

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LOCALISATION ET CARACTÉRISATION D'UN ÉLÉMENT DE RÉPONSE À LA
TRIODOOTHYRONINE (T3) DANS LA PARTIE PROMOTRICE DU GÈNE DE LA
SYNTHÉTASE DES ACIDES GRAS (FAS) CHEZ L'OIE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

CAROLINE MARTEL

MARS 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je n'aime pas me prendre trop au sérieux, alors mes remerciements seront plutôt brefs.

Bien sûr mes premiers remerciements personnels vont à mes parents et à mon frère qui m'ont toujours soutenue dans mes projets, mes bonheurs et mes peines, particulièrement durant cette dernière année. Merci!

Merci à Yan pour sa complicité, sa patience, sa compréhension et son amour. Merci d'avoir pris soin de mon coeur durant cette dernière année. Je sais bien que ça n'a pas été facile pour toi aussi.

Et bien sûr, à Catherine milles mercis! J'ai énormément appris avec toi et j'ai acquis beaucoup de confiance.

Plusieurs personnes, tant des étudiants, des collègues de labo, que des professionnels, m'ont donné des conseils et m'ont fourni certains protocoles; je vous en remercie. Vous êtes assez nombreux, alors pardonnez-moi de ne pas tous vous nommer un à un!

Puisque la vie est courte, inutile de trop se prendre la tête (ceux qui me connaissent trouveront bien drôle que ce soit moi qui tienne ces propos) mais la vie nous réserve parfois bien des surprises.

Un petit ange est venu frapper à ma porte, mais je n'ai pas su le laisser entrer. Reviens quand tu veux petit ange et je saurai maintenant t'ouvrir...

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
RÉSUMÉ	xi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1.1- Lipogenèse	4
1.1.1- Introduction	4
1.1.2- Synthèse des acides gras saturés	4
1.1.3- Régulation nutritionnelle et hormonale de la lipogenèse	5
1.1.3.1- Régulation nutritionnelle	5
1.1.3.2- Régulation hormonal	6
1.2- Synthétase des acides gras (FAS)	8
1.2.1- Purification de la FAS	8
1.2.2- Mécanisme d'action	9
1.2.3- Structure de la protéine FAS	10
1.2.4- Expression tissulaire	11
1.2.5- Gène FAS et région promotrice	12
1.3- Inhibiteurs pharmacologiques	16
1.4- Hormones thyroïdiennes et récepteurs	16
1.4.1- Hormones thyroïdiennes	17
1.4.2- Récepteurs nucléaires à la T3	17
1.4.3- Isoformes et expression	18
1.4.4- Mécanisme d'action	20
1.5- Exemple du promoteur du gène de l'enzyme malique	21
1.5.1- Introduction	21
1.5.2- Régulateurs connus	21
1.5.3- Éléments de réponse à la triiodothyronine (TRES)	22

1.6- Effets des acides gras à chaînes moyennes (MCFAs)	22
CHAPITRE II	
MATÉRIELS ET MÉTHODES	24
2.1- MATÉRIELS	24
2.1.1- Cellules	24
2.1.2- Plasmides, cosmides et souches bactériennes	26
2.1.3- Solutions utilisées	27
2.1.3.1- Milieux bactériologiques	27
2.1.3.2- Solutions standard	27
2.1.3.3- Culture cellulaire	27
2.1.3.4- Enzymes de restriction ou de modification	27
2.1.3.5- Produits chimiques	28
2.2- MÉTHODES	29
2.2.1- Amplification du cosmide	29
2.2.1.1- Encapsidation	29
2.2.1.2- Analyse par restriction de l'ADN obtenu	30
2.2.2- Carte de restriction du cosmide	30
2.2.2.1- Digestions	30
2.2.2.2- Migration sur gel	30
2.2.2.3- Analyse des fragments de restriction obtenus	30
2.2.3- Clonage d'un fragment d'ADN (fragment de restriction ou de PCR)	31
2.2.3.1- Digestion par une enzyme de restriction	31
2.2.3.2- Génération par PCR de différents fragments à partir du promoteur testé	31
2.2.3.2.1- Choix des amorces et préparation	31
2.2.3.2.2- Amplification par PCR	31
2.2.3.2.3- Digestion des produits PCR	32
2.2.3.3- Purification d'une bande d'ADN sur gel d'agarose	33
2.2.3.4- Clonage d'un fragment d'ADN dans un vecteur (pBlueScript ou autre)	33
2.2.3.4.1- Ligation	34
2.2.3.4.2- Préparation de bactéries compétentes	34

2.2.3.4.3- Transformation bactérienne	35
2.2.3.5- Mini-préparation d'ADN plasmidique	35
2.2.3.6- Vérification des clones	36
2.2.3.7- Maxi-préparation d'ADN plasmidique	36
2.2.3.8- Séquençage et analyse des séquences	37
2.2.4- Culture cellulaire (LMH, HepG2, CEH)	37
2.2.4.1- Culture de lignées; cellules LMH et HepG2	37
2.2.4.2- Préparation et culture des hépatocytes embryonnaires de poulet (CEH)	37
2.2.5- Transfections	38
2.2.5.1- Cellules LMH	38
2.2.5.2- Cellules HepG2	39
2.2.5.3- Hépatocytes embryonnaires de poulet	39
2.2.6- Analyse de l'activité promotrice des différentes constructions réalisées	40
2.2.6.1- Lysats cellulaires (pour l'essai luciférase)	40
2.2.6.2- Lysats cellulaires (pour l'essai CAT-ÉLISA)	40
2.2.6.3- Essais luciférase	41
2.2.6.4- Dosage de l'activité CAT	41
2.2.6.5- Dosage des protéines	41
2.2.6.6- Dosage de l'activité β -galactosidase	42
2.2.6.7- Calculs	43
2.2.6.7.1- Calcul de l'activité luciférase standardisée	43
2.2.6.7.2- Calcul de l'activité CAT standardisée	43
2.2.6.7.3 - Analyse statistique	43
2.2.7- Retards sur gel	43
2.2.7.1- Choix des oligonucléotides et préparation	43
2.2.7.2- Préparation d'extraits nucléaires	44
2.2.7.3- Marquage des oligonucléotides	45
2.2.7.4- Réalisation des gels, montage et pré-migration	46
2.2.7.5- Réactions	46
2.2.7.6- Migration et séchage	47

	vi
2.2.7.7- Révélation	47
CHAPITRE III	
RÉSULTATS	48
3.1- Carte de restriction du cosmide cosFAS5	48
3.2- Clonage du fragment proximal de la partie promotrice du gène FAS de l'oie	50
3.3- Séquence du fragment d'ADN isolé de 1584 pb	51
3.4- Activité promotrice obtenue lors d'essais luciférase réalisés avec la construction contenant la partie promotrice du gène FAS de l'oie	53
3.5- Réalisation des différentes constructions à partir du fragment de 1.6 Kpb	55
3.6- Activité CAT obtenue avec la construction 1.6FAS-pJFCAT1, la construction TRE-TKCAT et la construction contenant le petit fragment -765/-663 (nommée ¾-TRE-TKCAT), suite aux stimulations	59
3.7- Retards sur gel	64
CHAPITRE IV	
DISCUSSION	70
4.1- Réponse à la T3 et identification d'un TRE	70
4.2- Réponse à l'insuline et effet synergique	71
4.3- Complexes obtenus par retard sur gel en utilisant le TRE putatif identifié	75
CONCLUSIONS	79
RÉFÉRENCES	80

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Voie métabolique pour la conversion du glucose en palmitate	5
1.2 Complexe homodimère FAS chez les mammifères	9
1.3 Action de la FAS	10
1.4 Monomère de la FAS	11
1.5 Alignement de promoteurs FAS	14
1.6 Séquence nucléotidique de la région 5'-flanquante du gène de la synthétase des acides gras de l'oie	15
1.7 Représentation de différents isoformes des récepteurs d'hormone thyroïdienne	19
1.8 Représentation de la voie de signalisation de la T3	21
3.1 Deux exemples de migration sur gel d'agarose 1% des digestions effectuées afin de réaliser la carte de restriction du cosmide	49
3.2 Carte de restriction partielle du cosFAS5 obtenue suite à l'analyse des différentes bandes obtenues sur gel	49
3.3 Migration sur gel d'agarose 1% des fragments obtenus suite à la digestion par l'enzyme HindIII du fragment de 9kb du cosFAS5	51
3.4 Séquence complète (5' → 3') du clone de 1.6 kb contenant l'ADN 5' flanquant du gène de la synthétase des acides gras de l'oie (FAS) (MARTEL, C. et C. MOUNIER, 2003; PubMed). AC #AY391824	52
3.5 Activité promotrice du fragment de 1,6 kb transfecté dans les cellules LMH en utilisant les essais luciférase	54
3.6 Activité promotrice du fragment de 1,6 kb transfecté dans les cellules LMH stimulées 48 heures à la T3	54
3.7 Schématisation de la stratégie employée afin de déterminer l'emplacement de l'élément de réponse à la T3 dans la partie promotrice du gène de la synthétase des acides gras de l'oie	55

Figure	Page
3.8 Migration sur gel d'agarose 1% des différentes délétions successives réalisées par PCR	56
3.9 Alignement de différentes séquences nucléotidiques de promoteurs FAS contenant un TRE. Figure tirée de Wang et al, 2004, article publié dans le Journal of Nutrition	57
3.10 Migration sur gel d'agarose du fragment contenant l'élément putatif de réponse à la T3	58
3.11 Migration sur gel d'agarose 1% des petits fragments ayant été amplifiés par PCR à partir du 'TRE'	59
3.12 Photographie d'hépatocytes embryonnaires de poulet isolés à l'aide de la technique décrite par A.G. Goodridge (Goodridge, 1971)	60
3.13 Effets de la T3 et de l'insuline sur l'activité du promoteur FAS de l'oie	62
3.14 Effets de la T3 et de l'insuline sur l'activité de la partie située entre -902 et -663 du promoteur FAS de l'oie	63
3.15 Expérience de retard sur gel pour vérifier la liaison de protéines nucléaires au TRE putatif	65
3.16 Expérience de retard sur gel de compétition spécifique avec le TRE	66
3.17 Expérience de retard sur gel de compétition non spécifique avec le TRE	67
3.18 Expérience de retard sur gel de supershift avec un anticorps anti-TR et anti-RXR	68
4.19 Comparaison des complexes obtenus par supershift par Debbie Thurmond (1998) et ceux obtenus lors de notre étude	77

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ACC	acétyl-CoA carboxylase
ADN	acide désoxyribonucleique
Akt	protéine kinase B
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARNm	ARN messenger
ATF2	« activating transcription factor-2 »
CEH	hépatocyte embryonnaire de poulet
ChREBP	« carbohydrate responsive element binding protein », élément de réponse aux hydrates de carbone
CPT-1	carnitine parmitoyl transférase 1
DBD	« DNA binding domain », domaine de liaison à l'ADN
DR4	« direct repeat-4 », répétition directe séparée par 4 bases variables
EM	enzyme malique
FAS	« fatty acid synthase », synthétase des acides gras
(h)FIRE	élément de réponse à l'insuline du gène FAS (hépatique)
GH	« growth hormone », hormone de croissance
GLUT4	transporteur de glucose-4
GR	« glucocorticoid receptor », récepteur de glucocorticoïdes
ICE	élément CAATT inversé
kDa	kilodalton
Kpb ou Kb	kilopaire de base
LMH	« Leghorn male hepatoma cells »
LXR	« liver X factor receptor »
LXRE	« liver X response element »
MCD	malonyl-CoA décarboxylase
MCFA	« medium chain fatty acids », acides gras à chaînes moyennes
mSin3	« mammalian Sin3 corepressor complex »
NADPH	déhydronicotinamide adénine dinucléotide phosphate

N-CoR	co-répresseur de récepteurs nucléaires
NPY	neuropeptide Y
Pb	paire de base
PI3-kinase	phosphatidyl inositol-3 kinase
PKA	protéine kinase A
PPAR	« peroxysome proliferator activator receptor »
PUFA	« polyunsaturated fatty acids », acides gras polyinsaturés
RAR	« retinoic acid receptor »
RXR	« retinoic X receptor »
SCD	« stearoyl-CoA desaturase », stearoyl-CoA désaturase
SMRT	« silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor »
SRE	élément de réponse aux stérols
SREBP-1	« sterol responsive element binding protein-1 »
T3	triiodothyronine
T3RU	« triiodothyronine responsive unit », unité de réponse à la triiodothyronine
T4	thyroxine
TH	« thyroid hormones », hormones thyroïdiennes
THRA	gène codant pour les récepteurs (TR) de type alpha
THRB	gène codant pour les récepteurs (TR) de type bêta
TR	« thyroid hormone receptor », récepteur de l'hormone thyroïdienne
TRAC	« thyroid hormone- and retinoic acid receptor- associated corepressor »
TRE ou T3RE	« triiodothyronine responsive element », élément de réponse à la triiodothyronine (aussi T3RE)
VDR	« vitamin D receptor »

RÉSUMÉ

L'obésité est maintenant perçue comme un problème de santé majeur dans notre société. C'est pourquoi la compréhension des mécanismes moléculaires liés au développement de cette maladie est primordiale. Des études comparatives entre des poulets de lignées grasses et des poulets de lignées maigres ont montré que la lipogénèse hépatique était plus élevée chez les animaux gras. La Synthétase des Acides Gras (FAS) est connue comme étant responsable de la synthèse des lipides saturés à longues chaînes. Des études antérieures ont démontré que ce gène est régulé à la fois par l'état nutritionnel et hormonal. Dans ce contexte, l'objectif de la présente étude était d'examiner le rôle de l'hormone thyroïdienne (T3), et aussi d'un mélange de T3 et d'insuline, sur l'activité transcriptionnelle du gène aviaire de la FAS. Certains des éléments agissant au niveau de la réponse à l'insuline ont déjà été identifiés chez l'humain, le poulet, la souris et le rat. Afin d'identifier l'effet de la T3 et d'un mélange de T3 et d'insuline, un fragment d'ADN de 1,6 Kpb de la partie promotrice de FAS a été isolé, séquencé et cloné dans un vecteur contenant le gène rapporteur codant pour la chloramphénicol acétyl transférase (CAT). Cette construction nommée 1.6FAS-pJFCAT1 a ensuite été transfectée de façon transitoire dans les cellules HepG2 et les hépatocytes embryonnaires de poulet. Les analyses d'expression ont démontré une augmentation de l'activité du gène rapporteur codant pour CAT de 2.5 fois, suite à une stimulation de 48 heures avec 1.6 μ M de T3. Ce promoteur posséderait donc un élément de réponse nécessaire à la modulation par cette hormone. Des constructions contenant des délétions successives de ce grand fragment d'ADN et des alignements de séquences ont permis l'identification de la région interne localisée entre -902/-577 pb où se retrouve l'élément de réponse à la T3, appelé TRE pour 'Thyroid Hormone Response Element'. Des analyses de retard sur gel (EMSA) utilisant comme TRE un oligonucléotide contenant les bases -732 à -692 ont ensuite permis d'identifier des protéines se fixant sur ce fragment d'ADN en réponse à la T3, renforçant ainsi la présence possible d'un TRE. Une augmentation de l'activité CAT de 2.3 fois a d'ailleurs aussi été obtenue après 48 heures de stimulation à la T3 lors d'expériences de transfections transitoires avec la construction contenant le fragment -765/-663 placé devant le promoteur TK. Le TRE correspondrait donc à la séquence CGCCCTgtggTAACCT, séquence très différente du consensus établi et très différente des T3RE retrouvés dans la partie promotrice du gène de l'enzyme malique. Il a toutefois une forte homologie avec un TRE retrouvé dans le gène FAS chez l'humain, le poulet, la souris et le rat. Ceci semble démontrer la forte variation de ces éléments de réponse. L'analyse par retard sur gel révèle qu'en présence de T3 seulement il y a fixation du récepteur TR alors que lorsque l'insuline est aussi présente, il semble que le facteur de transcription RXR se fixe aussi. Ceci suggérerait l'idée que la formation d'hétérodimères TR/RXR serait grandement favorisée en présence d'insuline. Ces informations, en combinaison avec les résultats récents obtenus par d'autres équipes sur la régulation de la FAS, serviront à la compréhension des mécanismes de régulation de la transcription d'un gène clé de la lipogénèse hépatique.

Mots clés : hormone thyroïdienne, TRE, synthétase des acides gras, FAS, lipogénèse.

INTRODUCTION

L'excès de poids, de même que l'obésité, sont des sujets dont on entend de plus en plus parler ces derniers temps puisqu'ils sont en augmentation constante depuis les dernières années. Au niveau mondial, soit tant dans les pays développés que dans ceux en voie de développement, l'obésité affecte de plus en plus d'hommes, de femmes et malheureusement d'enfants (American Obesity Association (AOA); www.obesity.org). D'ailleurs, selon cette dernière source en 2000, 64.5 % de la population des États-Unis a un excédant de poids (indice de masse corporelle > 25), alors que 30.5 % de la population adulte âgée entre 20 et 64 ans est obèse (indice de masse corporelle > 30) (AOA, 2005). L'indice de masse corporelle est une mesure du statut pondéral égal au rapport du poids de l'individu, exprimé en kilogrammes, sur le carré de sa taille, exprimée en mètres. Un poids normal auquel est associé un risque moindre de développer des problèmes de santé correspond à un IMC qui se situe entre 18,5 kg/m² et 24,9 kg/m² (Organisation mondiale de la santé (OMS); www.who.int).

L'obésité peut être perçue comme étant le déséquilibre de deux fonctions physiologiques, c'est-à-dire la régulation de l'appétit et du métabolisme énergétique. La combinaison des deux entraînant une balance énergétique désordonnée (Gale *et al*, 2004; Hellstrom *et al*, 2004). Pour être considérée comme obèse, une personne doit avoir un indice de masse corporelle supérieure à 30 (Santé Canada (HC); www.hc-sc.gc.ca). Malheureusement le Québec et le Canada n'échappent pas à cette tendance mondiale, puisque plus de la moitié des Canadiens ont un excédent de poids, ce qui représenterait un risque pour la santé des deux tiers de ces personnes. Au Canada en 2000-2001, on estime que 15 % de la population adulte est obèse (Statistiques Canada (SC); www.statcan.ca), alors que, chez les européens, cette proportion de la population adulte atteint 18.5 % (Organisation mondiale de la santé (OMS); www.who.int/fr/). L'obésité chez les enfants s'est aussi accrue passant de 4,3 % (1971-1974) à 16 % (1999-2000) chez les garçons, et de 3.6 % (1971-1974) à 14.5 % (1999-2000) chez les filles (AOA, 2005).

Nous savons d'ailleurs aujourd'hui que l'obésité entraîne d'autres problèmes de santé graves, notamment elle augmente le risque d'insuffisance coronarienne, d'arthrose, d'hypertension, de divers cancers (entre autres le cancer du sein, du colon et de l'œsophage) et de diabète de type II. Elle augmente également le risque de lésions lombaires, qui représentent un coût significatif pour l'industrie (AOA, 2005). L'obésité est donc reconnue de plus en plus comme un problème de société majeur. Afin de pouvoir lutter contre ce fléau, nous nous devons de bien connaître les mécanismes de régulation des gènes impliqués dans la lipogenèse, c'est-à-dire la synthèse *de novo* des acides gras.

La synthèse *de novo* des acides gras est considérée par certains comme ayant une contribution minimale à la mise en réserve des lipides à l'intérieur du corps (Wang *et al*, 2004). Toutefois, la prévalence de l'obésité mentionnée plus haut, ainsi que les effets bénéfiques cumulatifs apportés par des réductions de la mise en réserve des graisses, soulignent le besoin de comprendre les mécanismes de synthèse des acides gras (Wang *et al*, 2004). Une étude réalisée par le groupe de Ntambi a d'ailleurs démontré que les acides gras mis en réserve sous la forme de triglycérides provenaient essentiellement de la synthèse *de novo* (Miyazaki *et al*, 2004). En utilisant des souris knock-out pour un gène impliqué dans la synthèse des acides gras, c'est-à-dire le gène de la stéaroyl-CoA désaturase ou SCD1 (SCD1 *-/-*), et en supplémentant l'alimentation des souris avec du palmitate (C 16 :0) et du stéarate (C 18 :0), ils n'ont pas induit l'expression de SREBP-1c ou l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse. SREBP-1c est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de plusieurs gènes clés du métabolisme des acides gras. Toujours selon cette étude, le niveau de triglycérides au niveau du foie n'a pas augmenté non plus. Avec leurs diverses expériences, ils ont pu démontrer que l'oléate (C 18 :1) synthétisé de façon endogène (synthèse *de novo*) était un régulateur de l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse plus efficacement accessible que l'oléate contenu dans la diète (Miyazaki *et al*, 2004).

L'objectif de ce projet est de caractériser la régulation du gène de la synthétase des acides gras (FAS ; « fatty acid synthase »), une enzyme clé de la lipogenèse hépatique. Cette enzyme, en présence de NADPH, catalyse la formation d'acides gras saturés à longues chaînes qui sont l'acide palmitique (C 16 :0) et l'acide stéarique (C 18 :0) à partir d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA par une succession de cycles, en ajoutant deux carbones à chaque cycle. Ces acides gras sont nécessaires au bon fonctionnement des organismes, puisqu'ils serviront entre autres à la

formation d'hormones, d'éléments servant à la construction des membranes cellulaires et à la production d'énergie. Par contre, une surproduction d'acides gras entraîne leur mise en réserve dans les tissus adipeux menant au développement de l'obésité.

Plusieurs études ont montré que les enzymes de la lipogenèse étaient régulées par différentes hormones et nutriments au niveau transcriptionnel (Goodridge *et al*, 1991; Girard *et al*, 1994).

Dans ce projet, nous caractériserons tout d'abord la région 5' régulatrice du gène de la FAS de l'oie et caractériserons le(s) élément(s) de réponse à la triiodothyronine.

Pour y parvenir, nous avons en notre possession le clone CosFAS5, un cosmide qui contient environ 46 kb du gène de la FAS. Cette construction inclut 12 Kpb d'ADN en aval du site d'initiation de la transcription renfermant 7 exons, ainsi que 34 Kpb en amont contenant la partie promotrice. C'est d'ailleurs ce dernier fragment qui nous intéresse, puisque c'est là que nous retrouverons les éléments régulateurs de l'expression de la FAS. Cette étude nous permettra d'élargir nos connaissances générales sur la régulation nutritionnelle et hormonale de ce gène clé de la lipogenèse hépatique.

Afin de caractériser un élément de réponse à la triiodothyronine, nous isolerons d'abord le fragment proximal de la partie promotrice du gène FAS de l'oie, puis nous réaliserons des délétions successives en 5'. Ces constructions seront transfectées dans différents types cellulaires afin de localiser l'emplacement de cet élément de régulation. La réalisation de retards sur gel nous permettra de confirmer qu'il s'agit d'un TRE, et permettra aussi de compléter notre étude de caractérisation.

CHAPITRE I

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1-Lipogenèse

1.1.1-Introduction

La lipogenèse est la synthèse *de novo* des lipides. Malgré le fait que les lipides représentent un groupe de composés très hétérogènes, ils n'ont que quatre grands rôles biologiques à jouer. Dans toutes les cellules, ils servent d'éléments de structure des membranes, de réserve d'énergie (triacylglycérols), de plus ils entrent dans la composition de plusieurs vitamines et hormones, ainsi que dans celle des acides biliaires (Numa *et al*, 1974).

1.1.2- Synthèse des acides gras saturés

Les principales étapes de la synthèse *de novo* des acides gras saturés sont présentées dans la **Figure 1.1**. Les enzymes clés de la lipogenèse hépatique sont l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), la synthétase des acides gras (FAS,) la stéaroyl-CoA désaturase (SCD-1; non présente dans la **Figure 1.1**) et l'enzyme malique (EM). Le principal précurseur de cette voie de biosynthèse est l'acétyl-CoA formé à partir du glucose alimentaire par l'intermédiaire de la glycolyse. L'ACC catalyse la première étape de cette biosynthèse des lipides. Cette enzyme transforme l'acétyl-CoA en malonyl-CoA. L'ACC catalyse deux réactions différentes, dont la deuxième est irréversible et essentielle à la synthèse des acides gras (Munday M.R., 2002).

La deuxième étape de la synthèse des acides gras est catalysée par un complexe multienzymatique appelé la synthétase des acides gras. Cette enzyme condense le malonyl-CoA et l'acétyl-CoA en palmitate (C 16 :0) et stéarate (C 18 :0) en présence de NADPH. Le palmitate et le stéarate sont les acides gras les plus abondants dans les organismes vivants. (Smith *et al*, 2003)

Suite à l'élongation des chaînes d'acides gras, d'autres transformations peuvent se produire (non représentées sur la figure), comme par exemple des désaturations des acides gras nouvellement synthétisés, c'est-à-dire l'introduction de double liaison. C'est le rôle des désaturases et en particulier de la stéaroyl-CoA désaturase qui introduit une désaturation sur la position 9 de l'acide palmitique donnant ainsi de l'acide palmitoléique. (Ntambi J.M., 1995).

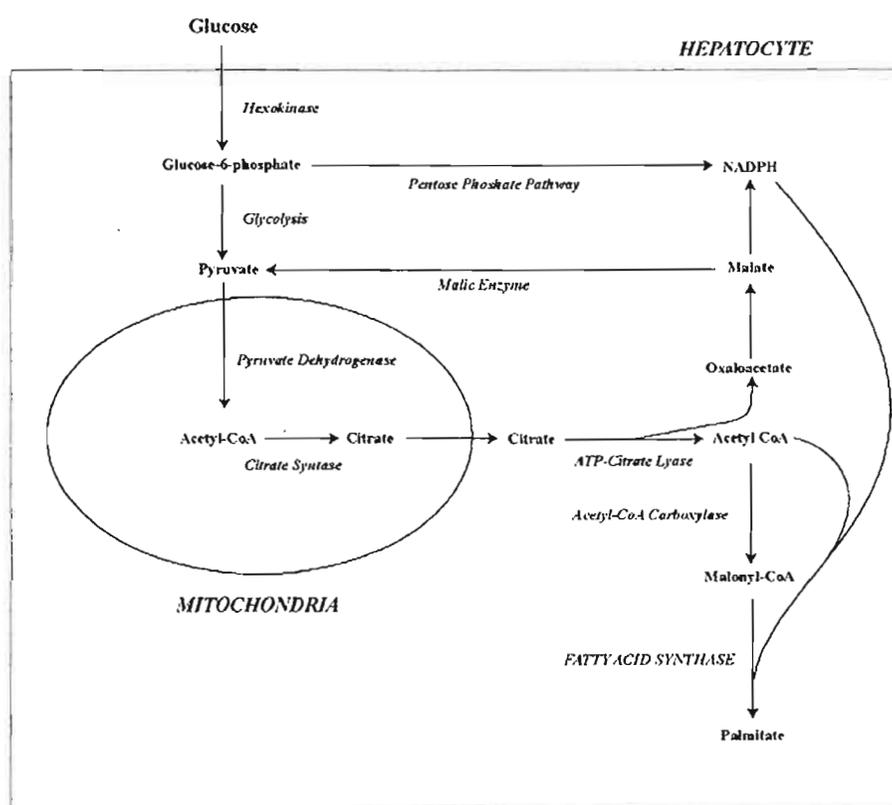


Figure 1.1 : Voie métabolique pour la conversion du glucose en palmitate. Tirée de Griffin *et al*, 2004.

1.1.3- Régulation nutritionnelle et hormonale de la lipogenèse

1.1.3.1 - Régulation nutritionnelle

Des changements dans la diète ont une grande influence sur la lipogenèse. Une diète riche en sucres (par exemple riche en glucose) stimule la synthèse d'acides gras en augmentant la transcription de nombreux gènes impliqués dans la lipogenèse hépatique (Uyeda *et al*, 2002). En ce qui concerne le glucose, cela se fait par l'intermédiaire de l'activation d'un facteur de

transcription ChREBP (« Carbohydrate Responsive Element Binding Protein ») (Uyeda *et al*, 2002). En réponse à une concentration élevée de glucose, ce facteur de transcription se fixe sur les éléments de réponse aux sucres présents dans de nombreux promoteurs des gènes de la lipogenèse activant la transcription de ces gènes. Une alimentation riche en sucres stimule également la sécrétion d'insuline par le pancréas, ce qui rend difficile la différenciation *in vivo* de l'effet glucidique et insulinique (Uyeda *et al*, 2002).

À l'opposé, une alimentation riche en acides gras polyinsaturés (PUFAs) inhibe la lipogenèse en diminuant l'expression de plusieurs gènes au niveau hépatique dont celui de la FAS et de la SCD-1. Les PUFAs inhibent plus particulièrement la transcription du gène FAS en modulant l'expression de SREBP-1, un facteur de transcription essentiel à l'expression du gène (Moon *et al*, 2002). Le jeûne de façon générale réduit aussi la lipogenèse, inhibant la transcription de nombreux gènes. Effectivement, après 24 heures de jeûne, les ARNm de FAS dans le foie sont grandement réduits, tout comme l'expression de la protéine (Kim *et al*, 2002). Ces effets sont plus particulièrement dus à une augmentation de la production de glucagon, une hormone dont l'expression est fortement activée dans ces conditions (21,16). Toutefois, ce ne serait cependant pas le cas au niveau du cerveau. En effet, le niveau d'ARNm FAS et le niveau de protéines FAS ne sont pas affectés par un jeûne de 24 heures (Kim *et al*, 2002). Ces résultats suggèrent que FAS aurait une fonction différente au niveau du cerveau de son rôle de mise en réserve d'énergie, comme c'est le cas au niveau du foie et du tissu adipeux (Ronnelt *et al*, 2005).

1.1.3.2 - Régulation hormonale

L'insuline est probablement le facteur hormonal ayant le plus d'influence sur la lipogenèse. Cette hormone agit en augmentant l'incorporation du glucose par la cellule adipeuse via le recrutement des transporteurs de glucose (GLUT4) à la surface de la membrane plasmique, mais aussi en activant, par modification covalente, certaines enzymes glycolytiques et lipogéniques (Kersten S., 2001). Les voies de signalisation par lesquelles l'insuline agit sont connues et bien caractérisées impliquant une fixation de l'hormone sur son récepteur, puis l'activation de différentes kinases en aval telles que PI3-kinase et Akt (Di Guglielmo *et al*, 1998).

L'hormone thyroïdienne T3 stimule aussi la synthèse des acides gras via les récepteurs d'hormones thyroïdiennes (TR). Cependant, à la différence de l'insuline, l'hormone se fixe sur son récepteur puis le complexe est internalisé activant directement la transcription de plusieurs gènes dont la FAS. Il est intéressant de souligner que l'action de la T3 et de l'insuline serait additive (Kameda *et al*, 1991). Les glucocorticoïdes sont aussi de très forts inducteurs de la lipogenèse agissant par l'intermédiaire de leurs récepteurs GR dont le mode d'action est similaire à celui de la T3 (Goodridge *et al*, 1991).

Bien que certaines hormones augmentent la lipogenèse, d'autres au contraire semblent la réduire. C'est le cas du glucagon qui, agissant via une augmentation de l'AMPc intracellulaire et une activation de la PKA, inhibe la transcription de plusieurs gènes de la lipogenèse dont la FAS et l'enzyme malique (EM). Pour l'EM, cela se fait par une modification de la fixation de 2 facteurs de transcription, c-Jun et ATF2 sur un élément de réponse négative à l'AMPc caractérisé dans le promoteur de ce gène (Mounier *et al*, 1997).

Au niveau des adipocytes, l'hormone de croissance (GH) ainsi que la leptine auraient un effet important sur la lipogenèse (Kersten S., 2001). La leptine, produit de 16 kDa, joue un rôle très important dans la régulation de l'appétit (Zhang *et al*, 1994; Pelleymounter *et al*, 1995; Halaas *et al*, 1995; Freidman *et al*, 1998), du métabolisme énergétique (Mistry *et al*, 1997; Scarpace *et al*, 1997; Hwa *et al*, 1997; Salbe *et al*, 1997), ainsi que dans la reproduction chez les mammifères (Barash *et al*, 1996; Chehab *et al*, 1996). La leptine est sécrétée par le tissu adipeux (Zhang *et al*, 1994) des mammifères et est utilisée comme mécanisme de signalisation hormonale pour le dépôt des graisses. Les adipocytes de mammifères produisent et sécrètent une quantité plus grande de leptine dans la circulation sanguine quand la mise en réserve de graisses augmente (Maffei *et al*, 1995). Ils signalent au cerveau via les récepteurs de leptine (Banks *et al*, 1996; Hakansson *et al*, 1996; Mercer *et al*, 1996; Fei *et al*, 1997; Elmquist *et al*, 1998), et modulent ainsi l'expression de certains neuropeptides hypothalamiques afin de supprimer l'appétit tout en augmentant la dépense énergétique (Stephens *et al*, 1995; Rhoner-Jeanrenaud *et al*, 1996; Schwartz *et al*, 1996; Schwartz *et al*, 1997; Kristensen *et al*, 1998; Mizuno *et al*, 1998). Les études menées depuis les dernières années sur l'effet direct de la leptine sur le métabolisme des lipides chez les mammifères ont produit des résultats contradictoires. Les équipes de Bryson et Fukada ont montré des effets d'inhibition sur la lipogenèse (plus particulièrement du gène FAS) par la leptine, et ce au niveau des tissus

adipeux et hépatiques (Bryson *et al*, 1999; Fukada *et al*, 1999). À l'opposé, le groupe de Mick n'a trouvé aucun changement dans le transport du glucose, la lipolyse et la lipogenèse suite à une exposition normale ou chronique d'adipocytes de rat à la leptine, et ce en conditions basales ou en présence d'insuline (Mick *et al*, 1998). D'autres études sont donc nécessaires afin d'élucider les différents facteurs influençant la lipogenèse.

