9841, 1986.
111. Nahon, J. L., Venetianer, A., and Sala-Trepat, J. M. Specific sets of DNase I-hypersensitive sites are associated with the potential and overt

- expression of the rat albumin and alpha-fetoprotein genes, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84: 2135-9, 1987.
112. Guertin, M., LaRue, H., Bernier, D., Wrangle, O., Chevrette, M., Gingras, M. C., and Belanger, L. Enhancer and promoter elements directing activation and glucocorticoid repression of the alpha 1-fetoprotein gene in hepatocytes, *Mol Cell Biol.* 8: 1398-1407, 1988.
 113. Watanabe, K., Saito, A., and Tamaoki, T. Cell-specific enhancer activity in a far upstream region of the human alpha-fetoprotein gene, *J Biol Chem.* 262: 4812-8, 1987.
 114. Muglia, L. and Rothman-Denes, L. B. Cell type-specific negative regulatory element in the control region of the rat alpha-fetoprotein gene, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83: 7653-7, 1986.
 115. Camper, S. A. and Tilghman, S. M. Postnatal repression of the alpha-fetoprotein gene is enhancer independent, *Genes Dev.* 3: 537-46, 1989.
 116. Nakata, K., Motomura, M., Nakabayashi, H., Ido, A., and Tamaoki, T. A possible mechanism of inverse developmental regulation of alpha-fetoprotein and albumin genes. Studies with epidermal growth factor and phorbol ester, *J Biol Chem.* 267: 1331-4, 1992.
 117. Wen, P., Group, E. R., Buzard, G., Crawford, N., and Locker, J. Enhancer, repressor, and promoter specificities combine to regulate the rat alpha-fetoprotein gene, *DNA Cell Biol.* 10: 525-36, 1991.
 118. Rabek, J. P., Hsie, D. Y., and Papaconstantinou, J. Alpha-fetoprotein expression in fetal kidney cells does not require enhancers, *Biochim Biophys Acta.* 1130: 317-25, 1992.
 119. Godbout, R., Ingram, R., and Tilghman, S. M. Multiple regulatory elements in the intergenic region between the alpha- fetoprotein and albumin genes, *Mol Cell Biol.* 6: 477-87, 1986.
 120. Nakabayashi, H., Hashimoto, T., Miyao, Y., Tjong, K. K., Chan, J., and Tamaoki, T. A position-dependent silencer plays a major role in repressing alpha- fetoprotein expression in human hepatoma, *Mol Cell Biol.* 11: 5885-93, 1991.

121. Scott, R. W. and Tilghman, S. M. Transient expression of a mouse alpha-fetoprotein minigene: deletion analyses of promoter function, *Mol Cell Biol.* 3: 1295-309, 1983.
122. Sakai, M., Morinaga, T., Urano, Y., Watanabe, K., Wegmann, T. G., and Tamaoki, T. The human alpha-fetoprotein gene. Sequence organization and the 5' flanking region, *J Biol Chem.* 260: 5055-60, 1985.
123. Darnell, J., Lodish, H., and Baltimore, D. *Molecular Cell Biology*, Second Edition edition, p. 1105. New York, USA: Scientific American Books, 1990.
124. Kunkel, G. R. and Martinson, H. G. Nucleosomes will not form on double-stranded RNA or over poly(dA).poly(dT) tracts in recombinant DNA, *Nucleic Acids Res.* 9: 6869-88, 1981.
125. Iyer, V. and Struhl, K. Poly(dA:dT), a ubiquitous promoter element that stimulates transcription via its intrinsic DNA structure, *Embo J.* 14: 2570-9, 1995.
126. Thomassin, H., Hamel, D., Bernier, D., Guertin, M., and Belanger, L. Molecular cloning of two C/EBP-related proteins that bind to the promoter and the enhancer of the alpha 1-fetoprotein gene. Further analysis of C/EBP beta and C/EBP gamma, *Nucleic Acids Res.* 20: 3091-3098, 1992.
127. Courtois, G., Baumhueter, S., and Crabtree, G. R. Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85: 7937-41, 1988.
128. Zhang, D. E., Ge, X., Rabek, J. P., and Papaconstantinou, J. Functional analysis of the trans-acting factor binding sites of the mouse alpha-fetoprotein proximal promoter by site-directed mutagenesis, *J Biol Chem.* 266: 21179-85, 1991.
129. Zhang, X. K., Dong, J. M., and Chiu, J. F. Regulation of alpha-fetoprotein gene expression by antagonism between AP-1 and the glucocorticoid receptor at their overlapping binding site, *J Biol Chem.* 266: 8248-54, 1991.
130. Galarnau, L., Pare, J. F., Allard, D., Hamel, D., Levesque, L., Tugwood, J. D., Green, S., and Belanger, L. The alpha1-fetoprotein locus is activated

- by a nuclear receptor of the *Drosophila* FTZ-F1 family, *Mol Cell Biol.* 16: 3853-3865, 1996.
131. Feuerman, M. H., Godbout, R., Ingram, R. S., and Tilghman, S. M. Tissue-specific transcription of the mouse alpha-fetoprotein gene promoter is dependent on HNF-1, *Mol Cell Biol.* 9: 4204-12, 1989.
 132. Bois-Joyeux, B. and Danan, J. L. Members of the CAAT/enhancer-binding protein, hepatocyte nuclear factor- 1 and nuclear factor-1 families can differentially modulate the activities of the rat alpha-fetoprotein promoter and enhancer, *Biochem J.* 301: 49-55, 1994.
 133. Bois-Joyeux, B., Denissenko, M., Thomassin, H., Guesdon, S., Ikonomova, R., Bernuau, D., Feldmann, G., and Danan, J. L. The c-jun proto-oncogene down-regulates the rat alpha-fetoprotein promoter in HepG2 hepatoma cells without binding to DNA, *J Biol Chem.* 270: 10204-11, 1995.
 134. Wen, P., Crawford, N., and Locker, J. A promoter-linked coupling region required for stimulation of alpha- fetoprotein transcription by distant enhancers, *Nucleic Acids Res.* 21: 1911-8, 1993.
 135. Wen, P. and Locker, J. A novel hepatocytic transcription factor that binds the alpha- fetoprotein promoter-linked coupling element, *Mol Cell Biol.* 14: 6616-26, 1994.
 136. Apergis, G. A., Crawford, N., Ghosh, D., Stepan, C. M., Vorachek, W. R., Wen, P., and Locker, J. A novel nk-2-related transcription factor associated with human fetal liver and hepatocellular carcinoma, *J Biol Chem.* 273: 2917-25, 1998.
 137. McVey, J. H., Michaelides, K., Hansen, L. P., Ferguson-Smith, M., Tilghman, S., Krumlauf, R., and Tuddenham, E. G. A G-->A substitution in an HNF I binding site in the human alpha- fetoprotein gene is associated with hereditary persistence of alpha- fetoprotein (HPAFP), *Hum Mol Genet.* 2: 379-84, 1993.

138. 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: 3731-6, 1993.
139. Magee, T. R., Cai, Y., El-Houseini, M. E., Locker, J., and Wan, Y. J. Retinoic acid mediates down-regulation of the alpha-fetoprotein gene through decreased expression of hepatocyte nuclear factors, *J Biol Chem.* 273: 30024-32, 1998.
140. Lamontagne, A. Résultats non-publiés. .
141. Belanger, L., Hamel, D., Lachance, L., Dufour, D., Tremblay, M., and Gagnon, P. M. Hormonal regulation of alpha1 foetoprotein, *Nature.* 256: 657-9, 1975.
142. Turcotte, B., Meyer, M. E., Bocquel, M. T., Belanger, L., and Chambon, P. Repression of the alpha-fetoprotein gene promoter by progesterone and chimeric receptors in the presence of hormones and antihormones, *Mol Cell Biol.* 10: 5002-6, 1990.
143. Numa, F. Effect of maternal pituitary-adrenal axis on serum alphafetoprotein levels in pregnant rats, *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* 39: 1143-8, 1987.
144. Guertin, M., Baril, P., Bartkowiak, J., Anderson, A., and Belanger, L. Rapid suppression of alpha 1-fetoprotein gene transcription by dexamethasone in developing rat liver, *Biochemistry.* 22: 4296-4302, 1983.
145. Turcotte, B., Guertin, M., Chevrette, M., and Belanger, L. Rat alpha 1-fetoprotein messenger RNA: 5'-end sequence and glucocorticoid-suppressed liver transcription in an improved nuclear run-off assay, *Nucleic Acids Res.* 13: 2387-2398, 1985.
146. Belanger, L., Frain, M., Baril, P., Gingras, M. C., Bartkowiak, J., and Sala-Trepat, J. M. Glucocorticosteroid suppression of alpha1-fetoprotein synthesis in developing rat liver. Evidence for selective gene repression at the transcriptional level, *Biochemistry.* 20: 6665-72, 1981.
147. Rabek, J. P., Zhang, D. E., Torres-Ramos, C. A., and Papaconstantinou, J. Analysis of the mechanism of glucocorticoid-mediated down regulation

- of the mouse alpha-fetoprotein gene, *Biochim Biophys Acta*. 1218: 136-44, 1994.
148. Umesono, K. and Evans, R. M. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors, *Cell*. 57: 1139-46, 1989.
 149. Hertz, R., Magenheim, J., Berman, I., and Bar-Tana, J. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha, *Nature*. 392: 512-6, 1998.
 150. Makishima, M., Okamoto, A. Y., Repa, J. J., Tu, H., Learned, R. M., Luk, A., Hull, M. V., Lustig, K. D., Mangelsdorf, D. J., and Shan, B. Identification of a nuclear receptor for bile acids [see comments], *Science*. 284: 1362-5, 1999.
 151. Parks, D. J., Blanchard, S. G., Bledsoe, R. K., Chandra, G., Consler, T. G., Kliewer, S. A., Stimmel, J. B., Willson, T. M., Zavacki, A. M., Moore, D. D., and Lehmann, J. M. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor [see comments], *Science*. 284: 1365-8, 1999.
 152. Wang, H., Chen, J., Hollister, K., Sowers, L. C., and Forman, B. M. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR, *Mol Cell*. 3: 543-53, 1999.
 153. Green, V. J., Kokkotou, E., and Ladias, J. A. Critical structural elements and multitarget protein interactions of the transcriptional activator AF-1 of hepatocyte nuclear factor 4, *J Biol Chem*. 273: 29950-7, 1998.
 154. Webb, P., Nguyen, P., Shinsako, J., Anderson, C., Feng, W., Nguyen, M. P., Chen, D., Huang, S. M., Subramanian, S., McKinerney, E., Katzenellenbogen, B. S., Stallcup, M. R., and Kushner, P. J. Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins, *Mol Endocrinol*. 12: 1605-18, 1998.
 155. Ma, H., Hong, H., Huang, S. M., Irvine, R. A., Webb, P., Kushner, P. J., Coetzee, G. A., and Stallcup, M. R. Multiple Signal Input and Output Domains of the 160-Kilodalton Nuclear Receptor Coactivator Proteins, *Mol Cell Biol*. 19: 6164-6173, 1999.

