

2m11.3102.9

Université de Montréal

RÉGULATION DU GÈNE “*STEROIDOGENIC ACUTE REGULATORY  
PROTEIN*” PAR LE CHOLESTÉROL DANS L’OVAIRE PORCIN

par

Eric Deneault

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l’obtention du grade de maîtrise ès sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option reproduction

29 août 2003

© Eric Deneault, 2003



SF

607

U54

2004

V.004

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

# IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

RÉGULATION DU GÈNE “*STEROIDOGENIC ACUTE REGULATORY  
PROTEIN*” PAR LE CHOLESTÉROL DANS L’OVAIRE PORCIN

présenté par  
Eric Deneault

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

.....

Jean Sirois, président-rapporteur

.....

Bruce D. Murphy, directeur de recherche

.....

Christopher A. Price, membre du jury

## RÉSUMÉ

Le but de cet ouvrage était d'explorer les effets d'une déplétion de cholestérol intracellulaire sur la transactivation du gène de la *protéine de régulation rapide du cholestérol (StAR)* et sur l'acétylation des histones H3 et H4 associées à son promoteur. Des cultures primaires de granulosa porcines ont été maintenues dans un milieu privé de cholestérol. Une analyse Northern a révélé une stimulation de 1,7 fois sur la transcription de *StAR* en ARNm. Des transfections de vecteurs pour la protéine de liaison aux éléments régulés par les stéroïdes (SREBP) dans une lignée de granulosa porcines ont clairement activé le promoteur de *StAR*. La protéine de liaison à CREB (CBP), une acétyltransférase d'histones connue, a de plus stimulé ce promoteur de manière additive. Des essais d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont démontré une plus grande association des histones H3 acétylées (et non H4) avec la région proximale du promoteur de *StAR* dans les granulosa privées de cholestérol. Les ChIP ont également indiqué que SREBP, CBP et la protéine stimulatrice 1 (Sp1) étaient liées en plus grand nombre au promoteur sous une déplétion de cholestérol. Ces résultats reflètent l'évidence qu'une déplétion de cholestérol active le gène *StAR* via la voie métabolique de SREBP. Cette induction de la transcription engendre l'acétylation des histones H3 et tout porte à croire qu'elle serait effectuée par CBP. La stratégie des ChIP a aussi montré que des inhibiteurs de déacétylase d'histones (HDAC) suracétylent les histones H3 sur le promoteur de *StAR*, alors que sa transcription est paradoxalement inhibée.

Mots clés: déplétion de cholestérol, StAR, histones H3, acétylation, SREBP, CBP, Sp1

## ABSTRACT

The purpose of this investigation was to explore the effects of intracellular cholesterol depletion on *steroidogenic acute regulatory protein (StAR)* gene transactivation, and to determine whether acetylation of histones H3 and H4 was involved in this process. Primary cultures of luteinized porcine granulosa cells were incubated in cholesterol depleted medium. This treatment stimulated a 1.7 fold increase in StAR mRNA transcription, as determined by Northern analysis. When the transcriptionally active fragments of sterol-regulated element binding protein (SREBP) were cotransfected into a porcine granulosa cell line, they clearly increased *StAR* promoter activation. CREB binding protein (CBP), a known histone acetyltransferase, interacted with SREBP-1a in stimulation of the promoter in an additive manner. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) demonstrated that H3 (but not H4) acetylation is associated with the proximal *StAR* promoter in sterol depleted granulosa cultures relative to sterol repleted control cultures. ChIP also indicated that SREBP, CBP and the stimulating protein 1 (Sp1) bound to the porcine *StAR* promoter in greater concentrations in cholesterol depleted cultures relative to control. These results provide evidence in support of the hypothesis that sterol depletion, acting via the SREBP pathway, activates the *StAR* gene. Induction of transcription engenders acetylation of histone H3, and it is likely that this is effected by CBP. ChIP strategy further demonstrated that inhibitors of histone deacetylase (HDAC) hyperacetylate H3 associated with *StAR* promoter, while its transcription was paradoxically inhibited.