1.2 – Synthétase des acides gras (FAS)

1.2.1 - Purification de la FAS

Jusqu'à la fin des années 1950, les scientifiques pensaient que la synthèse des acides gras à partir de l'acétyl-CoA était en fait la réaction inverse de la voie de la β -oxydation mitochondriale, qui exécute la dégradation des acides gras en acétyl-CoA (Lynen *et al*, 1953). En 1958, le groupe de Wakil démontre que le malonyl-CoA, formé par la carboxylation de l'acétyl-CoA, est bien un intermédiaire unique de la voie de synthèse (Wakil *et al*, 1958). Ils montrèrent aussi que les enzymes impliquées dans la synthèse n'étaient pas associées au système de β -oxydation mitochondriale, mais qu'elles étaient plutôt localisées dans le cytoplasme (Gibson *et al*, 1958). En peu de temps, l'ensemble des étapes enzymatiques a été identifié (Lynen F., 1961; Wakil *et al*, 1964).

Au début des années 1970, quelques synthétases des acides gras (FASs) avaient été purifiées à partir de levures et d'animaux. Par contre, contrairement à ce qui avait été trouvé chez les procaryotes (*Escherichia coli*), ces enzymes semblaient être associées sous la forme de larges complexes (Wakil *et al*, 1964; Smith *et al*, 2003). Ceci donna lieu à la théorie selon laquelle les FASs d'origine animale et de levure étaient des complexes avec plusieurs sous-unités, pour lesquelles les activités individuelles étaient présentes sur des polypeptides différents regroupés en complexe par des liens non covalents (Kumar *et al*, 1970; Bratcher *et al*, 1976). Toutefois, lorsque toutes les précautions furent prises lors de la préparation d'extraits de FAS animale, il fut démontré qu'elle se présentait en fait sous la forme de deux polypeptides identiques, soit deux homodimères (Alberts *et al*, 1975; Stoops *et al*, 1975). Au même moment, on mis en évidence que la FAS, chez la levure, était aussi composée de larges polypeptides multifonctionnels (Knobling *et al*, 1975). Il fut alors décidé d'utiliser le terme FAS 'de type I' pour la forme animale et de levure (larges polypeptides multifonctionnels) et FAS 'de type II' pour les plantes et les procaryotes (plusieurs polypeptides monofonctionnels individuels)

(Smith *et al*, 2003). La FAS animale se présente donc sous la forme de deux sous-unités de 250 kDa (dont un homodimère est présenté à la **Figure 1.2**), alors que des analyses biochimiques et génétiques montrèrent que la FAS de levure était formée de deux sous unités non identiques de 185 et 180 kDa (Schweizer E., 1977). Vers la fin des années 1980, la séquence complète des deux sous unités de la FAS de levure, ainsi que la séquence de la FAS chez le rat et le poulet étaient connues (Schweizer *et al*, 1989; Amy *et al*, 1989; Holzer *et al*, 1989).

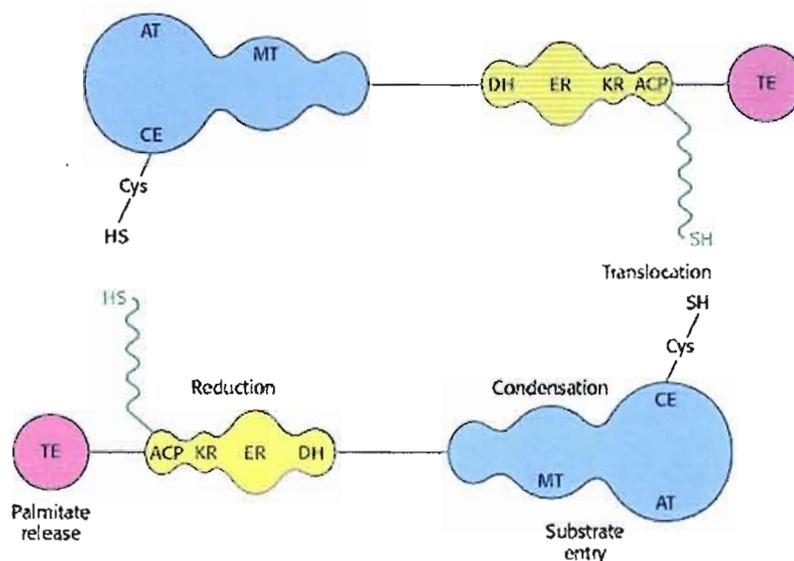


Figure 1.2 : Complexe homodimère FAS chez les mammifères. Représentation schématique d'un homodimère de 250 kDa du complexe FAS chez les mammifères. Chacune des chaînes identiques du dimère contient trois domaines. Le domaine 1 (bleu) contient l'acétyl transférase (AT), la malonyl transférase (MT) et l'enzyme de condensation (CE; « condensing enzyme »). Le domaine 2 (jaune) contient l'« acyl carrier protein » (ACP), la β -ketoacyl réductase (KR), la β -ketoacyl déshydratase (DH) et l'énolyl réductase (ER). Le domaine 3 (rose) contient la thioestérase. Tirée de Tsukamoto *et al*, 1983.

1.2.2- Mécanisme d'action

La FAS catalyse donc la deuxième réaction de la biosynthèse des acides gras. Elle effectue l'élongation des chaînes de carbone par sept étapes successives et permet la formation du palmitate et du stéarate. Les étapes permettant cette élongation sont représentées à la **Figure 1.3**. En résumé, le transfert des unités acyles de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA sur la protéine FAS débute le premier cycle. L'acétyl-CoA se fixe de manière covalente à l'enzyme et le malonyl-CoA se fixe sur la partie ACP (« acyl carrier protein »). Par décarboxylation, l'acétyl-CoA est ajouté à l'extrémité libre du malonyl-CoA. Cette nouvelle molécule est par la

suite transférée au site de fixation de l'acétyl-CoA. Une nouvelle molécule de malonyl-CoA peut maintenant se fixer à l'ACP et l'élongation continue en fixant la première molécule à quatre atomes de carbone à l'extrémité libre du malonyl-CoA (Smith *et al*, 2003).

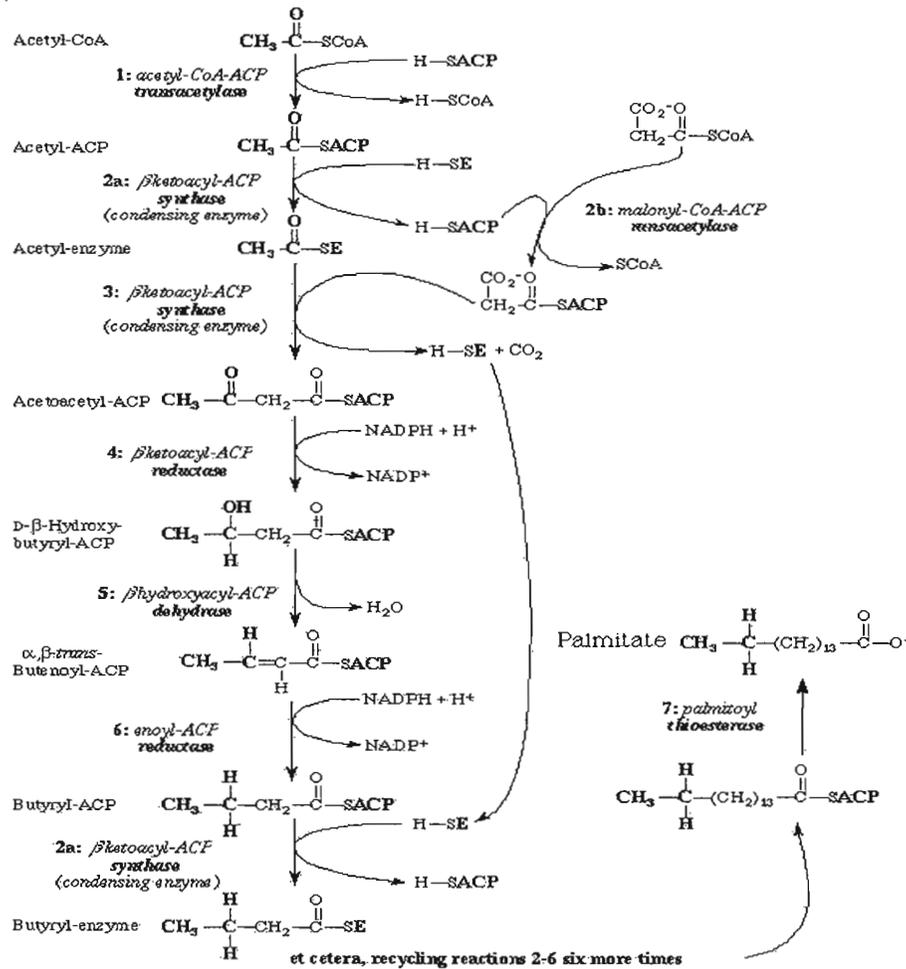


Figure 1.3 : Action de la FAS. Schéma des différentes étapes permettant l'élongation des chaînes de carbone par FAS en vue d'obtenir du palmitate. Tirée de www.humboldt.edu.

1.2.3 - Structure de la protéine FAS

Chez les vertébrés, la protéine FAS est le produit d'un seul gène qui génère une chaîne polypeptidique d'environ 250 kDa (deux monomères), laquelle est modifiée post-traductionnellement par l'addition d'un groupe phosphopantotheine (Alberts *et al*, 1984). Elle est multifonctionnelle et se présente sous la forme d'un homodimère constitué par deux sous-unités de 250 kDa. Un exemple de monomère est présenté en **Figure 1.4** (Alberts *et al*, 1984).

Pour être fonctionnelle, la FAS doit être sous la forme d'un tétramère, c'est donc dire de deux homodimères. Chaque monomère contient trois domaines N-terminaux; l'enzyme de condensation, la malonyl/acétyl-CoA transacylase et déhydratase. Ces domaines N-terminaux sont séparés par un corps de quatre domaines C-terminaux; l'enoyle reductase, la β -ketoacyl reductase, l'« acyl carrier protein » et la thioesterase (Smith *et al*, 2003). La cinétique et la spécificité de la réaction de fixation du substrat (catalysée par la malonyl/acétyl-CoA transacylase), de la réaction de condensation (catalysée par l'enzyme de condensation) et de la réaction de terminaison de la chaîne (catalysée par la thioesterase), assurent que les molécules intermédiaires ne se séparent pas de l'enzyme (Smith *et al*, 2003). Seulement les chaînes saturées sont allongées. Le principal produit libéré est le palmitate (Smith, S. *et al*, 2003).

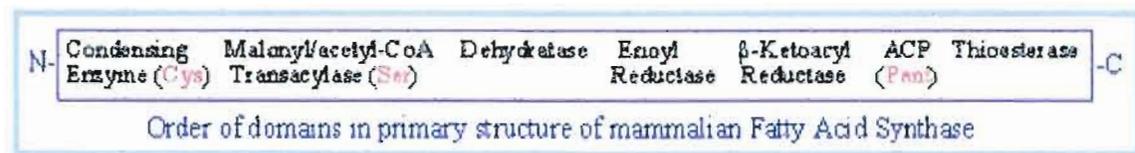


Figure 1.4 : Monomère de la FAS. Représentation de l'ordre dans lequel se présente, en structure primaire, les différents domaines du complexe enzymatique FAS chez les mammifères. Tirée de www.dentistry.leeds.ac.uk.

1.2.4 - Expression tissulaire

Alors qu'il a longtemps été la règle de penser que la synthèse *de novo* des acides gras se produisait uniquement au niveau du foie, des études récentes démontrent qu'elle se produit aussi, mais de façon moindre, au niveau des adipocytes, du moins chez le rat et l'humain (Wang *et al*, 2004). L'influence de facteurs hormonaux et nutritionnels sur la lipogénèse, et ce tant au niveau hépatique qu'adipeux, a d'ailleurs été démontrée, il y a quelques années (Kersten *et al*, 1999). Chez les humains, les résultats des études sont plus controversés. Le groupe de Aarsland a montré qu'un régime riche en sucres augmentait la synthèse totale des graisses, mais que cette augmentation ne pouvait uniquement être attribuée à la lipogénèse hépatique, suggérant ainsi que cette dernière était augmentée dans les adipocytes (Aarsland *et al*, 1997). D'autres groupes ne rapportent aucune différence de la lipogénèse ou de l'activité des enzymes lipogéniques au niveau du tissu adipeux humain suite à des changements dans la diète (Diraison *et al*, 2003; Letexier *et al*, 2003). Par contre, les études *in vitro* sur le tissu adipeux se multiplient et démontrent bien, et ce dans des lignées cellulaires de souris et des adipocytes primaires humains, que l'insuline, l'angiotensine II et les glucocorticoïdes

augmentent la lipogénèse et ces enzymes clés (Jones *et al*, 1997; Claycombe *et al*, 1998; Wang *et al*, 2004). L'activité de la FAS, ainsi que son taux de transcription sont augmentés considérablement sous ces conditions (Wang *et al*, 2004). Il est à noter que les études *in vivo* ont plus de poids que les études *in vitro*. Les différentes substances ayant de l'influence sur le niveau d'expression des gènes impliqués dans la lipogénèse, plus particulièrement sur l'expression de la FAS, font l'objet de la prochaine sous-section.

Les transcrits d'ARNm de la FAS ont été retrouvés dans la majorité des tissus; par exemple le tissu adipeux, le foie, les poumons, le cerveau, les reins, le petit intestin, de même que le placenta. Généralement, l'abondance des ARNm FAS à l'intérieur du tissu détermine le taux de synthèse de la protéine FAS, et ultimement le contenu en protéine FAS dans le tissu. Au niveau du foie, le taux de transcription du gène FAS est corrélé avec le niveau d'ARNm FAS, alors que le contenu en ARNm FAS dans le tissu adipeux serait déterminé par des facteurs affectant la transcription du gène et la stabilité des ARNm (Clarke S.D., 1993). Alors qu'il existe une modulation de l'abondance des ARNm de FAS au niveau du foie et du tissu adipeux, il semble que son expression dans d'autres tissus est indépendante des manipulations hormonales et nutritionnelles (Clarke S.D., 1993).

Tel que mentionné précédemment, la FAS est exprimée au niveau du cerveau. Alors que certains pensaient qu'elle se localisait dans les cellules non neuronales, des études immunohistochimiques ont démontré que la FAS était exprimée de façon prédominante dans les neurones de plusieurs régions du cerveau, tout comme d'autres enzymes de la voie de synthèse des acides gras (Acétyl-CoA carboxylase (ACC) et Malonyl-CoA décarboxylase (MCD)) (Kim *et al*, 2002). En ce qui concerne les oiseaux, dont notre modèle d'étude fait partie, il semble que la lipogénèse serait essentiellement hépatique (Clarke S.D., 1993).

1.2.5 – Gène FAS et région promotrice

Le gène FAS de l'oie s'étend sur approximativement 50 Kpb (Kameda *et al*, 1991), alors que celui du rat fait 20 Kpb (Amy *et al*, 1992) et la région codante du gène FAS chez l'humain ne dépasse pas plus de 19 Kpb (Jayakumar *et al*, 1995). Une comparaison des régions codantes N-terminales (résidus 1 à 352) de la FAS a permis de découvrir que l'homologie en acides aminés est de 88.5% entre l'oie et le poulet (Holzer *et al*, 1989), et de 77.3% entre l'oie et le rat (Amy *et al*, 1989). L'homologie au niveau de la séquence en acides nucléiques est quant à

elle de 81.3% entre l'oie et le poulet (Holzer *et al*, 1989) et de 61.5% entre l'oie et le rat (Amy *et al*, 1989).

Le gène FAS a été isolé chez plusieurs organismes, dont le poulet, l'oie, le rat, la souris et plus récemment chez l'humain. Les régions promotrices ont été clonées, permettant l'étude de la régulation du gène. La **Figure 1.5**, tirée de l'article de Wang *et al* (2004), montre l'alignement des régions promotrices du gène FAS pour les cinq organismes précédemment cités. Bien que de plus longs fragments aient été séquencés, ce groupe s'est concentré sur les premières 1000 paires de bases, sauf pour l'oie puisqu'au moment de la publication de leur étude, seulement 597 pb étaient disponibles (Wang *et al*, 2004). On retrouve sur cet alignement des éléments de réponse communs entre espèces. Comme on peut le voir sur la **Figure 1.5**, les 150 premières paires de bases du promoteur sont hautement conservées entre les cinq espèces. Les différences de séquences sont plus grandes au-delà de ces 150 pb. Toutefois une autre région bien conservée se retrouve entre -400 et -600. C'est dans cette région que se trouve un site de fixation à l'élément de réponse à l'insuline FAS-1 (FIRE; « FAS Insulin Response Element ») (Wang *et al*, 2004). La synthétase des acides gras est principalement régulée par la diète ainsi que par l'action d'hormones, cette régulation étant majoritairement effectuée au niveau transcriptionnel (Goodridge *et al*, 1991; Girard *et al*, 1994; Kim *et al*, 1998). Dans des adipocytes ou hépatocytes en culture ou chez des souris transgéniques exprimant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur FAS, les éléments nécessaires à la régulation hormonale, nutritionnelle de l'expression de FAS (dépendante du tissu) seraient contenus dans les premières 2,1 Kpb du promoteur (Wang *et al*, 2004). Le groupe de Latasa *et al* (2003) a d'ailleurs démontré dans un modèle de souris *in vivo* la nécessité de la présence de deux éléments, soit un SRE à -150 et une E-box -65 (agissant à titre de IRE; « Insulin Response Element »), afin d'obtenir une régulation par le glucose et par l'insuline pour le promoteur FAS de rat. Dans un article publié récemment, ils affirment que des facteurs de transcription, soit le USF-1, USF-2 et SREBP-1c jouent un rôle dominant dans la régulation transcriptionnelle du gène FAS et ils avancent même la possibilité que ces facteurs agissent de manière coopérative (Griffin *et al*, 2004). Ces facteurs de transcription agissent via les deux éléments nommés précédemment du promoteur FAS chez le rat. En effet, USF-1 et USF-2 se fixent sur la E-box à -65, alors que SREBP-1c se fixe sur le SRE classique à -150, de même qu'à un site superposé à la E-box à -65. Il a été démontré, dans des hépatocytes primaires, que la région contenue entre -151 et -42 du promoteur serait nécessaire pour la régulation de la transcription

de FAS par l'insuline et le glucose, cette région comprenant la E-box à -65, un site de fixation superposé de SREBP-1c et un site de fixation pour NF-Y et Sp1 (Magana *et al*, 2000).

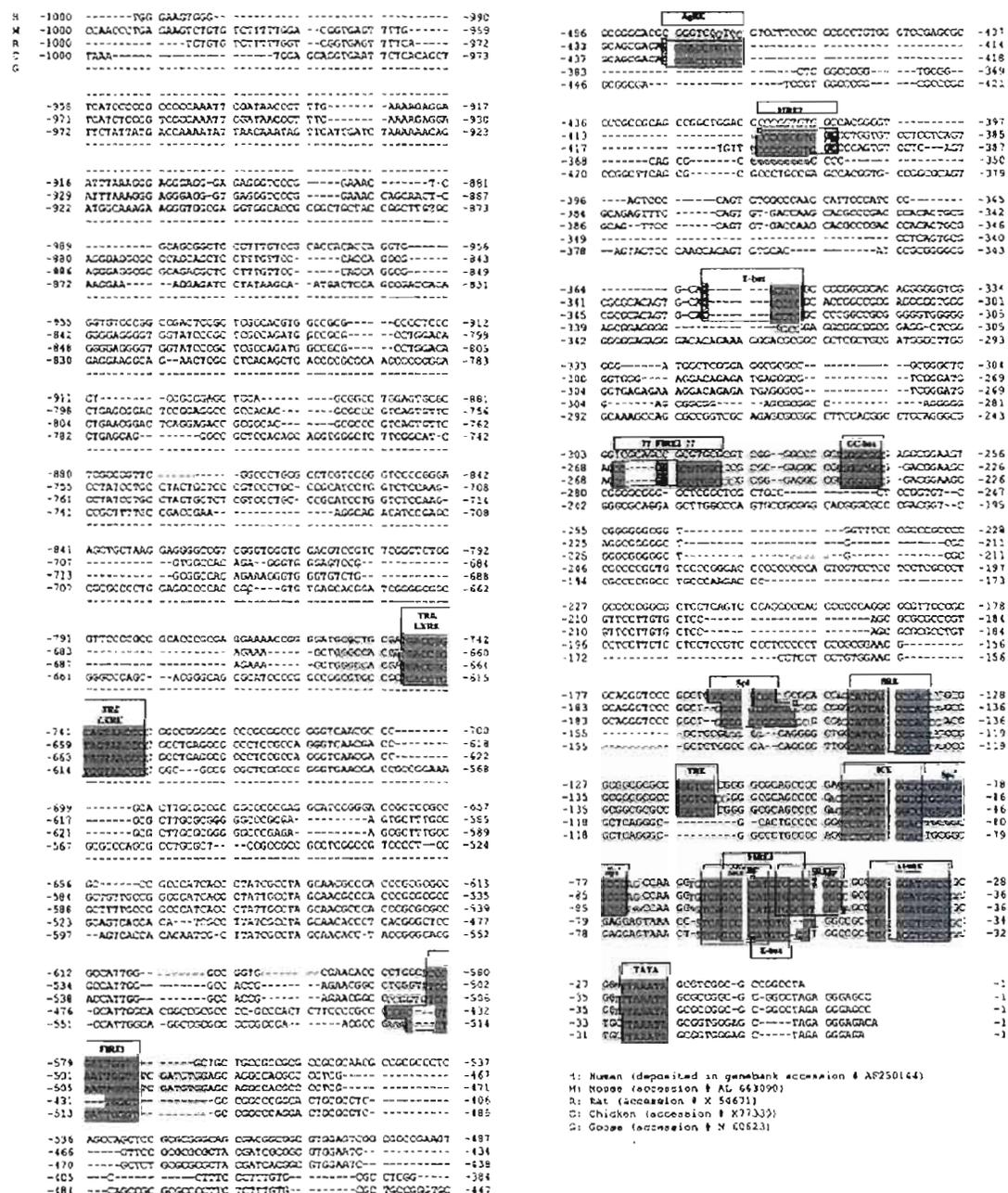


Figure 1.5 : Aligment de promoteurs FAS. Comparaison entre le promoteur FAS humain et les promoteurs FAS de souris, rat, poulet et de l'oie. Les séquences encadrées représentent des éléments régulateurs. AgRE, « agouti response element »; « E-box consensus », CANNTG; « GC-box consensus », GGGCGG; hFIRE, « hepatic FAS insulin response element »; ICE, « inverted CAATT

element »; LXRE, « liver X receptor element »; Sp1, « stimulatory protein 1 »; SRE, « sterol response element »; TATA, « TATA-box »; TRE, « thyroid response element ». Tirée de Wang *et al*, 2004.

Chez l'humain, les études menées par le groupe de Wakil ont permis d'isoler le gène FAS, de le caractériser et d'analyser la partie promotrice. Cette étude a montré que le gène FAS chez l'humain possédait deux promoteurs, le I et le II. La force du promoteur II, qui est localisé à l'intérieur de l'intron I, est approximativement égale au 1/15^e de la force du promoteur I. (Hsu *et al*, 1996).

La séquence nucléotidique de la partie promotrice du gène FAS chez l'oie est présentée en **Figure 1.6**. Kameda et collaborateurs (1991) ont séquencé 597 pb en amont du site d'initiation de la transcription. L'analyse informatique révèle la présence d'une boîte TATA à -28 pb et d'un motif CCAAT à -60. La région en amont de la boîte TATA est composée à 73% de G/C et elle contient cinq sites potentiels de liaison pour le facteur de transcription Sp1 (positions -113, -196, -247, -347 et -424). Des sites putatifs de fixation pour AP-2, C/EBP et pour les récepteurs de la T3 et de glucocorticoïdes sont aussi indiqués sur la **Figure 1.6**.

```

-597   AGTCACCACA CAATCGCTTA TCGCCTAGCA ACACCTACCG GGCACGCCAT TGGCAGGCCG
-537   CGCCCCCGCC CAACGCCCCC GCCTGATTGG GTGCCGGCCC AGGACTGCGC GTCCAGCCCG
        GRE?
-477   GCGCCCTTC TCTTTGTGCG CTGCCGGGTG CCGCGCGATC CGTGGCCCGG CCGCCGCCCG
        GRE?
-417   GCTTCAGCGC GCCCTGCCGA GCCACGGTGC CCGCGCAGTA GTAGTCCCAA CCACAGTGTG
-357   CACATCCGCG GGGCGGGGG AGAGGGACAC AGAAAGGGAC GCGGCGCTCG CTGCATGGA
        GRE?
-297   CTTGGGCAA GCCAGCGCCG GTCGCAGAGC GCGGCCTTCC ACGGCCTCCA GGGCGGGGGG
        AP-2
-237   CAGGAGCTTG GCCCAGTCCG GCGGGCACGG GCGCCCGAGC GTCCGCCCGG GCCTGCCCAA
        C/EBP
-177   GACCCCTTCC TCCTGTGGAA CGGCTCTGGC GGACAGGGGT TGGCATCACC TRE?
        AP-2
-117   CTCAGGGCGG CCCTGCCCCA GCTCTCATTG GACTGCGGGC AGGAGTAAAC TGTACGCCCA
        AP-2
-57    TGTGCGTGGC CGCCGAGGT GCGGCTGCT TAAATACCGG TGGGAGCTAG AGGGAGACAG
        +1
+4     TGAGGAGAGC GCGGAGCATC GGACGTACGC AGCTCGGCAC CCGCCGCCCG AGCGCCCGAG
+64    TCCGCCTGAA GAGCCTGCCG CGCAGCAGCC CGGTCCGGCG CTGAGCTGAC TACAGGGTCC
+124   TCTCGGCACG HindIII
        AAGCTT

```

Figure 1.6 : Séquence nucléotidique de la région 5'-flanquante du gène de la synthétase des acides gras de l'oie. +1 représente le site d'initiation de la transcription. Les flèches représentent 5 sites de liaison probables pour le facteur de transcription Sp1. Les éléments de régulation potentiels pour les glucocorticoïdes et l'hormone thyroïdienne sont surlignés, alors que les sites de fixation pour C/EBP et AP-2 sont soulignés. Tirée de Kameda *et al*, 1991.

Lors d'expériences de transfections transitoires utilisant un fragment d'ADN de 1,6 Kpb, les auteurs ont obtenu une stimulation de 2,3 fois de l'activité du gène rapporteur utilisé suite à

une stimulation à la T3, en présence d'insuline. Ce groupe a alors identifié deux zones comme étant des éléments de contrôle potentiels de la T3, soit un à -91 et l'autre à -106. Ces éléments ont été identifiés par l'analyse informatique. Les auteurs n'ont cependant pas poursuivi leurs études sur ce promoteur (Kameda *et al*, 1991).

1.3- Inhibiteurs pharmacologiques

La céruléine, ou le C75, diminue l'activité de la FAS. Cette substance avait d'abord été utilisée dans le traitement du cancer, puisqu'elle induit l'apoptose des cellules cancéreuses (Kuhajda *et al*, 1994). Il a par la suite été montré qu'elle réduit l'apport alimentaire en diminuant l'appétit et entraîne de grandes pertes de poids réversibles (Ronnnett *et al*, 2005). La céruléine est un antibiotique naturel produit à partir d'un champignon et possédant un large spectre d'inhibition sur l'enzyme FAS (Omura S., 1976; Funabashi *et al*, 1989). Ce produit entraîne une perte de poids considérable et réversible, tant chez les souris minces, qu'obèses (ob/ob) (Loftus *et al*, 2000; Makimura *et al*, 2001). Malheureusement, ce produit naturel ne fonctionne pas toujours, son efficacité étant variable selon les souches de souris. De plus, elle est très difficile à solubiliser et son action interfère avec l'acétylation des protéines (Deeney *et al*, 2000; Ronnett *et al*, 2005). C'est pourquoi les scientifiques développent un inhibiteur synthétique, le C75. En plus d'inhiber FAS, de réduire l'apport alimentaire et d'entraîner une perte de poids significative, des études ont révélé que le C75 stimulait aussi le gène CPT-1 (carnitine palmityl-transférase-1) et augmentait la β -oxydation. Des hypothèses concernant les mécanismes d'action selon lesquels la céruléine et le C75 agissent ont donc été proposées. Ces substances altéreraient le profil d'expression de certains neuropeptides liés à l'alimentation comme NPY, impliqué dans les mécanismes d'action de la leptine. Le C75 aurait toutefois de effets non désirés, ce qui explique pourquoi on cherche toujours à trouver de nouvelles molécules (Ronnnett *et al*, 2005).

1.4 – Hormones thyroïdiennes et récepteurs

Le but de notre étude étant d'étudier la régulation de la FAS par la T3, nous allons introduire ici les hormones thyroïdiennes, les récepteurs nucléaires de ces hormones, de même que leur mécanisme d'action.

1.4.1 – Hormones thyroïdiennes

La glande thyroïde, située dans la partie antérieure du cou, est composée entre autres de cellules folliculaires qui sécrètent une glycoprotéine appelée thyroglobuline. C'est à partir de ces molécules de thyroglobulines, auxquelles va s'attacher l'iode, que sont dérivées les hormones thyroïdiennes (TH). À l'exception de certains organes adultes (la rate, les testicules, l'utérus et la glande thyroïde elle-même), les TH agissent sur les cellules de presque tous les tissus. Ces hormones thyroïdiennes contiennent donc toutes les deux de l'iode; soit quatre atomes pour la thyroxine (T4) et trois atomes pour la triiodothyronine (T3). La T4 est sécrétée par les follicules thyroïdiens, alors que la majeure partie de la T3 est formée dans les tissus cibles suite à la conversion de la T4 en T3 par des 5'-déiodinases (Larsen *et al*, 1981). Elles ont des effets marqués sur la croissance, le développement et les fonctions métaboliques de tous les tissus et organes chez l'humain et autres organismes supérieurs (Wolff *et al*, 1964; Oppenheimer *et al*, 1983; Samuels H.H., 1983). La sécrétion de T3 au niveau du foie est augmentée lors de l'alimentation. La T3 est dix fois plus active que la T4 (Samuels H.H., 1983).

1.4.2 – Récepteurs nucléaires à la T3

Les récepteurs à la T3 font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires constituée par un très grand nombre de facteurs de transcription spéciaux dont l'activité est, dans plusieurs cas, régulée par leurs ligands respectifs (Mangelsdorf *et al*, 1995). Cette superfamille est généralement divisée en deux groupes. Le groupe de Type I renferme les récepteurs stéroïdiens classiques qui sont responsables des actions des hormones stéroïdiennes telles; les glucocorticoïdes, les minéralo-corticoïdes, les progestines, les androgènes et les estrogènes. Le groupe de Type II inclu les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TRs), aux acides rétinoïques (ceux de l'acide rétinoïque (RARs) et ceux du facteur X rétinoïque (RXRs)), à la vitamine D (VDR), aux peroxisomes (PPARs), ainsi que plusieurs récepteurs dits orphelins, dont le ligand reste inconnu (Dangshen *et al*, 2002).

Les récepteurs de Type I agissent en se liant à leur élément de réponse palindromique sous la forme d'homodimères (Aranda *et al*, 2001); ceux de Type II ont un mode de fonctionnement beaucoup plus complexe. Les récepteurs de Type II peuvent se lier à l'ADN sous la forme de monomères, d'homodimères et d'hétérodimères (Umesono *et al*, 1991; Forman *et al*, 1992). Les éléments de réponse auxquels ils se fixent sont aussi complexes (quoiqu'il existe des

séquences consensus) et peuvent se présenter sous la forme de séquences répétées directes ($\rightarrow \rightarrow$), inverses ($\rightarrow \leftarrow$) ou renversées ($\leftarrow \rightarrow$) (Mangelsdorf *et al*, 1995). C'est donc de cette dernière façon que fonctionne le récepteur de l'hormone thyroïdienne, puisqu'il fait partie du groupe de Type II.

La régulation transcriptionnelle via les TRs est déterminée par un réseau dynamique qui intègre l'action de plusieurs intervenants. En effet, ce réseau comprend le récepteur lui-même, son ligand, des sites de fixation à l'ADN, des facteurs de transcription auxiliaires, des corépresseurs (SMRT (famille TRAC), mSin3 et N-Cor (famille TRAC)) et coactivateurs, ainsi que les voies de signalisation cellulaire (Glass *et al*, 2000). D'ailleurs, l'abondance relative ou la disponibilité des coactivateurs par rapport aux corépresseurs peut influencer l'effet des TRs.