156. Gelman, L., Zhou, G., Fajas, L., Raspe, E., Fruchart, J. C., and Auwerx, J. p300 interacts with the N- and C-terminal part of Ppargamma2 in a ligand-independent and -dependent manner, respectively, *J Biol Chem.* 274: 7681-8, 1999.
157. Dell, H. and Hadzopoulou-Cladaras, M. CREB-binding protein is a transcriptional coactivator for hepatocyte nuclear factor-4 and enhances apolipoprotein gene expression, *J Biol Chem.* 274: 9013-21, 1999.
158. Juge-Aubry, C. E., Hammar, E., Siegrist-Kaiser, C., Pernin, A., Takeshita, A., Chin, W. W., Burger, A. G., and Meier, C. A. Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain, *J Biol Chem.* 274: 10505-10, 1999.
159. Wilkinson, J. R. and Towle, H. C. Identification and characterization of the AF-1 transactivation domain of thyroid hormone receptor beta1, *J Biol Chem.* 272: 23824-32, 1997.
160. Hammer, G. D., Krylova, I., Zhang, Y., Darimont, B. D., Simpson, K., Weigel, N. L., and Ingraham, H. A. Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress, *Mol Cell.* 3: 521-6, 1999.
161. Tremblay, A., Tremblay, G. B., Labrie, F., and Giguere, V. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1, *Mol Cell.* 3: 513-9, 1999.
162. Xing, H., Mattick, S., Lew, D., and Shapiro, D. J. An N-terminal deletion mutant of estrogen receptor exhibits increased synergism with upstream activators and enhanced binding to the estrogen response element, *Biochemistry.* 34: 3956-63, 1995.
163. Danielsen, M., Northrop, J. P., Jonklaas, J., and Ringold, G. M. Domains of the glucocorticoid receptor involved in specific and nonspecific deoxyribonucleic acid binding, hormone activation, and transcriptional enhancement, *Mol Endocrinol.* 1: 816-22, 1987.

164. Ikeda, Y., Lala, D. S., Luo, X., Kim, E., Moisan, M. P., and Parker, K. L. Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression, *Mol Endocrinol.* 7: 852-60, 1993.
165. Miller, J., McLachlan, A. D., and Klug, A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*, *Embo J.* 4: 1609-14, 1985.
166. Freedman, L. P., Luisi, B. F., Korszun, Z. R., Basavappa, R., Sigler, P. B., and Yamamoto, K. R. The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain, *Nature.* 334: 543-6, 1988.
167. Severne, Y., Wieland, S., Schaffner, W., and Rusconi, S. Metal binding 'finger' structures in the glucocorticoid receptor defined by site-directed mutagenesis, *Embo J.* 7: 2503-8, 1988.
168. Lee, M. S., Gippert, G. P., Soman, K. V., Case, D. A., and Wright, P. E. Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain, *Science.* 245: 635-7, 1989.
169. Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R., and Sigler, P. B. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA [see comments], *Nature.* 352: 497-505, 1991.
170. Evans, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily, *Science.* 240: 889-95, 1988.
171. Yamamoto, K. R. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks, *Annu Rev Genet.* 19: 209-52, 1985.
172. Green, S. and Chambon, P. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation, *Trends Genet.* 4: 309-14, 1988.
173. Hollenberg, S. M., Giguere, V., Segui, P., and Evans, R. M. Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor, *Cell.* 49: 39-46, 1987.

174. Kumar, V. and Chambon, P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer, *Cell*. 55: 145-56, 1988.
175. Tsai, S. Y., Carlstedt-Duke, J., Weigel, N. L., Dahlman, K., Gustafsson, J. A., Tsai, M. J., and BW, O. M. Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation, *Cell*. 55: 361-9, 1988.
176. Green, S., Kumar, V., Theulaz, I., Wahli, W., and Chambon, P. The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity, *Embo J*. 7: 3037-44, 1988.
177. Mader, S., Kumar, V., de Verneuil, H., and Chambon, P. Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element, *Nature*. 338: 271-4, 1989.
178. Wilson, T. E., Paulsen, R. E., Padgett, K. A., and Milbrandt, J. Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors, *Science*. 256: 107-10, 1992.
179. Wilson, T. E., Fahrner, T. J., and Milbrandt, J. The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction, *Mol Cell Biol*. 13: 5794-804, 1993.
180. Ueda, H., Sun, G. C., Murata, T., and Hirose, S. A novel DNA-binding motif abuts the zinc finger domain of insect nuclear hormone receptor FTZ-F1 and mouse embryonal long terminal repeat-binding protein, *Mol Cell Biol*. 12: 5667-72, 1992.
181. Kumar, V., Green, S., Staub, A., and Chambon, P. Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor, *Embo J*. 5: 2231-6, 1986.
182. Wurtz, J. M., Bourguet, W., Renaud, J. P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H. A canonical structure for the ligand-binding

- domain of nuclear receptors [see comments] [published erratum appears in *Nat Struct Biol* 1996 Feb;3(2):206], *Nat Struct Biol.* 3: 87-94, 1996.
183. Webster, N. J., Green, S., Jin, J. R., and Chambon, P. The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function, *Cell.* 54: 199-207, 1988.
 184. Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J. R., and Chambon, P. Functional domains of the human estrogen receptor, *Cell.* 51: 941-51, 1987.
 185. Beato, M., Herrlich, P., and Schutz, G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot, *Cell.* 83: 851-7, 1995.
 186. Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H., and Chambon, P. RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo, *Embo J.* 12: 2349-60, 1993.
 187. Allan, G. F., Leng, X., Tsai, S. Y., Weigel, N. L., Edwards, D. P., Tsai, M. J., and BW, O. M. Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation, *J Biol Chem.* 267: 19513-20, 1992.
 188. Renaud, J. P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all- trans retinoic acid, *Nature.* 378: 681-9, 1995.
 189. Pratt, W. B., Scherrer, L. C., Hutchison, K. A., and Dalman, F. C. A model of glucocorticoid receptor unfolding and stabilization by a heat shock protein complex, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 41: 223-9, 1992.
 190. Scherrer, L. C., Dalman, F. C., Massa, E., Meshinchi, S., and Pratt, W. B. Structural and functional reconstitution of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex, *J Biol Chem.* 265: 21397-400, 1990.
 191. Dalman, F. C., Bresnick, E. H., Patel, P. D., Perdew, G. H., Watson, S. J., Jr., and Pratt, W. B. Direct evidence that the glucocorticoid receptor binds to hsp90 at or near the termination of receptor translation in vitro, *J Biol Chem.* 264: 19815-21, 1989.

192. Dalman, F. C., Koenig, R. J., Perdew, G. H., Massa, E., and Pratt, W. B. In contrast to the glucocorticoid receptor, the thyroid hormone receptor is translated in the DNA binding state and is not associated with hsp90, *J Biol Chem.* 265: 3615-8, 1990.
193. Orti, E., Bodwell, J. E., and Munck, A. Phosphorylation of steroid hormone receptors, *Endocr Rev.* 13: 105-28, 1992.
194. Cavailles, V., Dauvois, S., F, L. H., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P. J., and Parker, M. G. Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor, *Embo J.* 14: 3741-51, 1995.
195. Le Douarin, B., Zechel, C., Garnier, J. M., Lutz, Y., Tora, L., Pierrat, P., Heery, D., Gronemeyer, H., Chambon, P., and Losson, R. The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand- dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18, *Embo J.* 14: 2020-33, 1995.
196. Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and BW, O. M. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily, *Science.* 270: 1354-7, 1995.
197. Glass, C. K., Rose, D. W., and Rosenfeld, M. G. Nuclear receptor coactivators, *Curr Opin Cell Biol.* 9: 222-32, 1997.
198. Sadovsky, Y., Webb, P., Lopez, G., Baxter, J. D., Fitzpatrick, P. M., Gizang-Ginsberg, E., Cavailles, V., Parker, M. G., and Kushner, P. J. Transcriptional activators differ in their responses to overexpression of TATA-box-binding protein, *Mol Cell Biol.* 15: 1554-63, 1995.
199. Jantzen, H. M., Strahle, U., Gloss, B., Stewart, F., Schmid, W., Boshart, M., Miksicek, R., and Schutz, G. Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene, *Cell.* 49: 29-38, 1987.
200. Goodman, P. A., Medina-Martinez, O., and Fernandez-Mejia, C. Identification of the human insulin negative regulatory element as a negative glucocorticoid response element, *Mol Cell Endocrinol.* 120: 139-46, 1996.

201. Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K. K., Cato, A. C., Gebel, S., Ponta, H., and Herrlich, P. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone, *Cell*. 62: 1189-204, 1990.
202. Wissink, S., van Heerde, E. C., van der Burg, B., and van der Saag, P. T. A dual mechanism mediates repression of NF-kappaB activity by glucocorticoids, *Mol Endocrinol*. 12: 355-63, 1998.
203. McKay, L. I. and Cidlowski, J. A. Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism, *Mol Endocrinol*. 12: 45-56, 1998.
204. Pipaon, C., Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. COUP-TF upregulates NGFI-A gene expression through an Sp1 binding site, *Mol Cell Biol*. 19: 2734-45, 1999.
205. Liu, Y., Yang, N., and Teng, C. T. COUP-TF acts as a competitive repressor for estrogen receptor-mediated activation of the mouse lactoferrin gene, *Mol Cell Biol*. 13: 1836-46, 1993.
206. Tran, P., Zhang, X. K., Salbert, G., Hermann, T., Lehmann, J. M., and Pfahl, M. COUP orphan receptors are negative regulators of retinoic acid response pathways, *Mol Cell Biol*. 12: 4666-76, 1992.
207. Seol, W., Choi, H. S., and Moore, D. D. An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors, *Science*. 272: 1336-9, 1996.
208. Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T. M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A. P., McCabe, E. R., and et al. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita, *Nature*. 372: 635-41, 1994.
209. Lavorgna, G., Karim, F. D., Thummel, C. S., and Wu, C. Potential role for a FTZ-F1 steroid receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 3004-8, 1993.