Keywords: cholesterol depletion, StAR, histone H3, acetylation, SREBP, CBP, Sp1

## TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	viii
REMERCIEMENTS.....	xii
I. INTRODUCTION.....	13
II. RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	18
1. LE CHOLESTÉROL.....	18
1.1. Généralités.....	18
1.2. Destination.....	18
1.3. Stéroïdogénèse.....	20
1.4. Régulation de la stéroïdogénèse.....	21
1.5. Homéostasie intracellulaire du cholestérol.....	24
2. PROTÉINE DE RÉGULATION RAPIDE DE LA STÉROÏDOGÉNÈSE.....	26
2.1. La découverte.....	26
2.2. Rôle.....	28
2.3. Mécanisme d'action.....	29
2.4. Régulation positive de la transcription.....	30
2.5. Régulation négative de la transcription.....	34
3. RESTRUCTURATION DE LA CHROMATINE.....	35
3.1. Généralités.....	35
3.2. Acétylation des histones.....	36
3.3. Familles d'acétyltransférases d'histones.....	37
3.4. Déacétylation des histones.....	38
3.5. Inhibition de la déacétylation des histones.....	40

III. MÉTHODOLOGIE.....	42
1. COLLECTION DES TISSUS, CULTURES CELLULAIRES ET MILIEUX DE CULTURE.....	42
2. TRANSFECTIONS ET ACTIVITÉ DU PROMOTEUR DE <i>StAR</i> PORCIN.....	43
3. ANALYSES NORTHERN.....	44
4. RADIOIMMUNOESSAIS DE LA PROGESTÉRONNE.....	45
5. IMMUNOPRÉCIPITATION DE LA CHROMATINE.....	45
6. ANALYSES STATISTIQUES.....	47
IV. RÉSULTATS.....	48
1. ARTICLE.....	48
2. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES.....	80
V. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	83
VI. CONCLUSION.....	88
VII. SOURCES DOCUMENTAIRES.....	89

## LISTE DES FIGURES

### Article :

- Figure 1. Progesterone accumulation in primary porcine granulosa cells.....70
- Figure 2. StAR mRNA abundance is regulated by cholesterol.....72
- Figure 3. StAR promoter activity in a porcine granulosa cell line.....74
- Figure 4. Chromatin immunoprecipitation assay for SREBP, Sp1, CBP, and acetylated H3 and H4.....76
- Figure 5. Chromatin immunoprecipitation assay of acetylated H3.....78

### Résultats supplémentaires:

- Figure 6. StAR mRNA abundance is regulated by HDAC inhibitors.....81

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide arachidonique
ACAT	Enzyme acyl-Co : acyltransférase du cholestérol
ACTH	Hormone adrénocorticotrophique
ACTR	Récepteur de l'activine
ADD1	Facteur de différenciation et de détermination des adipocytes 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
AhR	Récepteur arylhydrocarbone
AMPc	3',5'-monophosphate d'adénosine cyclique
ARC	Cofacteur recruté activé
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ARNT	Relocalisateur nucléaire arylhydrocarbone
ATF	Facteur de transcription activateur
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcium
CG	Gonadotrophine chorionique
CAH	Hyperplasie surrenalocorticale lipidique congénitale
CBP	Protéine de liaison à CREB
C/EBP	Protéine de liaison au rehausseur CCAAT
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
CRE	Élément de réponse à l'AMPc
CREB	Protéine de liaison aux éléments de réponse à l'AMPc
CREM	Protéine modulatrice des CRE
CRH	Hormone de relâchement des corticotrophines

DAX-1	Récepteur hormonal nucléaire pour l'inversion du sexe sensible au dosage-hypoplasie surrénale congénitale, chromosome X, gène 1
dCTP	Désoxycytidine 5'-diphosphate
DHEA	Déhydroépiandrostérone
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
FBS	Sérum de fœtus de bovin
FBLDS	Sérum de fœtus de bovin délipoprotéiné
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GATA	Protéine de liaison à la séquence (A/T)GATA(A/G)
GDP	Guanosine 5'-diphosphate
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
HAT	Acétyltransférane d'histones
HCl	Acide chlorhydrique
HDAC	Déacétylase d'histones
HDL	Lipoprotéine à haute densité
HMG-CoA	Coenzyme A 3-hydroxy-3-méthylglutaryl
5-HPETE	Acide 5(S)-hydroperoxy-(6E,8Z,11Z,14Z)-eicosatétraénoïque
3 $\beta$ -HSD	Enzyme 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LDL	Lipoprotéine à basse densité
LDLr	Récepteur des lipoprotéines à basse densité
LH	Hormone lutéinisante
LXR	Récepteur nucléaire orphelin
MA-10	Cellules tumorales de Leydig murines
MAPK	Kinase mitogène activée
MEM	Milieu de culture essentiel minimal
MMTV	Virus oncogène mammaire de souris
$\mu$ Ci	Microcurie