1.4.3 - Isoformes et expression

Les récepteurs d'hormones thyroïdiennes sont des facteurs de transcription dépendant de la fixation de leur ligand, la T3. Deux gènes codent pour les récepteurs, soit les gènes THRA et THRB, qui sont situés sur différents chromosomes, respectivement le chromosome 3 et 17 (Cheng S-Y., 2000). Suite à de l'épissage alternatif, on retrouve plusieurs isoformes de ces récepteurs, soit α -1 et α -2 (issus de THRA) ou β -0 (chez les oiseaux), β -1 et β -2 (issus de THRB). Ces différents isoformes sont présentés à la **Figure 1.7A** (sauf TR α -2 qui ne fixe pas la T3). Les TRs sont formés de structures modulaires dont le domaine de liaison du ligand en C-terminal et le domaine de liaison à l'ADN au centre de la molécule. Ils ont une homologie très grande, sauf dans leur domaine N-terminal A/B (Cheng S-Y., 2000; Yen P.M., 2001) **Figure 1.7B**. Contrairement aux récepteurs des hormones stéroïdiennes, aucune partie cytoplasmique n'a été identifiée (Samuels *et al*, 1974; Casanova *et al*, 1984), et ces récepteurs peuvent s'associer avec d'autres protéines nucléaires en absence de ligand (Samuels *et al*, 1974; Koerner *et al*, 1975; Casanova *et al*, 1984). Le récepteur d'hormones thyroïdiennes contenu dans des extraits nucléaires peut s'associer *in vitro* à l'ADN (MacLeod *et al*, 1976; Perlman *et al*, 1982).

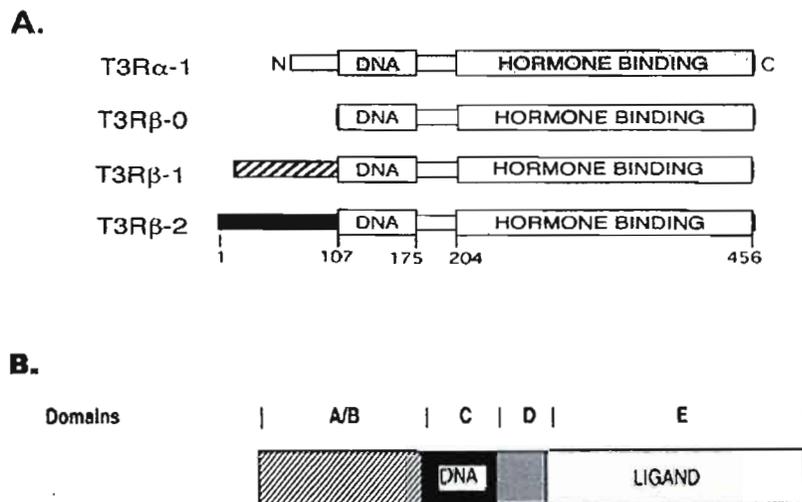


Figure 1.7 : Représentation de différents isoformes des récepteurs d'hormone thyroïdienne. A) Alignement des isoformes TR α -1 et TR β -0/1 et 2, les récepteurs qui peuvent lier la T3. Tirée de Yang *et al*, 1999. **B)** Schéma de la structure générale des TR. Les TRs contiennent un domaine N-terminal A/B, un domaine C central de liaison à l'ADN qui contient deux doigts de zinc (DBD; « DNA binding domain »), une région D contenant un signal de localisation nucléaire et finalement un domaine C-terminal E servant à la liaison du ligand (LBD; « Ligand binding domain »). Tirée de Yen P.M., 2001.

L'expression des TRs est spécifique à chaque tissu et est régulée par le développement (Cheng S-Y., 2000; Yen P.M., 2001). Les isoformes α -1 et β -1 sont exprimés de façon ubiquitaire, cependant, α -1 est exprimé majoritairement au cœur, dans les os et au cerveau (O'Shea *et al*, 2003; Zhang *et al*, 2002; Wondisford F.E., 2003), alors que TR β -1 est plus abondant au niveau du foie, du rein et de la glande thyroïde (O'Shea *et al*, 2003; Wondisford F.E., 2003). L'expression de TR β -2 est limitée à la glande pituitaire, à l'hypothalamus, la rétine et à l'oreille interne (Wondisford F.E., 2003), alors que TR β -0 l'est au niveau du cœur et du rein (Williams G.R., 2000). La modulation de l'expression durant le développement des différents isoformes des TRs a été particulièrement bien étudiée au cerveau. Chez plusieurs espèces, incluant les humains, le gène THRA est exprimé de façon hâtive (premier trimestre) au cerveau du fœtus, alors que le gène THRB est exprimé plus tard dans le développement du cerveau (Forrest *et al*, 1991; Bradley *et al*, 1992; Iskaros *et al*, 2000).

Les récepteurs TRs ont des propriétés 'doubles' de transcription, ce qui veut dire qu'ils peuvent autant réprimer qu'activer l'expression d'un gène donné, et ce selon le statut hormonal, la nature du promoteur, ainsi que le contexte cellulaire (Yang *et al*, 1999). La

capacité des isoformes α -1, β -0 et β -1 de réprimer la transcription de plusieurs de leurs gènes cibles en absence d'hormone, et d'activer la transcription de ces mêmes gènes en présence de l'hormone, est particulièrement bien caractérisée (Damm *et al*, 1989; Sap *et al*, 1989; Baniahmad *et al*, 1992; Casanova *et al*, 1994; Baniahmad *et al*, 1995; Sjoberg *et al*, 1995; Schulman *et al*, 1996). Ces propriétés de régulation particulières sont très fortement reliées à la capacité de ces récepteurs de recruter des protéines accessoires, appelées corépresseurs et coactivateurs, qui serviront à médier la réponse transcriptionnelle (Horwitz *et al*, 1996).

1.4.4 - Mécanisme d'action

Bien qu'il manque encore beaucoup d'informations afin de bien comprendre les mécanismes de fixation de la T3 à son récepteur, ils impliqueraient apparemment des modifications dans la matrice de chromatine (Pazin *et al*, 1997; Wolffe A.P., 1997). En absence d'hormone, les récepteurs lient physiquement des corépresseurs appelés SMRT et N-Cor (Chen *et al*, 1995; Horlein *et al*, 1995; Sande *et al*, 1996; Seol *et al*, 1996; Zamir *et al*, 1996). Par la suite, ces molécules recrutent, au moment opportun, un complexe protéique contenant mSin3 et une histone désacétylase, qui en hypoacétylant la chromatine, diminuerait l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN. À l'inverse, la fixation du ligand (T3) aux TRs entraîne un changement de conformation des TRs, libérant ainsi le complexe de corépresseurs, et le recrutement de complexes coactivateurs, dont plusieurs possèderaient une activité histone acétyltransférase (Casanova *et al*, 1994; Baniahmad *et al*, 1995; Chen *et al*, 1995; Horlein *et al*, 1995; Wagner *et al*, 1995; Chen *et al*, 1996; Horwitz *et al*, 1996; Sande *et al*, 1996; Schulman *et al*, 1996; Lin *et al*, 1997).

La triiodothyronine se fixe sur son récepteur au niveau du cytoplasme, tout près de la membrane nucléaire. Ce complexe est ensuite internalisé dans le noyau, où il régule la transcription des gènes en se fixant aux éléments de réponse à la T3 (T3RE ou TRE) présents dans les régions régulatrices de nombreux gènes impliqués dans la lipogenèse hépatique (Glass *et al*, 1990) (**Figure 1.8**). Les TRE consistent, tel que mentionné précédemment, en des paires de répétitions hexamériques sous la forme de palindromes de séquences répétées directes, inverses, renversées ou sous la forme de simples copies de l'hexamère (Thurmond *et al*, 1998). Ils peuvent en effet s'associer avec d'autres facteurs de transcription tels que les LXR et les RXR (Harvey *et al*, 2002).

1.5 - Exemple du promoteur du gène de l'enzyme malique

1.5.1 - Introduction

Le gène de l'enzyme malique étant régulé de façon similaire au gène FAS (régulation par les nutriments et hormones), des rapprochements peuvent donc être faits entre ces deux gènes. Le gène de l'enzyme malique étant, jusqu'à présent, beaucoup plus étudié que celui de la synthétase des acides gras, les études effectuées sur ce dernier constituent en quelque sorte des balises pour l'étude de la FAS.

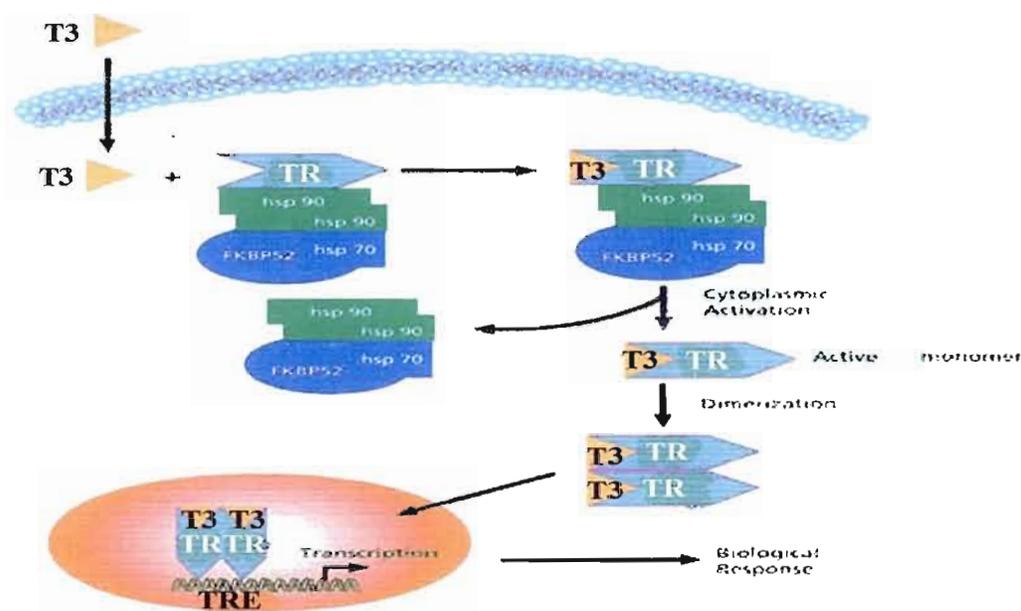


Figure 1.8 : Représentation de la voie de signalisation de la T3. Ici l'association hormone-récepteur est indiquée comme se faisant au niveau du cytoplasme. Ce schéma est présenté à titre d'exemple général, les protéines associées au complexe T3-TRE sont donc considérées comme des protéines accessoires, et ne sont, par conséquent, pas décrites. Tirée à l'origine de www.sigma.ca, mais modifiée par C. Martel.

1.5.2 - Régulateurs connus

De nombreuses études qui traitent de la régulation nutritionnelle et hormonale du gène de l'EM, ont été publiées par l'équipe du Dr A.G. Goodridge. L'activité de cette enzyme est faible lorsque les hépatocytes de poulets embryonnaires sont cultivés en absence d'hormones ou uniquement en présence d'insuline. Par contre, lorsque l'on ajoute de la triiodothyronine, on remarque une augmentation de la présence des ARNm de l'enzyme malique de 30 à 50 fois et, en présence d'insuline et de T3, une augmentation de près de 100 fois (Winberry *et al*,

1983). Les acides gras à chaînes moyennes (MCFAs), tels l'hexanoate et l'octanoate, de même que le glucagon qui n'est pas un MCFA, inhibent cette augmentation causée par l'insuline et la T3 (Winberry *et al*, 1983). Ces changements d'activité sont dus essentiellement à une modification de la transcription du gène (Roncero *et al*, 1992). Des éléments de régulation qui confèrent la propriété de réponse à la T3 et à l'hexanoate ont été localisés entre -4.1 kb et -0.41 kb en amont du site d'initiation de la transcription dans le promoteur du gène de l'enzyme malique (Hodnett *et al*, 1996). L'inhibition par les MCFAs serait due à l'action de ces composés sur les zones de réponse à la T3, empêchant ainsi l'hormone d'agir, les mécanismes exacts de leurs actions restant encore à élucider (Thurmond *et al*, 1998).

1.5.3 - Éléments de réponse à la triiodothyronine (TREs)

L'équipe de Goodridge (Luckow *et al*, 1987; Hodnett *et al*, 1996) a démontré que le gène de l'enzyme malique contenait au moins six TREs, dont cinq sont regroupés dans une unité de réponse à la T3 de 130 pb (T3RU- « T3 Unit Response ») (Hodnett *et al*, 1996). Cette unité de réponse se retrouve à 3.8 Kpb en amont du site d'initiation de la transcription et son action est complétée par un TRE supplémentaire situé à 800 pb en aval du T3RU. Les éléments de réponse contenus dans le T3RU ressemblent à des DR4, c'est-à-dire des répétitions directes séparées par 4 bases variables, et chacun apporte une contribution très variable à la réponse totale du T3RU. Ce groupe a aussi montré qu'en plus des nucléotides compris à l'intérieur des demi sites (répétitions), les nucléotides situés juste à proximité joueraient un rôle critique dans la définition des rôles propres à chaque TREs, ceci parce qu'ils lieraient de nouvelles protéines (Hodnett *et al*, 1996).

1.6 – Effets des acides gras à chaînes moyennes (MCFAs)

La T3 augmente de façon importante la transcription du gène de la FAS et de l'EM dans les hépatocytes de poulets embryonnaires (Goodridge *et al*, 1967). Il a été démontré que les MCFAs inhibaient cette induction (Roncero *et al*, 1992). Des travaux ont aussi montré que pour l'EM, l'hexanoate (C 6:0) et l'octanoate (C 8:0) sont plus particulièrement responsables de cette inhibition (Thurmond *et al*, 1998). Des résultats similaires ont d'ailleurs été obtenus au laboratoire du Dr Mounier, et ce sur la FAS. L'inhibition par les C 6:0 et les C 8:0 est sélective et spécifique dans la mesure où les acides gras à 4 ou 10 carbones n'ont pas ou peu d'effet. Les MCFAs inhibent directement la transcription, ne modifiant pas la fixation de la T3

aux TR ou celle des TR aux TREs. Contrairement aux acides gras polyinsaturés à longue chaîne qui régulent la transcription de certains gènes en se fixant directement sur un élément de réponse qui leur est spécifique ou en modifiant des protéines régulatrices, l'action inhibitrice des MCFAs se produit directement sur le complexe TRE-TR-T3. Leur(s) mécanisme(s) exact(s) d'action reste(nt) cependant encore à élucider; par contre ils pourraient agir en inhibant la fonction de transactivation du récepteur (Thurmond *et al*, 1998).

Les objectifs principaux de ce travail de recherche étaient principalement :

- d'étudier la régulation de l'expression du gène FAS de l'oie par la T3 et l'insuline en utilisant la région promotrice du gène;
- de localiser un élément de réponse à la T3 dans la partie promotrice du gène FAS chez l'oie, et finalement;
- de caractériser certains des éléments se fixant à ce TRE.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 - Matériels

Cette section présente brièvement le matériel utilisé lors de cette étude.

2.1.1 - Cellules

Dans la présente étude, plusieurs types cellulaires ont été utilisés; des cellules de la lignée LMH, des cellules de la lignée HepG2 et des hépatocytes de poulets embryonnaires.

La lignée LMH

Les cellules de la lignée cellulaire LMH sont un modèle très intéressant, puisqu'elles proviennent d'un hépatocarcinome aviaire, c'est-à-dire d'une tumeur de foie de poulet (Kawaguchi *et al*, 1987). Elles nous ont été fournies par le laboratoire de génétique animale de l'INRA à Rennes. Ces cellules sont relativement différenciées et démontrent une expression de nombreux gènes impliqués dans la lipogenèse (FAS, ACC, SCD-1) (Belloir *et al*, 1997). Elles répondent aux hormones, plus particulièrement à la T3 et à l'insuline. Par contre elles réagissent de manière souvent différente des cellules primaires.

La lignée HepG2

Les cellules de la lignée HepG2 sont des cellules transformées de foie d'origine humaine, plus précisément d'un hépatoblastome humain. Ces cellules nous ont gracieusement été fournies par le laboratoire du Dr Louise Brissette au Département des sciences biologiques de l'UQÀM. Cette lignée est intéressante car elle a aussi conservé un certain degré de différenciation, comme la sécrétion de nombreuses protéines hépatospécifiques (transferrine, albumine, protéines du complément, fibrinogène) (Knowles *et al*, 1980). Les cellules HepG2 ont un métabolisme lipidique très actif, possédant une quantité de lipides intracellulaires et un

pourcentage de triglycérides supérieur aux niveaux retrouvés chez les hépatocytes en culture primaire.

Hépatocytes de poulets embryonnaires

L'utilisation d'hépatocytes de poulets embryonnaires pour cette étude s'explique principalement par le fait que, chez cet organisme, la lipogenèse s'effectue majoritairement au niveau des cellules du foie, tout comme chez l'humain. (Goodridge *et al*, 1967; Gondret *et al*, 2001). La contribution du foie à la synthèse totale d'un organisme en acides gras varie selon les espèces, l'âge de l'animal, ainsi que la composition de la diète. De façon générale, la synthèse d'acides gras dans le foie des ruminants représente plus de 90% de la capacité de synthèse *de novo* d'acides gras chez le poulet (Clarke S.D., 1993). Ceci contraste avec ce qui se passe chez le rat et chez les autres rongeurs souvent utilisés comme modèles (souris, hamsters), où les cellules du tissu adipeux jouent aussi un rôle dans la synthèse des acides gras. De plus, le clone CosFAS5 que nous avons à notre disposition et qui contient une large partie de la région promotrice, provient de l'oie justifiant aussi l'utilisation du poulet comme modèle (l'homologie entre le gène de la FAS de l'oie et du poulet est de 81.3%) (Kameda *et al*, 1991; Le Fur *et al*, 1996). Finalement, lors d'études préliminaires utilisant la transfection transitoire d'une partie de la région promotrice du gène de la FAS dans des hépatocytes de poulets en culture primaire, il a été possible d'en mesurer l'activité, fournissant donc des preuves que ce système est bien valable pour l'étude ici proposée (Kameda *et al*, 1991; Thurmond *et al*, 1998).

Les cellules primaires sont des cellules non transformées isolées directement de tissus. Dans notre cas, il s'agissait de foies de poulets embryonnaires. Pour ce faire, nous avons à notre disposition au laboratoire un incubateur à œufs. Les œufs fécondés produits par le couvoir Simetin (Mirabel, QC, Canada) étaient reçus toutes les semaines, identifiés et placés à l'incubateur à un degré d'humidité constante et à une température entre 39-40°C. La technique employée afin d'isoler les cellules de foie d'embryons de poulets est expliquée en détails à la section suivante. Alors que les cellules de lignées permettaient la mise au point des modèles, les cellules primaires devaient permettre d'effectuer les véritables tests, celles-ci se rapprochant beaucoup plus du modèle *in vivo*. Les hépatocytes en culture ne sont pas transformés et expriment donc des réponses plus fiables aux différentes hormones que l'on ajoutait à leur milieu.

2.1.2 - Plasmides, cosmides et souches bactériennes

Plusieurs plasmides différents ont été utilisés lors de nos expériences. Tout d'abord, le vecteur pBlueScript a été majoritairement utilisé pour réaliser les sous-clonages et à séquencer le fragment proximal de la partie promotrice. Pour les expériences avec le gène rapporteur luciférase, les vecteurs utilisés ont été pGL2-Basic (contrôle négatif et clonage du fragment étudié) et le vecteur pGL2-Control contenant le promoteur du virus SV40 (contrôle positif). Pour les expériences avec le gène rapporteur CAT (chloramphenicol acétyl transférase), les vecteurs utilisés ont été pJFCAT1 (contrôle négatif, clonage des fragments étudiés), le vecteur pJFRSVCAT1 contenant aussi le promoteur de SV40 (contrôle positif) et le vecteur pBLCAT2 contenant le promoteur minimal de la thymidine kinase. Le vecteur pBLCAT2 a été utilisé pour le clonage des petits fragments internes, et ce afin de nous permettre d'en mesurer l'activité promotrice. Le vecteur d'expression pSV-SPORT1-TR α , contenant l'ADNc du récepteur TR α , a aussi été utilisé pour effectuer des expériences en condition de surexpression du récepteur. Les vecteurs étaient déjà tous disponibles au laboratoire (généreusement fourni par B.I. Posner de l'Université McGill, C. Diot de l'INRA de Rennes, F.B. Hillgartner de l'Université de West Virginia et par A.G. Goodridge de l'Université de l'Iowa), sauf le vecteur pBLCAT2 qui provient du laboratoire du Dr Éric Rassart du Département des sciences biologiques à l'UQÀM. À titre de vecteur contrôle pour mesurer l'efficacité de transfection, le vecteur pSV β -galactosidase contenant le promoteur SV40 a été utilisé. Ce dernier provenait aussi du laboratoire du Dr Rassart.

L'ADN génomique de FAS était contenu dans un cosmide nommé CosFAS5. Il s'agit d'un cosmide qui contient environ 46 Kpb du gène FAS. Cette construction d'ADN génomique inclut 12 Kpb d'ADN en aval du site d'initiation de la transcription renfermant 7 exons, ainsi que 34 Kpb en amont contenant la partie promotrice. Le clone CosFAS5, contenant une grande partie de la région promotrice du gène de la FAS vient du laboratoire du Dr A.G. Goodridge (University of Iowa), évitant ainsi de nombreuses étapes préliminaires.

Les principales souches bactériennes utilisées sont des bactéries *Escherichia coli* DH5 α , pour les expériences de clonage, ou XL1-Blue lors de l'amplification du cosmide. Au départ, ces bactéries ont été récupérées au laboratoire du Dr Rassart, puis nous en avons conservé des aliquots dans du glycérol à -80°C, afin de préparer nos propres bactéries compétentes.

2.1.3 - Solutions utilisées

Sauf lorsque mentionné, la composition des solutions utilisées est celle qui se retrouve dans la « Bible des recettes de laboratoire », soit le MANIATIS (Molecular Cloning- A Laboratory Manuel- 2nd ed. Sambrook- Fritch-Maniatis).

2.1.3.1 - Milieux bactériologiques

Le milieu de culture le plus utilisé pour nos expériences a été le Luria Bertini (LB; pH 7.4) avec ou sans antibiotique, liquide ou sous forme de gélose. Lors de la préparation des bactéries compétentes, nous avons utilisé du milieu TYM (« trypticase yeast maltose »), du TfbI et du TfbII.

2.1.3.2 - Solutions standard

Les solutions standard retrouvées normalement dans un laboratoire ont été utilisées; entre autres du Tris 2M pH 7.5, 8.0 et 8.5, 50X TAE, 5X TBE, EDTA 0.5M, NaAc 3M, bromure d'éthidium (BEt) 10mg/ml, NaCl 5M, etc. Les recettes se retrouvaient dans MANIATIS, tel que mentionné.

2.1.3.3 - Culture cellulaire

Puisque nous utilisons plusieurs types de cellules, nous avons des milieux de culture cellulaire différents. Pour les HepG2, nous utilisons le milieu MEM, pour les LMH le milieu Williams'E ou du MEM et pour les hépatocytes primaires, le milieu Waymouth. Tous ces milieux ont été achetés chez Sigma (Oakville, ON, Canada). Des antibiotiques (streptomycine 60µg/ml, pénicilline 100µg/ml) étaient ajoutés à tous les milieux utilisés; par contre uniquement les milieux MEM et Williams'E étaient additionnés de 10% de sérum de veau fœtal. Les antibiotiques ajoutés dans les milieux et la trypsine utilisée pour décoller les cellules ont aussi été achetés chez Sigma. Quant au sérum, il provenait de chez Cansera (Etobicoke, ON, Canada).

2.1.3.4 - Enzymes de restriction ou de modification

Les enzymes de restriction ou de modification ont été achetés selon leur disponibilité ou leur coût respectif. De façon générale, ils provenaient de chez GEHealthCare Bio-Sciences anciennement Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC, Canada), USB Corporation (Baie d'Urfé, QC, Canada), New England Biolabs (Mississauga, ON, Canada) ou Qiagen (Taq polymérase contenue dans le kit PCR) (Mississauga, ON, Canada).

2.1.3.5 - Produits chimiques

La majorité des produits chimiques ont été achetés chez Sigma (Oakville, ON, Canada), Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada) ou au magasin de chimie du Département de chimie de l'UQÀM. Les agents de transfection utilisés provenaient d'Invitrogen (Burlington, ON, Canada) ou Roche Diagnostics (Laval, QC, Canada).

2.2 - Méthodes

Cette section présente les techniques qui ont été utilisées tout au long de l'étude.

2.2.1 - Amplification du cosmide

Un cosmide contient les séquences cos du phage lambda et peut donc être empaqueté dans les capsides de phage. Ainsi tout l'ADN compris entre les deux sites cos est introduit dans une capside. Les cosmides ont l'avantage de pouvoir contenir d'assez longs fragments d'ADN entre 33 et 47 Kpb. Puisqu'ils sont sous la forme d'un-phage, leur entrée dans les bactéries est très efficace et ils pourront se multiplier une fois à l'intérieur de la bactérie. Le clone isolé dans le laboratoire du Dr A.G. Goodridge et reçu au laboratoire a donc tout d'abord été amplifié, afin d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour travailler.

2.2.1.1 - Encapsidation

L'ADN obtenu a tout d'abord été encapsidé grâce au kit GigaPack Gold II de Stratagene. Le réactif d'encapsidation conservé à -80°C a été décongelé, puis 1µg d'ADN cosmique a été ajouté immédiatement à ces extraits. Le mélange a été agité doucement, puis laissé à la température de la pièce durant deux heures. 500µl de tampon SM (100mM NaCl, 8mM MgSO₄·7H₂O, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 5ml de gélatine 2%) ont été ensuite ajoutés, puis 20µl de chloroforme. Le mélange a été agité, puis centrifugé afin de sédimenter les débris (le surnageant contient l'ADN encapsidé). Des dilutions de 1 :10 et 1 :50 ont ensuite été préparées dans du tampon SM (100mM NaCl, 8mM MgSO₄·7H₂O, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 5ml de gélatine 2%). Les bactéries (souche XL1-Blue) ont été infectées avec les différentes dilutions (30 minutes à température pièce, suivies d'une heure à 37°C), puis étalées sur gélose en présence d'un antibiotique pour la sélection (ampicilline). De larges quantités d'ADN ont par la suite été produites, puis isolées sur gradient de chlorure de césium (CsCl) d'après la méthode décrite par Ish-Horowicz et Burke (Ish-Horowicz *et al*, 1981). La densité optique à 260nm et 280nm a été mesurée afin de déterminer la concentration d'ADN en µg/µl. La concentration s'obtient en effectuant le calcul suivant :

$$\text{ADN en } \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{\text{D.O.}_{260\text{nm}} * 50 * 1/\text{dilution}}{1000}$$

2.2.1.2 - Analyse par restriction de l'ADN obtenu

Afin de vérifier que nous avons amplifié le bon fragment, nous avons digéré 2µg d'ADN par l'enzyme de restriction EcoRI (30 unités de l'enzyme, à 37°C, pendant 4 heures) ce qui nous donnait, suite à une migration sur gel d'agarose 1%, des patrons de bandes bien particulières par visualisation sous UV.

2.2.2 - Carte de restriction du cosmide

Cette étape a servi à orienter le choix des enzymes à utiliser afin d'isoler le fragment d'ADN contenant la partie promotrice que l'on voulait étudier.

2.2.2.1 - Digestions

Une quantité fixe d'ADN du cosFAS5 (généralement 1µg ou 5µg) a été digérée par différentes enzymes de restriction. Plusieurs enzymes ont été utilisées, dont BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI et SalI. Entre 10 à 20 U de chaque enzyme ont été utilisées. Le volume final des digestions était généralement de 30µl. Les digestions ont été effectuées à 37°C pendant 4 à 6 heures, afin d'assurer une bonne digestion.

2.2.2.2 - Migration sur gel

6µl de tampon de charge (50% glycérol, 50mM EDTA pH 7.5, 1% bromophenol blue, 1% xylene cyanol) ont été ajoutés à chaque tube, inactivant ainsi la réaction. Le contenu de chacun des tubes a ensuite été déposé sur un gel d'agarose 1% (contenant 0.4µg/ml de BEt), la migration étant réalisée à 90Volts pendant 2 heures. Suite à la migration, l'ADN est visualisé sous UV.

2.2.2.3 - Analyse des fragments de restriction obtenus

La photo obtenue a permis d'évaluer la longueur approximative de chacun (lorsque c'était possible) des différents fragments résultant des digestions effectuées. Ces longueurs ont pu être déduites en comparant les bandes obtenues à celles du marqueur de poids moléculaire utilisé. Dans notre cas, il s'agissait de l'ADN du phage Lambda digéré par l'enzyme de restriction HindIII. En se fiant sur la carte partielle réalisée par Kameda (Kameda *et al*, 1991), nous avons pu dessiner la carte de restriction du cosFAS5.

2.2.3 - Clonage d'un fragment d'ADN (fragment de restriction ou de PCR)

2.2.3.1 - Digestion par une enzyme de restriction

Le fragment à cloner doit tout d'abord être digéré par une ou deux enzymes de restriction, par exemple lorsque ce dernier se trouve à l'intérieur d'un plasmide duquel on veut l'extraire. À titre d'exemple, 10µg d'ADN du cosFAS5 ont été digérés par 30 unités de l'enzyme BamHI à 30°C pendant 3 heures, et ce dans un volume final de 50µl. 10µl de tampon de charge (50% glycérol, 50mM EDTA pH 7.5, 1% bromophenol blue, 1% xylene cyanol) ont été ajoutés au tube, puis l'ADN digéré a été migré sur un gel d'agarose 1% à 90 Volts pendant 2 heures. Suite à la migration du gel (contenant 0.4µg/ml de BET), l'ADN a été visualisé sous UV. La bande correspondant au fragment désiré a été excisée du gel en utilisant une lame de rasoir, puis placée dans un tube afin d'extraire l'ADN qu'elle contenait.

2.2.3.2 - Génération par PCR de différents fragments à partir du promoteur testé

2.2.3.2.1 - Choix des amorces et préparation

Les oligos utilisés ont tous été commandés chez Invitrogen. Ils ont tous été choisis en analysant la séquence obtenue du fragment proximal et en utilisant le site internet EMBOSS (<http://bioinfo.pbi.ncr.ca>). Chaque amorce contenait à ses extrémités des sites de restriction (6 bases) et 6 bases supplémentaires à chaque extrémité afin de les stabiliser. Les sites de restriction ont été ajoutés afin de faciliter le clonage des fragments obtenus suite aux réactions de PCR. Les amorces ont été resuspendus dans du 5T.1E (5mM Tris pH7.5, 0.1mM EDTA) afin d'obtenir une concentration de 100µM, chauffés 5 minutes à 65°C. Puis, les tubes ont été placés sur une plaque agitatrice pendant quelques heures.

2.2.3.2.2 - Amplification par PCR

Les conditions de réalisation des réactions de PCR ont dû être optimisées avant d'arriver à l'amplification des fragments de la longueur désirée. La température d'appariement, le temps d'appariement, ainsi que le temps d'élongation ont été les principaux paramètres modifiés au fil des essais. Nous présentons toutefois ici les conditions optimales que nous avons obtenues après ces différents essais. Les réactions PCR ont été réalisées en utilisant le kit Taq CORE PCR de la compagnie QIAGEN. 50 ng d'ADN, 2µl de l'amorce sens (100mM), 2µl de l'amorce anti-sens (100mM), 1µl de dNTPs (10mM), 5µl de DMSO, 1.25U de Taq DNA polymerase et

5 μ l de tampon de l'enzyme (10X) ont été mélangés dans un volume final de 50 μ l, complété en utilisant de l'eau nanopure. Les tubes ont été placés dans l'appareil TECHNE (modèle Techgene), puis les 35 cycles de la séquence suivante ont été réalisés:

Dénaturation initiale:	3 min à 94°C
Dénaturation:	1 min à 94°C
Appariement:	1 min à 45°C
Élongation:	30sec-1 min30 à 72°C (selon la taille désirée)
Élongation finale:	7 min à 72°C

Généralement 5 μ l de la réaction de PCR étaient utilisés afin de vérifier s'il y avait eu amplification et quelle était la longueur des fragments amplifiés. Cet échantillon était migré sur un gel d'agarose 1% ou 1.5% (0.4 μ g/ml de BEt), à 90-100Volts, et ce, pendant environ 60 minutes, ou selon la vitesse de migration des fragments que l'on s'attendait à obtenir. Le gel était ensuite visualisé aux UV afin de s'assurer de l'efficacité des réactions et aussi afin de voir si on obtenait une seule bande. Suite à la migration, les 45 μ l restant étaient purifiés en utilisant un montage de filtration par centrifugation pour les réactions de PCR de la compagnie Millipore, et ce, afin de concentrer les fragments amplifiés, changer le tampon et aussi afin d'éliminer les dNTPs et les amorces non incorporés. Les 45 μ l restant étaient donc déposés dans le réservoir d'échantillon de la colonne (placée préalablement dans un tube) et le volume était complété à 400 μ l avec du 5T.1E. Le montage était centrifugé à 1000g, pendant 15 minutes. La colonne était alors retirée, puis placée de façon inverse dans un nouveau tube. 20 μ l de tampon étaient alors déposés dans la partie supérieure du réservoir, puis le montage était centrifugé à 1000g pendant 2 minutes. L'ADN était ensuite récupéré dans un tube eppendorf.