210. Ueda, H., Sonoda, S., Brown, J. L., Scott, M. P., and Wu, C. A sequence-specific DNA-binding protein that activates fushi tarazu segmentation gene expression, *Genes Dev.* 4: 624-35, 1990.
211. Lavourga, G., Ueda, H., Clos, J., and Wu, C. FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of fushi tarazu, *Science.* 252: 848-51, 1991.
212. Lawrence, P. A., Johnston, P., Macdonald, P., and Struhl, G. Borders of parasegments in *Drosophila* embryos are delimited by the fushi tarazu and even-skipped genes, *Nature.* 328: 440-2, 1987.
213. Ohno, C. K. and Petkovich, M. FTZ-F1 beta, a novel member of the *Drosophila* nuclear receptor family, *Mech Dev.* 40: 13-24, 1993.
214. Ayer, S., Walker, N., Mosammaparast, M., Nelson, J. P., Shilo, B. Z., and Benyajati, C. Activation and repression of *Drosophila* alcohol dehydrogenase distal transcription by two steroid hormone receptor superfamily members binding to a common response element, *Nucleic Acids Res.* 21: 1619-27, 1993.
215. Ueda, H. and Hirose, S. Identification and purification of a *Bombyx mori* homologue of FTZ-F1, *Nucleic Acids Res.* 18: 7229-34, 1990.
216. Sun, G. C., Hirose, S., and Ueda, H. Intermittent expression of BmFTZ-F1, a member of the nuclear hormone receptor superfamily during development of the silkworm *Bombyx mori*, *Dev Biol.* 162: 426-37, 1994.
217. Ito, M., Masuda, A., Yumoto, K., Otomo, A., Takahashi, Y., Takamatsu, N., Kanda, H., Yamashita, S., and Shiba, T. cDna cloning of a new member of the Ftz-F1 subfamily from a rainbow trout, *Biochim Biophys Acta.* 1395: 271-4, 1998.
218. Ayer, S. and Benyajati, C. The binding site of a steroid hormone receptor-like protein within the *Drosophila* Adh adult enhancer is required for high levels of tissue-specific alcohol dehydrogenase expression, *Mol Cell Biol.* 12: 661-73, 1992.

219. Murata, T., Kageyama, Y., Hirose, S., and Ueda, H. Regulation of the EDG84A gene by FTZ-F1 during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*, *Mol Cell Biol.* *16*: 6509-15, 1996.
220. Ueda, H. and Hirose, S. Defining the sequence recognized with BmFTZ-F1, a sequence specific DNA binding factor in the silkworm, *Bombyx mori*, as revealed by direct sequencing of bound oligonucleotides and gel mobility shift competition analysis, *Nucleic Acids Res.* *19*: 3689-93, 1991.
221. Ohno, C. K., Ueda, H., and Petkovich, M. The *Drosophila* nuclear receptors FTZ-F1 alpha and FTZ-F1 beta compete as monomers for binding to a site in the fushi tarazu gene, *Mol Cell Biol.* *14*: 3166-75, 1994.
222. Luo, X., Ikeda, Y., and Parker, K. L. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation, *Cell.* *77*: 481-90, 1994.
223. Rausa, F. M., Galarneau, L., Belanger, L., and Costa, R. H. The Nuclear Receptor Fetoprotein Transcription Factor is Coexpressed with Its Target Gene HNF-3 Beta in the Developing Murine Liver Intestine and Pancreas, *Mechanisms of Development.* *89*: 185-188, 1999.
224. Paré, J. F. Résultats non-publiés, .
225. Galarneau, L., Drouin, R., and Belanger, L. Assignment of the fetoprotein transcription factor gene (FTF) to human chromosome band 1q32.11 by in situ hybridization, *Cytogenet Cell Genet.* *82*: 269-70, 1998.
226. Busch, S. J. and Sassone-Corsi, P. Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains, *Trends Genet.* *6*: 36-40, 1990.
227. Landschulz, W. H., Johnson, P. F., and McKnight, S. L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins, *Science.* *240*: 1759-64, 1988.
228. Pinna, L. A. Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation?, *Biochim Biophys Acta.* *1054*: 267-84, 1990.
229. Woodgett, J. R., Gould, K. L., and Hunter, T. Substrate specificity of protein kinase C. Use of synthetic peptides corresponding to physiological

- sites as probes for substrate recognition requirements, *Eur J Biochem.* 161: 177-84, 1986.
230. Feramisco, J. R., Glass, D. B., and Krebs, E. G. Optimal spatial requirements for the location of basic residues in peptide substrates for the cyclic AMP-dependent protein kinase, *J Biol Chem.* 255: 4240-5, 1980.
231. Pless, D. D. and Lennarz, W. J. Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74: 134-8, 1977.
232. Bause, E. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes, *Biochem J.* 209: 331-6, 1983.
233. Towler, D. A., Gordon, J. I., Adams, S. P., and Glaser, L. The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation, *Annu Rev Biochem.* 57: 69-99, 1988.
234. Grand, R. J. Acylation of viral and eukaryotic proteins, *Biochem J.* 258: 625-38, 1989.
235. Nitta, M., Ku, S., Brown, C., Okamoto, A. Y., and Shan, B. CPF: an orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 6660-5, 1999.
236. Li, M., Xie, Y. H., Kong, Y. Y., Wu, X., Zhu, L., and Wang, Y. Cloning and characterization of a novel human hepatocyte transcription factor, hB1F, which binds and activates enhancer II of hepatitis B virus, *J Biol Chem.* 273: 29022-31, 1998.
237. Tugwood, J. D., Issemann, I., and Green, S. LRH-1: a nuclear hormone receptor active in the absence of exogenous ligands, GenBank accession number M81385, 1991.
238. Ellinger-Ziegelbauer, H., Hihi, A. K., Laudet, V., Keller, H., Wahli, W., and Dreyer, C. FTZ-F1-related orphan receptors in *Xenopus laevis*: transcriptional regulators differentially expressed during early embryogenesis, *Mol Cell Biol.* 14: 2786-97, 1994.

239. Liu, D., Le Drean, Y., Ekker, M., Xiong, F., and Hew, C. L. Teleost FTZ-F1 homolog and its splicing variant determine the expression of the salmon gonadotropin IIbeta subunit gene, *Mol Endocrinol.* 11: 877-90, 1997.
240. Lee, Y. K., Parker, K. L., Choi, H. S., and Moore, D. D. Activation of the promoter of the orphan receptor SHP by orphan receptors that bind DNA as monomers [In Process Citation], *J Biol Chem.* 274: 20869-73, 1999.
241. Harrison, T. R., Isselbacher, K. J., Braunwald, E., Wilson, J. D., Martin, J. B., Fauci, A. S., and Kasper, D. L. The liver. *In: McGraw-Hill (ed.) Harrison's Principle of Internal Medicine, 13th edition edition*, pp. Part 10, section 2, chapter 261-272. New-York: McGraw-Hill, 1994.
242. Blumberg, B. S. Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of the liver, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 7121-5, 1997.
243. Blumberg, B. S., Gerstley, B. J., Hungerford, D. A., London, W. T., and Sutnick, A. I. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis, *Ann Intern Med.* 66: 924-31, 1967.
244. Dane, D. S., Cameron, C. H., and Briggs, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen- associated hepatitis, *Lancet.* 1: 695-8, 1970.
245. Kaplan, P. M., Greenman, R. L., Gerin, J. L., Purcell, R. H., and Robinson, W. S. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen, *J Virol.* 12: 995-1005, 1973.
246. Robinson, W. S., Clayton, D. A., and Greenman, R. L. DNA of a human hepatitis B virus candidate, *J Virol.* 14: 384-91, 1974.
247. Robinson, W. S. and Greenman, R. L. DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate, *J Virol.* 13: 1231-6, 1974.
248. Organization, O. M. d. I. S. W. H. Life in the 21st century - A vision for all, *World Health Report*, 1998.
249. Organization, O. M. d. I. S. W. H. Rapport sur la Santé dans le Monde 1999, *World Health Report*, 1999.

250. Beasley, R. P., Hwang, L. Y., Lin, C. C., and Chien, C. S. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan, *Lancet*. 2: 1129-33, 1981.
251. Lampertico, P., Del Ninno, E., Manzin, A., Donato, M. F., Rumi, M. G., Lunghi, G., Morabito, A., Clementi, M., and Colombo, M. A randomized, controlled trial of a 24-month course of interferon alfa 2b in patients with chronic hepatitis B who had hepatitis B virus DNA without hepatitis B e antigen in serum, *Hepatology*. 26: 1621-5, 1997.
252. Hagelstein, J., Kist, A., Stremmel, W., and Galle, P. R. Antiviral potential of interferon-omega on hepatitis B virus replication in human hepatoma cells, *Arzneimittelforschung*. 48: 343-7, 1998.
253. Marques, A. R., Lau, D. T., McKenzie, R., Straus, S. E., and Hoofnagle, J. H. Combination therapy with famciclovir and interferon-alpha for the treatment of chronic hepatitis B, *J Infect Dis*. 178: 1483-7, 1998.
254. Group, I. I.-a. H. C. S. Effect of interferon-alpha on progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. International Interferon-alpha Hepatocellular Carcinoma Study Group, *Lancet*. 351: 1535-9, 1998.
255. Ikeda, K., Saitoh, S., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Tsubota, A., Fukuda, M., Koida, I., Arase, Y., Chayama, K., Murashima, N., and Kumada, H. Interferon decreases hepatocellular carcinogenesis in patients with cirrhosis caused by the hepatitis B virus: a pilot study, *Cancer*. 82: 827-35, 1998.
256. Berenguer, M. and Wright, T. L. Hepatitis B and C viruses: molecular identification and targeted antiviral therapies, *Proc Assoc Am Physicians*. 110: 98-112, 1998.
257. Aguesse-Germon, S., Liu, S. H., Chevallier, M., Pichoud, C., Jamard, C., Borel, C., Chu, C. K., Trepo, C., Cheng, Y. C., and Zoulim, F. Inhibitory effect of 2'-fluoro-5-methyl-beta-L-arabinofuranosyl-uracil on duck hepatitis B virus replication, *Antimicrob Agents Chemother*. 42: 369-76, 1998.