NaBu	Butyrate de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NF-Y	Facteur nucléaire-Y
NPC1	Protéine Niemann-Pick C1
NURF	Facteur de remodelage des nucléosomes
ORF	Cadre de lecture ouvert
<sup>32</sup> P	Isotope radioactif du phosphore
P450 <sub>scc</sub>	Cytochrome P450 coupant la chaîne latérale
PBR	Récepteur périphérique de la benzodiazépine
PBS	Tampon phosphaté salin
P/CAF	Facteur de transcription associé à p300 et à CBP
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKI	Protéine kinase I
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
RPM	Révolution par minute
S1P	Protéase site 1
S2P	Protéase site 2
SAP	Peptide activateur de la stéroïdogénèse
SAHA	Acide subéroyl anilide hydroxamique
SBHA	Acide subéroyl bis-hydroxamique
SCAP	Protéine de clivage activée par les stérols
SCP-2	Protéine de transport des stérols de type 2
SDS	Sulfate de sodium dodécyle
SRE	Élément de réponse aux stérols
SREBP	Protéine de liaison aux éléments de réponse aux stérols
SF-1	Facteur stéroïdogénique-1
Sp1	Protéine de stimulation 1
SR-BI	Récepteur piègeur de classe B, type I
SRC-1	Cofacteur récepteur d'hormones nucléaires
StAR	Protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse

START	Domaine de transfert lipidique relié à StAR
TIM	Transporteur mitochondrial transmembranaire interne
TOM	Transporteur mitochondrial transmembranaire externe
TRIS	Tris(hydroxyméthyle)aminométhane
TSA	Trichostatin A
USF	Facteur de régulation en amont
UV	Rayon ultra-violet
Y-1	Cellules tumorales de la glande surrénale de souris
YY1	Facteur de transcription multifonctionnel Yin Yang 1

## REMERCIEMENTS

Je remercie d'abord mon directeur de maîtrise, le Dr Bruce D. Murphy, pour la qualité et la variété de ses connaissances scientifiques, ainsi que son immense talent pour la communication scientifique. Sa motivation, sa rigueur, sa grande souplesse et son sens de l'humour m'ont offert un environnement de travail remarquable.

Je remercie également les professeurs du CRRA pour leur soutien scientifique ainsi que mes collègues de laboratoire, Dan Lacroix, Richard Bennett, Tatiana Ruiz-Cortés, Leonor M. Jimenez, Mira Dobias, Flavia L. Lopes, Joëlle Desmarais et Sandra Ledoux, pour leur aide précieuse et leur amitié, et plus particulièrement, Nicolas Y. Gévry, pour les innombrables connaissances techniques qu'il m'a appris.

Je tiens aussi à souligner le dévouement exceptionnel du personnel du CRRA, en particulier celui d'Odette Hélie et de Micheline Sicotte sans qui le centre ne pourrait fonctionner à pleine capacité.

Je remercie les organismes subventionnaires qui ont supporté mon projet financièrement (subvention MT11018 de l'Institut Canadien de la Recherche sur la Santé), ainsi que la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal pour l'octroi de bourses d'admission et de rédaction.

Enfin, je réserve une mention spéciale à ma famille et mes amis pour leur appui et leurs encouragements, à mes parents sans qui il aurait été plus difficile, financièrement, d'achever cette maîtrise, et du plus profond de mon cœur, je remercie ma très chère Nathalie pour son amour, son soutien et sa compréhension dans les bons comme dans les moins bons moments, ainsi que mon fils, Gabriel, qui m'inspire la persévérance.