2.2.3.2.3 - Digestion des produits PCR

Suite à la vérification des produits PCR et à leur purification sur colonne, 10 à 20 μ l des fragments purifiés étaient digérés en utilisant les enzymes de restriction correspondant aux sites de coupure présents aux extrémités des amorces utilisées pour la réaction PCR (BamHI et XhoI dans le tampon K pour les fragments devant être ultérieurement clonés dans le vecteur pJFCAT1 et HindIII et XbaI dans le tampon M pour ceux devant être clonés dans le vecteur pBLCAT2). 10U de chaque enzyme étaient utilisées en même temps, la réaction se déroulant dans un volume de 30 μ l à 37°C pendant 4 heures, puis 10U supplémentaires ont été ajoutées. Le volume final était ajusté à 35 μ l et la réaction était continuée jusqu'au lendemain matin.

Ceci s'explique par le fait que les fragments d'ADN amplifiés par PCR seraient plus difficiles à couper car l'enzyme doit se placer à l'extrémité du fragment PCR. La totalité de la réaction de digestion était déposée sur un gel d'agarose 1.5% (0.4µg/ml de BEt), puis migrée à 70Volts, jusqu'à la distance désirée selon les fragments à isoler. L'ADN contenu dans le gel était visualisé sous UV, en prenant bien soin de le déposer sur un morceau de pellicule plastique, les bandes d'intérêts étaient retirées à l'aide d'une lame propre et les morceaux de gel étaient placés individuellement dans un tube.

2.2.3.3 - Purification d'une bande d'ADN sur gel d'agarose

Afin de purifier l'ADN contenu dans une bande de gel, le kit QIAEXII de QIAGEN a été utilisé, et ce, selon les recommandations du manufacturier. La quantité de gel prélevée a été pesée, puis 3 volumes de tampon QX1 et 2 volumes d'eau nanopure ont été ajoutés au tube, lorsque la bande à purifier était d'une taille supérieure à 4 kb (3 volumes de tampon QX1 sont nécessaires lorsque le fragment est compris entre 100 pb et 4 kb, alors que 6 volumes de QX1 sont nécessaires quand le fragment a une taille inférieure à 100 pb). Les billes QIAEXII resuspendues ont ensuite été ajoutées, et ce en fonction de la quantité d'ADN présente dans la bande (10µl de billes lorsqu'il y a moins de 2µg d'ADN, 30µl de billes lorsqu'il y a entre 2 et 10µg d'ADN). Le tube a été placé à 50°C pendant 10 min, en agitant le contenu à toutes les 2 min. Le tube a été centrifugé 30 sec à vitesse maximale, et le culot de billes resuspendu dans 500µl de tampon QX1. Le tube a encore été centrifugé, puis le culot a été rincé deux fois avec du tampon PE. Le culot de billes a été séché environ 30 min à 37°C. Le culot sec a été resuspendu dans 20µl de 10mM Tris-HCl pH 8.0, puis placé à 50°C pendant 5 min, puisque le fragment désiré a une taille comprise entre 4 et 10 kb (5 min à température pièce pour un fragment plus petit que 4 kb, 10 min à 50°C pour un fragment supérieur à 10 kb). Une centrifugation de 30 sec à vitesse maximale a permis de récupérer le surnageant contenant l'ADN purifié.

2.2.3.4 - Clonage d'un fragment d'ADN dans un vecteur (pBlueScript ou autre)

Voici les différentes étapes réalisées afin de cloner un fragment d'ADN d'intérêt à l'intérieur d'un vecteur.

2.2.3.4.1 - Ligation

Le vecteur utilisé pour le clonage est digéré préalablement par une ou deux enzymes correspondant aux mêmes enzymes utilisées pour digérer les fragments à cloner. Lorsqu'un seul site de restriction est utilisé pour le clonage, il est préférable de déphosphoryler le vecteur, afin de favoriser la ligation avec le fragment à cloner, et en évitant la recircularisation du vecteur de clonage sur lui-même. Cette réaction est réalisée dans un volume final de 50µl en utilisant 10 à 15U de phosphatase alcaline provenant d'intestin de veau, à 37°C pendant 15 min. L'ADN du vecteur est ensuite purifié par une extraction au phénol/chloroforme, précipité avec de l'éthanol 100%, lavé avec de l'éthanol 70%, et finalement resuspendu dans 10µl de 5T.1E. La ligation du vecteur déphosphorylé avec le fragment isolé a été réalisée, lorsque cela était possible, dans un volume final de 10µl en utilisant 5U de l'ADN ligase du phage T4. Cette réaction a été réalisée à 16°C pendant toute la nuit. Afin de favoriser la ligation de l'insert au vecteur, des quantités plus grandes d'ADN de l'insert étaient utilisées lors de l'étape de ligation, soit un rapport allant de 3 :1 (3 fois plus de molécules d'insert que de vecteur) et même jusqu'à un rapport de 10 :1.

La partie proximale à l'étude a été sous-clonée dans le vecteur pBlueScript (notamment pour le séquençage), puis clonée dans les vecteurs pGL2-Basic et pJFCAT1. Les délétions successives ont été clonées dans le vecteur pJFCAT1, alors que le fragment 'TRE'-FAS et les petits fragments obtenus à partir de la construction 'TRE'-FAS ont été clonés dans le vecteur pBLCAT2.

2.2.3.4.2 - Préparation de bactéries compétentes

Les bactéries utilisées pour l'amplification des plasmides recombinants ont été préalablement rendues compétentes au laboratoire. Une colonie de bactéries *E.coli* DH5α (ou XL1-Blue), isolée sur une boîte de milieu gélosé LB, a servi à ensemercer 5 ml de milieu TYM (2% bactotryptone, 0.5% d'extrait de levures, 0.1M NaCl, 10mM MgSO₄). Le tube a été placé 2 heures sous agitation à 37°C, puis son contenu a été transféré dans 100ml de TYM à 37°C sous agitation, et ce jusqu'à l'obtention d'une DO comprise entre 0.5 et 0.8. Les bactéries ont alors été séparées en deux tubes et centrifugées (SS34) à 3000 rpm, 12 min. Les culots recueillis ont été soigneusement égouttés, chacun a été repris sur glace dans 15ml de TfbI (30mM KAc, 100mM KCl, 10mM CaCl₂, 15% glycérol, 50mM MnCl₂ ajouté extemporanément), puis laissés sur glace 5 à 10 min. Les tubes ont été centrifugés à 4°C, 8 min à 3000 rpm et les culots

ont été resuspendus dans 4ml de TfbII (10mM NaMOPS pH 7.0, 7.5mM CaCl₂, 10mM KCl, 15% glycérol) sur glace. Les bactéries ont alors été aliquotées par 100 ou 200µl dans des tubes eppendorfs stériles, puis congelées dans un bain de glace sèche/éthanol avant d'être placées à -80°C.

2.2.3.4.3 - Transformation bactérienne

La totalité de la réaction de ligation, en moyenne de 100 à 200ng d'ADN, a été déposée dans un tube de 13ml contenant 50µl de bactéries compétentes. Ce mélange a été placé sur glace pendant 30 min, en agitant légèrement le tube à l'occasion. Un choc thermique de 90 sec a été réalisé à 42°C, avant de remettre le tube sur glace 2 min. 950µl de milieu LB (1% bactotryptone, 0.5% d'extrait de levures, 1% NaCl) préchauffés à 37°C ont été ajoutés au tube, puis ce dernier a été placé sous agitation à 37°C pendant 1 heure. Le tube a été centrifugé 5 minutes à 1000 rpm, à 4°C. Le culot de bactéries a alors été resuspendu dans 200µl de milieu LB, puis des aliquots de 100µl ont été étalés sur des pétris de milieu LB contenant de l'ampicilline (100µg/ml) et sur lesquels on avait préalablement étalés 20µl de X-gal 2% et 100µl d'IPTG 100mM si nécessaire (sous-clonage dans pBlueScript). La présence de ces produits sur le milieu permet de différencier les colonies ayant inséré l'ADN transformé de celles ne l'ayant pas inséré. Les colonies positives étaient de couleur blanches et celles négatives étaient de couleur bleues. Les pétris ont été placés à l'incubateur à 37°C pendant environ 16 heures. Les colonies positives ayant poussé ont ensuite été mises en préculture dans 3ml de LB avec ampicilline (100µg/ml) à 37°C sous agitation toute la nuit. Des contrôles positifs (vecteur circulaire) et négatifs (vecteur non circularisé) étaient aussi réalisés, et ce, particulièrement lorsque le système de sélection bleu/blanc n'était pas utilisé.

2.2.3.5 - Mini-préparation d'ADN plasmidique

La technique de lyse alcaline utilisée pour l'analyse rapide des clones plasmidiques obtenus a été décrite par Birnboim et Doly (1979) et modifiée par Ish-Horowicz et Burke (1981). Ainsi 1.5ml de la culture bactérienne cultivée à 37°C pendant la nuit a été centrifugée 1 min à vitesse maximale. Les bactéries ont ensuite été resuspendues dans 100µl de solution I froide (50mM glucose, 10mM Na₂ EDTA, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 4mg/ml lysozyme ajoutés extemporanément) et laissées 5 min à la température de la pièce. La suspension a alors été incubée 5 min dans la glace en présence de 200µl de solution II (1% SDS, 0.2M NaOH). La

solution a été neutralisée par l'addition de 150µl d'acétate de potassium 3M pH 4.8 et le mélange a été incubé 5 min dans la glace. Les débris cellulaires bactériens et la majeure partie de l'ADN chromosomique sont éliminés par une centrifugation de 5 min à vitesse maximale. L'ADN plasmidique est ensuite purifié par deux extractions au phénol/chloroforme, puis précipité à l'éthanol 100%. Après rinçage à l'éthanol 70%, l'ADN est finalement repris dans 50µl de 5T.1E additionné de RNase A sans DNase (20µg/ml).

2.2.3.6 -Vérification des clones

10µl de l'ADN plasmidique recueilli ont été digérés par 10U de l'enzyme de restriction appropriée, afin de vérifier la présence du fragment cloné. Les digestions ont été migrées sur gel d'agarose 1% et l'ADN a été visualisé sous UV.

2.2.3.7 - Maxi-préparation d'ADN plasmidique

De grandes quantités d'ADN plasmidique des constructions désirées ont été produites en utilisant le kit de maxi-préparation d'ADN plasmidique de la compagnie QIAGEN (QIAGEN Plasmid Maxi kit), et ce selon les recommandations du manufacturier. 250 à 500µl de culture bactérienne ont servi à inoculer 500ml de milieu LB (1% bactotryptone, 0.5% d'extrait de levures, 1% NaCl) supplémenté en ampicilline (100µg/ml), puis ce mélange a été placé à 37°C sous agitation pendant 16 heures. La culture a été centrifugée à 4°C, à 6000 rpm pendant 15 min. à l'aide du rotor JA-14 pour centrifugeuse Beckman Coulter H2-JS. Le culot bactérien a été resuspendu dans 10ml de solution P1. 10ml de solution P2 ont été ajoutés. Le mélange a été agité doucement, puis laissé à la température de la pièce pour 5 min. 10ml de tampon P3 ont ensuite été ajoutés et le mélange a été agité, puis laissé sur glace pendant 20 min. Le mélange a été centrifugé à 20 000g pendant 30 min, à 4°C. Le surnageant a été récupéré rapidement, puis centrifugé à nouveau à 20 000g pendant 15 min. Pendant ce temps, une colonne QIAGEN-tip 500 a été équilibrée en utilisant 10ml de tampon QBT. Le surnageant récupéré a ensuite été déposé sur la colonne. La colonne a été lavée deux fois en utilisant 30ml de tampon QC. L'ADN a été récupéré en déposant 15ml de tampon QF. L'ADN a été précipité avec 10.5ml d'isopropanol, le contenu du tube a été agité et le tube a été centrifugé à 15 000g, à 4°C pendant 30 min. en utilisant le rotor JA-17. Le culot obtenu contient l'ADN plasmidique. Ce culot a été lavé avec 5ml d'éthanol 70%, puis le tube a été centrifugé à nouveau à 15 000g, à 4°C, pendant 10min. Le culot a été séché pendant 5 à 10 min, puis

l'ADN a été resuspendu dans un volume adéquat (selon la taille du culot obtenu) de solution 10mM Tris-Cl, pH8.5. La concentration de l'ADN récupéré a été calculée de la même façon qu'au point 2.2.1.1.

2.2.3.8 - Séquençage et analyse des séquences

Le séquençage de l'ADN du clone obtenu a été réalisé, suite à la préparation de la maxi-préparation d'ADN plasmidique, à l'Institut Sheldon de l'Université McGill à Montréal avec les amorces T3 (sens) et T7 (anti-sens) du vecteur pBluescript. Lorsque d'autres oligonucléotides ont été nécessaires, ces oligonucléotides ont été choisis grâce au programme EMBOSS (<http://bioinfo.pbi.nrc.ca>) et ils ont servi à séquencer de nouveau le fragment. L'analyse des différentes séquences obtenues a été réalisée en utilisant le même programme et aussi manuellement, en comparant les séquences entre elles, de même qu'à la séquence de Kensuke Kameda (Kameda, 1991).

2.2.4 - Culture cellulaire (LMH, HepG2, CEH)

2.2.4.1 - Culture de lignées; cellules LMH et HepG2

Les cellules LMH, issues d'un hépatocarcinome de poulet ont été cultivées en milieu Williams'E ou MEM (Sigma) contenant 10% de SVF (Cansera) et des antibiotiques (streptomycine 60µg/ml, pénicilline 100µg/ml). Les cellules HepG2 ont été cultivées en milieu MEM (Sigma) contenant 10% de SVF (Cansera) et des antibiotiques (streptomycine 60µg/ml, pénicilline 100µg/ml). Les cellules LMH et HepG2 étaient cultivées en flacons de 75mm² à 37°C, sous une atmosphère contenant 5% CO₂. Les cellules étaient réensemencées lorsqu'elles étaient à confluence, soit environ une fois par semaine (décollées avec 1ml de trypsine (Sigma)) et diluées au 12^e. Le milieu de culture des cellules était renouvelé à tous les deux jours.

2.2.4.2 - Préparation et culture des hépatocytes embryonnaires de poulet (CEH)

Les cellules primaires ont été isolées à partir de foies d'embryons de poulet de 19 jours. Ce protocole est adapté de la technique mise au point par A.G. Goodridge (Goodridge, 1973). Une mise au point particulière a été réalisée au laboratoire. Tout le protocole a été réalisé en utilisant des instruments et des solutions stériles. L'œuf est d'abord trempé dans une solution de javellisant à 5%, afin d'éliminer les saletés ou bactéries se trouvant sur la coquille. L'œuf

est craqué, la vésicule ombilicale (« yolk sac ») séparée de l'embryon, la tête coupée, puis l'embryon est trempé dans une solution d'éthanol 70%. L'abdomen de l'embryon est ouvert de bas en haut et le foie est retiré avec la vésicule biliaire. Cette dernière est ensuite détachée du foie, en évitant de la percer, le contenu de celle-ci pouvant endommager sérieusement les hépatocytes. Les foies récupérés (une douzaine) sont placés dans 25ml de MKRBB préalablement filtrés (1.54M NaCl, 1.54M KCl, 0.77M MgSO₄, 0.77M KH₂PO₄, 25mM NaHCO₃) et gazéifiés (95%O₂, 5%CO₂) pendant une heure. Cette étape, ainsi que les suivantes, sont réalisées sur glace. Le surplus de liquide est aspiré et les morceaux de foies sont placés dans un erlenmeyer contenant 40ml de MKRBB additionné de 20mg de collagénase H de chez Roche Diagnostics (Laval, QC, Canada). Ce mélange est placé à 37°C, sous agitation (150-200 rpm), pendant une heure, en gazéifiant le mélange toutes les 20 minutes. Le contenu de l'erlenmeyer est ensuite filtré à travers deux couches de bas de nylon montés sur un entonnoir (stérile), et le mélange filtré est ensuite centrifugé 3 fois à 900rpm pendant 5 minutes et à 4°C. Après chaque centrifugation, le surnageant est aspiré, puis les cellules sont resuspendues dans 10ml de MKRBB, 40ml de MKRBB et finalement 5ml de milieu Waymouth froid à la fin de la dernière centrifugation. Le volume de cellules isolées est alors mesuré (généralement entre 1.0 à 1.5ml), puis une dilution 1:9 est effectuée. Par exemple, si la quantité de cellules isolées est de 2.0ml, le volume final du mélange cellules+milieu sera de 20ml. Un mélange est alors préparé avec du milieu afin que 220µl de ce mélange soient déposés dans chaque puits (35mm*10mm). Les hépatocytes étaient cultivés dans du milieu Waymouth (Sigma), sans sérum et sans antibiotique dans des plaques 6 puits « TC-treated » (Sarstedt, Montréal, QC, Canada).

2.2.5 - Transfections

2.2.5.1 - Cellules LMH

Un jour avant les transfections, les cellules LMH à confluence dans les flacons de culture de 75 mm² étaient décollées avec 1-2 ml de trypsine (Sigma), puis réensemencées à raison de 1 à 2*10⁶ cellules par puits, dans des plaques 6 puits et dans un milieu qui ne contenait pas d'antibiotique, mais avec 10% de SVF. 24 heures après la mise en plaque, l'ADN à transférer (total de 2µg) était dilué dans 250µl de milieu sans sérum et sans antibiotique, puis mélangé doucement. Les différentes constructions utilisées étaient les suivantes; FAS1.6-pGL2, pGL2-Basic (contrôle négatif), pGL2-Control (contrôle positif), pBlueScript et pSVβ-galactosidase

(contrôle d'efficacité de transfection). 1µl de Lipofectamine 2000 était parallèlement dilué dans un volume final de 250µl, puis laissé à température de la pièce pendant 5 minutes. Le mélange qui contenait l'ADN et celui qui contenait la Lipofectamine 2000 étaient par la suite déposés dans un même tube, mélangés, puis laissés à température de la pièce pendant 20 minutes. Pendant ce temps, les cellules à transfecter étaient rincées deux fois avec du PBS froid, puis 1.5ml de milieu MEM sans sérum et sans antibiotique était ajouté. Le mélange de transfection de 500µl était ensuite ajouté aux cellules. Les plaques étaient replacées à l'incubateur à 37°C pour une période de 24 ou 48 heures. Toutefois le milieu de transfection était changé après 6 heures. Les expériences de transfection étaient réalisées en duplicata ou en triplicata.

2.2.5.2 - Cellules HepG2

Les transfections ont été réalisées de la même façon qu'au point 2.2.5.1. Par contre 5µl de Lipofectamine 2000 ont été utilisés par puits. 24 heures après les transfections, les cellules étaient stimulées avec 1.6µM de T3 ou un mélange contenant 1.6µM de T3 et 50mM d'insuline, et ce pour 48 heures. Les stimulations étaient toujours réalisées dans du milieu sans sérum.

2.2.5.3 - Hépatocytes embryonnaires de poulet

Les transfections ont été réalisées en utilisant de la Lipofectine, commercialisée aussi par la compagnie Invitrogen. Environ 6 heures après la mise en plaque des cellules, 2µg totaux d'ADN (1.5µg construction à tester ou pBluescript; 0.5µg de pSVβ-galactosidase) sont dilués dans un volume final de 100µl de milieu Waymouth. Que ce soit pour les contrôles, la construction contenant le fragment total, celles contenant les délétions successives ou celles contenant les petits fragments dérivés de la construction 'TRE'-FAS, les quantités d'ADN transfectées sont toujours demeurées les mêmes. Lorsqu'il y avait surexpression du récepteur TRα, 0.25µg de l'ADN du récepteur, 0.25µg du contrôle de transfection et toujours 1.5µg de la construction à tester étaient mélangés. 15µl de Lipofectin étaient dilués dans 100µl de milieu Waymouth, puis laissés à la température de la pièce 30 à 45 minutes. Le mélange contenant l'ADN y était ajouté, le tout agité et laissé 10 à 15 minutes à la température de la pièce. 800µl de milieu étaient ajoutés aux tubes, puis le mélange était déposé sur les cellules, préalablement rincées deux fois avec du PBS à 37°C. Les cellules étaient replacées à l'incubateur à 39°C.

Après 24 heures, le milieu était renouvelé et les cellules stimulées avec 1.6 μ M de T3 ou un mélange contenant 1.6 μ M de T3 et 50mM d'insuline. Les stimulations étaient toujours réalisées dans du milieu sans sérum.

2.2.6 - Analyse de l'activité promotrice des différentes constructions réalisées

2.2.6.1 - Lysats cellulaires (pour l'essai luciférase)

Suite à l'incubation de 24 à 48 heures, les cellules étaient rincées deux fois avec du PBS froid, puis grattées à l'aide d'un râteau. Une centrifugation à basse vitesse (700-1000 rpm) et à 4°C permettait d'obtenir un culot de cellules au fond du tube. Les cellules étaient ensuite resuspendues dans 200 μ l de tampon (0.1M Tris-HCl pH 7.8, 1mM EDTA, 1mM DTT, 10 μ g/ml d'inhibiteur de trypsine, 1mM PMSF), puis lysées par étapes successives de congélation/décongélation. La congélation (minimum 10 minutes) était réalisée dans un bain de glace sèche et d'éthanol et la décongélation au bain-marie à 37°C et cette opération était répétée trois fois. Les tubes étaient par la suite centrifugés à vitesse maximale pendant 10 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. À partir du surnageant de ces lysats cellulaires différents dosages étaient réalisés.

2.2.6.2 - Lysats cellulaires (pour l'essai CAT-ÉLISA)

Les lysats cellulaires sont préparés en utilisant le tampon de lyse fourni avec le kit CAT-ÉLISA de chez Roche Applied Sciences, et selon les recommandations du fournisseur. Après 48 heures en présence ou non d'hormones, chaque puits est rincé trois fois avec 2ml de PBS froid. Suite au dernier rinçage, 500 μ l de tampon de lyse (dont la composition n'est pas indiquée dans le guide d'utilisateur, ni sur le site de la compagnie) sont ajoutés. Les plaques sont laissées à la température de la pièce pour 30 minutes, puis légèrement agitées à la main afin de bien décoller toutes les cellules. Le surnageant récupéré est centrifugé à vitesse maximale, à 4°C, et ce, pendant 15 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. Lorsque l'essai CAT-ÉLISA n'était pas réalisé immédiatement, des échantillons étaient congelés sur glace sèche et placés à -80°C.

2.2.6.3 - Essais luciférase

Les essais luciférase ont été réalisés en utilisant le 'Luciferase assay system' de la compagnie Promega et le luminomètre Monolight™ 3010 de BD Biosciences Pharmingen. Brièvement, 100µl du réactif luciférine étaient ajoutés automatiquement par le luminomètre (programme déjà établi) à 20µl de lysat cellulaire déposé dans un tube en plastique. Le tube utilisé à titre de blanc contenait 20µl de tampon de lyse. Les différentes lectures obtenues étaient exprimées en RLU (« relative light units »), soit des unités d'intensité lumineuse relative.

2.2.6.4 - Dosage de l'activité CAT

L'activité CAT a été évaluée en utilisant le kit de CAT-ÉLISA de la compagnie Roche Applied Sciences, et ce selon les recommandations du fournisseur. 50µg ou 100µg de protéines ont été utilisées par essai, lorsque cela était possible. Les puits contenant des protéines ont été couverts avec de la pellicule plastique auto-collante. La plaque a été placée à 37°C pendant 3 heures pour permettre la liaison spécifique de la protéine CAT à l'anticorps CAT fixé à la surface de la microplaque. La plaque a ensuite été rincée 5 fois avec du tampon de lavage. Le premier anticorps, soit 200µl d'anti-CAT-DIG dilué (anticorps dirigé contre la protéine CAT couplé à la digoxigénine), a été déposé dans chaque puits, puis l'incubation à 37°C s'est poursuivie pendant 1 heure. 5 autres rinçages ont suivi, puis le deuxième anticorps, soit 200µl d'anti-DIG-POD dilué (anticorps dirigé contre la digoxigénine couplé à la peroxidase), a été déposé dans chaque puits et l'incubation à 37°C s'est encore poursuivie pour 1 heure. Les puits ont encore été rincés 5 fois avec du tampon de lavage, puis finalement le substrat POD ABTS (substrat de la peroxidase), auquel l'activateur de substrat (« substrate enhancer ») avait été ajouté à raison de 1mg/ml, a été déposé dans les puits. Les puits ont été incubés à la température de la pièce, dans l'obscurité, jusqu'à l'apparition d'une coloration verte, puis l'absorbance à 405nm a été mesurée. L'apparition de la couleur provient du fait que la peroxidase présente dans les puits va catalyser la réaction de clivage de son substrat.

2.2.6.5 - Dosage des protéines

La quantité de protéines était évaluée en utilisant la méthode de Bradford (Bradford, 1976) permettant ainsi de standardiser les résultats finaux par la quantité de protéines contenue dans l'extrait cellulaire. Le volume généralement utilisé afin d'effectuer le dosage des protéines pour les cellules LMH était de 10µl de lysat cellulaire. Les dosages étaient effectués en

duplicata. En même temps que la préparation des échantillons, une courbe standard dont la quantité en protéines variait de 0 à 25 μ g était aussi préparée. Cette courbe standard était préparée avec de la BSA (250 μ g/ml). Les protéines à doser étaient diluées avec de l'eau nanopure dans un volume final de 500 μ l, puis 2ml de la solution de Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent) préalablement diluée 1:4 avec de l'eau nanopure étaient ajoutés. Le mélange était vortexé, puis transféré dans une cuvette de lecture. Les lectures étaient réalisées à 595nm à l'intérieur de 60 minutes. Le premier tube de la courbe standard correspondait à 0 μ g et servait de blanc pour ajuster le spectrophotomètre. Suite aux lectures, l'équation de la courbe standard était calculée, puis utilisée afin de déterminer la quantité de protéines de chacun des échantillons.

Pour les cellules HepG2 et les hépatocytes embryonnaires de poulet, des quantités différentes d'extraits cellulaires ont été utilisés afin d'effectuer les dosages. De façon générale, 10 μ l d'extrait étaient nécessaire dans le cas des cellules HepG2, alors que de 30 à 50 μ l d'extrait étaient parfois nécessaire dans le cas des hépatocytes. Une fois la quantité de protéines déterminée, nous pouvions calculer la quantité d'extrait cellulaire nécessaire à la réalisation du dosage de l'activité CAT (voir 2.2.6.4).

2.2.6.6 - Dosage de l'activité β -galactosidase

Le dosage de l'activité β -galactosidase (Sambrook, 2000) était effectué afin d'évaluer l'efficacité de transfection, efficacité pouvant varier d'un puits à l'autre et d'une préparation d'ADN à l'autre. 2 à 10 μ l de lysat cellulaire étaient utilisés pour mesurer l'activité pour les cellules LMH. 269 μ l du mélange de réaction contenant 3 μ l de Mg 100X (0.1M MgCl₂, 4.5M β -mercaptoéthanol), 66 μ l d'une solution d'ONPG à 13mM et 200 μ l de tampon NaPO₄ (200mM Na₂PO₄·7H₂O; 200mM NaH₂PO₄·H₂O) étaient ajoutés à chacun des tubes. L'incubation se faisait à 37°C, et ce, pour environ 30 minutes ou jusqu'à l'apparition d'une coloration jaune. Un blanc était aussi réalisé avec la même quantité de tampon de lyse. Suite à l'apparition de la coloration jaune, 500 μ l d'une solution de Na₂CO₃ 1M étaient ajoutés afin d'arrêter la réaction. Les tubes étaient vortexés et placés sur la glace en attendant que leur contenu soit transféré dans une cuvette de lecture. La densité optique des échantillons était évaluée à 420nm.

Le dosage de l'activité β -galactosidase a été effectué de la même manière pour les cellules HepG2 et les cellules primaires. Des quantités différentes de lysat ont cependant été utilisées. 10 à 20 μ l d'extrait étaient utilisés pour les HepG2, alors que généralement 30 μ l l'étaient pour les cellules primaires.

2.2.6.7 - Calculs

2.2.6.7.1 - Calcul de l'activité luciférase standardisée

Afin d'obtenir un résultat qui tenait compte de la quantité de protéines et de l'activité β -galactosidase de chacun des échantillons, la valeur en RLU obtenue devait subir l'opération mathématique suivante :

$$\text{Act luciférase standardisée} = [\text{RLU} / \text{protéines (en } \mu\text{g})] / \text{DO } \beta\text{-gal}$$

2.2.6.7.2 - Calcul de l'activité CAT standardisée

Puisque l'activité CAT obtenue était déjà standardisée par la quantité de protéines, il ne restait qu'à standardiser avec l'activité β -galactosidase. Ceci équivaut donc uniquement à la formule suivante :

$$\text{Act CAT standardisée} = \text{Act CAT calculée} / \text{DO } \beta\text{-gal}$$

2.2.6.7.3 - Analyse statistique

L'analyse statistique pour chaque condition de stimulation a été réalisée par analyse de variance ou ANOVA. L'écart-type à la moyenne est présenté sur les graphiques lorsque ceci est possible, et ce afin d'indiquer le degré de variabilité entre les données issues d'expériences différentes.

2.2.7 - Retards sur gel

2.2.7.1 - Choix des oligonucléotides et préparation

Les oligonucléotides utilisés ont tous été commandés chez Invitrogen et préparés selon la façon décrite au point 2.2.6.1. Toutefois, une lecture de DO à 260nm a été effectuée, puis le calcul de la concentration des oligos a été fait en utilisant la formule suivante :

$$\text{oligos en } \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{\text{D.O.}_{260\text{nm}} * 30 * \text{l/dilution}}{1000}$$

Pour la compétition spécifique, les mêmes oligos sens et anti-sens 'TRE' de 40pb ont été utilisés, mais ces derniers n'étaient pas marqués. Pour la compétition non-spécifique, les oligos de 32pb utilisés étaient issus d'un EST rétroviral. Afin de réaliser les réactions de compétition spécifique et non spécifique, des tubes contenant un mélange de chaque couple d'oligos (sens et anti-sens) de concentration de 62.5ng/μl (50X) et 125ng/μl (100X) ont été préparés.

2.2.7.2 - Préparation d'extraits nucléaires

Les cellules HepG2 à confluence dans les flacons de culture de 75 mm² sont décollées avec 1-2 ml de trypsine (Sigma), puis déposées à raison de 1-2*10⁶ cellules par pétri (3 pétris par condition), dans du milieu MEM avec 10% de sérum, mais ne contenant pas d'antibiotique, pour une durée d'au moins 48 heures, afin d'obtenir des cellules presque à confluence. Les cellules HepG2 à confluence ont ensuite été traitées pendant 48 heures avec 1.6μM de T3 ou 1.6μM de T3 et 50mM d'insuline, après une incubation de 24 heures dans un milieu sans sérum (jeûne).

Les extraits nucléaires ont été réalisés en utilisant un protocole adapté de Dignam *et al* (1983). Les cellules de 9 pétris (100mm*20mm) ont été rincées deux fois avec du PBS, puis décollées avec 1 ml de trypsine. Les cellules des 3 pétris représentant la même condition ont été mises ensemble dans un tube, puis centrifugées (Sorvall HG4L rotor) à 2000 rpm, 10 min à 4°C. Les culots ont été resuspendus dans 5 volumes de PBS froid, puis centrifugés à 2000 rpm, 10 min à 4°C. Les culots obtenus ont alors été resuspendus dans 5 volumes de tampon A (10mM HEPES pH 7.9, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 2μg/ml aprotinine et leupeptine) et laissé reposer 10 minutes sur glace. Les tubes ont ensuite été centrifugés à nouveau à 2000 rpm, 10 min à 4°C et les culots ont été resuspendus cette fois-ci dans 2 volumes de tampon A. Les cellules ont été lysées par 10 coups d'homogénéisateur Dounce (piston de type B). Les cellules lysées ont été centrifugées à 2000 rpm, 10 min à 4°C afin d'obtenir un culot contenant les noyaux. Les culots contenant les noyaux ont été resuspendus dans une quantité de tampon C (20mM HEPES pH 7.9, 25% glycérol, 0.42M NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.5mM PMSF, 0.5mM DTT, 2μg/ml aprotinine et leupeptine) équivalente à la quantité de cellules lysées (ex. 3ml de tampon C/10⁹ cellules). Lentement, sur glace, les noyaux ont été lysés avec 10 coups d'homogénéisateur Dounce. Ces lysats ont été laissés sur glace 30 min, en agitant doucement à la main. Ils ont ensuite été centrifugés à 25 000g, 30 min à 4°C (Beckman H2-JS

rotor JA-17). Les surnageants récupérés ont été dialysés en utilisant une membrane de type Spectra/Por® Biotech RC (16 mm de largeur) de la compagnie Spectrum. Le type de membrane utilisée permettait de laisser passer librement les protéines dont le poids moléculaire était inférieur à 8 000 Da. Les morceaux de membranes découpés ont d'abord été bouillis 10 minutes dans 1L de solution de préparation (2% bicarbonate de soude, 1mM EDTA pH 8.0). Ensuite ils ont été rincés à l'aide d'eau nanopure, puis bouillis à nouveau dans 500ml de 1mM EDTA pH 8.0. Les membranes ont été refroidies à la température de la pièce dans cette solution, puis placées à 4°C jusqu'à utilisation. Avant de les utiliser, elles ont été rincées plusieurs fois à l'intérieur et à l'extérieur avec de l'eau nanopure. Les surnageants récupérés ont donc été déposés dans les membranes, puis la dialyse a été réalisée séparément contre 200ml de tampon D (20mM HEPES pH 7.9, 20% glycérol, 0.1M KCl, 0.2mM EDTA, 0.5mM PMSF, 0.5mM DTT, 2µg/ml aprotinine et leupeptine) à 4°C pendant une nuit. Suite à la dialyse, les extraits ont été récupérés et centrifugés (Sorvall SS34 rotor) à 25 000g, 20 min à 4°C. Les surnageants contenaient les protéines nucléaires.