258. Shaw, T. and Locarnini, S. A. Preclinical aspects of lamivudine and famciclovir against hepatitis B virus., *Journal of Viral Hepatitis*. 6: 89-106, 1999.
259. Tassopoulos, N. C., Volpes, R., Pastore, G., Heathcote, J., Buti, M., Goldin, R. D., Hawley, S., Barber, J., Condreay, L., and Gray, D. F. Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. Lamivudine Precore Mutant Study Group, *Hepatology*. 29: 889-96, 1999.
260. Lau, G. K., Liang, R., Wu, P. C., Lee, C. K., Lim, W. L., and Au, W. Y. Use of famciclovir to prevent HBV reactivation in HBsAg-positive recipients after allogeneic bone marrow transplantation, *J Hepatol*. 28: 359-68, 1998.
261. Hoofnagle, J. H. Therapy of viral hepatitis, *Digestion*. 59: 563-78, 1998.
262. Organization, O. M. d. I. S. W. H. Safety of Hepatitis B Vaccination programmes, WHO/OMS Meeting report - 28-30th September - Geneva, 1998.
263. Warren, K. S., Heeney, J. L., Swan, R. A., Heriyanto, and Verschoor, E. J. A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*), *J Virol*. 73: 7860-5, 1999.
264. McLachlan, A. *Molecular Biology of the Hepatitis B virus*, CRC Press, Boca Raton Ann Arbor, Boston, London, 1991.
265. Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C., and Gripon, P. Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity, *J Virol*. 72: 5573-8, 1998.
266. Melegari, M., Scaglioni, P. P., and Wands, J. R. The small envelope protein is required for secretion of a naturally occurring hepatitis B virus mutant with pre-S1 deleted, *J Virol*. 71: 5449-54, 1997.
267. Gallina, A., De Koning, A., Rossi, F., and Milanesi, G. Intracellular retention of hepatitis B virus surface protein mutants devoid of amino-terminal pre-S1 sequences, *J Gen Virol*. 75: 449-55, 1994.

268. Bruss, V. and Thomssen, R. Mapping a region of the large envelope protein required for hepatitis B virion maturation, *J Virol.* 68: 1643-50, 1994.
269. Bruss, V. A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation, *J Virol.* 71: 9350-7, 1997.
270. Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C., and Gripon, P. Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain, *J Virol.* 73: 2052-7, 1999.
271. Pontisso, P., Petit, M. A., Bankowski, M. J., and Peeples, M. E. Human liver plasma membranes contain receptors for the hepatitis B virus pre-S1 region and, via polymerized human serum albumin, for the pre-S2 region, *J Virol.* 63: 1981-8, 1989.
272. Gripon, P., Le Seyec, J., Rumin, S., and Guguen-Guillouzo, C. Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity, *Virology.* 213: 292-9, 1995.
273. Poisson, F., Severac, A., Hourieux, C., Goudeau, A., and Roingeard, P. Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle, *Virology.* 228: 115-20, 1997.
274. Meyer, M., Caselmann, W. H., Schluter, V., Schreck, R., Hofschneider, P. H., and Baeuerle, P. A. Hepatitis B virus transactivator MHBst: activation of NF-kappa B, selective inhibition by antioxidants and integral membrane localization, *Embo J.* 11: 2991-3001, 1992.
275. Caselmann, W. H., Renner, M., Schluter, V., Hofschneider, P. H., Koshy, R., and Meyer, M. The hepatitis B virus MHBst167 protein is a pleiotropic transactivator mediating its effect via ubiquitous cellular transcription factors, *J Gen Virol.* 78: 1487-95, 1997.
276. Liou, J., Jeng, K., Lin, C., Hu, C., and Chang, C. A novel regulator inhibits HBV gene expression, *J Biomed Sci.* 5: 343-54, 1998.

277. Lan, Y. T., Li, J., Liao, W., and Ou, J. Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication, *Virology*. 259: 342-8, 1999.
278. Roossinck, M. J. and Siddiqui, A. In vivo phosphorylation and protein analysis of hepatitis B virus core antigen, *J Virol*. 61: 955-61, 1987.
279. Duclos-Vallee, J. C., Capel, F., Mabit, H., and Petit, M. A. Phosphorylation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase protein kinase activity, *J Gen Virol*. 79: 1665-70, 1998.
280. Kau, J. H. and Ting, L. P. Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46- kilodalton serine kinase, *J Virol*. 72: 3796-803, 1998.
281. Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W. H., and Helenius, A. Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex, *J Cell Biol*. 145: 45-55, 1999.
282. Seifer, M., Hamatake, R., Bifano, M., and Standring, D. N. Generation of replication-competent hepatitis B virus nucleocapsids in insect cells, *J Virol*. 72: 2765-76, 1998.
283. Magnusius, L. O. and Espmark, J. A. New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants, *J Immunol*. 109: 1017-21, 1972.
284. Lamberts, C., Nassal, M., Velhagen, I., Zentgraf, H., and Schroder, C. H. Precore-mediated inhibition of hepatitis B virus progeny DNA synthesis, *J Virol*. 67: 3756-62, 1993.
285. Guidotti, L. G., Matzke, B., Pasquinelli, C., Schoenberger, J. M., Rogler, C. E., and Chisari, F. V. The hepatitis B virus (HBV) precore protein inhibits HBV replication in transgenic mice, *J Virol*. 70: 7056-61, 1996.
286. Milich, D. R., Jones, J. E., Hughes, J. L., Price, J., Raney, A. K., and McLachlan, A. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero?, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 6599-603, 1990.
287. Wang, G. H. and Seeger, C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis, *Cell*. 71: 663-70, 1992.

288. Chen, H. S., Kaneko, S., Girones, R., Anderson, R. W., Hornbuckle, W. E., Tennant, B. C., Cote, P. J., Gerin, J. L., Purcell, R. H., and Miller, R. H. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks, *J Virol.* 67: 1218-26, 1993.
289. Doria, M., Klein, N., Lucito, R., and Schneider, R. J. The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors, *Embo J.* 14: 4747-57, 1995.
290. Wang, H. D., Trivedi, A., and Johnson, D. L. Regulation of RNA polymerase I-dependent promoters by the hepatitis B virus X protein via activated Ras and TATA-binding protein, *Mol Cell Biol.* 18: 7086-94, 1998.
291. Klein, N. P. and Schneider, R. J. Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras, *Mol Cell Biol.* 17: 6427-36, 1997.
292. Natoli, G., Avantaggiati, M. L., Chirillo, P., Costanzo, A., Artini, M., Balsano, C., and Levrero, M. Induction of the DNA-binding activity of c-jun/c-fos heterodimers by the hepatitis B virus transactivator pX, *Mol Cell Biol.* 14: 989-98, 1994.
293. Schek, N., Bartenschlager, R., Kuhn, C., and Schaller, H. Phosphorylation and rapid turnover of hepatitis B virus X-protein expressed in HepG2 cells from a recombinant vaccinia virus, *Oncogene.* 6: 1735-44, 1991.
294. Wu, J. Y., Zhou, Z. Y., Judd, A., Cartwright, C. A., and Robinson, W. S. The hepatitis B virus-encoded transcriptional trans-activator hbx appears to be a novel protein serine/threonine kinase [published erratum appears in *Cell* 1993 Nov 19;75(4):826], *Cell.* 63: 687-95, 1990.
295. Rossner, M. T. Review: hepatitis B virus X-gene product: a promiscuous transcriptional activator, *J Med Virol.* 36: 101-17, 1992.
296. Unger, T. and Shaul, Y. The X protein of the hepatitis B virus acts as a transcription factor when targeted to its responsive element, *Embo J.* 9: 1889-95, 1990.

297. Maguire, H. F., Hoeffler, J. P., and Siddiqui, A. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions, *Science*. 252: 842-844, 1991.
298. Choi, B. H., Park, G. T., and Rho, H. M. Interaction of hepatitis B viral X protein and CCAAT/ enhancer-binding protein alpha synergistically activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter, *J Biol Chem*. 274: 2858-65, 1999.
299. Lee, H., Lee, Y. H., Huh, Y. S., Moon, H., and Yun, Y. X-gene product antagonizes the p53-mediated inhibition of hepatitis B virus replication through regulation of the pregenomic/core promoter, *J Biol Chem*. 270: 31405-12, 1995.
300. Lee, H., Kim, H. T., and Yun, Y. Liver-specific enhancer II is the target for the p53-mediated inhibition of hepatitis B viral gene expression, *J Biol Chem*. 273: 19786-19791, 1998.
301. Cheong, J. H., Yi, M., Lin, Y., and Murakami, S. Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation, *Embo J*. 14: 143-50, 1995.
302. Lin, Y., Nomura, T., Cheong, J., Dorjsuren, D., Iida, K., and Murakami, S. Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor IIB and the RNA polymerase II subunit 5, *J Biol Chem*. 272: 7132-9, 1997.
303. Qadri, I., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Schaack, J., and Siddiqui, A. Hepatitis B virus transactivator protein, HBx, associates with the components of TFIIH and stimulates the DNA helicase activity of TFIIH, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 10578-83, 1996.
304. Avantaggiati, M. L., Balsano, C., Natoli, G., De Marzio, E., Will, H., Elfassi, E., and Levrero, M. The hepatitis B virus X protein transactivation of c-fos and c-myc proto-oncogenes is mediated by multiple transcription factors, *Arch Virol Suppl*. 4: 57-61, 1992.