Les protéines nucléaires récupérées suite à la dialyse ont été dosées en utilisant la méthode de Bradford décrite précédemment au point 2.2.4.5. La solution stock de BSA utilisée afin de réaliser la courbe standard a toutefois dû être préparée dans le tampon D.

2.2.7.3 - Marquage des oligonucléotides

Plutôt que de marquer les deux oligos, un premier oligo était marqué radioactivement, puis purifié sur colonne et ensuite il était apparié à son complémentaire, constituant l'ADN qui fixera les facteurs de transcription. Le marquage l'oligo utilisé était réalisé la journée précédent la réalisation des retards sur gel. L'oligo de 40pb utilisé pour le marquage correspondait au TRE putatif du promoteur du gène FAS de l'oie (-731/-692). 50ng d'oligos sens, 2µl de tampon de T4PNK, 1.5µl de l'enzyme T4 polynucléotide kinase (T4PNK) et 10µCi de ³²P γ-ATP (1µl) étaient mélangés dans un même tube dont le volume était complété à 20µl avec de l'eau nanopure. Ce mélange a été placé à 37°C pendant 30 min, puis 2µl de EDTA 0.5M pH 8.0 et 28µl H₂O étaient ajoutés afin d'arrêter la réaction. Pendant ce temps, la colonne de type G25 de la compagnie Pharmacia était préparée, selon les recommandations du manufacturier, et ce afin de purifier le premier oligo marqué. La totalité du mélange contenant l'oligo marqué a donc été déposée au centre de la résine. Le montage a été centrifugé une première fois à 3400 rpm pendant 2 min, puis 38µl d'eau ont été ajoutés. Une deuxième

centrifugation à 3400 rpm, 2 min a été réalisée. Par la suite, 100ng du brin complémentaire anti-sens ont été ajoutés au volume d'environ 88 μ l du brin sens radioactif récupéré de la résine. 10 μ l du tampon d'appariement 10X (1M NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 1mM DTT) ont été ajoutés, puis le mélange a été chauffé à 90°C, 10 min. Le tube a ensuite été centrifugé quelques secondes, puis déposé dans un cochonnet de plomb afin que son contenu puisse refroidir très lentement pour permettre l'appariement, et ce en toute sécurité.

2.2.7.4 - Réalisation des gels, montage et pré-migration

Tout le matériel servant à la réalisation des retards sur gel a été soigneusement nettoyé avant chaque utilisation. La plus petite plaque de verre était recouverte d'Acrylease, une solution allant permettre de ne pas briser le gel en séparant les plaques. Des gels non-dénaturants d'acrylamide à 6% (6% acrylamide, 0.5X TBE, 2.5% glycérol) ont été réalisés. Ce mélange était dégazé afin de réduire la présence de petites bulles d'air dans le gel. 200 μ l d'une solution de persulfate d'ammonium 25% et 50 μ l de TEMED étaient ajoutés, par 40ml de gel, et ce afin de permettre la polymérisation. Rapidement, les gels étaient coulés dans les montages, puis laissés 45 min à 1 heure à polymériser. Les gels étaient ensuite déposés dans la cuve d'électrophorèse, puis une pré-migration était effectuée dans du tampon TBE 0.5X froid. Cette pré-migration durait entre 1 à 2 heures à 20 mA. Les réactions étaient réalisées pendant ce temps.

2.2.7.5 - Réactions

5 μ l d'une solution contenant 50 μ l de l'oligo marqué, 10 μ l de polydIdC (2 μ g/ μ l), 10 μ l BSA (10mg/ml), 20 μ l de tampon de ligation 10X (100mM HEPES pH 7.9, 40% glycérol, 10% Ficoll, 250mM KCl, 250mM NaCl, 10mM DTT, 5mM EDTA) et 10 μ l d'eau nanopure étaient déposés dans un tube. 3 μ g, 6 μ g ou 12 μ g de protéines nucléaires étaient ensuite ajoutées, puis le mélange était laissé à la température de la pièce 15 à 30 min. Lors des essais de compétition spécifique et non-spécifique; 62.5ng (50X), 125ng (100X) ou 625ng (500X) de compétiteurs non marqués étaient ajoutés aux réactions pour un temps additionnel de 15 à 30 min. Lors des essais de supershift, 5 μ l (1 μ g) d'un anti-TR α 1 (dirigé contre les isoformes TR α 1/2 et TR β 1/2 du rat, de la souris, du poulet et de l'humain) ou 5 μ l (1 μ g) d'un anti-RXR (Δ 197) (dirigé contre les isoformes RXR α , RXR β et RXR γ du rat, de la souris et de l'humain) ont été ajoutés.

Ces anticorps ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology inc. Les anticorps ont aussi été ajoutés pendant 15 à 30 min additionnelles.

2.2.7.6 - Migration et séchage

À la fin de la réaction, 1µl de tampon de charge (20% Ficoll, 0.2% bromophenol blue, 0.2% xylene cyanol) pour chaque 5µl de réaction a été ajouté, puis les échantillons ont été déposés dans les puits des gels, préalablement rincés avec du TBE 0.5X. Les gels ont été migrés à 120 Volts ou 20 à 25 mA, pendant 2 à 3 heures. Les gels ont ensuite été démoulés, déposés sur un morceau de papier Whatman, enveloppés, puis séchés dans un séchoir à gel (gel dryer Bio-Rad model 583) 1 heure à 80°C. Les gels séchés ont été placés dans une cassette d'autoradiographie contre un écran Kodak 3 heures ou 16 heures.

2.2.7.7 - Révélation

Les écrans ont ensuite été révélés au PhosphoImager (Molecular Imager FX Bio-Rad) et les images obtenues modifiées en utilisant le logiciel de BioRad Quantity One 1-D Analysis.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Afin de comprendre la régulation de la FAS et de déterminer des associations physiologiques pertinentes, il était tout d'abord essentiel de déterminer la façon dont il fallait procéder pour obtenir le fragment proximal du promoteur du gène FAS de l'oie, le sujet de l'étude.

3.1 - Carte de restriction du cosmide cosFAS5

Le gène FAS de l'oie s'étend sur plus de 50 Kpb (Kameda *et al*, 1991). Le cosFAS5 (décrit au point 2.1.2) quant à lui, contient les 7 premiers exons (15 Kpb) et environ 35 Kpb d'ADN en amont du site d'initiation de la transcription. Cette construction provient d'une librairie d'ADN génomique d'oie (Kameda *et al*, 1991). Afin de réaliser une carte de restriction partielle de ce clone, l'ADN a été digéré par plusieurs enzymes de restrictions différentes. Dans certains cas, des doubles digestions ont aussi été réalisées. Soulignons qu'une carte de restriction partielle existait déjà, et qu'un fragment de 597 pb de la partie promotrice du gène FAS de l'oie avait déjà été isolé, séquencé et analysé par un autre groupe. Les enzymes utilisées pour digérer le cosFAS5 ont donc été EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI, Sall et BamHI. La **Figure 3.1** montre deux exemples des patrons de bandes obtenus suite à la migration sur gel d'agarose et visualisation aux UV. La digestion du clone par l'enzyme BamHI (**Fig. 3.1-A**) donne trois fragments de tailles différentes, soit 33 Kpb, 9 Kpb et 4.1 Kpb. La digestion du clone par l'enzyme EcoRI (**Figure 3.1-B**), quant à elle, donne sept bandes différentes, soit 17 Kpb, 7.6 Kpb, 5.4 Kpb, 4.4 Kpb, 3.6 Kpb, 3.4 Kpb et un fragment d'environ 1.3 Kpb que l'on ne voit pas sur la photo. Cette bande de 1.3 Kpb n'apparaît pas puisque le gel de petite taille a été migré longtemps pour permettre une bonne séparation entre la bande de 3.6 Kpb et celle de 3.4 Kpb.

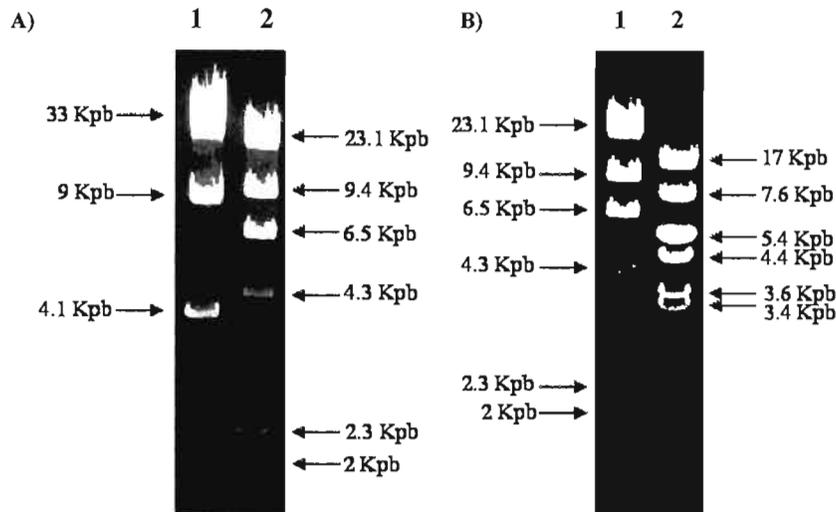


Figure 3.1 : Deux exemples de migration sur gel d'agarose 1% des digestions effectuées afin de réaliser la carte de restriction du cosmide. **A)** Digestion du cosmide cosFAS5 par l'enzyme de restriction BamHI (piste 1). L'ADN du phage λ digéré par l'enzyme HindIII, avec son profil de bandes caractéristiques, a servi de standard de poids moléculaire (piste 2). **B)** Digestion du cosmide cosFAS5 par l'enzyme de restriction EcoRI (piste 2). On retrouve également l'ADN du phage λ digéré par l'enzyme HindIII comme marqueur de poids moléculaire (piste 1).

Ces digestions nous ont permis de réaliser la carte de restriction partielle présentée à la **Figure 3.2**. En regardant la carte, nous voyons qu'il sera possible d'isoler le fragment proximal du promoteur FAS de l'oie, et ce en utilisant les enzymes BamHI et HindIII.

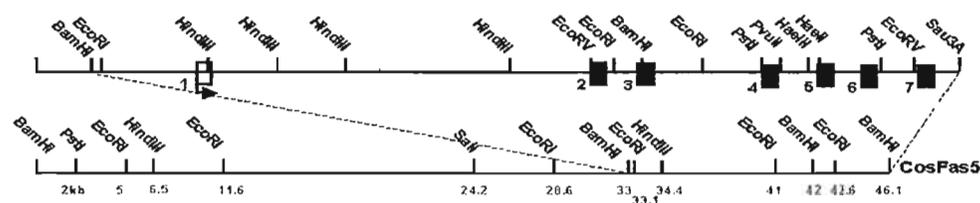


Figure 3.2 : Carte de restriction partielle du cosFAS5 obtenue suite à l'analyse des différentes bandes obtenues sur gel. Figure inspirée de l'article de Kameda *et al*, 1991. On y retrouve les sites pour les enzymes que nous avons testées, soit BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI et SalI. Il est à noter que les sites HaeII, HaeIII, PvuII et Sau3A ont été ajoutés en comparant avec la carte de restriction partielle préalablement établie par Kameda. La boîte blanche représente le premier exon et la flèche le site d'initiation de la transcription. Les boîtes noires numérotées de 2 à 7 représentent les 6 exons suivants.

3.2 - Clonage du fragment proximal de la partie promotrice du gène FAS de l'oie

Suite à l'analyse de la carte de restriction obtenue, le cosFAS5 a été digéré par l'enzyme BamHI. Cette digestion, lorsqu'elle est migrée sur gel, donne trois bandes caractéristiques de 33 Kpb, 9 Kpb et 4.1 Kpb (voir **Fig.1-A**; piste 1). En se référant à la carte obtenue et montrée à la **Figure 3.2**, nous voyons que le fragment contenant la partie proximale du promoteur est le fragment de 9 Kpb. Ce fragment a donc été isolé et cloné dans le vecteur pBlueScript. L'ADN plasmidique récupéré des clones positifs ont été digérés par l'enzyme EcoRV, et ce afin de vérifier l'orientation du fragment dans le vecteur. L'orientation du fragment dans le sens désiré génère une bande à 11 Kpb et une autre à 1 Kpb, alors que si il est dans la mauvaise orientation ce sont des bandes à 8 Kpb et à 4 Kpb qui sont obtenues (résultats non montrés).

Afin d'obtenir le fragment proximal, 20 μ l d'une mini-préparation d'ADN plasmidique d'un des clones positifs pour le fragment de 9 Kpb, orienté dans la bonne direction, ont été digérés par 20U de l'enzyme HindIII. La **Figure 3.3** représente cette digestion suite à sa migration sur gel d'agarose 1% et sa visualisation aux UV. La bande à 4.6 Kpb, correspondant au vecteur pBluescript et au fragment de 1.6 Kpb proximal de l'ADN de la partie promotrice, a été excisée du gel et l'ADN a été purifiée (voir Matériels et Méthodes; point 2.2.3.3). Une recircularisation de ce fragment a été réalisée avec 5 μ l de l'ADN récupéré et 5U d'ADN ligase du phage T4. La réaction s'est déroulée à 16°C, toute la nuit. Le produit de ligation a ensuite été transformé dans des bactéries compétentes (voir Matériels et Méthodes; point 2.2.3.4.3). Quelques colonies blanches obtenues ont été mise en préculture, puis l'ADN plasmidique a été extrait (voir Matériels et Méthodes; point 2.2.3.5). Une préparation à grande échelle de l'ADN plasmidique d'un clone positif a été réalisée (voir Matériels et Méthodes; point 2.2.3.7), et ce afin de séquencer l'ADN, mais aussi pour effectuer le clonage du fragment de 1.6 Kpb dans les vecteurs qui seront utilisés lors des transfections pour l'analyse de l'activité promotrice du fragment sans ou avec des stimulations.

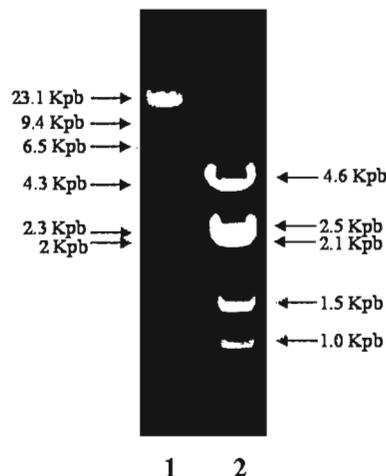


Figure 3.3 : Migration sur gel d'agarose 1% des fragments obtenus suite à la digestion par l'enzyme HindIII du fragment de 9kb du cosFAS5 (voir figure 1 (A) piste 1). Le fragment de 9kb de l'ADN du cosmide a été cloné à l'intérieur du vecteur pBlueScript (d'une longueur de 3kb) au site de restriction BamHI. La digestion par l'enzyme HindIII a permis d'obtenir 5 fragments de 4.6kb, 2.5kb, 2.1kb, 1.5kb et 1.0kb. Le fragment de 4.6kb est celui d'intérêt, puisqu'il contient le vecteur pBlueScript, de même que le fragment proximal du promoteur du gène FAS de l'oie (piste 2). On retrouve également l'ADN du phage λ digéré par l'enzyme HindIII comme marqueur de poids moléculaire (piste 1).

3.3 - Séquence du fragment d'ADN isolé de 1584 pb

La séquence nucléotidique du fragment proximal de la partie promotrice du gène FAS de l'oie a été déterminée jusqu'à -1450 pb (**Figure 3.4**). La séquence qui correspond à la boîte TATA se retrouve à -28 pb, alors qu'une séquence similaire à une boîte CAAT se retrouve à -61 pb. Cette séquence est riche en G/C, puisque 61.2 % des 1584 bases obtenues sont des G ou des C. Suite à une analyse informatique, de même qu'en comparant cette séquence à celles d'autres espèces, il a été possible de déterminer un certain nombre de sites putatifs de fixation de différents facteurs de transcription pertinents dans le cadre de notre étude.

Ainsi, nous avons noté la présence possible d'éléments de liaison de récepteurs de glucocorticoïdes à plusieurs endroits, soit à -1441, -1300, -1153, -1123, -577, -338, -336, -276 et -132. La plupart des éléments indiqués seraient impliqués dans l'action de l'insuline, ces derniers étant mieux documentés. C'est notamment le cas de la E-box présente en position -61 à -55. Cette dernière agirait comme une séquence de réponse à l'insuline (IRS) et elle est connue pour être un site de fixation pour USF (« upstream stimulatory factor »), qui est un facteur de transcription ubiquitaire (Griffin *et al*, 2004). La séquence SRE de -135 à -125, de même que celles indiquées à -114 et -66 (mais appelées SREBP à la **Figure 3.4**) seraient aussi

impliquées dans la réponse à l'insuline. Une étude de Griffin sur le promoteur FAS du rat a dernièrement montré qu'en mutant la E-box et en prévenant ainsi la fixation de USF-1, SREPB-1 ne se fixait pas au SRE, suggérant une interaction fonctionnelle entre ces deux protéines (Griffin *et al*, 2004). Notons aussi la présence de trois éléments de réponse à l'insuline retrouvés chez plusieurs espèces dans le promoteur FAS (FIRE 1 à -524 et 3 à -63), dont un hépatique (hFIRE à -44). Alors que Kameda *et al* avançait la possibilité qu'il y ait 2 éléments de réponse à la triiodothyronine dans le fragment séquencé jusqu'à -597 pb (à -106 et -91), notre analyse informatique ne va pas en ce sens. Il est à noter que l'homologie entre la séquence obtenue par Kameda et la notre est de 98% (dont 100% en position -106 et -91).



Figure 3.4 : Séquence complète (5'→ 3') du clone de 1.6 kb contenant l'ADN 5' flanquant du gène de la synthétase des acides gras de l'oie (FAS) (MARTEL, C. et C. MOUNIER, 2003; PubMed). AC #AY391824. Le séquençage de ce fragment de 1584 pb (-1450/+133) a été réalisé sur les deux

brins, en utilisant les amorces T3 et T7 du vecteur pBlueScript, ainsi que les amorces internes dont la séquence est en vert (les flèches au-dessus des amorces montrent le sens). Le codon d'initiation de la transcription est encerclé en orange. Les boîtes TATA et CAAT sont encadrées en rouge. Les sites de restriction BamHI et HindIII, utilisés pour le clonage dans pBS, sont surlignés ou soulignés en noir (portant le total de la séquence à 1596 pb). Les sites putatifs de fixation de différents facteurs de transcription connus et pertinents sont indiqués sur la séquence. Abréviations : GR, récepteurs de glucocorticoïdes; PR, récepteurs de progestérone; FIRE 1 ou 3, élément de réponse à l'insuline de FAS; hFIRE, élément de réponse à l'insuline de FAS au niveau hépatique; SRE, élément de réponse aux stéroïdes; ICE, élément CAATT inversé.

3.4 - Activité promotrice obtenue lors d'essais luciférase réalisés avec la construction contenant la partie promotrice du gène FAS de l'oie

La présence d'une boîte TATA et d'une séquence s'apparentant à une boîte CAAT en amont du site d'initiation de la transcription, indique un promoteur eucaryote typique (Kameda *et al*, 1991). Afin de vérifier l'activité de cette partie du promoteur FAS de l'oie, une construction 1.6FAS-pGL2 a été réalisée. Cette construction comprend le fragment isolé à partir du cosFAS5, de même qu'un vecteur contenant le gène rapporteur de la luciférase. Cette construction, de même que des contrôles, a été transfectée de façon transitoire dans des cellules de lignées de type LMH. Les résultats obtenus, montrés à la **Figure 3.5**, démontrent que le promoteur FAS de l'oie est relativement fort, puisqu'il a en moyenne une activité promotrice 20 fois plus élevée que celle du contrôle positif utilisé, soit une construction contenant le promoteur de SV40 suivi du gène de la luciférase.

Pour la suite des expériences, nous avons toutefois dû utiliser un vecteur contenant un gène rapporteur différent du gène de la luciférase. Effectivement, les premiers essais de stimulation à la T3 et à l'insuline avec la construction FAS1.6-pGL2 nous ont donné des résultats plutôt étranges d'inhibition ou de stimulation non significative (résultats non montrés). Lors d'une expérience de transfection de la construction 1.6FAS-pGL2 avec surexpression du récepteur TR α , nous avons noté que lorsque la quantité de récepteur transfecté augmentait (soit 0.5 μ g, 1.0 μ g ou 1.5 μ g), l'activité luciférase augmentait en absence de T3, ce qui est normal, vu l'activité promotrice du fragment de 1.6 Kpb mentionnée au paragraphe précédent. Par contre, l'ajout de T3 au milieu de culture entraînait une diminution de l'activité luciférase enregistrée, et ce, de façon inversement proportionnelle à la quantité de récepteur transfecté (**Figure 3.6**). Ces résultats seraient probablement causés par la présence d'un élément de réponse négatif à la T3 à l'intérieur même du gène LUC (Maia *et al*, 1996). Des tests réalisés en transfectant uniquement les vecteurs contrôles (pGL2-Basic et pGL2-Control vector) ont confirmé cette

hypothèse. En effet, nous avons obtenu une diminution de l'activité luciférase après traitement à la T3 des cellules transfectées avec ces vecteurs contrôles (résultats non montrés).

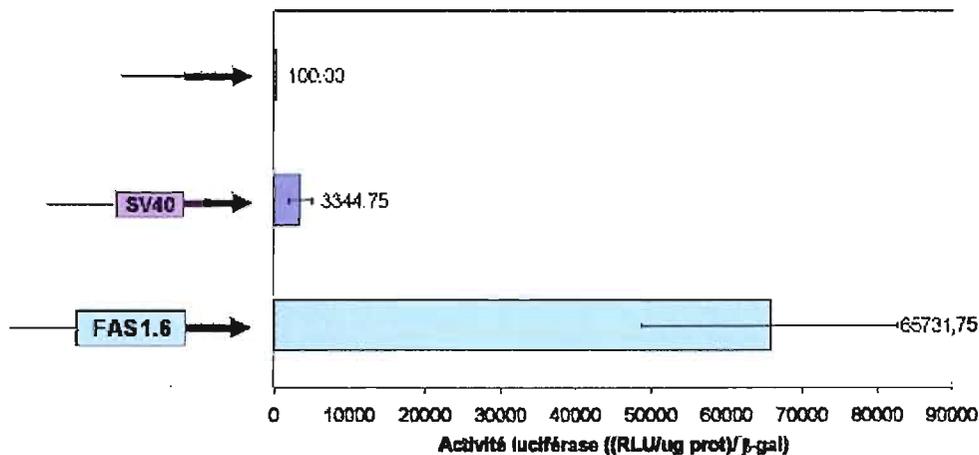


Figure 3.5 : Activité promotrice du fragment de 1,6 Kpb transfecté dans les cellules LMH en utilisant les essais luciférase. Le diagramme indique l'activité luciférase mesurée dans les cellules transfectées, et ce soit avec la construction sans promoteur contenant uniquement le gène luciférase (flèche pleine noire), soit avec la construction contenant le promoteur SV40 (rectangle mauve) ou celle contenant le promoteur FAS (rectangle bleu clair, FAS1.6-pGL 2). L'activité luciférase a été mesurée dans des cellules LMH cultivées en absence de sérum. Les résultats ont été exprimés en comparaison à l'activité obtenue avec la construction sans promoteur fixée à 100. Valeurs représentant au moins trois expériences individuelles (écart-type indiqué).

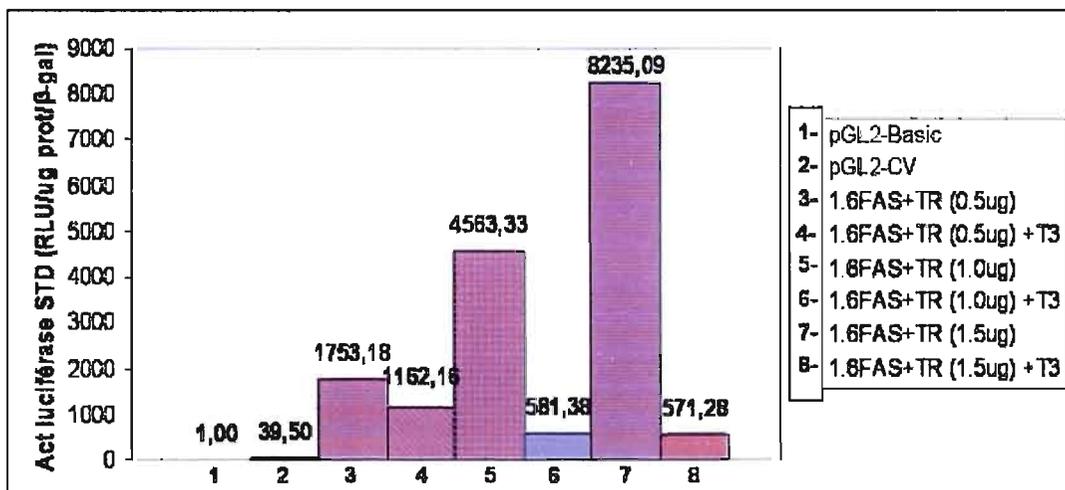


Figure 3.6 : Activité promotrice du fragment de 1,6 kb transfecté dans les cellules LMH stimulées 48 heures à la T3. Le diagramme indique l'activité luciférase mesurée dans les cellules transfectées, et ce soit avec la construction sans promoteur contenant uniquement le gène luciférase (pGL2-Basic), soit avec la construction contenant le promoteur SV40 (pGL2-CV) ou celle contenant le promoteur FAS (1.6FAS) avec surexpression du récepteur TR en présence ou non de T3. L'activité luciférase a été mesurée dans des cellules LMH cultivées en absence de sérum. Les résultats ont été exprimés en

comparaison à l'activité obtenue avec la construction sans promoteur fixée à 1. Ces valeurs représentent une expérience unique, donc nous ne pouvons pas indiquer d'écart-type.

3.5 - Réalisation des différentes constructions à partir du fragment de 1.6 Kpb

La présence d'activité promotrice du fragment de 1.6 Kpb isolé nous a mené à réaliser des délétions successives afin de déterminer où se trouvait le ou les éléments entraînant cette activité. La présente section sert donc à décrire les différentes constructions qui ont été réalisées. Toutefois, afin d'éviter ce problème d'élément de réponse négatif à la T3 dans le gène luciférase, nous avons décidé d'utiliser le vecteur pJFCAT1 qui contient le gène rapporteur codant pour la chloramphénicol acétyl transférase (CAT), plutôt que le gène de la luciférase. D'ailleurs, les résultats d'activité CAT obtenus pour quelques-unes des constructions décrites dans la présente section sont présentés plus tard, soit à la section 3.6.

Les délétions successives ont été réalisées à partir du fragment de 1.6 Kpb en utilisant la technique d'amplification PCR avec des amorces spécifiques, puisque l'analyse de la séquence présentée à la **Figure 3.4**, nous avait révélé que nous ne pouvions pas utiliser simplement des enzymes de restriction afin de générer ces fragments. En effet, les sites uniques de restriction correspondaient à des enzymes peu communes, donc que l'on ne retrouvait pas dans le site multiple de clonage des vecteurs utilisés dans le cadre de notre étude. La schématisation de ces délétions successives est présentée à la **Figure 3.7**.

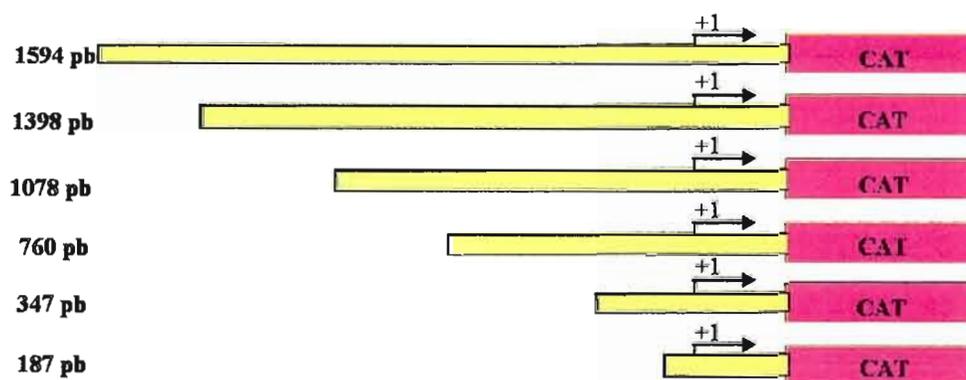


Figure 3.7 : Schématisation de la stratégie employée afin de déterminer l'emplacement de l'élément de réponse à la T3 dans la partie promotrice du gène de la synthétase des acides gras de l'oie. La stratégie utilisée a été la production de fragments de plus en plus courts, en utilisant la technique d'amplification PCR, à partir du fragment de 1.6kb isolé du cosFAS5. La taille des différents

fragments amplifiés est indiquée sur la gauche. Le site d'initiation de la transcription est indiqué par +1. Le gène rapporteur utilisé a été celui du chloramphénicol acétyl transférase, noté CAT.

La **Figure 3.8**, quant à elle, montre les fragments de 1398 pb (piste 2), 1078 pb (piste 3) et 760 pb (piste 4) obtenus suite à la réalisation des PCRs et à leur clonage dans le vecteur pJFCAT1 (**Fig. 3.8-A**) et aussi les fragments de 347 pb (piste 3) et de 187 pb (piste 2) seulement suite à la réalisation des PCRs (**Fig. 3.8-B**). Ces fragments ont été choisis de façon plutôt aléatoire, en se fiant aux meilleurs couples d'amorces que nous pouvions utiliser. Nous avons toutefois essayé d'avoir des fragments de longueurs variables bien répartis tout au long du fragment de 1.6 Kpb.

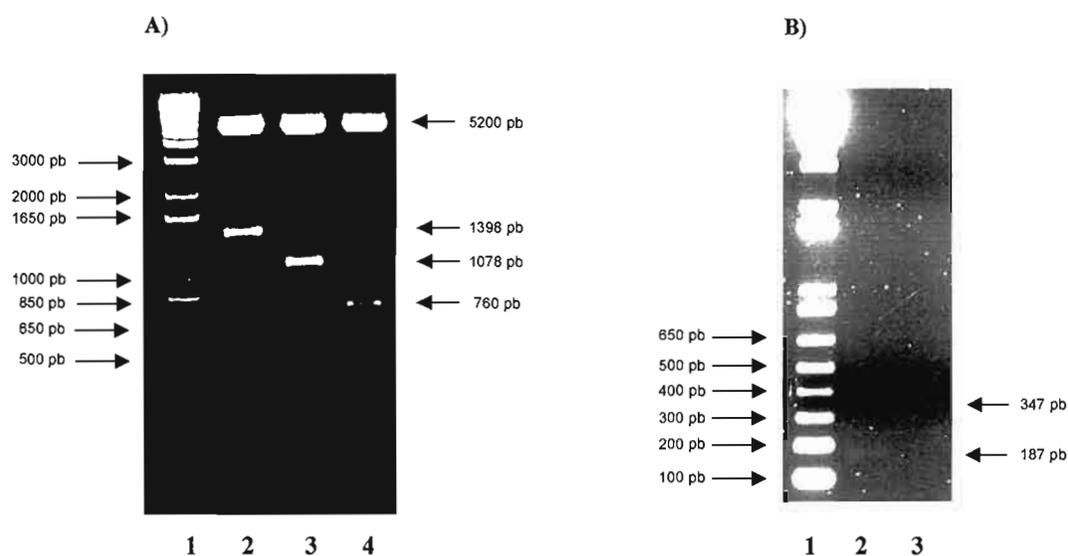
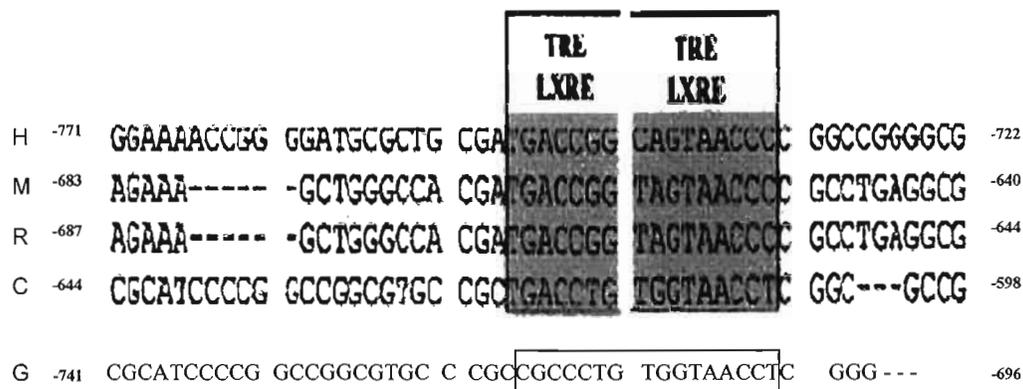


Figure 3.8 : Migration sur gel d'agarose 1% des différentes délétions successives réalisées par PCR. A) Digestions par BamHI et XhoI de clones positifs pour les fragments de 1398pb (piste 2), 1078pb (piste 3) et de 760pb (piste 4) dans le vecteur pJFCAT1 (bande supérieure). **B)** Gel de quantification des produits PCR pour les fragments de 347pb (piste 3) et de 187pb (piste 2). Migrations réalisées sur gels d'agarose 1%. Les pistes 1 contenaient toutes les deux le marqueur de poids moléculaire 1Kb Plus DNA Ladder de la compagnie Invitrogen.

La lecture d'un article de Wang *et al*, paru en 2004 et portant sur le promoteur FAS humain, nous a toutefois permis de concentrer notre étude sur une partie interne plus précise du 1.6 Kpb. L'alignement présenté à la **Figure 3.9** est d'ailleurs tiré de cet article. Il s'agit d'un alignement de promoteur du gène FAS de l'humain (H), la souris (M), le rat (R) et le poulet

(C), où les auteurs ont noté la présence d'un T3RE/LXRE. Nous avons donc aligné notre propre séquence obtenue (PubMed; Acc # AY391824) du promoteur du gène FAS de l'oie (G). Nous retrouvons un motif similaire. Notons de façon intéressante, que ce T3RE ne correspond pas au consensus AGGTCA mentionné à la section étude bibliographique. Si l'on regarde la similarité entre la séquence du poulet et celle de l'oie, on peut voir qu'elle est très grande, les différences étant uniquement au niveau de la première et de la troisième bases. La première base chez le poulet étant une thymine, alors que chez l'oie on retrouve une cytosine. Et en position trois de la séquence du poulet on retrouve une adénine, alors que c'est une autre cytosine chez l'oie.



H: Human (deposited in genbank accession # AF250144)
M: Mouse (accession # AL 663090)
R: Rat (accession # X 54671)
C: Chicken (accession # X77339)

G: Goose (accession # AY391824)

Figure 3.9 : Alignement de différentes séquences nucléotidiques de promoteurs FAS contenant un TRE. Figure tirée de Wang *et al*, 2004, article publié dans le *Journal of Nutrition*. On y voit la séquence promotrice du gène FAS pour l'humain, la souris, le rat, le poulet et celle de l'oie y a été ajoutée. La boîte représente un TRE et LXRE conservés entre les espèces.

Des amorces spécifiques contenant des sites de restriction à leurs extrémités ont donc été sélectionnées afin d'amplifier le fragment interne correspondant à la position -902/-577 du promoteur FAS de l'oie. Ce fragment de 325 pb est d'ailleurs montré à la **Figure 3.10**. Il a été cloné dans le vecteur pBLCAT2. Le vecteur pBLCAT2 possède le promoteur minimal de la

thymidine kinase ce qui permet de pallier à l'absence de certains éléments essentiels en 3' du fragment interne. L'activité CAT obtenue avec cette construction TRE-TKCAT suite aux transfections transitoires et aux stimulations à la T3 et à la T3 avec l'insuline est présentée à la **Figure 3.13**.

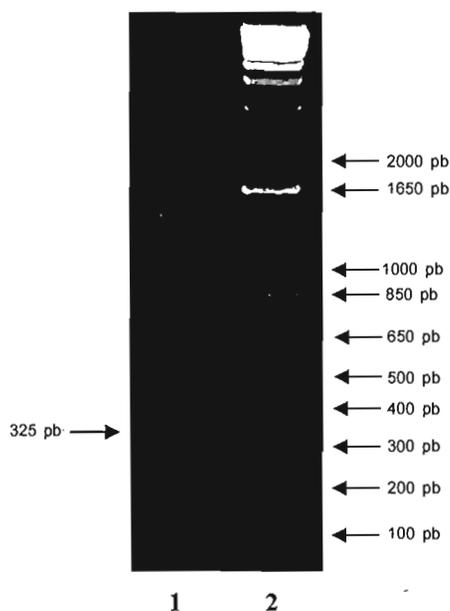


Figure 3.10 : Migration sur gel d'agarose 1% du fragment contenant l'élément putatif de réponse à la T3. Fragment amplifié par PCR de 325 pb basé sur les informations de l'article de Wang *et al*, 2004 (piste 1). Marqueur de poids moléculaires 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) (piste 2).

Afin de déterminer plus précisément l'emplacement du T3RE potentiel sur le fragment interne de 325 pb, d'autres constructions ont été réalisées (**Fig. 3.11**). En utilisant différentes combinaisons d'amorces spécifiques du fragment interne, nous avons amplifié d'autres petits fragments. Les amorces 1 et 2 ont permis d'amplifier un fragment de 138 pb situé entre -902/-765 du fragment interne (**Fig. 3.11**; piste 2), les amorces 2 et 3 un fragment de 240 pb situé entre -902/-663 (**Fig. 3.11**; piste 3), le couple d'amorces 3 et 4 donne un fragment de 103 pb situé entre -765/-663 (**Fig. 3.11**; piste 4) et finalement les amorces 4 et 5 ont permis d'obtenir un fragment de 189 pb situé entre -765/-577 (**Fig. 3.11**; piste 5). Il est à signaler que les bandes retrouvées à la **Figure 3.11** sont légèrement supérieures aux poids attendus, puisqu'il faut ajouter 12 bases à chacune des amorces (donc 24 bases à chaque fragment) pour le site de restriction allant servir au clonage dans pBLCAT2. Il est à noter que ces constructions ont été

nommées en fonction du couple d'amorces utilisé (ex. $\frac{1}{2}$ -TRE-TKCAT ou $\frac{3}{4}$ -TRE-TKCAT) pour l'amplification du fragment qu'elles contiennent. Si l'on se rapporte à la **Figure 3.9**, l'élément recherché se retrouverait entre -741 et -696 pb du promoteur FAS de l'oie. Le fragment amplifié à partir des amorces 3 et 4 est donc très intéressant, puisqu'il contiendrait le T3RE putatif et aussi parce qu'il ne fait que 100 pb. Il permet donc une localisation plus précise sans que le fragment à cloner ne soit trop petit. L'activité CAT obtenue suite aux transfections transitoires et aux stimulations à la T3 en utilisant ce fragment est d'ailleurs présentée à la **Figure 3.13** (construction notée TRE-TK-CAT -765/-663 sur la figure).

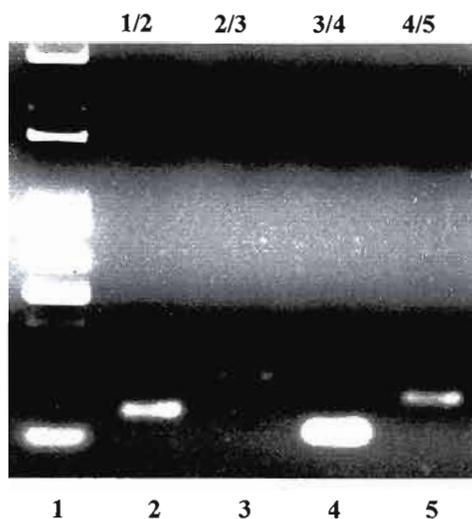


Figure 3.11 : Migration sur gel d'agarose 1% des petits fragments ayant été amplifiés par PCR à partir du 'TRE'. La migration a été réalisée sur un gel d'agarose 1.5%. Les amorces qui ont été utilisées pour effectuer les réactions de PCR sont indiquées au haut des puits. Les amorces 1,3 et 5 étant anti-sens, alors que les amorces 2 et 4 étaient des amorces sens (pistes 2 à 5). Le standard de poids moléculaire était le 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) (piste 1). La taille des bandes amplifiées était, dans l'ordre des puits, 162 pb, 264 pb, 127 pb et 213 pb.

3.6 - Activité CAT obtenue avec la construction 1.6FAS-pJFCAT1, la construction TRE-TKCAT et la construction contenant le petit fragment -765/-663 (nommée $\frac{3}{4}$ -TRE-TKCAT) , suite aux stimulations

Le choix des cellules utilisées était un facteur très important dans une expérience. Pour les premières transfections, nous avons utilisé des cellules LMH, mais nous avons abandonné ce modèle. La principale raison justifiant cet abandon était que des résultats obtenus au laboratoire par RT-PCR en temps réel laissaient entrevoir que ces cellules avaient des réponses trop variables lorsqu'elles étaient stimulées. Des cellules de lignées de type HepG2 et des

cellules primaires de type hépatocytes embryonnaires de poulet (CEH) (**Figure 3.12**) ont plutôt été utilisées (voir Matériels et Méthodes; section 2.1.1).

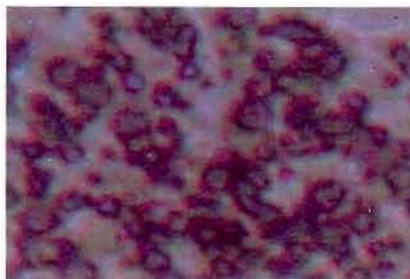


Figure 3.12 : Photographie d'hépatocytes embryonnaires de poulet isolés à l'aide de la technique décrite par A.G. Goodridge (Goodridge, 1971). Les hépatocytes ont été photographiés à l'aide d'un appareil photo numérique au microscope, à faible grossissement (40X).

Dans le but d'identifier dans le gène FAS de l'oie, une ou des séquences nucléotidiques spécifiques qui sont impliquées dans le contrôle de l'expression de FAS au niveau hormonal (surtout pour la T3), nous avons cloné un fragment de 1594 pb contenant le site d'initiation de la transcription (+1) et 1450 pb de la région 5'- flanquante (voir **Fig. 3.4**). L'analyse de la séquence a montré qu'il y avait un certain nombre de séquences consensus à l'intérieur de ce fragment. Ces séquences consensus pouvaient donc jouer un rôle potentiel dans la régulation de l'expression du gène. Le graphique de la **Figure 3.13** présente certains principaux résultats obtenus.

Le fragment -1450/+133 a été cloné dans un vecteur contenant le gène rapporteur CAT. Des expériences de transfections transitoires de cette construction (FAS1.6-pJFCAT1) dans une lignée cellulaire de type HepG2 ont été réalisées. Ces expériences nous ont donc permis de voir que suite à un jeûne de 24 heures et à une stimulation de 48 heures à la T3, l'activité CAT exogène était augmentée de 2.5 fois par rapport à l'activité CAT enregistrée avec la même construction mais sans T3 (**Fig. 3.13**; haut). La régulation de FAS par la T3 peut être démontrée en utilisant des cellules de type primaires (Kameda *et al*, 1991; Thurmond *et al*, 1998). Toutefois il est parfois plus facile d'utiliser des lignées cellulaires. L'utilisation de lignées cellulaires diminue grandement le temps de préparation, les coûts et les variations attribuables aux oeufs d'une semaine à l'autre. Dans le cadre de notre étude, des difficultés au

niveau des transfections expliquent aussi le fait que nous ayons finalement priorisé l'utilisation des cellules HepG2. En effet, en utilisant les CEH, nous obtenions une efficacité de transfection maximale d'environ 5%, alors qu'avec les HepG2, l'efficacité de transfection était d'environ 90 à 95% (efficacité de transfection évaluée par un test de coloration de β -galactosidase). Les autres groupes qui utilisaient les CEH et des vecteurs codant pour le gène rapporteur CAT, n'utilisaient pas comme nous des essais ÉLISA, mais faisaient plutôt de la chromatographie en couche mince (« thin-layer chromatography »). Les CEH étant des cellules de foie, nous observions toujours, lors de la lyse cellulaire, une couche assez importante de lipides à la surface du surnageant à récupérer. Peut-être que cette dernière venait interférer avec le CAT-ÉLISA.

La plupart des lignées cellulaires ne répondent pas à la T3 puisqu'elles n'expriment plus les récepteurs. C'est pourquoi les cellules doivent aussi être transfectées avec un vecteur d'expression contenant le récepteur (Hillgartner *et al*, 1995). Puisque nous ne savions pas si les récepteurs TRs étaient faiblement ou hautement exprimés chez les cellules HepG2, nous avons aussi réalisé des stimulations en conditions de surexpression du récepteur. Pour ce faire, lors des transfections, nous ajoutons une construction contenant l'ADNc du récepteur TR α à l'ADN de la construction 1.6FAS-pJFCAT1 et à l'ADN de pSV β -galactosidase servant au calcul de l'efficacité de transfection. Lors de la surexpression du récepteur TR α , nous avons obtenu une activité CAT exogène 3.4 fois plus élevée après 48 heures en présence de 1.6 μ M T3 et de 3.25 fois plus élevée après 48 heures en présence de 1.6 μ M T3 et 50 mM d'insuline. Notons que nous ne retrouvons pas de différence significative entre l'activité CAT enregistrée pour les cellules traitées à la T3 et celle enregistrée pour les cellules traitées à la T3 et à l'insuline.

Les expériences de transfection utilisant des cellules primaires, soient des hépatocytes embryonnaires de poulet (CEH), ont été plus laborieuses. L'efficacité de transfection étant très basse (près de 5%), nous n'avons pu obtenir qu'une fois des résultats positifs pour la construction 1.6FAS-pJFCAT1. Nous avons obtenu une activité CAT exogène 1.84 fois plus élevée dans les CEH traitées 48 heures à la T3 comparativement aux cellules transfectées avec la même construction mais non traitées (résultats non montrés).

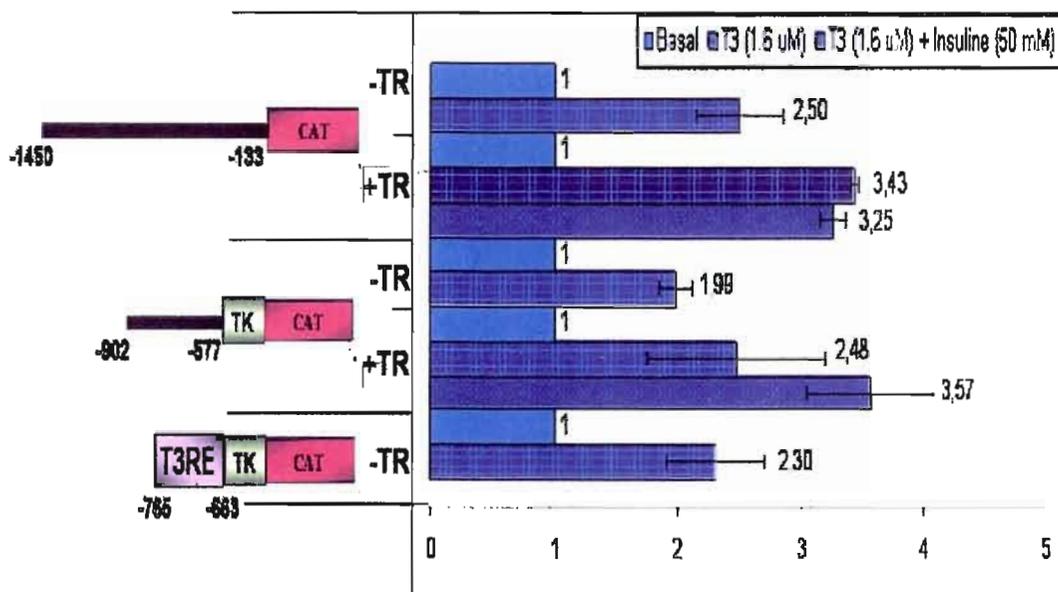


Figure 3.13 : Effets de la T3 et de l'insuline sur l'activité du promoteur FAS de l'oe. Compilation graphique de l'augmentation de l'activité CAT (axe des X) obtenue avec les constructions pJFCAT1-FAS1.6 (-1450/+133), TRE-TKCAT (-902/-577) et la construction contenant le petit fragment amplifié à l'aide des amorces #3 et 4 (-765/-663) suite aux stimulations, en comparaison avec l'activité obtenue sans stimulation. À gauche du graphique, on retrouve la schématisation des constructions transfectées, c'est-à-dire le fragment d'ADN de la partie promotrice contenu dans la construction, le gène rapporteur CAT et, dans certains cas, le promoteur hétérologue de la thymidine kinase (TK). L'activité CAT a été standardisée par l'activité β -gal et la quantité de protéines. Les conditions de transfection des cellules HepG2 sont décrites dans la section 'Matériels et Méthodes'. L'annotation +TR est utilisée lorsqu'il y a eu surexpression du récepteur TR α , l'annotation -TR lorsqu'il n'y avait pas de surexpression. Les valeurs sont généralement la représentation de 3 expériences individuelles.

Tel que mentionné au point 3.5, l'article de Wang *et al* nous a permis de nous concentrer sur un fragment situé entre -902/-577. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pBLCAT2 (construction TRE-TKCAT) et il a aussi servi pour les transfections. Sans surexpression du récepteur et suite à un jeûne de 24 heures et à 48 heures de stimulation à la T3, l'activité CAT exogène enregistrée était 1.99 fois plus élevée que chez les cellules n'ayant pas été stimulées (**Fig. 3.13**; milieu). Lorsque le récepteur est surexprimé, l'activité CAT est 2.48 fois plus élevée après une stimulation à la T3 de 48 heures, et 3.57 fois plus élevée après une stimulation à la T3 et à l'insuline pendant 48 heures. La différence entre ces deux conditions n'est toutefois pas significative. Dans les cellules primaires, nous avons obtenu, lors d'une expérience effectuée en triplicata, une activité CAT exogène 2.25 fois plus élevée dans les CEH traitées 48 heures à la T3 comparativement aux cellules transfectées avec la même

construction mais non traitées (résultats non montrés). Nos résultats nous permettent d'avancer qu'un TRE est présent à l'intérieur de ce fragment. Par contre, il ne semble pas y avoir d'effet synergique entre la T3 et l'insuline, comme on pouvait s'y attendre. Nous y reviendrons à la discussion.

Ces résultats sont renforcés par ceux obtenus suite à la transfection d'un plus petit morceau du fragment interne -902/-577, qui se situe entre -765 et -663 (construction $\frac{3}{4}$ -TRE-TKCAT). Suite à une stimulation de 48 heures à la T3, nous avons obtenu une activité CAT exogène de 2.3 fois supérieure à celle obtenue sans stimulation (**Fig. 3.13**; bas). L'ajout d'insuline au milieu de stimulation augmente légèrement l'activité CAT exogène enregistrée. Par contre cette augmentation ne semble pas être significative (résultats non montrés), comme c'était le cas avec les constructions contenant les fragments -1450/+133 et -902/-577.

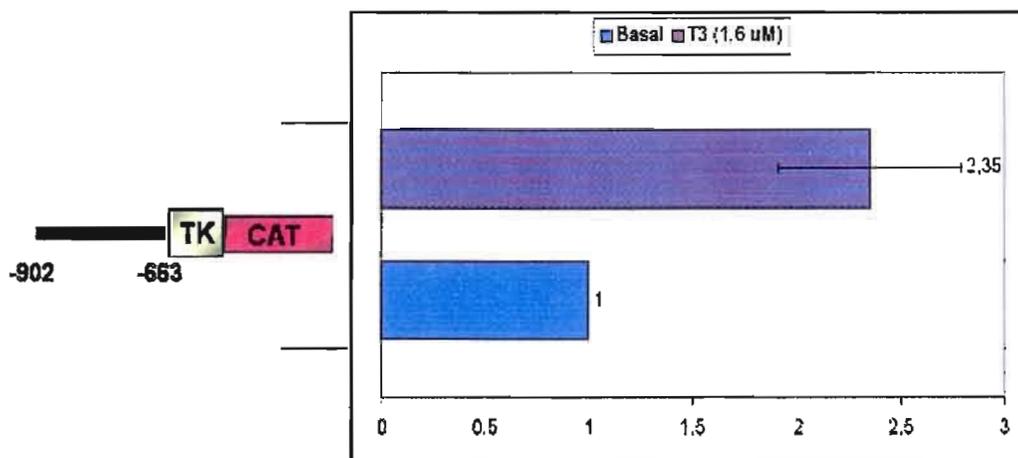


Figure 3.14 : Effets de la T3 sur l'activité de la partie située entre -902 et -663 du promoteur FAS de l'oie. Graphique de l'augmentation de l'activité CAT (axe des X) obtenue avec la construction $\frac{3}{4}$ -TRE-TKCAT (construction contenant le petit fragment amplifié à l'aide des amorces #2 et 3 (-902/-663)) suite à une stimulation de 48 heures avec 1.6 μ M de T3. À gauche du graphique on retrouve la schématisation de la construction transfectée, c'est-à-dire le fragment d'ADN de la partie promotrice contenu dans la construction, le gène rapporteur CAT et le promoteur hétérologue de la thymidine kinase (TK). L'activité CAT a été standardisée par l'activité β -gal et la quantité de protéines. Les conditions de transfection des cellules HepG2 sont décrites dans la section 'Matériels et Méthodes'. Les valeurs sont la représentation de 2 expériences individuelles réalisées en duplicata ou en triplicata.

Un résultat similaire a aussi été obtenu avec une autre construction réalisée à partir du fragment interne, soit le fragment situé entre -902 et -663 (construction $\frac{3}{4}$ -TRE-TKCAT),

amplifié à partir des amorces 2 et 3 (voir **Figure 3.11**; piste 2) qui contiendrait donc l'élément. En effet, lors de deux expériences indépendantes réalisées en duplicata ou en triplicata, nous avons enregistré une moyenne d'activité CAT exogène 2.35 fois plus élevée après 48 heures de stimulation à la T3 (**Figure 3.14**).

3.7 - Retards sur gel

Suite à l'analyse de la réponse à la T3 obtenue avec le fragment -765/-663, correspondant au fragment du promoteur du gène FAS de l'oie cloné dans le vecteur pBLCAT2 (construction nommée TRE-TKCAT), un oligonucléotide de 40 nucléotides a été synthétisé, et ce, en se basant aussi sur l'alignement de séquences présenté à la **Figure 3.9**. Ces oligos sens et anti-sens (CM-TRE-S et CM-TRE-AS) correspondent quant à eux au fragment -732/-692 du même promoteur et il ont été utilisés afin de réaliser des retards sur gel. Ces expériences ont pour but de démontrer la présence d'association entre un fragment d'ADN défini et des protéines nucléaires.

Le retard sur gel présenté à la **Figure 3.15** permet de voir qu'il y a bien formation de complexes entre les oligos CM-TRE-S, CM-TRE-AS et les protéines nucléaires extraites de cellules HepG2 traitées sous différentes conditions (basal, T3, T3/insuline). Pour plus de détails sur les retards sur gel, voir la section Matériels et Méthodes; section 2.2.7. En condition de stimulation à la T3 et aussi à la T3 et l'insuline, nous notons la présence de deux bandes de différentes intensités. Dans ces deux cas, la bande supérieure est de plus faible intensité que la bande inférieure. Ces complexes sont aussi présents lorsque l'on utilise des extraits nucléaires de cellules HepG2 non stimulées, mais ne migrent pas de la même façon (**Fig 3.15**; piste 3). En effet, en condition basale les bandes migrent plus lentement, et plus particulièrement en ce qui concerne la bande supérieure. Nous ne retrouvons donc pas de liaison majeure en condition basale.

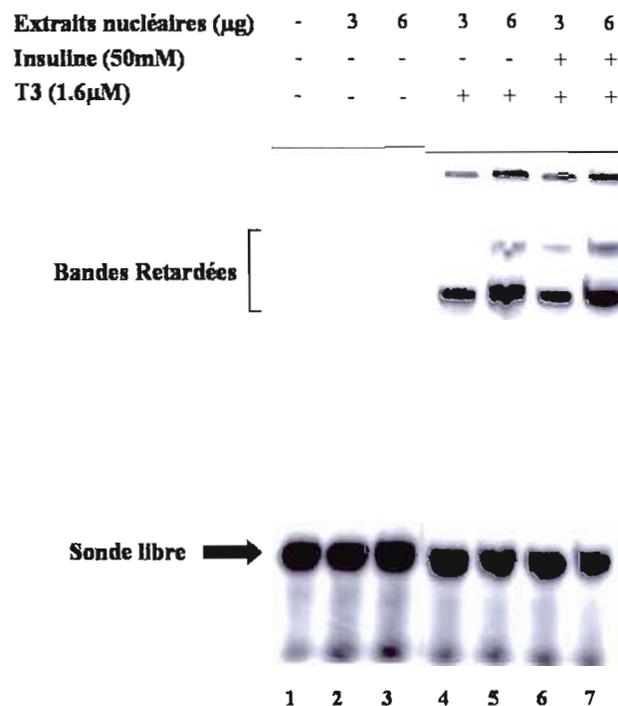


Figure 3.15 : Expérience de retard sur gel pour vérifier la liaison de protéines nucléaires au TRE putatif. Le fragment d'ADN double-brin 'TRE' marqué radioactivement, qui correspond au fragment -732/-692 de la partie promotrice du gène FAS de l'oie, a été incubé en absence (piste 1) ou en présence (pistes 2 à 7) d'une quantité croissante d'extraits nucléaires (3 ou 6 µg). Les cellules HepG2 utilisées afin de réaliser ces extraits nucléaires ont été cultivées pendant 48 heures en absence (pistes 2 et 3) ou en présence de 1.6µM de T3 (pistes 4 et 5) ou 1.6µM de T3 avec 50mM d'insuline (pistes 6 et 7). Le crochet représente la formation de complexes. La flèche pleine au bas du gel correspond à la sonde libre.

La formation des complexes est de beaucoup augmentée en présence d'extraits nucléaires de cellules stimulées à la T3. Les bandes s'intensifient lorsque la quantité d'extraits nucléaires utilisés augmente (**Fig 3.15**; piste 4 vs 5 ou piste 6 vs 7). L'ajout de l'insuline à la T3 lors des stimulations ne semble pas entraîner la formation de complexes différents de ceux obtenus suite à une stimulation à la T3 (**Fig 3.15**; piste 4 vs 6 ou piste 5 vs 7). D'après des études préalables (Thurmond *et al*, 1998), les bandes obtenues pourraient correspondre à des complexes d'homodimères TR/TR ou à des complexes d'hétérodimères RXR/TR. Les complexes hétérodimériques formés de RXR et TR se lient aux TREs avec une affinité plus grande et ils transactivent de façon plus efficace que les homodimères TR/TR (Thurmond *et al*, 1998). Les hétérodimères RXR/TR se lient aux répétitions directes des TREs selon une

polarité définie; RXR et TR se lie aux demi-sites en amont et en aval respectivement (Thurmond *et al*, 1998).

Ces complexes seraient bien spécifiques, puisqu'en effectuant une réaction de compétition avec un excès de 50, 100 ou 500 fois avec l'oligo -732/-692 non marqué, les bandes obtenues

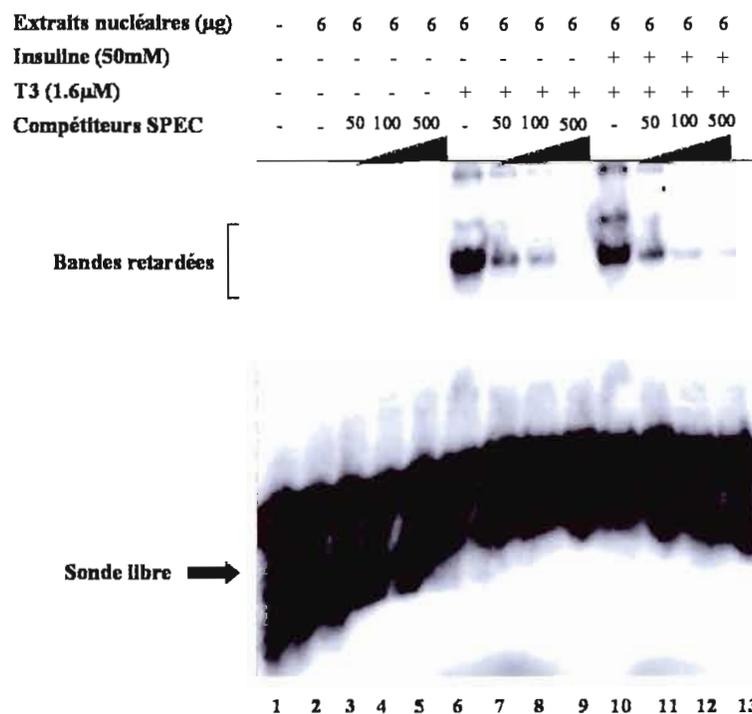


Figure 3.16 : Expérience de retard sur gel de compétition spécifique avec le TRE. Le fragment d'ADN double-brin 'TRE' marqué radioactivement, qui correspond au fragment -732/-692 de la partie promotrice du gène FAS de l'oie, a été incubé en absence (piste 1) ou en présence (pistes 2 à 13) d'extraits nucléaires (6 µg). Les cellules HepG2 utilisées afin de réaliser ces extraits nucléaires ont été cultivées pendant 48 heures en absence (pistes 2 et 5) ou en présence de 1.6µM de T3 (pistes 6 et 9) ou 1.6µM de T3 avec 50mM d'insuline (pistes 10 et 13). La compétition spécifique a été réalisée en utilisant le fragment double-brin 'TRE' (-732/-692) froid comme compétiteur, et ce à un excès molaire de 50 (pistes 3, 7 et 11), 100 (pistes 4, 8 et 12) et 500 (pistes 5, 9 et 13). Les mélanges réactionnels des pistes 2, 6 et 10 ne contenaient pas de compétiteur spécifique froid. Le crochet représente la formation de complexes. La flèche pleine au bas du gel correspond à la sonde libre.

disparaissent (**Fig 3.16**). Toutefois la réalisation de compétition non spécifique (**Fig 3.17**) nous a donné le même résultat que celui obtenu en compétition spécifique. La compétition non spécifique a été réalisée en utilisant un oligo double-brin froid de 32pb correspondant à un fragment de l'EST BB470007 chez la souris. Nous ne l'avons pas fait synthétiser nous-même,

mais nous l'avons plutôt récupéré d'un autre labo. Les analyses quant à la possibilité de formation de dimères entre les oligos CM-TRE-S et CM-TRE-AS (oligos d'intérêts) et le compétiteur non spécifique (fragment de l'EST BB470007, sens (CAC ATA CCG CAC AGA TGG CCT AGA GAT GTC AC) et anti-sens (GTG ACA TCT CTA GGC CAT CTG TGC GGT AGT TG)) n'ont donc pas été réalisées avant d'effectuer le retard sur gel. Des analyses subséquentes nous ont montré des ressemblances entre ces deux couples d'oligos. Il serait donc logique de penser que les oligos utilisés à titre de compétiteurs non spécifiques ait effectivement compétitionné, et ainsi entraîné la disparition des bandes retardées.

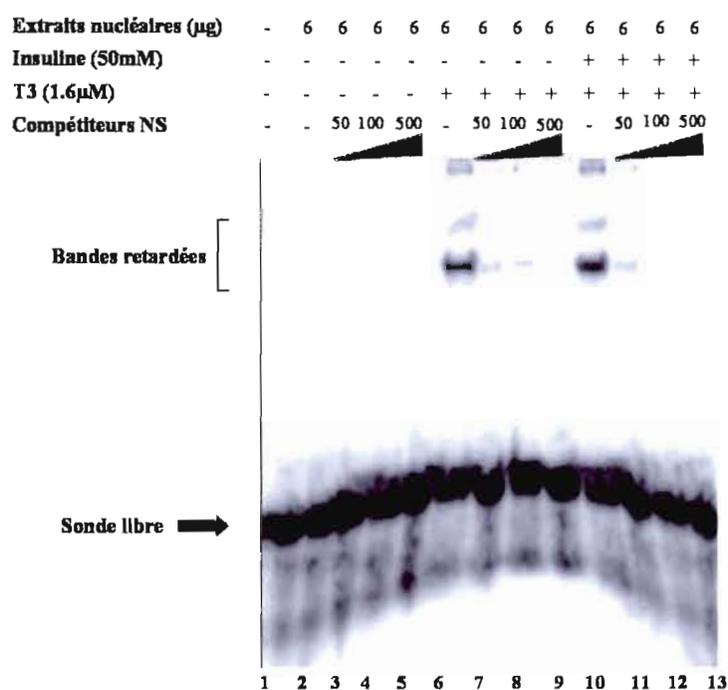


Figure 3.17 : Expérience de retard sur gel de compétition non spécifique avec le TRE. Le fragment d'ADN double-brin 'TRE' marqué radioactivement, qui correspond au fragment -732/-692 de la partie promotrice du gène FAS de l'oie, a été incubé en absence (piste 1) ou en présence (pistes 2 à 13) d'extraits nucléaires (6 µg). Les cellules HepG2 utilisées afin de réaliser ces extraits nucléaires ont été cultivées pendant 48 heures en absence (pistes 2 et 5) ou en présence de 1.6µM de T3 (pistes 6 et 9) ou 1.6µM de T3 avec 50mM d'insuline (pistes 10 et 13). La compétition non spécifique a été réalisée en utilisant un oligo double-brin froid de 32pb correspondant à un fragment de l'EST BB470007 chez la souris, et ce à un excès molaire de 50 (pistes 3, 7 et 11), 100 (pistes 4, 8 et 12) et 500 (pistes 5, 9 et 13). Les mélanges réactionnels des pistes 2, 6 et 10 ne contenaient pas de compétiteur non spécifique froid. Le crochet représente la formation de complexes. La flèche pleine au bas du gel correspond à la sonde libre.