305. Avantaggiati, M. L., Natoli, G., Balsano, C., Chirillo, P., Artini, M., De Marzio, E., Collepardo, D., and Levrero, M. The hepatitis B virus (HBV) pX transactivates the c-fos promoter through multiple cis-acting elements, *Oncogene*. 8: 1567-74, 1993.
306. Lara-Pezzi, E., Majano, P. L., Gomez-Gonzalo, M., Garcia-Monzon, C., Moreno-Otero, R., Levrero, M., and Lopez-Cabrera, M. The hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor alpha gene expression in hepatocytes, *Hepatology*. 28: 1013-21, 1998.
307. Lara-Pezzi, E., Armesilla, A. L., Majano, P. L., Redondo, J. M., and Lopez-Cabrera, M. The hepatitis B virus X protein activates nuclear factor of activated T cells (NF-AT) by a cyclosporin A-sensitive pathway, *Embo J*. 17: 7066-77, 1998.
308. Kekule, A. S., Lauer, U., Weiss, L., Lubber, B., and Hofschneider, P. H. Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway [see comments], *Nature*. 361: 742-5, 1993.
309. Huang, J., Kwong, J., Sun, E. C., and Liang, T. J. Proteasome complex as a potential cellular target of hepatitis B virus X protein, *J Virol*. 70: 5582-91, 1996.
310. Natoli, G., Avantaggiati, M. L., Chirillo, P., Puri, P. L., Ianni, A., Balsano, C., and Levrero, M. Ras- and Raf-dependent activation of c-jun transcriptional activity by the hepatitis B virus transactivator pX, *Oncogene*. 9: 2837-43, 1994.
311. Terradillos, O., Billet, O., Renard, C. A., Levy, R., Molina, T., Briand, P., and Buendia, M. A. The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice, *Oncogene*. 14: 395-404, 1997.
312. Seto, E., Zhou, D. X., Peterlin, B. M., and Yen, T. S. trans-activation by the hepatitis B virus X protein shows cell-type specificity, *Virology*. 173: 764-6, 1989.

313. Seto, E., Mitchell, P. J., and Yen, T. S. Transactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors, *Nature*. 344: 72-4, 1990.
314. Melegari, M., Scaglioni, P. P., and Wands, J. R. Cloning and characterization of a novel hepatitis B virus x binding protein that inhibits viral replication, *J Virol*. 72: 1737-43, 1998.
315. Twu, J. S., Lee, C. H., Lin, P. M., and Schloemer, R. H. Hepatitis B virus suppresses expression of human beta-interferon, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85: 252-6, 1988.
316. Twu, J. S., Chu, K., and Robinson, W. S. Hepatitis B virus X gene activates kappa B-like enhancer sequences in the long terminal repeat of human immunodeficiency virus 1, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86: 5168-72, 1989.
317. Twu, J. S., Lai, M. Y., Chen, D. S., and Robinson, W. S. Activation of protooncogene c-jun by the X protein of hepatitis B virus, *Virology*. 192: 346-50, 1993.
318. Becker, S. A., Lee, T. H., Butel, J. S., and Slagle, B. L. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair, *J Virol*. 72: 266-72, 1998.
319. Barnabas, S., Hai, T., and Andrisani, O. M. The hepatitis B virus X protein enhances the DNA binding potential and transcription efficacy of bZip transcription factors, *J Biol Chem*. 272: 20684-90, 1997.
320. Doong, S. L., Lin, M. H., Tsai, M. M., Li, T. R., Chuang, S. E., and Cheng, A. L. Transactivation of the human MDR1 gene by hepatitis B virus X gene product, *J Hepatol*. 29: 872-8, 1998.
321. Seifer, M. and Standring, D. N. Recombinant human hepatitis B virus reverse transcriptase is active in the absence of the nucleocapsid or the viral replication origin, DR1, *J Virol*. 67: 4513-20, 1993.
322. Nagaya, T., Nakamura, T., Tokino, T., Tsurimoto, T., Imai, M., Mayumi, T., Kamino, K., Yamamura, K., and Matsubara, K. The mode of hepatitis B virus DNA integration in chromosomes of human hepatocellular carcinoma, *Genes Dev*. 1: 773-82, 1987.

323. Johnson, P. J. Hepatitis B virus and primary liver cancer. Primary liver cancer: etiological and progression factors, Brechot C, ed. Paris; CRC 31-39, 1994.
324. Seifer, M., Hohne, M., Schaefer, S., and Gerlich, W. H. In vitro tumorigenicity of hepatitis B virus DNA and HBx protein, *J Hepatol.* 13 *Suppl 4*: S61-5, 1991.
325. Hohne, M., Schaefer, S., Seifer, M., Feitelson, M. A., Paul, D., and Gerlich, W. H. Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA, *Embo J.* 9: 1137-45, 1990.
326. Shirakata, Y., Kawada, M., Fujiki, Y., Sano, H., Oda, M., Yaginuma, K., Kobayashi, M., and Koike, K. The X gene of hepatitis B virus induced growth stimulation and tumorigenic transformation of mouse NIH3T3 cells, *Jpn J Cancer Res.* 80: 617-21, 1989.
327. Schaefer, S. and Gerlich, W. H. In vitro transformation by hepatitis B virus DNA, *Intervirology.* 38: 143-54, 1995.
328. Oguey, D., Dumenco, L. L., Pierce, R. H., and Fausto, N. Analysis of the tumorigenicity of the X gene of hepatitis B virus in a nontransformed hepatocyte cell line and the effects of cotransfection with a murine p53 mutant equivalent to human codon 249, *Hepatology.* 24: 1024-33, 1996.
329. Kim, C. M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., and Jay, G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice, *Nature.* 351: 317-20, 1991.
330. Koike, K. Hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis, *Intervirology.* 38: 134-42, 1995.
331. Koike, K., Moriya, K., Iino, S., Yotsuyanagi, H., Endo, Y., Miyamura, T., and Kurokawa, K. High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice, *Hepatology.* 19: 810-9, 1994.
332. Lee, T. H., Finegold, M. J., Shen, R. F., DeMayo, J. L., Woo, S. L., and Butel, J. S. Hepatitis B virus transactivator X protein is not tumorigenic in transgenic mice, *J Virol.* 64: 5939-47, 1990.

333. Balsano, C., Billet, O., Bennoun, M., Cavard, C., Zider, A., Grimber, G., Natoli, G., Briand, P., and Levrero, M. Hepatitis B virus X gene product acts as a transactivator in vivo, *J Hepatol.* 21: 103-9, 1994.
334. Billet, O., Grimber, G., Levrero, M., Seye, K. A., Briand, P., and Joulin, V. In vivo activity of the hepatitis B virus core promoter: tissue specificity and temporal regulation, *J Virol.* 69: 5912-6, 1995.
335. Reifenberg, K., Lohler, J., Pudollek, H. P., Schmitteckert, E., Spindler, G., Kock, J., and Schlicht, H. J. Long-term expression of the hepatitis B virus core-e- and X-proteins does not cause pathologic changes in transgenic mice, *J Hepatol.* 26: 119-30, 1997.
336. Slagle, B. L., Lee, T. H., Medina, D., Finegold, M. J., and Butel, J. S. Increased sensitivity to the hepatocarcinogen diethylnitrosamine in transgenic mice carrying the hepatitis B virus X gene, *Mol Carcinog.* 15: 261-9, 1996.
337. Dragani, T. A., Manenti, G., Farza, H., Della Porta, G., Tiollais, P., and Pourcel, C. Transgenic mice containing hepatitis B virus sequences are more susceptible to carcinogen-induced hepatocarcinogenesis, *Carcinogenesis.* 11: 953-6, 1990.
338. Feitelson, M. A. and Duan, L. X. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma, *Am J Pathol.* 150: 1141-57, 1997.
339. Ueda, H., Ullrich, S. J., Gangemi, J. D., Kappel, C. A., Ngo, L., Feitelson, M. A., and Jay, G. Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer, *Nat Genet.* 9: 41-7, 1995.
340. Prost, S., Ford, J. M., Taylor, C., Doig, J., and Harrison, D. J. Hepatitis B x protein inhibits p53-dependent DNA repair in primary mouse hepatocytes, *J Biol Chem.* 273: 33327-32, 1998.
341. Balsano, C., Avantaggiati, M. L., Natoli, G., De Marzio, E., Will, H., Perricaudet, M., and Levrero, M. Full-length and truncated versions of the hepatitis B virus (HBV) X protein (pX) transactivate the cmyc

- protooncogene at the transcriptional level, *Biochem Biophys Res Commun.* 176: 985-92, 1991.
342. Menzo, S., Clementi, M., Alfani, E., Bagnarelli, P., Iacovacci, S., Manzin, A., Dandri, M., Natoli, G., Levrero, M., and Carloni, G. Trans-activation of epidermal growth factor receptor gene by the hepatitis B virus X-gene product, *Virology.* 196: 878-82, 1993.
343. Su, Q., Liu, Y. F., Zhang, J. F., Zhang, S. X., Li, D. F., and Yang, J. J. Expression of insulin-like growth factor II in hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma: its relationship with hepatitis B virus antigen expression, *Hepatology.* 20: 788-99, 1994.
344. Kim, S. O., Park, J. G., and Lee, Y. I. Increased expression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor gene in hepatocellular carcinoma cell lines: implications of IGF-I receptor gene activation by hepatitis B virus X gene product, *Cancer Res.* 56: 3831-6, 1996.
345. Lee, T. H., Elledge, S. J., and Butel, J. S. Hepatitis B virus X protein interacts with a probable cellular DNA repair protein, *J Virol.* 69: 1107-14, 1995.
346. Haviv, I., Vaizel, D., and Shaul, Y. pX, the Hbv-encoded coactivator, interacts with components of the transcription machinery and stimulates transcription in a Taf- independent manner, *Embo J.* 15: 3413-20, 1996.
347. Haviv, I., Matza, Y., and Shaul, Y. pX, the Hbv-encoded coactivator, suppresses the phenotypes of Tbp and Tafi250 mutants, *Genes Dev.* 12: 1217-26, 1998.
348. Chirillo, P., Pagano, S., Natoli, G., Puri, P. L., Burgio, V. L., Balsano, C., and Levrero, M. The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 8162-7, 1997.
349. Elmore, L. W., Hancock, A. R., Chang, S. F., Wang, X. W., Chang, S., Callahan, C. P., Geller, D. A., Will, H., and Harris, C. C. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 14707-12, 1997.