L'addition d'anticorps anti-TR ou anti-RXR est utilisé afin de nous permettre de déterminer la spécificité des complexes obtenus. Notons que nous n'avons pas obtenu l'apparition d'une bande plus haute, mais plutôt la disparition ou l'atténuation d'une ou des deux bandes normalement retrouvées. Ceci s'explique par le fait qu'il est possible que l'anticorps ne se fixe pas au complexe (protéines + ADN), mais empêche uniquement la fixation des protéines par compétition.

Extraits nucléaires (µg)	-	6	6	6	6	6	6	6	6
Insuline (50mM)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
T3 (1.6µM)	-	+	+	+	+	+	+	+	+
IgG	-	-	TR	-	RXR	-	TR	-	RXR

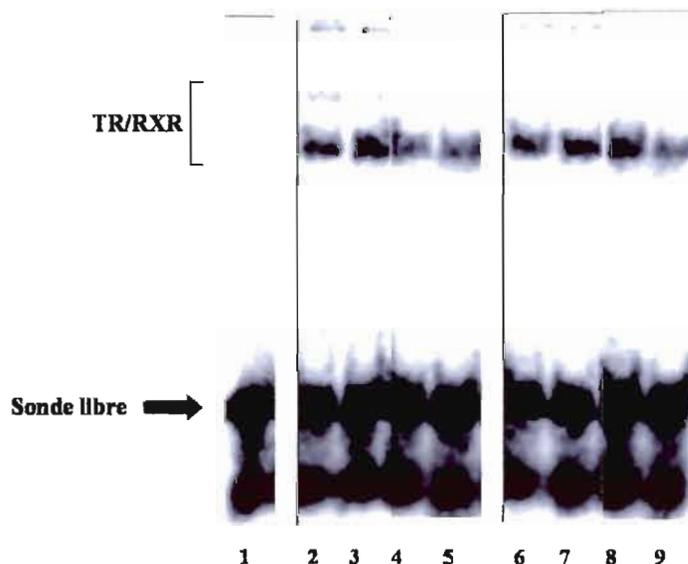


Figure 3.18 : Expérience de retard sur gel de supershift avec un anticorps anti-TR et anti-RXR. Le fragment d'ADN double-brin 'TRE' marqué radioactivement, qui correspond au fragment -732/-692 de la partie promotrice du gène FAS de l'oie, a été incubé en absence (piste 1) ou en présence (pistes 2 à 9) d'extraits nucléaires (6 µg). Les cellules HepG2 utilisées afin de réaliser ces extraits nucléaires ont été cultivées pendant 48 heures en présence de 1.6µM de T3 (pistes 2 à 5) ou en présence de 1.6µM de T3 avec 50mM d'insuline (pistes 6 à 9). Les expériences de supershift ont été réalisées en ajoutant 1µg d'un anticorps anti-TRα1, dirigé contre les isoformes TRα1/2 et TRβ1/2 reconnaissant à la fois les protéines de rat, de la souris, du poulet et de l'humain (pistes 3 et 7), ou 1µg d'un anticorps anti-RXR (Δ197), dirigé contre les isoformes RXRα, RXRβ et RXRγ et reconnaissant à la fois les protéines de rat, de la souris et de l'humain (pistes 5 et 9). Les anticorps ont été ajoutés pendant 15 à 30 minutes additionnelles aux mélanges. Les mélanges réactionnels des pistes 2, 4, 6 et 8 ne contenaient pas d'anticorps. Le crochet représente la formation de complexes TR/TR ou TR/RXR. La flèche pleine au bas du gel correspond à la sonde non appariée.

Ainsi en condition de stimulation à la T3, l'ajout de l'anticorps anti-TR au mélange de protéines nucléaires et d'oligos CM-TRE-S et CM-TRE-AS provoque une légère diminution d'intensité de la bande supérieure (**Fig 3.18**; piste 2 vs 3), suggérant qu'il y a association de l'anticorps anti-TR à ce complexe. Rien ne change lors de l'ajout de l'anticorps anti-RXR (**Fig 3.18**; piste 4 vs 5). Par contre, l'ajout d'insuline au milieu lors des stimulations semble entraîner un effet inverse. Effectivement, en milieu contenant de la T3 et de l'insuline, l'ajout de l'anticorps anti-TR au mélange protéines nucléaires et ne provoque aucun changement (**Fig 3.18**; piste 6 vs 7), alors que la bande inférieure diminue d'intensité et la bande supérieure disparaît complètement en présence de l'anticorps anti-RXR (**Fig 3.18**; piste 8 vs 9). Toutefois il est à noter que ces résultats sont issus d'une expérience unique. Ils devront donc être confirmés en répétant ce retard sur gel. Ceci permettra de confirmer les résultats obtenus en **3.18** et permettra peut-être de mieux comprendre les conditions dans lesquelles certains complexes sont ou ne sont pas formés. Les anticorps dirigés contre le TR et le RXR ont tout de même permis de faire varier une bande à la fois ou les deux en même temps, suggérant la possibilité que ces deux bandes près l'une de l'autre sont bien toutes les deux spécifiques aux complexes et qu'il ne s'agirait pas de complexes non TR/RXR spécifiques. La présence de bandes de poids différents pourrait être expliquée par la formation de différents complexes; soit des homodimères TR/TR, des hétérodimères TR/RXR et même des homodimères RXR/RXR. Mise à part les bandes qui représentent l'oligo libre (forme simple brin et double brin), aucune autre bande n'apparaît sur les retards sur gel.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1- Réponse à la T3 et identification d'un TRE

Tel que mentionné précédemment, la synthétase des acides gras (FAS) est régulée par des éléments contenus dans la diète et par la présence de certaines hormones. Cette régulation est réalisée principalement au niveau de la transcription (Back *et al*, 1986). Il a été démontré que la T3 stimule l'accumulation de l'enzyme FAS, de même que la transcription du gène dans les hépatocytes d'embryons de poulet en culture. Des études ont d'ailleurs aussi montré que la région promotrice du gène FAS de l'oie semblait contenir les éléments nécessaires pour la réponse à la T3 (Kameda *et al*, 1991). En effet, ils ont obtenu une activité CAT exogène 2.3 fois plus élevée en présence de l'hormone. Ces expériences ont été réalisées en utilisant un fragment du promoteur d'une longueur d'environ 1,6 Kpb. C'est donc dans le but de continuer l'étude de l'action de la T3 sur ce promoteur de l'oie, et aussi afin de déterminer l'emplacement d'un site putatif de réponse à la T3 (TRE), que nous avons aussi isolé un fragment du promoteur. Ce fragment a aussi une longueur d'environ 1600 pb, soit en réalité 1450 pb en amont du site d'initiation de la transcription et 133 pb en aval de ce dernier.

Ceci nous a permis d'avoir une séquence déterminée de 1450 pb du promoteur, alors qu'auparavant seulement 597 pb avaient été séquencées par un autre groupe.

Les expériences de stimulation en présence de T3 (1.6 μ M) ont été réalisées en utilisant différents types cellulaires; soient des cellules LMH, HepG2 et des CEH. Ces cellules ont toutes été décrites précédemment. Les cellules LMH n'ont toutefois pas été utilisées tout au long de cette étude, puisque leurs réponses aux différentes stimulations semblaient varier énormément. En ce qui a trait aux hépatocytes embryonnaires de poulet, ou CEH, nous avons obtenu très peu de résultats avec ces cellules. La mauvaise efficacité de transfection de ces

cellules primaires explique cette situation, selon nous, et ce malgré le fait que nous ayons essayé plusieurs agents de transfection différents dans le but de remédier à cette situation. Ceci explique pourquoi la majorité des résultats montrés dans ce travail sont issus d'expériences réalisées avec les cellules HepG2. L'utilisation de ces cellules est tout à fait adéquate, puisqu'il a été montré qu'elles avaient conservé les fonctions biochimiques normales des cellules du foie (Knowles *et al*, 1980).

Les résultats que nous avons obtenus en transfectant la construction 1.6FAS-pJFCAT1, contenant le fragment entier d'environ 1.6 Kpb du promoteur du gène FAS de l'oie cloné dans le vecteur pJFCAT1, nous donnent une augmentation de l'activité CAT exogène de 2.5 fois supérieure en présence de T3 (**Fig. 3.13 (haut)**). C'est donc dire que nous obtenons une stimulation induite par la T3 similaire, sinon légèrement supérieure, à celle obtenue par Kameda. Cette augmentation est bien causée par l'addition d'un fragment d'ADN de la partie promotrice du gène FAS de l'oie dans le vecteur, puisque nous ne retrouvons pas d'augmentation de l'activité du gène rapporteur CAT en stimulant des cellules contenant les vecteurs contrôles avec la même concentration d'hormone (résultats non montrés). L'utilisation des constructions TRE-TKCAT, $\frac{3}{4}$ -TRE-TKCAT et $\frac{2}{3}$ -TRE-TKCAT (**Fig. 3.13 et 3.14**) générant une augmentation de l'activité CAT exogène presque toujours supérieure à 2 fois en présence de T3, semble bien montrer que nous avons identifié l'élément responsable de la réponse à l'hormone, c'est-à-dire un TRE.

L'alignement de séquences tiré de l'article de Wang *et al* (2004) et présenté à la **Fig. 3.9**, auquel nous avons ajouté notre séquence du promoteur de l'oie, montre aussi que cette région est hautement conservée entre les espèces et qu'elle agit comme un élément de réponse à la T3 chez l'humain, la souris, le rat et le poulet. L'homologie est d'ailleurs très élevée entre le poulet et l'oie, puisque l'on retrouve uniquement deux bases différentes.

4.2- Réponse à l'insuline et effet synergique

La T3 est reconnue comme une hormone qui stimule la synthèse des acides gras (stimule l'accumulation des ARNm FAS) et l'ajout d'insuline amplifierait cette réponse (Wilson *et al*, 1986). L'effet des deux hormones serait donc synergique. Stapleton (1990) a démontré qu'il y avait augmentation de la transcription de 4 à 6 fois en présence de T3 pendant 48 heures pour le gène FAS du poulet (avec des cellules CEH) et que cette augmentation passait à 10 fois en

présence de T3 et d'insuline pendant 24 heures, alors que l'insuline seule ne semblait pas entraîner d'augmentation de la transcription. Nous avons donc testé cette affirmation en ajoutant de l'insuline (50 nM), en plus de la T3, au milieu de nos cellules. Nous n'avons toutefois pas obtenu de résultat allant en ce sens. En effet, l'ajout d'insuline au milieu de stimulation des cellules (HepG2 ou CEH), n'a en aucun cas entraîné une augmentation significative de l'activité CAT exogène enregistrée dans ces conditions, par rapport à celle enregistrée en l'unique présence de T3, et ce, quelque soit la construction transfectée (**Fig. 3.13**). Un modèle proposé par Goodridge pour expliquer l'effet synergique serait que cet effet de la T3 et de l'insuline passerait par un élément commun, peut-être un T3RE. Ce ne semble pas être le cas ici, puisque nous n'obtenons pas de stimulation supérieure en ajoutant de l'insuline. Ces deux réponses passeraient donc peut-être par des éléments différents. Contrairement à ce qu'avait avancé Goodridge, on ne retrouverait donc pas d'effet synergique direct d'expression en utilisant une construction contenant un T3RE, du moins en ce qui concerne le fragment de 1.6 Kpb que nous avons isolé.

Kameda (1991), qui a travaillé sur le promoteur de l'oie, ne fait pas mention de stimulations plus importantes en présence de T3 et d'insuline lors d'expériences de transfection avec sa construction contenant le fragment de 1.6 Kpb dans les CEH. Nous devons donc nous questionner sur le fait que nous ne retrouvons pas l'effet de l'insuline avec nos constructions, ou du moins pour celle contenant le plus grand fragment. En effet, une absence de réponse pour les constructions les plus petites aurait pu être expliquée par le fait qu'il manquait des éléments essentiels dû à la taille des fragments; toutefois, nous nous serions attendu à avoir une réponse avec la construction contenant le plus grand fragment. Par contre, il ne faut pas exclure la possibilité que l'élément qui procure un effet synergique de la T3 et de l'insuline directement au niveau transcriptionnel, si il y en a un, se retrouve en amont, ou peut-être même en aval, du fragment de 1.6 Kpb que nous avons cloné.

Le groupe de Sul (Latasa *et al*, 2003) a décrit les deux éléments essentiels de la réponse à l'insuline dans le promoteur FAS du rat comme étant un SRE à la position -150 et une E-box à la position -65. L'analyse de notre séquence nous montre que notre construction 1.6FAS-pJFCAT1 (grand fragment) contient pourtant ces deux éléments critiques à la réponse. Alors comment expliquer que nous n'obtenions pas une plus grande stimulation en présence des deux hormones? Une des réponses possibles pourrait être le choix des cellules, dans notre cas,

les cellules HepG2. Toutefois, comme nous l'avons mentionné auparavant, ces cellules répondent bien à la T3 (vu les résultats que nous avons obtenus) et elles sont aussi fréquemment utilisées pour des études impliquant l'insuline, puisqu'elles expriment les récepteurs à l'insuline et tous les facteurs nécessaires à cette réponse (Knowles *et al.*, 1980). Ce ne serait donc logiquement pas la raison. Il serait toutefois possible de surexprimer les récepteurs à l'insuline afin d'en avoir la preuve. En obtenant une forte augmentation de l'activité CAT exogène avec la construction 1.6FAS-pJFCAT1 en surexprimant les récepteurs de l'insuline et en stimulant à la T3 et à l'insuline, ceci nous montrerait que finalement le problème était peut-être à ce niveau. Le milieu utilisé pour la culture des cellules HepG2 avait une concentration élevée en glucose (25mM), expliquant peut-être le fait que l'on ne retrouve pas l'effet de l'insuline. Cette concentration élevée en glucose pourrait en effet peut-être causer un effet de saturation et on ne verrait pas l'effet de stimulation par l'insuline. Afin de vérifier l'influence de la quantité de glucose dans le milieu de culture, nos expériences pourraient être répétées en utilisant la partie promotrice d'un gène connu pour répondre à l'insuline (par exemple SCD-1) cloné dans le vecteur pJFCAT1, et ce dans les mêmes conditions de stimulation avec les cellules HepG2. Aussi, il est possible, que chez l'oie d'autres éléments soient essentiels afin de retrouver la réponse à l'insuline. Ces éléments se retrouveraient peut-être plus loin en amont sur le promoteur.

Il a été montré que la phosphorylation du récepteur de la T3 joue un rôle critique dans son activité, de même que pour sa stabilité après la fixation de la T3 (Lin *et al.*, 1992; Ting *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2003). L'insuline ajoutée au milieu pourrait contribuer à la phosphorylation du récepteur, mais peut-être que d'autres cofacteurs se trouvant plus en amont sur le promoteur, ou même en aval, sont nécessaires pour compléter le processus. Ces cofacteurs agissent peut-être au niveau de la conformation que prend le complexe une fois réalisé. L'absence de réponse à l'insuline, et d'effet synergique entre les deux hormones, telle qu'observée dans notre cas serait donc normale, puisqu'il nous manquerait des éléments essentiels à cette réponse.

Des résultats d'activité de l'enzyme FAS et de quantification des ARNm FAS obtenus par d'autres étudiantes du laboratoire du Dr Mounier, montrent bien qu'il existe réellement un effet synergique entre la T3 et l'insuline. Ces analyses portent toutefois sur le gène FAS ou l'enzyme FAS de poulet, puisque ces étudiantes ont utilisé les CEH, et non pas les HepG2.

Elles n'effectuaient pas d'analyse de gène exogène. Elles n'ont donc pas eu besoin d'effectuer de transfections, ce qui permet d'amener un autre élément renforçant le fait que l'efficacité de transfection est un véritable problème. L'activité de la FAS est augmentée d'environ 3.5 fois en présence de T3, d'environ 3.5 fois aussi en présence d'insuline et elle est augmentée d'environ 14 fois lorsque les deux hormones sont présentes à la fois (résultats obtenus par S. Sawadogo, Labo. Dr Mounier). Des analyses par RT-PCR en temps réel des ARN totaux ont montré que les ARNm FAS sont environ 2.5 fois plus nombreux en présence de T3, environ 2.0 fois plus nombreux en présence d'insuline et finalement, environ 9.5 fois plus nombreux lorsque les deux hormones sont présentes à la fois (résultats obtenus par P. Boissier, Labo. Dr Mounier).

Tout semble donc vouloir démontrer qu'il y a vraiment un effet synergique entre les deux hormones. La nature des expériences réalisées au cours de ce travail n'en permet toutefois pas la détection, et ce, pour une ou plusieurs des raisons énoncées précédemment.

Vu la très forte augmentation enregistrée, et ce, tant au niveau de l'activité de l'enzyme que de la quantité des ARNm spécifiques, il se pourrait aussi que l'effet synergique remarqué ne soit pas le résultat d'un phénomène se produisant au niveau transcriptionnel. Mais si cet effet n'est pas de nature transcriptionnelle, de quoi s'agit-il? Il serait possible que cet effet soit le résultat d'un phénomène post-transcriptionnel, passant par la stabilisation des ARNm produits (Swierczynski *et al*, 1991). Ainsi, ce ne serait pas nécessairement une augmentation directe du nombre des ARNm, mais plutôt une augmentation indirecte causée par une stabilisation des ARNm produits normalement qui empêcherait leur dégradation. La stabilisation des ARNm produits pourrait être vérifiée en utilisant un inhibiteur de la transcription, par exemple l'actinomycine D. Ainsi nous pourrions vérifier si il y a une réelle augmentation des ARNm, ou pas, dans le temps. Si l'on inhibe la transcription, mais que l'on continue à voir un enrichissement en ARNm de FAS, ceci nous indique que la modification se passerait après, soit donc de façon post-transcriptionnelle ou traductionnelle.

Une modification post-transcriptionnelle pourrait être vérifiée en utilisant un inhibiteur de kinases, par exemple H7 ou la génistéine. L'utilisation d'inhibiteur de kinases en présence de T3 et d'insuline nous permettrait de voir si nous avons une diminution de l'activité de la FAS. En supposant que nous obtenions une diminution de l'activité de l'enzyme suite à un

traitement aux inhibiteurs de kinases, ceci nous indiquerait que l'effet synergique enregistré provient de modifications post-traductionnelles. Il serait même possible d'utiliser les extraits nucléaires de ces cellules traitées aux hormones et avec l'inhibiteur de kinases afin de réaliser des retards sur gel et ainsi comparer les bandes avec celles que nous avons obtenues lors de ce travail.

4.3- Complexes obtenus par retard sur gel en utilisant le TRE putatif identifié

L'analyse de la section du promoteur du gène FAS de l'oie comprise entre -732 et -692 pb, en utilisant la technique de retard sur gel, devait nous permettre de vérifier si nous avons bien identifié un TRE putatif. Le gel présenté à la **Fig 3.15** montre qu'il y a bien liaison entre les protéines nucléaires des extraits utilisés et le fragment d'ADN isolé précédemment. De plus, nous voyons que cette fixation est beaucoup plus importante lorsque les cellules sont incubées en présence de T3, ou d'un mélange de T3 et d'insuline, suggérant fortement l'idée que nous avons vraiment isolé un TRE. Toutefois, ces résultats devaient être appuyés par d'autres preuves pour permettre d'en tirer certaines conclusions. Notons ici que l'ajout d'insuline aux cellules ne semble pas augmenter la liaison des protéines au fragment d'ADN isolé, puisque les bandes obtenues semblent être de la même intensité.

La liaison de protéines nucléaires semble être spécifique au fragment d'ADN isolé, car les deux bandes rapprochées retrouvées à la **Fig. 3.15** disparaissent lors d'expériences de compétition spécifique présentées à la **Fig 3.16**. Le fragment d'ADN non marqué radioactivement compétitionnerait donc avec lui-même, mais marqué radioactivement, pour la liaison aux protéines.

Toutefois les expériences de compétition non-spécifique présentées en **3.17** ne permettent pas de tirer les mêmes conclusions. En effet, alors que le fragment utilisé pour effectuer la réaction de compétition non-spécifique ne devrait pas lier les protéines nucléaires, nous obtenons une disparition des bandes signifiant qu'il y aurait liaison des protéines nucléaires à ce compétiteur non-spécifique. Par contre, tel que mentionné à la section précédente, une analyse informatique de comparaison des deux oligos simples brins de 32pb qui correspondent à un fragment de l'EST BB470007 chez la souris avec le fragment d'intérêt isolé (-732/-692 du promoteur du gène FAS de l'oie), montre qu'ils ont une grande similitude, et qu'ils peuvent s'apparier. Ceci explique peut-être le fait qu'il y ait compétition entre ces séquences pour les

protéines nucléaires. Afin de remédier à ce problème, il serait possible d'utiliser une forme mutée des oligos CM-S-TRE et CM-AS-TRE afin d'effectuer la compétition non-spécifique. En effet, si certaines des bases qui constituent le TRE sont critiques à la fixation des protéines nucléaires à ce dernier, en les modifiant, les complexes spécifiques ne devraient plus pouvoir s'y fixer.

L'expérience de supershift en utilisant des anticorps anti-TR et anti-RXR (**Fig. 3.18**) a été réalisée afin de déterminer la présence de ces derniers à l'intérieur des complexes formés. Les résultats obtenus nous permettent uniquement de dire qu'il semble bien y avoir fixation de l'anticorps RXR aux complexes lorsque l'insuline est présente dans le milieu de culture des cellules (**Fig 3.18**; piste 8 vs 9). Ceci indique donc la présence de RXR dans le complexe. Nous ne pouvons nous prononcer sur les résultats obtenus avec l'anti-TR, puisqu'ils ne sont pas assez clairs. Ils devront donc être répétés.

Que pourrait entraîner comme modification la présence de l'insuline dans le milieu? La présence d'insuline dans le milieu entraîne peut-être des modifications qui auraient comme conséquences de modifier la conformation de l'élément, et ainsi peut-être d'empêcher la fixation d'un deuxième TR (formation d'homodimères TR). Ces modifications pourraient, par exemple, être des mécanismes de phosphorylation de certains facteurs de transcription. Ceci pourrait donc favoriser la liaison de RXR au complexe (formation d'hétérodimères TR/RXR ou peut-être même d'homodimères RXR?). Il a été démontré que les complexes hétérodimériques TR/RXR pouvaient entraîner une superactivation d'un gène rapporteur si leur ligand respectif est présent dans le milieu (Li *et al*, 2002). Cet enrichissement en hétérodimères TR/RXR que nous semblons observer en présence d'insuline pourrait-il alors jouer un rôle dans l'effet synergique décrit précédemment? Alors serait-il possible que tout ceci se produise au niveau transcriptionnel? Est-ce que la liaison d'autres protéines cofacteurs essentielles exprimées en présence d'insuline, mais absente sur le fragment de 1.6 Kpb, empêche la fixation de TR? D'autres études sont nécessaires afin de répondre à ces questions.

Quoiqu'il en soit, la comparaison de nos résultats de retard sur gel en présence des anticorps anti-TR ou anti-RXR avec ceux obtenus par Debbie Thurmond présentés à la **Figure 4.19** (Thurmond *et al*, 1998), nous permet toutefois d'avancer l'idée que nous sommes réellement en présence d'un TRE nouvellement identifié, puisque le patron des bandes obtenues est

semblable. Elle obtient aussi deux bandes très rapprochées l'une de l'autre. Par contre, lorsque les anti-TR et anti-RXR sont présents, elle obtient vraiment une bande retardée, alors que nous obtenons une disparition ou une diminution du signal. Ces expériences devront toutefois être répétées afin de bien confirmer ces résultats. Il faut noter qu'il y a plusieurs différences entre les expériences de Thurmond et les nôtres. Effectivement, le type cellulaire utilisé était différent (CEH vs HepG2), les conditions de stimulation des cellules étaient légèrement différentes (présence continue d'insuline et de corticostérone pendant 48 heures et stimulation à la T3 pendant 24 heures vs stimulation à la T3 pendant 48 heures), le promoteur étudié ne provient pas du même organisme (poulet vs oie), ni du même gène (enzyme malique vs FAS). Ces différences expliquent probablement celles retrouvées au niveau des résultats. Il serait aussi intéressant, lors de la reprise de ces expériences, d'y inclure un anti-corps anti-LXR. L'utilisation de cet anticorps anti-LXR permettrait de vérifier si ce TRE agit aussi comme site de fixation putatif pour le récepteur LXR, et ce, tel que mentionné par Wang *et al* en 2004.

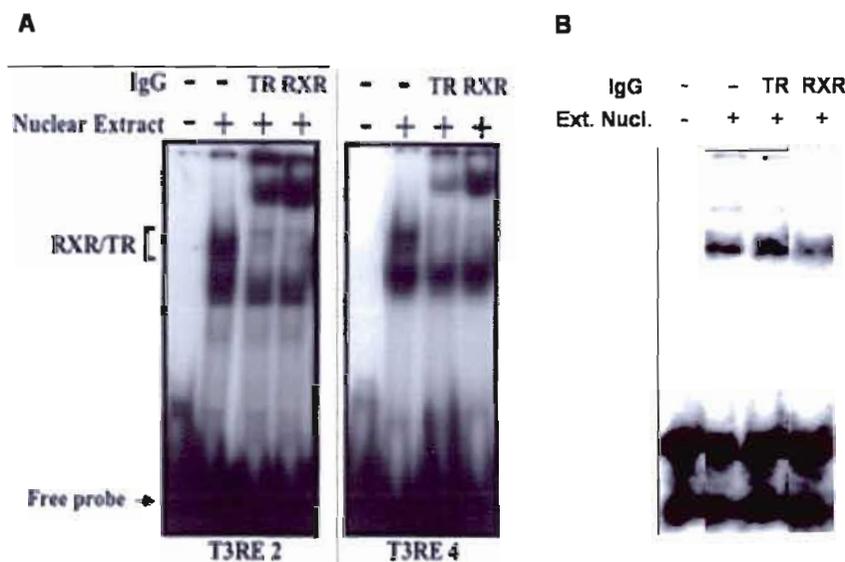


Figure 4.19 : Comparaison des complexes obtenus par supershift par Debbie Thurmond (1998) et ceux obtenus lors de notre étude. A) Retards sur gel réalisés par Debbie Thurmond en utilisant le T3RE #2 et #4 contenus dans le T3RU du promoteur du gène de l'enzyme malique du poulet. Les extraits nucléaires utilisés proviennent d'hépatocytes embryonnaires de poulet (CEH) cultivés en présence d'insuline et de corticostérone pendant 48 heures et en présence de T3 pendant 24 heures. Les mélanges réactionnels pour les retards sur gel ont été réalisés en utilisant 7 µg d'extraits nucléaires et ont été mis en présence d'anti-TR et d'anti-RXR pendant 15 minutes. **B)** Ce retard sur gel a été réalisé tel que décrit en 'Matériels et Méthodes'. Cette image est extraite de celle présentée à la Fig 3.18 (donc voir légende en 3.18) et présente les résultats obtenus avec les extraits nucléaires de cellules HepG2 ayant été mises en présence d'insuline et de T3 pendant 48 heures.

Tel que mentionné précédemment, la prévalence de l'obésité, ainsi que les effets bénéfiques cumulatifs apportés par des réductions de la mise en réserve des graisses, soulignent le besoin de comprendre les mécanismes de synthèse des acides gras (Wang *et al*, 2004). Les recherches menées par le groupe de Ntambi ont permis de démontrer que les acides gras mis en réserve sous la forme de triglycérides provenaient essentiellement de la synthèse *de novo* (Miyazaki *et al*, 2004). Cette synthèse *de novo* serait donc principalement responsable de l'adiposité. La compréhension des mécanismes de régulation du gène FAS est donc primordiale, puisque ce dernier est un gène clé de cette synthèse *de novo* des acides gras. En arrivant à diminuer l'expression des gènes impliqués dans la synthèse *de novo* des acides gras, nous pourrions peut-être arriver à diminuer l'adiposité.

Nous savons que lors de la prise alimentaire, la sécrétion de T3 est augmentée, et ce, afin d'éliminer le glucose élevé du système. La sécrétion d'insuline est aussi augmentée dans ces conditions. Ces deux hormones agissent ensuite, entre autres, directement sur l'expression de FAS via des éléments de réponse contenus dans la partie promotrice du gène. Lors de notre étude, nous pensons avoir identifié un de ces éléments, soit un TRE. Des résultats de Kameda *et al* (1991) semblaient démontrer que l'action de ces deux hormones était additive. Notre étude d'analyse du promoteur ne nous a pas permis de tirer cette conclusion, par contre, d'autres résultats obtenus au laboratoire semblent montrer que leurs effets sont réellement additifs, toutefois à un niveau de régulation différent de celui que nous avons étudié. Il serait donc très intéressant de poursuivre les études afin de déterminer les mécanismes selon lesquels cette synergie se produit et de comprendre leur implication dans l'adiposité.

CONCLUSIONS

En conclusion, nous pouvons dire que les objectifs principaux de ce travail de recherche soient :

- d'étudier la régulation de l'expression du gène FAS de l'oie par la T3 et l'insuline en utilisant la région promotrice du gène;
 - de localiser un élément de réponse à la T3 dans la partie promotrice du gène FAS chez l'oie;
- et
- de caractériser certains des éléments se fixant à ce TRE,

ont été atteints. En effet, nous avons obtenu une augmentation de l'activité du gène rapporteur CAT en stimulant à la T3, et ce en utilisant les 1600 premières paires de bases du promoteur FAS de l'oie. Ceci nous a permis de localiser cet élément entre -732/-692. Notre étude semble montrer qu'il y a fixation de TR et de RXR à cet élément.

Toutefois, il faut noter que des analyses supplémentaires sont nécessaires afin d'expliquer le fait que nous ne retrouvons pas d'effet de stimulation avec l'insuline, et ce en utilisant le fragment de 1.6 Kpb de l'oie. Ceci pourrait être expliqué par une spécificité de cette espèce ou par l'utilisation d'un milieu de culture trop riche en glucose (25mM). Il serait donc justifié de tester un milieu ne contenant que 5mM de glucose. Les résultats obtenus en utilisant la technique de retard sur gel nécessitent aussi d'être répétés. Toutefois, la comparaison de nos résultats avec ceux obtenus ultérieurement par un autre groupe semble montrer que nous sommes vraiment en présence d'un TRE. En répétant ces expériences et en obtenant des résultats similaires, il sera plus facile de justifier l'affirmation que les homodimères RXR/RXR et les hétérodimères TR/RXR semblent se fixer de manière préférentielle à ce TRE en présence d'insuline. Notre recherche a donc permis d'apporter de nouvelles informations sur la régulation transcriptionnelle par la T3 du gène FAS (de l'oie) impliqué dans la lipogenèse hépatique, tout en soulevant de nouvelles questions quant au mode de régulation de ce gène par l'insuline et par ces deux hormones à la fois.

RÉFÉRENCES

- Aarsland, A., Chinkes, D., and R.R. Wolfe. 1997. *Hepatic and whole-body fat synthesis in humans during carbohydrate overfeeding*. *Am J Clin Nutr.* **65**(6):1774-82.
- Alberts, A.W., Majerus, P.W., Talamo, B., and P.R. Vagelos. 1964. *Acyl-carrier protein. II. Intermediary reactions of fatty acid synthesis*. *Biochemistry.* **39**:1563-71.
- Alberts, A.W., Strauss, A.W., Hennessy, S., and P.R. Vagelos. 1975. *Regulation of synthesis of hepatic fatty acid synthetase: binding of fatty acid synthetase antibodies to polysomes*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **72**(10):3956-60.
- Alberts, A. and M.D. Greenspan. 1984. *Fatty acid metabolism and its regulation*. Amsterdam: Elsevier.
- Amy, C.M., Witkowski, A., Naggert, J., Williams, B., Randhawa, Z., and S. Smith. 1989. *Molecular cloning and sequencing of cDNAs encoding the entire rat fatty acid synthase*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **86**(9):3114-8.
- Aranda, A. and A. Pascual. 2001. *Nuclear hormone receptors and gene expression*. *Physiol Rev.* **81**(3):1269-304.
- Back, B.W., Goldman, M.J., Fisch, J.E., Ochs, R.A., and A.G. Goodridge. 1986. *The fatty acid synthase gene in avian liver. Two mRNAs are expressed and regulated in parallel by feeding, primarily at the level of transcription*. *J. Biol. Chem.* **261**:4190-97.
- Baniahmad, A., Kohne, A.C., and R. Renkawitz. 1992. *A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor*. *EMBO J.* **11**(3):1015-23.
- Baniahmad, A., Leng, X., Burris, T.P., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and B.W. O'Malley. 1995. *The tau 4 activation domain of the thyroid hormone receptor is required for release of a putative corepressor(s) necessary for transcriptional silencing*. *Mol Cell Biol.* **15**(1):76-86.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B., and L.M. Maness. 1996. *Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin*. *Peptides.* **17**(2):305-11.
- Barash, I.A., Cheung, C.C., Weigle, D.S., Ren, H., Kabigting, E.B., Kuijper, J.L., Clifton, D.K., and R.A. Steiner. 1996. *Leptin is a metabolic signal to the reproductive system*. *Endocrinology.* **137**(7):3144-7.

- Belloir, B., Diot, C. and M. Douaire. 1997. *Triglyceride synthesis and secretion and lipogenesis implicated gene expression in the chicken hepatocarcinoma cell line LMH*. Eur J Cell Biol. **74**(3): p. 246-250.
- Birnboim, H.L. and J. Doly. 1979. *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res. **7**: 1513.
- Bouchard, C.. 2000. *Inhibition of Food Intake by Inhibitors of Fatty Acid Synthase*. New England Journal of Medecine. **343**(25): p. 1888-1889.
- Bradford, M.M.. 1976. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. **72**:248-54.
- Bradley, D.J., Towle, H.C., and W.S. 3rd Young. 1992. *Spacial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in developing mammalian nervous system*. J Neurosci. **12**(6):2288-302.
- Bratcher, S.C. and R.Y. Hsu. 1976. *Sodium dodecyl sylvate disc-gel electrophoresis pattern of protease-free chicken liver fatty acid synthetase*. Arch Biochem Biophys. **174**(1):136-42.
- Bryson, J.M., Phuyal, J.L., Swan, V., and I.D. Caterson. 1999. *Leptin has acute effects on glucose and lipid metabolism in both lean and gold thioglucose-obese mice*. Am J Physiol. **270**:E417-22.
- Burton, D.N., Collins, J.M., Kennan, A.L., and J.W. Porter. 1969. *The effects of nutritional and hormonal factors on the fatty acid synthetase level of rat liver*. J Biol Chem. **244**:4510-16.
- Casanova, J., Helmer, E., Selmi-Ruby, S., Qi, J.S., Au-Fliegner, M., Desai-Yajnik, V., Koudinova, N., Yarm, F., Raaka, B.M., and H.H. Samuels. 1994. *Functional evidence for ligand-dependent dissociation of thyroid hormone and retinoic acid receptors from an inhibitory cellular factor*. Mol Cell Biol. **14**(9):5756-65.
- Casanova, J., Horowitz, Z. D., Copp, R.P., McIntyre, W.R., Pascual, A., and H.H. Samuels. 1984. *Photoaffinity labeling of thyroid hormone nuclear receptors: influence of n-butyrate and analysis of the half-lives of the 57 000 and 47 000 molecular weight receptor forms*. J Biol Chem. **259**:12084-12091.
- Chehab, F., Lim, M. and R. Lu. 1996. *Correction of the sterility effect in homozygous obese female by treatment with human recombinant leptin*. Nat Gen. **12**:318-20.
- Chen, J.D. and R.M. Evans. 1995. *A transcriptional corepressor that interacts with nuclear hormone receptors*. Nature. **377**(6548):387-8.
- Chen, J.D., Umesono, K., and R.M. Evans. 1996. *SMRT isoforms mediate repression and anti-repression of nuclear receptor heterodimers*. Proc Natl Acad Sci USA. **93**(15):7567-71.

- Chen, S.L., Chang, Y.J., Wu, Y.H., and K.H. Lin. 2003. *Mitogen-activated protein kinases potentiate thyroid hormone receptor transcriptional activity by stabilizing its protein*. *Endocrinology*. **144**:1407-19.
- Cheng, S.-Y.. 2000. *Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors*. *Rev Endocr Metab Disord*. **1**:9-18.
- Clarke, S.D.. 1993. *Regulation of fatty acid synthase gene expression: an approach for reducing fat accumulation*. *J Anim Sci*. **71**(7):1957-65.
- Claycombe, K.J., Jones, B.H., Standridge, M.K., Guo, Y., Chun, J.T., Taylor, J.W., and N. Moustaid-Moussa. 1998. *Insulin increases fatty acid synthase gene transcription in human adipocytes*. *Am J Physiol*. **274**:R1253-9
- Damm, K., Thompson, C.C., and R.M. Evans. 1989. *Protein encoded by v-erbA functions as a thyroid-hormone receptor antagonist*. *Nature*. **339**(6226):593-7.
- Daval, S., Lagarrigue, S., and M. Douaire. 2000. *Messenger RNA levels and transcription rates of hepatic lipogenesis genes in genetically lean and fat chickens*. *Genet Sel Evol*. **32**:521-31.
- Deeney, J.T., Gromada, J., Hoy, M., Holsen, H.L., Rhodes, C.J., Prentki, M., Berggren, P.O. and B.E. Corkey. 2000. *Acute stimulation with long chain acyl-CoA enhances exocytosis in insulin-secreting cells (HIT T-15 and NMRI beta-cells)*. *J Biol Chem*. **275**(13):9363-8.
- de Wet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R., and S. Subramani. 1987. *Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells*. *Mol Cell Biol*. **7**:425-737.
- Di Guglielmo, G.M., Drake, P.G., Baass P.C., Authier, F., Posner, B.I., and J.J. Bergeron. 1998. *Insulin receptor internalization and signalling*. *Mol Cell Biochem*. **182**(1-2): p. 59-63.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., and R.G. Roeder. 1983. *Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei*. *Nucleic Acids Res*. **11**:1475-89.
- Diraison, F., Dusserre, F., Vidal, H., Sothier, M., and M. Beylot. 2002. *Increased hepatic lipogenesis in adipose tissue in human obesity*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **282**(1):E46-51.
- Elmqvist, J.K., Bjorbaek, C., Ahima, R.S., Flier, J.S., and C.B. Saper. 1998. *Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain*. *J Comp Neurol*. **395**(4):535-47.
- Fei, H., Okano, H.J., Li, C., Lee, G.H., Zhao, C., Darnell, R. and J.M. Friedman. 1997. *Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **94**(13):7001-5.

- Forman, B.M., Casanova, J., Raaka, B.M., Ghysdael, J., and H.H. Samuels. 1992. *Half-site spacing and orientation determines whether thyroid hormone and retinoic acid receptors and related factors bind to DNA response elements as monomers, homodimers, or heterodimers.* Mol Endocrinol. **6**(3):429-42.
- Forrest, D., Hallbook, F., Persson, H., and B. Vennstrom. 1991. *Distinct functions for thyroid hormone receptors alpha and beta in brain development indicated by differential expression of receptor genes.* EMBO J. **10**(2):269-75.
- Freidman, J.M. and J.L. Halaas. 1998. *Leptin and the regulation of body weight in mammals.* Nature. **395**:763-70.
- Fukuda, H., Iritani, N., Sugimoto, T., and H. Ikeda. 1999. *Transcriptional regulation of fatty acid synthase gene by insulin/glucose, polyunsaturated fatty acid and leptin in hepatocytes and adipocytes in normal and genetically obese rats.* Eur J Biochem. **260**:505-11.
- Funabashi, H., Kawaguchi, A., Tomoda, H., Omura, S., Okuda, S., and S. Iwasaki. 1989. *Binding site of cerulenin in fatty acid synthetase.* J Biochem (Tokyo). **105**:751-5.
- Gale, S.M., Castracane, V.D. and C.S. Mantzoros. 2004. *Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology.* J Nutr. **134**: 295-8.
- Gibson, D.M., Titchener, E.B. and S.J. Wakil. 1958. *Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. V. Bicarbonate requirement for the synthesis of long-chain fatty acids.* Biochim Biophys Acta. **30**(2):376-83.
- Girard, J., Perdereau, D., Fougelle, F., Prip-Buus, C., and P. Ferre. 1994. *Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones.* Faseb J. **8**(1): p. 36-42.
- Glass, C.K. and J.M. Holloway. 1990. *Regulation of gene expression by the thyroid hormone receptor.* Biochim Biophys Acta. **1032**(2-3): p. 157-176.
- Glass, C.K. and M.G. Rosenfeld. 2000. *The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors.* Genes Dev. **14**(2):121-41.
- Gondret, F., P. Ferre, and I. Dugail. 2001. *ADD-1/SREBP-1 is a major determinant of tissue differential lipogenic capacity in mammalian and avian species.* J Lipid Res. **42**(1): p. 106-113.
- Goodridge, A.G. and E.G. Ball. 1967. *Lipogenesis in the pigeon: in vivo studies.* Am J Physiol. **213**(1): p. 245-249.
- Goodridge, A.G.. 1968. *Citrate-cleavage enzyme, 'malic' enzyme and certain dehydrogenases in embryonic and growing chicks.* Biochem J. **108**(4):663-6.
- Goodridge, A.G.. 1973. *Regulation of fatty acid synthesis in isolated hepatocytes prepared from the livers of neonatal chicks.* J Biol Chem. **248**(6): 1924-31.

- Goodridge, A.G. and T.G. Adelman. 1976. *Regulation of malic enzyme synthesis by insulin, triiodothyronine, and glucagon in liver cells in culture.* J Biol Chem. **251**(10):3027-32.
- Goodridge, A.G., Fantozzi, D.A., Klautky, S.A., Ma, X.J., Roncero, C., and L.M. Salati. 1991. *Nutritional and hormonal regulation of genes for lipogenic enzymes.* Proc Nutr Soc. **50**(2): p. 115-122.
- Griffin, M.J., and H.S. Sul. 2004. *Insulin regulation of fatty acid synthase gene transcription: roles of USF and SREBP-1c.* IUBMB Life. **56**(10):595-600.
- Groul, D.J.. 1980. *3,5,3'-Triiodo-L-thyronine receptor-containing chromatin fragments: production by nuclease digestion.* Endocrinology. **107**:994-999.
- Hakansson, M.L., Hulting, A.L. and B. Meister. 1996. *Expression of leptin receptor mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus-relationship with NPY neurones.* Neuroreport. **7**(18):3087-92.
- Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., and J.M. Friedman. 1995. *Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by obese gene.* Science. **269**(5223):543-6.
- Harvey, C.B. and G.R. Williams. 2002. *Mechanism of thyroid hormone action.* Thyroid. **12**(6): p. 441-446.
- Hellstrom, P.M., Geliebter, A., Naslund, E., Schmidt, P.T., Yahav, E.K., Hashim, S.A., and M.R. Yeomans. 2004. *Peripheral and central signals in the control of eating in normal, obese and binge-eating human subjects.* Br J Nutr. **92**(Suppl. 1): S 47-57.
- Hillgartner, F.B., Salati, L.M. and A.G. Goodridge. 1995. *Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis.* Physiol Rev. **75**(1): 47-76.
- Hodnett, D.W., Fantozzi, D.A., Thurmond, D.C., Klautky, S.A., MacPhee, K.G., Estrem, S.T., Xu, G., and A.G. Goodridge. 1996. *The chicken malic enzyme gene: structural organization and identification of triiodothyronine response elements in the 5'-flanking DNA.* Arch Biochem Biophys. **334**(2): p. 309-324.
- Holzer, K.P., Liu, W. and G.G. Hammes. 1989. *Molecular cloning and sequencing of chicken liver fatty acid synthase cDNA.* Proc Natl Acad Sci USA. **86**(12):4387-91.
- Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R, Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., and M.G. Rosenfeld. 1995. *Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor corepressor.* Nature. **377**(6548):397-404.
- Horwitz, K.B., Jackson, T.A., Bain, D.L., Richer, J.K., Takimoto, G.S., and L. Tung. 1996. *Nuclear receptor coactivators and corepressors.* Mol Endocrinol. **10**(10):1167-77.

- Hsu, M.H., Chirala, S.S., and S.J. Wakil. 1996. *Human fatty-acid synthase gene*. J Biol Chem. **271**(23):13584-13592.
- Hwa, J.J., Fawzi, A.B., Graziano, M.P., Ghibaudi, L., Williams, P., Van Heek, M., Davis, H., Rudinski, M., Sybert, E., and C.D. Strader. 1997. *Leptin increases energy expenditure and selectively promotes fat metabolism in ob/ob mice*. Am J Physiol. **272**(4Pt2):R1204-9.
- Ish-Horowitz, D. and J.F. Burke. 1981. *Rapid and efficient cosmid cloning*. Nucleic Acids Res. **9**(13): 2989-2998.
- Iskaros, J., Pickard, M., Evans, I., Sinha, A., Hardiman, P., and R. Ekins. 2000. *Thyroid hormone receptor gene expression in first trimester human fetal brain*. J Clin Endocrinol Metab. **85**(7):2620-3.
- Jones, B.H., Standridge, M.K. And N. Moustaid. 1997. *Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells*. Endocrinology. **138**(4):1512-9.
- Jump, D.B., Seelig, S., Schwartz, H.L., and J.H. Oppenheimer. 1981. *Association of thyroid hormone receptor with rat liver chromatin*. Biochemistry. **20**:6781-6789.
- Kameda, K. and A.G. Goodridge. 1991. *Isolation and partial characterization of the gene for goose fatty acid synthase*. J Biol Chem. **266**(1): p. 419-426.
- Kawaguchi, T., Nomura, K., Hirayama, Y., and T. Kitagawa. 1987. *Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH*. Cancer Res. **47**(16): p. 4460-4464.
- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., and W. Wahli. 1999. *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting*. J Clin Invest. **103**(11):1489-98.
- Kersten, S.. 2001. *Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis*. EMBO Rep. **2**(4): p. 282-286.
- Kim, E.K., Miller, I., Landree, L.E., Borisy-Rudin, F.F., Brown, P., Tihan, T., Townsend, C.A., Witters, L.A., Moran, T.H., Kuhajda, F.P., and G.V. Ronnett. 2002. *Expression of FAS within hypothalamic neurons: a model for decreased food intake after C75 treatment*. Am J Physiol Endocrinol Metab. **283**(5):E867-79.
- Kim, J.B., Sarraf, P., Wright, W., Yao, K.M., Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B.B., and B.M. Spiegelman. 1998. *Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1*. J Clin Invest. **101**(1):1-9.
- Knobling, A. and E. Schweizer. 1975. *Temperature-sensitive mutants of the yeast fatty-acid-synthetase complex*. Eur J Biochem. **59**(2):415-21.

- Knowles, B.B., Howe, C.C. and D.P. Aden. 1980. *Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen*. Science. **209**(4455): p. 497-499.
- Koerner, D., Schwartz, H.L., Surks, M.I., Oppenheimer, J.H., and E.C. Jorgensen. 1975. *Binding of selected iodothyronine analogues to receptor sites of isolated rat hepatic nuclei: high correlation between structural requirements for nuclear binding and biological activity*. J Biol Chem. **250**:6417-6423.
- Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., Larsen, P.J., and S. Hastrup. 1998. *Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin*. Nature. **393**(6680):72-76.
- Kuhajda, F.P., Jenner, K., Wood, F.D., Hennigar, R.A., Jacobs, L.B., Dick, J.D. and G.R. Pasternack. 1994. *Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy*. Proc Natl Acad Sci USA. **91**(14):6379:83.
- Kumar, S., Dorsey, J.K. and J.W. Porter. 1970. *Mechanism of dissociation of pigeon liver fatty acid synthetase complex into half-molecular weight subunits and their reassociation to enzymatically active complex*. Biochem Biophys Res Commun. **40**(4):825-32.
- Lakshmanan, M.R., Nepokroeff, C.M., and J.W. Porter. 1972. *Control of the synthesis of fatty acid synthetase in rat liver by insulin, glucagons, and adenosine 3':5' cyclic monophosphate*. Proc Natl Acad Sci USA. **69**:3516-19.
- Larsen, P.R., Silva, J.E., and M.M. Kaplan. 1981. *Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinical implications*. Endocr. **2**:87-102.
- Latasa, M.J., Griffin, M.J., Moon, Y.S., Kang, C., and H.S. Sul. 2003. *Occupancy and function of the -150 sterol regulatory element and -65 E-box in nutritional regulation of the fatty acid synthase gene in living animals*. Mol Cell Biol. **23**:5896-907.
- Le Fur, N., el Khadir-Mounier, C., Powell, R.S., Diot, C., Mallard, J., and M. Douaire. 1996. *Characterization of the chicken fatty acid synthase gene 5' part and promoter region*. Eur J Biochem. **240**(2): p. 323-330.
- Letexier, D., Pinteur, C., Large, V., Frering, V., and M. Beylot. 2003. *Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue*. J Lipid Res. **44**(11):2127-34.
- Li, D., Li, T., Wang, F., Tian, H., and H.H. Samuels. 2002. *Functional evidence for retinoid X receptor (RXR) as a nonsilent partner in the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer*. Mol Cell Biol. **22**(16):5782-92.

- Lin, B.C., Hong, S.H., Krig, S., Yoh, S.M., and M.L. Privalsky. 1997. *A conformational switch in nuclear hormone receptors is involved in coupling hormone binding to corepressor release*. *Mol Cell Biol.* **17**(10):6131-8.
- Lin, K.H., Ashizawa, K., and S.Y. Cheng. 1992. *Phosphorylation stimulates the transcriptional activity of the human beta 1 thyroid hormone nuclear receptor*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**:7737-41.
- Loftus T.M., Jaworsky, D.E., Frehywot, G.L., Townsend, C.A., Ronnett, G.V., Lane, M.D., and F.P. Kuhajda. 2000. *Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors*. *Science.* **288**(5475): p. 2299.
- Luckow, B. and G. Schutz. 1987. *CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements*. *Nucleic Acids Res.* **15**(13):5490.
- Lynen, F. and S. Ochoa. 1953. *Enzymes of fatty acid metabolism*. *Biochim Biophys Acta.* **12**(1-2):299-314.
- Lynen, F.. 1961. *Biosynthesis of saturated fatty acids*. *Fed Proc.* **20**:941-51.
- MacLoed, K.M. And J.D. Baxter. 1976. *Chromatin receptors for thyroid hormones: interactions of the solubilized proteins with DNA*. *J Biol Chem.* **251**:7380-7387.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., et al. 1995. *Leptin levels in human and rodents: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects*. *Nat Med.* **1**(11):1155-61.
- Magana, M.M., Koo, S.H., Towle, H.C., and T.F. Osborne. 2000. *Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase*. *J Biol Chem.* **275**:4726-33.
- Maia, A.L., Harney, J.W. and P.R. Larsen. 1996. *Is there a negative TRE in the luciferase reporter cDNA?* *Thyroid.* **6**(4): 325-8.
- Majerus, P.W., Alberts, A.W. and P.R. Vagelos. 1965. *Acyl carrier protein. IV. The identification of 4'-phosphopantetheine as the prosthetic group of the acyl carrier protein*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **53**:410-7.
- Majerus, P.W., Alberts, A.W. and P.R. Vagelos. 1965. *Acyl carrier protein. 3. An enoyl hydase specific for acyl carrier protein thioesters*. *J Biol Chem.* **240**:618-21.
- Makimura, H, Mizuno, T.M., Yang, X.J., Silverstein, J., Beasley, J., and C.V. Mobbs. 2001. *Ceruleinin mimics effects of leptin on metabolic rate, food intake, and body weight independent of the melanocortin system, but unlike leptin, ceruleinin fails to block neuroendocrine effects of fasting*. *Diabetes.* **50**:733-9.

- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and R.M. Evans. 1995. *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell. **83**(6):835-9.
- Mangelsdorf, D.J. And R.M. Evans. 1995. *The RXR heterodimers and orphan receptors*. Cell. **83**(6):841-50.
- McKenna, N.J., Lanz, R.B., and B.W. O'Malley. 1999. *Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology*. Endocr Rev. **20**(3):321-44.
- Mercer, J.G., Hoggard, N., Williams, L.M., Lawrence, C.B., Hannah, L.T., and P. Trayhurn. 1996. *Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization*. FEBS Lett. **387**(2-3):113-6.
- Miyazaki, M., Dobrzyn, A., Man, W.C., Chu, K., Sampath, H., Kim, H.J., and J.M. Ntambi. 2004. *Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms*. J Biol Chem. **279**(24):25164-71.
- Mick, G., Vander Bloomer, T., Fu, C.L., and K. McCormick. 1998. *Leptin does not affect adipocyte glucose metabolism: studies in fresh and cultures adipocytes*. Metabolism. **47**:1360-5.
- Mizuno, T.M., Kleopoulos, S.P., Bergen, H.T., Roberts, J.L., Priest, C.A., and C.V. Mobbs. 1998. *Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin*. Diabetes. **47**:294-7.
- Moon, Y.S., Latasa, M.-J., Kim, K.-H., Wang, D., and H.S. Sul. 2000. *Two 5'-regions are required for nutritional and insulin regulation of the fatty-acid synthase promoter in transgenic mice*. J Biol Chem. **275**(14):10121-10127.
- Moon, Y.S., Latasa, M.-J., Griffin, M.J., and H.S. Sul. 2002. *Suppression of fatty acid synthase promoter by polyunsaturated fatty acids*. J Lipid Res. **43**(5): p. 691-698.
- Mounier, C., Chen, W., Klautky, S.A., and A.G. Goodridge. 1997. *Cyclic AMP-mediated inhibition of transcription of the malic enzyme gene in chick embryo hepatocytes in culture. Characterization of a cis-acting element far upstream of the promoter*. J Biol Chem. **272**(38): p. 23606-23615.
- Munday, M.R.. 2002. *Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase*. Biochem Soc Trans. **30**(Pt 6): p. 1059-1064.
- Mistry, A.M., Swick, A.G. and D.R. Romsos. 1997. *Leptin rapidly lowers food intake and elevates metabolic rates in lean and ob/ob mice*. J Nutr. **127**:2065-72.
- Ntambi, J.M.. 1995. *The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD)*. Prog Lipid Res. **34**(2): p. 139-150.

- Numa, S. and S. Yamashita. 1974. *Regulation of lipogenesis in animal tissues*. *Curr Top Cell Regul.* **8**(0): p. 197-246.
- Omura, S.. 1976. *The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis*. *Bacteriol Rev.* **40**:681-97.
- Oppenheimer, J.H.. 1983. *The nuclear receptor-triiodothyronine complex: relationship to thyroid hormone distribution, metabolism, and biological action*. In *Molecular Basis of Thyroid Hormone Action*. J.H. Oppenheimer and H.H. Samuels, editors. Academic Press Inc. New York. 1-35.
- O'Shea, P.J., Harvey, C.B., Suzuki, H., Kaneshige, M., Kaneshige, K., Cheng, S.-Y., and G.R. Williams. 2003. *A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone*. *Mol Endocrinol.* **17**(7):1410-24.
- Pazin, M.J. and J.T. Kadonaga. 1997. *What's up and down with histone deacetylation and transcription?* *Cell.* **89**(3):325-8.
- Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., and F. Collins. 1995. *Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice*. *Science.* **269**(5223):540-543.
- Perlman, A.J., Stanley, F., and H.H. Samuels. 1982. *Thyroid hormone nuclear receptor: evidence of multimeric organization in chromatin*. *J Biol Chem.* **257**:930-938.
- Rohner-Jeanrenaud, F., Cusin, I., Sainsbury, A., Zakrewska, K.E., and B. Jeanrenaud. 1996. *The loop between neuropeptide Y and leptin in normal and obese rodents*. *Horm Metab Res.* **28**:642-8.
- Roncero, C. and A.G. Goodridge. 1992. *Hexanoate and octanoate inhibit transcription of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture*. *J Biol Chem.* **267**(21): p. 14918-14927.
- Roncero, C. and A.G. Goodridge. 1992. *Regulation of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture: corticosterone and carnitine regulate responsiveness to triiodothyronine*. *Arch Biochem Biophys.* **295**(2): p. 258-267.
- Ronnett, G.V., Kim, E.K., Landree, L.E., and Y. Tu. 2005. *Fatty acid metabolism as a target for obesity treatment*. *Physiol Behav.* **85**(1):25-35.
- Salati, L.M., Ma, X.J., McCormick, C.C., Stapleton, S.R., and A.G. Goodridge. 1991. *Triiodothyronine stimulates and cyclic AMP inhibits transcription of the gene for malic enzyme in chick embryo hepatocytes in culture*. *J Biol Chem.* **266**(6):4010-6.
- Salbe, A.D., Nicolson, M. and E. Ravussin. 1997. *Total energy expenditure and the level of physical activity correlate with plasma leptin concentrations in 5 year-old children*. *J Clin Invest.* **99**:592-5.

- Sambrook, J., and D.W. Russell. 2000. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor. New York.
- Samuels, H.H., Tsai, J.S., Casanova, J., and F. Stanley. 1974. *Thyroid hormone action: in vitro characterization of solubilized nuclear receptors from rat liver and cultured GH1 cells*. *J Clin Invest.* **54**:853-65.
- Samuels, H.H.. 1983. *Identification and characterization of thyroid hormone receptors and action using cell cultures techniques*. In *Molecular Basis of Thyroid Hormone Action*. J.H. Oppenheimer and H.H. Samuels, editors. Academic Press Inc. New York. 35-64.
- Sande, S. and M.L. Privalsky. 1996. *Identification of TRACs (T3 receptor-associating cofactors), a family of cofactors that associate with, and modulate the activity of, nuclear hormone receptors*. *Mol Endocrinol.* **10**(7):813-25.
- Sap, J., Munoz, A., Schmitt, J., Stunnenberg, H., and B. Vennstrom. 1989. *Repression of transcription mediated at a thyroid hormone response element by the v-erb-A oncogene product*. *Nature.* **340**(6230):242-4.
- Sauer, F., Pugh, E.L., Wakil, S.J., Delaney, R., and R.L. Hill. 1964. *2-mercaptoethylamine and beta-alanine as components of acyl carrier protein*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **52**:1360-6.
- Scarpace, P.J., Matheny, M., Pollock, B.H., and N. Tumer. 1997. *Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure*. *M J Physiol.* **273**:E226-30.
- Schulman, I.G., Juguilon, H., and R.M. Evans. 1996. *Activation and repression by nuclear hormone receptors: hormone modulates an equilibrium between active and repressive states*. *Mol Cell Biol.* **16**(7):3807-13.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Campfield, L.A., Burn, P., and D.G. Baskin. 1996. *Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus*. *J Clin Invest.* **98**:1101-6.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Woods, S.C., Weigle, D.S., Campfield, L.A., Burn, P., and D.G. Baskin. 1997. *Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus*. *Diabetes.* **46**(12):2119-23.
- Schweizer, E.. 1977. *Biosynthesis and structure of the yeast fatty acid synthetase complex*. *Naturwissenschaften.* **64**(7):366-70.
- Schweizer, M., Takabayashi, K., Laux, T., Beck, K.F., and R. Schreglmann. 1989. *Rat mammary gland fatty acid synthase: localization of the constituent domains and two functional polyadenylation/termination signals in the cDNA*. *Nucleic Acids Res.* **17**(2):567-86.
- Seol, W., Mahon, M.J., Lee, Y.K., and D.D. Moore. 1996. *Two receptor interacting domains in the nuclear hormone receptor corepressor RIP13/N-CoR*. *Mol Endocrinol.* **10**(12):1646-55.

- Sjoberg, M. and B. Vennstrom. 1995. *Ligand-dependent and -independent transactivation by thyroid hormone receptor beta 2 is determined by the structure of the hormone response element*. Mol Cell Biol. **15**(9):4718-26.
- Smith, S., Witkowski, A. and A.K. Joshi. 2003. *Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase*. Prog Lipid Res. **42**(4): p. 289-317.
- Stephens, T.W., Basinski, M., Bristow, P.K., Bue-Valleskey, J.M., Burgett, S.G., Craft, L., Hale, J., Hoffmann, J., Hsiung, H.M., Kriauciunas, A. et al. 1995. *The role of neuropeptide Y in antiobesity action of the obese gene product*. Nature. **377**(6549):530-2.
- Stoops, J.K., Arslanian, M.J., Oh, Y.H., Aune, K.C., Vanaman, T.C., and S.J. Wakil. 1975. *Presence of two polypeptide chains comprising fatty acid synthetase*. Proc Natl Acad Sci USA. **72**(5):1940-4.
- Swierczynski, J., Mitchell, D.A., Reinhold, D.S., Salati, L.M., Stapleton, S.R., Klautky, S.A., Struve, A.E., and A.G. Goodridge. 1991. *Triiodothyronine-induced accumulations of malic enzyme, fatty acid synthase, acetyl-coenzymeA carboxylase, and their mRNAs are blocked by protein kinase inhibitors. Transcription is the affected step*. J Biol Chem. **266**(26): p. 17459-17466.
- Thurmond, D.C., Baillie, R.A. and A.G. Goodridge. 1998. *Regulation of the action of steroid/thyroid hormone receptors by medium-chain fatty acids*. J Biol Chem. **273**(25): p. 15373-15381.
- Thurmond, D.C. and A.G. Goodridge. 1998. *Characterization of thyroid hormone response elements in the gene for chicken malic enzyme. Factors that influence triiodothyronine responsiveness*. J Biol Chem. **273**(3): p. 1613-1622.
- Ting, Y.T., Bhat, M.K., Wong, R., and S. Cheng. 1997. *Tissue-specific stabilization of the thyroid hormone beta 1 nuclear receptor by phosphorylation*. J. Biol. Chem. **272**:4129-34.
- Tsukamoto, Y., Wong, H., Mattick, J.S. and S.J. Wakil. 1983. *The architecture of the animal fatty acid synthetase complex. IV. Mapping of active centers and model for the mechanism of action*. J Biol Chem. **258**(24):15312-22.
- Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C., and R.M. Evans. 1991. *Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors*. Cell. **65**(7):1255-66.
- Uyeda, K., Yamashita, H. and T. Kawaguchi. 2002. *Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage*. Biochem Pharmacol. **63**(12): p. 2075-2080.

- Wagner, R.L., Apriletti, J.W., McGrath, M.E., West, B.L., Baxter, J.D., and R.J. Fletterick. 1995. *A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor*. *Nature*. **378**(6558):690-7.
- Wakil, S.J., Titchener, E.B. and D.M. Gibson. 1958. *Evidence for the participation of biotin in the enzymic synthesis of fatty acids*. *Biochim Biophys Acta*. **29**(1):225-6.
- Wakil, S.J.. 1962. *Lipid metabolism*. *Annu Rev Biochem*. **31**:369-406.
- Wakil, S.J., Pugh, E.L. and F. Sauer. 1964. *The mechanism of fatty acid synthesis*. *Prot Natl Acad Sci USA*. **52**:106-114.
- Wakil, S.J.. 1989. *Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme*. *Biochemistry*. **28**(11):4523-30.
- Wang, Y., Voy, B.J., Urs, S., Kim, K., Soltani-Bejnood, M., Quigley, N., Heo, Y., Standridge, M., Andersen, B., Dhar, M., Joshi, R., Wortman, P., Taylor, J.W., Chun, J., Leuze, M., Claycombe, K., Saxton, A.M., and N. Moustaid-Moussa. 2004. *The human fatty acid synthase gene and de novo lipogenesis are coordinately regulated in human adipose tissue*. *J Nutr*. **134**(5): 1032-8.
- Weeks, G. and S.J. Wakil. 1968. *Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. 18. Preparation and general properties of the enoyl acyl carrier protein reductases from Escherichia coli*. *J Biol Chem*. **243**(6):1180-9.
- Williams, G.R.. 2000. *Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor β isoforms*. *Mol Cell Biol*. **20**:8329-8342.
- Wilson, S.B., Back, D.W., Morris, S.M., Swierczynski, J.Jr., and A.G. Goodridge. 1986. *Hormonal regulation of lipogenic enzymes in chick embryo hepatocytes in culture. Expression of the fatty acid synthase gene is regulated at both translational and pretranslational steps*. *J Biol Chem*. **261**:15179-182.
- Winberry, L.K., Morris, S.M. Jr, Fisch, J.E., Glynias, M.J., Jenik, R.A., and A.G. Goodridge. 1983. *Molecular cloning of cDNA sequences for avian malic enzyme. Nutritional and hormonal regulation of malic enzyme mRNA levels in avian liver cells in vivo and in culture*. *J Biol Chem*. **258**(2): p. 1337-1342.
- Wolffe, A.P.. 1997. *Transcriptional control. Sinful repression*. *Nature*. **387**(6628):16-7.
- Wolff, E.C., and J. Wolff. 1964. *The mechanism of action of the thyroid hormones*. In *The Thyroid Gland*. Vol. 1. R. Pitt-Rivers and W.R. Trotter, editors. Butterworth and Co. Ltd. London. 237-282.
- Wondisford, F.E.. 2003. *Thyroid hormone action: insight from transgenic mouse models*. *J Investig Med*. **51**:215-220.

- Yang, Z., Hong, S.H., and M.L. Privalsky. 1999. *Transcriptional anti-repression. Thyroid hormone receptor beta-2 recruits SMRT corepressor but interferes with subsequent assembly of a functional corepressor complex.* J Biol Chem. **274**(52):37131-8.
- Yen, P.M.. 2001. *Physiological and molecular basis of thyroid hormone action.* Physiol. **81**:1097-1142.
- Zhang, X.-Y., Kaneshige, M., Kamiya, Y., Kaneshige, K., McPhie, P., and S.-Y. Cheng. 2002. *Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms dictates the dominant negative activity of mutant Beta receptor.* Mol Endocrinol. **16**(9):2077-92.
- Zamir, I., Harding, H.P., Atkins, G.B., Horlein, A., Glass, C.K., Rosenfeld, M.J., and M.A. Lazar. 1996. *A nuclear hormone receptor corepressor mediates transcriptional silencing by receptors with distinct repression domains.* Mol Cell Biol. **16**(10):5458-65.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and J.M. Friedman. 1994. *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.* Nature (London). **372**:425-32.