350. Wang, X. W., Gibson, M. K., Vermeulen, W., Yeh, H., Forrester, K., Sturzbecher, H. W., Hoeijmakers, J. H., and Harris, C. C. Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene, *Cancer Res.* 55: 6012-6, 1995.
351. Kim, H., Lee, H., and Yun, Y. X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells, *J Biol Chem.* 273: 381-5, 1998.
352. Dejean, A., Lugassy, C., Zafrani, S., Tiollais, P., and Brechot, C. Detection of hepatitis B virus DNA in pancreas, kidney and skin of two human carriers of the virus, *J Gen Virol.* 65: 651-5, 1984.
353. Hadchouel, M., Scotto, J., Huret, J. L., Molinie, C., Villa, E., Degos, F., and Brechot, C. Presence of HBV DNA in spermatozoa: a possible vertical transmission of HBV via the germ line, *J Med Virol.* 16: 61-6, 1985.
354. Budkowska, A., Quan, C., Groh, F., Bedossa, P., Dubreuil, P., Bouvet, J. P., and Pillot, J. Hepatitis B virus (HBV) binding factor in human serum: candidate for a soluble form of hepatocyte HBV receptor, *J Virol.* 67: 4316-22, 1993.
355. Pontisso, P., Ruvoletto, M. G., Tiribelli, C., Gerlich, W. H., Ruol, A., and Alberti, A. The preS1 domain of hepatitis B virus and IgA cross-react in their binding to the hepatocyte surface, *J Gen Virol.* 73: 2041-5, 1992.
356. Babinet, C., Farza, H., Morello, D., Hadchouel, M., and Pourcel, C. Specific expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in transgenic mice, *Science.* 230: 1160-3, 1985.
357. Araki, K., Miyazaki, J., Hino, O., Tomita, N., Chisaka, O., Matsubara, K., and Yamamura, K. Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 207-11, 1989.
358. Aragona, E., Burk, R. D., Ott, M., Shafritz, D. A., and Gupta, S. Cell type-specific mechanisms regulate hepatitis B virus transgene expression in liver and other organs, *J Pathol.* 180: 441-9, 1996.
359. Junker, M., Galle, P., and Schaller, H. Expression and replication of the hepatitis B virus genome under foreign promoter control, *Nucleic Acids Res.* 15: 10117-32, 1987.

360. McLachlan, A., Milich, D. R., Raney, A. K., Riggs, M. G., Hughes, J. L., Sorge, J., and Chisari, F. V. Expression of hepatitis B virus surface and core antigens: influences of pre-S and precore sequences, *J Virol.* 61: 683-92, 1987.
361. Hwang, W. L. and Su, T. S. The encapsidation signal of hepatitis B virus facilitates preC AUG recognition resulting in inefficient translation of the downstream genes, *J Gen Virol.* 80: 1769-76, 1999.
362. Treinin, M. and Laub, O. Identification of a promoter element located upstream from the hepatitis B virus X gene, *Mol Cell Biol.* 7: 545-8, 1987.
363. Nakamura, I. and Koike, K. Identification of a binding protein to the X gene promoter region of hepatitis B virus, *Virology.* 191: 533-40, 1992.
364. Yaginuma, K., Nakamura, I., Takada, S., and Koike, K. A transcription initiation site for the hepatitis B virus X gene is directed by the promoter-binding protein, *J Virol.* 67: 2559-65, 1993.
365. Takada, S., Kaneniwa, N., Tsuchida, N., and Koike, K. Hepatitis B virus X gene expression is activated by X protein but repressed by p53 tumor suppressor gene product in the transient expression system, *Virology.* 216: 80-9, 1996.
366. Gustin, K., Shapiro, M., Lee, W., and Burk, R. D. Characterization of the role of individual protein binding motifs within the hepatitis B virus enhancer I on X promoter activity using linker scanning mutagenesis, *Virology.* 193: 653-60, 1993.
367. Zhang, P., Raney, A. K., and McLachlan, A. Characterization of the hepatitis B virus X- and nucleocapsid gene transcriptional regulatory elements, *Virology.* 191: 31-41, 1992.
368. Fukai, K., Takada, S., Yokosuka, O., Saisho, H., Omata, M., and Koike, K. Characterization of a specific region in the hepatitis B virus enhancer I for the efficient expression of X gene in the hepatic cell, *Virology.* 236: 279-87, 1997.

369. Faktor, O. and Shaul, Y. The identification of hepatitis B virus X gene responsive elements reveals functional similarity of X and HTLV-I tax, *Oncogene*. 5: 867-72, 1990.
370. Goodarzi, G., Ohno, H., Adams, R., Darabi, A., Tewari, A., Watabe, M., and Watabe, K. Mutational analysis of enhancer domains responsive to trans-activation by the X gene of human hepatitis B virus, *Arch Virol*. 114: 237-42, 1990.
371. Spandau, D. F. and Lee, C. H. trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein, *J Virol*. 62: 427-34, 1988.
372. Zheng, Y. W., Riegler, J., Wu, J., and Yen, T. S. Novel short transcripts of hepatitis B virus X gene derived from intragenic promoter, *J Biol Chem*. 269: 22593-8, 1994.
373. Chol, C. Y., Park, G. T., and Rho, H. M. A positive regulatory sequence of hepatitis B viral small X promoter, *Eur J Biochem*. 239: 579-87, 1996.
374. Choi, C. Y., Choi, B. H., Park, G. T., and Rho, H. M. Activating transcription factor 2 (ATF2) down-regulates hepatitis B virus X promoter activity by the competition for the activating protein 1 binding site and the formation of the ATF2-Jun heterodimer, *J Biol Chem*. 272: 16934-9, 1997.
375. Chang, H. K., Chou, C. K., Chang, C., Su, T. S., Hu, C., Yoshida, M., and Ting, L. P. The enhancer sequence of human hepatitis B virus can enhance the activity of its surface gene promoter, *Nucleic Acids Res*. 15: 2261-8, 1987.
376. Zhou, D. X. and Yen, T. S. The hepatitis B virus S promoter comprises a CCAAT motif and two initiation regions, *J Biol Chem*. 266: 23416-21, 1991.
377. Bogomolski-Yahalom, V., Klein, A., Greenblat, I., Haviv, Y., and Turkaspa, R. The TATA-less promoter of hepatitis B virus S gene contains a TBP binding site and an active initiator, *Virus Res*. 49: 1-7, 1997.
378. Siddiqui, A., Jameel, S., and Mapoles, J. Transcriptional control elements of hepatitis B surface antigen gene, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83: 566-70, 1986.

379. De-Medina, T., Faktor, O., and Shaul, Y. The S promoter of hepatitis B virus is regulated by positive and negative elements, *Mol Cell Biol.* 8: 2449-55, 1988.
380. Standing, D. N., Rutter, W. J., Varmus, H. E., and Ganem, D. Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in cultured murine cells initiates within the presurface region, *J Virol.* 50: 563-71, 1984.
381. Chang, H. K. and Ting, L. P. The surface gene promoter of the human hepatitis B virus displays a preference for differentiated hepatocytes, *Virology.* 170: 176-83, 1989.
382. Raney, A. K., Le, H. B., and McLachlan, A. Regulation of transcription from the hepatitis B virus major surface antigen promoter by the Sp1 transcription factor, *J Virol.* 66: 6912-21, 1992.
383. Raney, A. K., Easton, A. J., and McLachlan, A. Characterization of the minimal elements of the hepatitis B virus large surface antigen promoter, *J Gen Virol.* 75: 2671-9, 1994.
384. Chang, H. K., Wang, B. Y., Yuh, C. H., Wei, C. L., and Ting, L. P. A liver-specific nuclear factor interacts with the promoter region of the large surface protein gene of human hepatitis B virus, *Mol Cell Biol.* 9: 5189-97, 1989.
385. Raney, A. K. and McLachlan, A. Characterization of the hepatitis B virus major surface antigen promoter hepatocyte nuclear factor 3 binding site, *J Gen Virol.* 78: 3029-38, 1997.
386. Masuda, M., Lee, G., Yuasa, T., and Yoshikura, H. Upstream region of hepatitis B virus S gene responsible for transcriptional stimulation by dexamethasone, *Microbiol Immunol.* 32: 741-7, 1988.
387. Rossner, M. T., Jackson, R. J., and Murray, K. Modulation of expression of the hepatitis B virus surface antigen gene by the viral X-gene product, *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 241: 51-8, 1990.
388. Xu, Z., Jensen, G., and Yen, T. S. Activation of hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum, *J Virol.* 71: 7387-92, 1997.

389. Su, H. and Yee, J. K. Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 2708-12, 1992.
390. Dikstein, R., Faktor, O., Ben-Levy, R., and Shaul, Y. Functional organization of the hepatitis B virus enhancer, *Mol Cell Biol.* 10: 3682-9, 1990.
391. Ostapchuk, P., Scheirle, G., and Hearing, P. Binding of nuclear factor EF-C to a functional domain of the hepatitis B virus enhancer region, *Mol Cell Biol.* 9: 2787-97, 1989.
392. Shaul, Y., Rutter, W. J., and Laub, O. A human hepatitis B viral enhancer element, *Embo J.* 4: 427-30, 1985.
393. Trujillo, M. A., Letovsky, J., Maguire, H. F., Lopez-Cabrera, M., and Siddiqui, A. Functional analysis of a liver-specific enhancer of the hepatitis B virus, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 3797-801, 1991.
394. Dikstein, R., Faktor, O., and Shaul, Y. Hierarchic and cooperative binding of the rat liver nuclear protein C/EBP at the hepatitis B virus enhancer, *Mol Cell Biol.* 10: 4427-30, 1990.
395. Ori, A., Atzmony, D., Haviv, I., and Shaul, Y. An NF1 motif plays a central role in hepatitis B virus enhancer, *Virology.* 204: 600-8, 1994.
396. Huan, B. and Siddiqui, A. Retinoid X receptor RXR alpha binds to and trans-activates the hepatitis B virus enhancer, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 9059-63, 1992.
397. Garcia, A. D., Ostapchuk, P., and Hearing, P. Functional interaction of nuclear factors EF-C, HNF-4, and RXR alpha with hepatitis B virus enhancer I, *J Virol.* 67: 3940-50, 1993.
398. Huan, B., Kosovsky, M. J., and Siddiqui, A. Retinoid X receptor alpha transactivates the hepatitis B virus enhancer 1 element by forming a heterodimeric complex with the peroxisome proliferator-activated receptor, *J Virol.* 69: 547-51, 1995.
399. Ori, A. and Shaul, Y. Hepatitis B virus enhancer binds and is activated by the Hepatocyte nuclear factor 3, *Virology.* 207: 98-106, 1995.

400. Chen, M., Hieng, S., Qian, X., Costa, R., and Ou, J. H. Regulation of hepatitis B virus EN1 enhancer activity by hepatocyte-enriched transcription factor HNF3, *Virology*. 205: 127-32, 1994.
401. Kosovsky, M. J. and Siddiqui, A. Biochemical and Functional Properties of a Palindromic Sequence Motif within the Hepatitis B Virus Enhancer 1, *Virology*. 259: 60-66, 1999.
402. Kosovsky, M. J., Huan, B., and Siddiqui, A. Purification and properties of rat liver nuclear proteins that interact with the hepatitis B virus enhancer 1, *J Biol Chem*. 271: 21859-69, 1996.
403. Ori, A., Zauberman, A., Doitsh, G., Paran, N., Oren, M., and Shaul, Y. p53 binds and represses the Hbv enhancer: an adjacent enhancer element can reverse the transcription effect of p53, *Embo J*. 17: 544-53, 1998.
404. Tur-Kaspa, R., Burk, R. D., Shaul, Y., and Shafritz, D. A. Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid-responsive element, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83: 1627-31, 1986.
405. Tur-Kaspa, R., Shaul, Y., Moore, D. D., Burk, R. D., Okret, S., Poellinger, L., and Shafritz, D. A. The glucocorticoid receptor recognizes a specific nucleotide sequence in hepatitis B virus DNA causing increased activity of the HBV enhancer, *Virology*. 167: 630-3, 1988.
406. Hamasaki, K., Nakata, K., Nakao, K., Mitsuoka, S., Tsutsumi, T., Kato, Y., Shima, M., Ishii, N., Tamaoki, T., and Nagataki, S. Interaction of interferon-alpha with interleukin-1 beta or tumor necrosis factor-alpha on hepatitis B virus enhancer activity, *Biochem Biophys Res Commun*. 183: 904-9, 1992.
407. Ohno, H., Kaneko, S., Kobayashi, K., and Murakami, S. Human hepatitis B virus enhancer 1 is responsive to human interleukin-6, *J Med Virol*. 52: 413-8, 1997.
408. Roossinck, M. J., Jameel, S., Loukin, S. H., and Siddiqui, A. Expression of hepatitis B viral core region in mammalian cells, *Mol Cell Biol*. 6: 1393-400, 1986.

409. Yu, X. and Mertz, J. E. Promoters for synthesis of the pre-C and pregenomic mRNAs of human hepatitis B virus are genetically distinct and differentially regulated, *J Virol.* 70: 8719-26, 1996.
410. Yu, X. and Mertz, J. E. Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoters of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily, *J Virol.* 71: 9366-74, 1997.
411. Guo, W., Chen, M., Yen, T. S., and Ou, J. H. Hepatocyte-specific expression of the hepatitis B virus core promoter depends on both positive and negative regulation, *Mol Cell Biol.* 13: 443-8, 1993.
412. Raney, A. K., Johnson, J. L., Palmer, C. N., and McLachlan, A. Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter, *J Virol.* 71: 1058-1071, 1997.
413. Li, M., Xie, Y., Wu, X., Kong, Y., and Wang, Y. HNF3 binds and activates the second enhancer, ENII, of hepatitis B virus, *Virology.* 214: 371-378, 1995.
414. Johnson, J. L., Raney, A. K., and McLachlan, A. Characterization of a Functional Hepatocyte Nuclear Factor 3 Binding Site in the Hepatitis B Virus Nucleocapsid Promoter, *Virology.* 208: 147-158, 1995.
415. Lopez-Cabrera, M., Letovsky, J., Hu, K. Q., and Siddiqui, A. Multiple liver-specific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic promoter: trans-activation and repression by CCAAT/enhancer binding protein, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 5069-5073, 1990.
416. Lopez-Cabrera, M., Letovsky, J., Hu, K. Q., and Siddiqui, A. Transcriptional factor C/EBP binds to and transactivates the enhancer element II of the hepatitis B virus, *Virology.* 183: 825-829, 1991.
417. Yuh, C. H. and Ting, L. P. C/EBP-like proteins binding to the functional box-alpha and box-beta of the second enhancer of hepatitis B virus, *Mol Cell Biol.* 11: 5044-52, 1991.
418. Zhang, P., Raney, A. K., and McLachlan, A. Characterization of functional Sp1 transcription factor binding sites in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter, *J Virol.* 67: 1472-81, 1993.

419. Lai, C. K. and Ting, L. P. Transcriptional repression of human hepatitis B virus genes by a bZIP family member, E4BP4, *J Virol.* 73: 3197-209, 1999.
420. Yee, J. K. A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus, *Science.* 246: 658-661, 1989.
421. Wang, Y., Chen, P., Wu, X., Sun, A. L., Wang, H., Zhu, Y. A., and Li, Z. P. A new enhancer element, ENII, identified in the X gene of hepatitis B virus, *J Virol.* 64: 3977-3981, 1990.
422. Chen, M. and Ou, J. H. Cell type-dependent regulation of the activity of the negative regulatory element of the hepatitis B virus core promoter, *Virology.* 214: 198-206, 1995.
423. Hiraga, M., Nishizono, A., Mifune, K., Esumi, M., and Shikata, T. Analysis of upstream region of hepatitis B virus core gene using in vitro transcription system, *J Med Virol.* 43: 404-411, 1994.
424. Lo, W. Y. and Ting, L. P. Repression of enhancer II activity by a negative regulatory element in the hepatitis B virus genome, *J Virol.* 68: 1758-1764, 1994.
425. Galarnau, L. Résultats non-publiés. .
426. Allard, D., Gilbert, S., Lamontagne, A., Hamel, D., and Belanger, L. Identification of rat alpha-albumin and cDNA cloning of its human ortholog, *Gene.* 153: 287-8, 1995.
427. Kozak, M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs, *Nucleic Acids Res.* 15: 8125-48, 1987.
428. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular cloning - A laboratory manual*, second edition edition, Vol. 1-3. USA: Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989.
429. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-80, 1994.
430. Felsenstein, J. PHYLIP -- Phylogeny Inference Package (Version 3.2)., *Cladistics.* 5: 164-166, 1989.

431. Araki, T., Haupt, H., Hermentin, P., Schwick, H. G., Kimura, Y., Schmid, K., and Torikata, T. Preparation and partial structural characterization of alpha1T- glycoprotein from normal human plasma, *Arch Biochem Biophys.* 351: 250-6, 1998.
432. Haupt, H. and Heide, K. Isolierung eines in spuren vorkommenden tryptophanarmen alpha1-glycoproteins aus humanserum, *Clinica Chimica Acta.* 10: 555-558, 1964.
433. Candiano, G., Ghiggeri, G. M., Delfino, G., Queirolo, C., and Vecchio, G. Isoelectric focusing in low-denaturing media: visualization in renal disease of variation of the isoelectric point of albumin not related to a remarkable conformational variation, *J Chromatogr.* 374: 279-88, 1986.
434. Nagase, S., Shimamune, K., and Shumiya, S. Albumin-deficient rat mutant, *Science.* 205: 590-1, 1979.
435. Sugiyama, K., Emori, T., and Nagase, S. Synthesis and secretion of plasma proteins by isolated hepatocytes of analbuminemic rats, *J Biochem (Tokyo).* 92: 775-9, 1982.
436. Nishi, S., Koyama, Y., Sakamoto, T., Soda, M., and Kairiyama, C. B. Expression of rat alpha-fetoprotein cDNA in *Escherichia coli* and in yeast, *J Biochem (Tokyo).* 104: 968-72, 1988.
437. Rees, S., Coote, J., Stables, J., Goodson, S., Harris, S., and Lee, M. G. Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein, *Biotechniques.* 20: 102-4, 106, 108-10, 1996.
438. Huang, G. C., Page, M. J., Nicholson, L. B., Collison, K. S., McGregor, A. M., and Banga, J. P. The thyrotrophin hormone receptor of Graves' disease: overexpression of the extracellular domain in insect cells using recombinant baculovirus, immunoaffinity purification and analysis of autoantibody binding, *J Mol Endocrinol.* 10: 127-42, 1993.
439. Grossman, S. B., Yap, S. H., and Shafritz, D. A. Influence of chronic renal failure on protein synthesis and albumin metabolism in rat liver, *J Clin Invest.* 59: 869-78, 1977.

440. Kozlov, V. V. and Rjabov, S. I. [Albumin metabolism in chronic renal insufficiency], *Z Gesamte Inn Med.* 36: 889-91, 1981.
441. Razboynikow, S., Tishkov, I., Tchoukanov, C., and Shipkova, P. [Serum glycoproteins as an index of protein metabolism in advanced chronic kidney failure], *Z Urol Nephrol.* 70: 715-8, 1977.
442. Lindgren, J., Vaheri, A., and Ruoslahti, E. Identification and isolation of a foetoprotein in the chicken, *Differentiation.* 2: 233-6, 1974.
443. Gitlin, D., Perricelli, A., and Gitlin, J. D. The presence of serum alpha-fetoprotein in sharks and its synthesis by fetal gastrointestinal tract and liver, *Comp Biochem Physiol [B].* 46: 207-15, 1973.
444. Beattie, W. G. and Dugaiczky, A. Structure and evolution of human alpha-fetoprotein deduced from partial sequence of cloned cDNA, *Gene.* 20: 415-22, 1982.
445. Moskaitis, J. E., Sargent, T. D., Smith, L. H., Jr., Pastori, R. L., and Schoenberg, D. R. *Xenopus laevis* serum albumin: sequence of the complementary deoxyribonucleic acids encoding the 68- and 74-kilodalton peptides and the regulation of albumin gene expression by thyroid hormone during development, *Mol Endocrinol.* 3: 464-73, 1989.
446. Gilbert, S. F. *Developmental Biology*, 3rd Edition edition, p. 891. Massachusetts, USA, 1995.
447. Aussel, C. Presence of three different binding sites for retinoids, bilirubin and estrogen or arachidonic acid on rat alpha-fetoprotein, *Tumour Biol.* 6: 179-93, 1985.
448. Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N., and Wagner, E. F. c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis [published erratum appears in *Nature* 1993 Nov 25;366(6453):368], *Nature.* 365: 179-81, 1993.
449. Chen, W. S., Manova, K., Weinstein, D. C., Duncan, S. A., Plump, A. S., Prezioso, V. R., Bachvarova, R. F., and Darnell, J. E., Jr. Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in

- embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos, *Genes Dev.* 8: 2466-77, 1994.
450. Duncan, S. A., Nagy, A., and Chan, W. Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of *Hnf-4(-/-)* embryos, *Development.* 124: 279-87, 1997.
451. Ang, S. L. and Rossant, J. HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development, *Cell.* 78: 561-74, 1994.
452. Miesfeld, R., Rusconi, S., Godowski, P. J., Maler, B. A., Okret, S., Wikstrom, A. C., Gustafsson, J. A., and Yamamoto, K. R. Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA, *Cell.* 46: 389-99, 1986.
453. Simon, M. C. Gotta have GATA [news; comment], *Nat Genet.* 11: 9-11, 1995.
454. Imagawa, S., Yamamoto, M., and Miura, Y. GATA transcription factors negatively regulate erythropoietin gene expression, *Acta Haematol.* 95: 248-56, 1996.
455. Gove, C., Walmsley, M., Nijjar, S., Bertwistle, D., Guille, M., Partington, G., Bomford, A., and Patient, R. Over-expression of GATA-6 in *Xenopus* embryos blocks differentiation of heart precursors [published erratum appears in *EMBO J* 1997 Apr 1;16(7):1806-7], *Embo J.* 16: 355-68, 1997.
456. Ko, L. J. and Engel, J. D. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family, *Mol Cell Biol.* 13: 4011-22, 1993.
457. Chang, T. J., Scher, B. M., Waxman, S., and Scher, W. Inhibition of mouse GATA-1 function by the glucocorticoid receptor: possible mechanism of steroid inhibition of erythroleukemia cell differentiation [published erratum appears in *Mol Endocrinol* 1993 Jun;7(6):786], *Mol Endocrinol.* 7: 528-42, 1993.
458. Hu, E., Mueller, E., Oliviero, S., Papaioannou, V. E., Johnson, R., and Spiegelman, B. M. Targeted disruption of the *c-fos* gene demonstrates *c-fos*-dependent and - independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes, *Embo J.* 13: 3094-103, 1994.

459. Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. AP-1 function and regulation, *Curr Opin Cell Biol.* 9: 240-6, 1997.
460. Lamb, P. and McKnight, S. L. Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization, *Trends Biochem Sci.* 16: 417-22, 1991.
461. Angel, P., Allegretto, E. A., Okino, S. T., Hattori, K., Boyle, W. J., Hunter, T., and Karin, M. Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP- 1, *Nature.* 332: 166-71, 1988.
462. Bohmann, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K., and Tjian, R. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1, *Science.* 238: 1386-92, 1987.
463. Zhang, X. K., Huang, D. P., Chiu, D. K., and Chiu, J. F. The expression of oncogenes in human developing liver and hepatomas, *Biochem Biophys Res Commun.* 142: 932-8, 1987.
464. Tournier-Thurneyssen, I., Feldmann, G., and Bernuau, D. Nuclear oncogenes and alpha-fetoprotein gene expression in hepatoma cell lines, *Tumour Biol.* 14: 201-12, 1993.
465. Morello, D., Fitzgerald, M. J., Babinet, C., and Fausto, N. c-myc, c-fos, and c-jun regulation in the regenerating livers of normal and H-2k/c-myc transgenic mice, *Mol Cell Biol.* 10: 3185-93, 1990.
466. Lucibello, F. C., Slater, E. P., Jooss, K. U., Beato, M., and Muller, R. Mutual transrepression of Fos and the glucocorticoid receptor: involvement of a functional domain in Fos which is absent in FosB, *Embo J.* 9: 2827-34, 1990.
467. Kerppola, T. K., Luk, D., and Curran, T. Fos is a preferential target of glucocorticoid receptor inhibition of AP-1 activity in vitro, *Mol Cell Biol.* 13: 3782-91, 1993.
468. Schule, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I. M., and Evans, R. M. Functional antagonism between

- oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor, *Cell*. 62: 1217-26, 1990.
469. Duncan, S. A., Manova, K., Chen, W. S., Hoodless, P., Weinstein, D. C., Bachvarova, R. F., and Darnell, J. E., Jr. Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91: 7598-602, 1994.
470. Sladek, F. M., Zhong, W. M., Lai, E., and Darnell, J. E., Jr. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily, *Genes Dev*. 4: 2353-65, 1990.
471. Frain, M., Swart, G., Monaci, P., Nicosia, A., Stampfli, S., Frank, R., and Cortese, R. The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain, *Cell*. 59: 145-57, 1989.
472. Hu, Z. Z., Zhuang, L., Meng, J., and Dufau, M. L. Transcriptional regulation of the generic promoter III of the rat prolactin receptor gene by C/EBPbeta and Sp1, *J Biol Chem*. 273: 26225-35, 1998.
473. Mikita, T., Kurama, M., and Schindler, U. Synergistic activation of the germline epsilon promoter mediated by Stat6 and C/EBP beta, *J Immunol*. 161: 1822-8, 1998.
474. Rippe, K., von Hippel, P. H., and Langowski, J. Action at a distance: DNA-looping and initiation of transcription, *Trends Biochem Sci*. 20: 500-6, 1995.
475. Zagariya, A., Mungre, S., Lovis, R., Birrer, M., Ness, S., Thimmapaya, B., and Pope, R. Tumor necrosis factor alpha gene regulation: enhancement of C/EBPbeta- induced activation by c-Jun, *Mol Cell Biol*. 18: 2815-24, 1998.
476. Boruk, M., Savory, J. G., and Hache, R. J. AF-2-dependent potentiation of CCAAT enhancer binding protein beta- mediated transcriptional activation by glucocorticoid receptor, *Mol Endocrinol*. 12: 1749-63, 1998.
477. Brenner, D. A. Signal transduction during liver regeneration, *J Gastroenterol Hepatol*. 13 *Suppl*: S93-5, 1998.

478. Nakao, K., Lawless, D., Ohe, Y., Miyao, Y., Nakabayashi, H., Kamiya, H., Miura, K., Ohtsuka, E., and Tamaoki, T. c-Ha-ras down regulates the alpha-fetoprotein gene but not the albumin gene in human hepatoma cells, *Mol Cell Biol.* 10: 1461-9, 1990.
479. Mehta, F., Lallemand, D., Pfarr, C. M., and Yaniv, M. Transformation by ras modifies AP1 composition and activity, *Oncogene.* 14: 837-47, 1997.
480. Willy, P. J. and Mangelsdorf, D. J. Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR, *Genes Dev.* 11: 289-98, 1997.
481. Baes, M., Castelein, H., Desmet, L., and Declercq, P. E. Antagonism of COUP-TF and PPAR alpha/RXR alpha on the activation of the malic enzyme gene promoter: modulation by 9-cis RA, *Biochem Biophys Res Commun.* 215: 338-45, 1995.
482. Palmer, C. N., Hsu, M. H., Muerhoff, A. S., Griffin, K. J., and Johnson, E. F. Interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha with the retinoid X receptor alpha unmasks a cryptic peroxisome proliferator response element that overlaps an ARP-1-binding site in the CYP4A6 promoter, *J Biol Chem.* 269: 18083-9, 1994.
483. Wiebel, F. F. and Gustafsson, J. A. Heterodimeric interaction between retinoid X receptor alpha and orphan nuclear receptor OR1 reveals dimerization-induced activation as a novel mechanism of nuclear receptor activation, *Mol Cell Biol.* 17: 3977-86, 1997.
484. Ktistaki, E. and Talianidis, I. Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1, *Science.* 277: 109-12, 1997.
485. Yu, Y., Li, W., Su, K., Yussa, M., Han, W., Perrimon, N., and Pick, L. The nuclear hormone receptor Ftz-F1 is a cofactor for the Drosophila homeodomain protein Ftz, *Nature.* 385: 552-5, 1997.
486. Tremblay, J. J., Marcil, A., Gauthier, Y., and Drouin, J. Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain, *Embo J.* 18: 3431-41, 1999.

487. Prefontaine, G. G., Lemieux, M. E., Giffin, W., Schild-Poulter, C., Pope, L., LaCasse, E., Walker, P., and Hache, R. J. Recruitment of octamer transcription factors to DNA by glucocorticoid receptor, *Mol Cell Biol.* *18*: 3416-30, 1998.
488. Li, F. Q., Ueda, H., and Hirose, S. Mediators of activation of fushi tarazu gene transcription by BmFTZ-F1, *Mol Cell Biol.* *14*: 3013-21, 1994.
489. Takemaru, K., Li, F. Q., Ueda, H., and Hirose, S. Multiprotein bridging factor 1 (MBF1) is an evolutionarily conserved transcriptional coactivator that connects a regulatory factor and TATA element-binding protein, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *94*: 7251-6, 1997.
490. Chang, C. J., Chen, Y. L., and Lee, S. C. Coactivator TIF1beta interacts with transcription factor C/EBPbeta and glucocorticoid receptor to induce alpha1-acid glycoprotein gene expression, *Mol Cell Biol.* *18*: 5880-7, 1998.
491. Subramaniam, N., Treuter, E., and Okret, S. Receptor interacting protein RIP140 inhibits both positive and negative gene regulation by glucocorticoids, *J Biol Chem.* *274*: 18121-7, 1999.
492. Chuang, F. M., West, B. L., Baxter, J. D., and Schaufele, F. Activities in Pit-1 determine whether receptor interacting protein 140 activates or inhibits Pit-1/nuclear receptor transcriptional synergy, *Mol Endocrinol.* *11*: 1332-41, 1997.
493. Wang, J. C., Stafford, J. M., and Granner, D. K. SRC-1 and GRIP1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4, *J Biol Chem.* *273*: 30847-50, 1998.
494. Crawford, P. A., Polish, J. A., Ganpule, G., and Sadovsky, Y. The activation function-2 hexamer of steroidogenic factor-1 is required, but not sufficient for potentiation by SRC-1, *Mol Endocrinol.* *11*: 1626-35, 1997.
495. Kashala, L. O., Conne, B., Kapanci, Y., Frei, P. C., Lambert, P. H., Kalengayi, M. R., and Essex, M. Hepatitis B virus, alpha-fetoprotein synthesis, and hepatocellular carcinoma in Zaire, *Liver.* *12*: 330-40, 1992.

496. Kashala, L. O., Kalengayi, M. M., and Essex, M. Alpha-fetoprotein synthesis in human hepatocellular carcinoma: correlation with hepatitis B surface antigen expression, *Cancer Invest.* 10: 513-22, 1992.
497. Miquerol, L., Lopez, S., Cartier, N., Tulliez, M., Raymondjean, M., and Kahn, A. Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas, *J Biol Chem.* 269: 8944-51, 1994.