## I. INTRODUCTION

Le développement de la réceptivité de l'endomètre à l'embryon ainsi que la maintenance d'une gravidité normale et naturelle requièrent la biosynthèse d'une grande quantité d'hormones stéroïdiennes. À cet effet, un organe transitoire mais crucial pour la survie de l'embryon sera développé à partir d'un follicule suite à l'ovulation. Il s'agit du corps jaune, glande stéroïdogénique capable de produire jusqu'à 40 mg de progestérone par jour chez l'humain (Devoto, Kohen *et al.* 2002). Ce sont les cellules de granulosa et de la thèque, constituant le corps jaune, qui sont responsables de la stéroïdogénèse lutéale. La production de ces hormones stéroïdiennes est en grande partie sous le contrôle des gonadotrophines, et en particulier de l'hormone lutéinisante (LH) qui agit à l'aide d'un système de signalisation intracellulaire impliquant le second messenger AMPc afin de réguler l'expression de gènes essentiels concernés par la synthèse hormonale et le développement lutéal (Devoto, Kohen *et al.* 2002).

Un seul substrat commun est utilisé pour la synthèse de toutes les hormones stéroïdiennes: le cholestérol (Strauss, Schuler *et al.* 1981). Cette biosynthèse débute avec le clivage enzymatique de la chaîne latérale du cholestérol pour fabriquer le premier stéroïde produit dans n'importe quel tissu stéroïdien, la prégnénolone (Farkash, Timberg *et al.* 1986), qui est ensuite convertie en progestérone dans les microsomes. Le procédé requiert alors différentes enzymes oxydatives situées dans les mitochondries et dans le réticulum endoplasmique pour produire une variété de stéroïdes. L'étape limitante dans la synthèse d'hormones stéroïdiennes est la livraison du cholestérol de la membrane externe à la membrane interne de la mitochondrie, où se situe le complexe enzymatique responsable de la conversion du cholestérol en prégnénolone (Stocco, Clark *et al.* 2001). Le transport du cholestérol dans cet espace intermembranaire mitochondrial est gouverné par StAR, phosphoprotéine exprimée dans les cellules stéroïdogéniques (Strauss, Kallen *et al.* 1999). La protéine StAR n'est pas très fortement exprimée dans les cellules

de granulosa des follicules pré-ovulatoires (Kiriakidou, McAllister *et al.* 1996). Par contre, le processus de lutéinisation est associé à une augmentation dramatique de l'expression de StAR (Pescador, Stocco *et al.* 1999). C'est pourquoi on qualifie cette enzyme de pivot déterminant dans la stéroïdogénèse lutéale (Devoto, Kohen *et al.* 2002).

L'utilisation subséquente du substrat pour la synthèse de stéroïdes mène alors à une diminution de la concentration intracellulaire de cholestérol. Cependant, l'homéostasie est maintenue par des mécanismes de rétrocontrôle locaux qui régulent l'importation, le transport interne et la synthèse *de novo* du cholestérol (Brown and Goldstein 1997). Le contrôle transcriptionnel de gènes impliqués dans la voie homéostatique du cholestérol, en réponse à une déplétion de cholestérol, est effectué via d'importants facteurs de transcription connus sous le nom de protéines de liaison aux éléments de régulation des stérols (SREBPs; Edwards, Tabor *et al.* 2000). Les SREBPs sont exceptionnels et possèdent la propriété inhabituelle de demeurer ancrés dans la membrane du réticulum endoplasmique jusqu'à ce qu'un clivage protéolytique, dirigé par les concentrations de stérols, provoque le relâchement de leur partie amino-terminale transcriptionnellement active de 68 kDa, qui contient un motif de localisation nucléaire et un domaine de dimérisation/transactivation adoptant une conformation à fermeture leucine hélice-boucle-hélice de base (Brown and Goldstein 1997). Trois isoformes de SREBP sont présentement connus. SREBP-1a et -1c proviennent d'un seul gène par épissage alternatif (Goldstein, Rawson *et al.* 2002). SREBP-2 émane d'un gène différent et partage 50% d'homologie avec SREBP-1 (Miserez, Cao *et al.* 1997). Il a déjà été démontré que SREBP module l'expression de StAR, en particulier SREBP-1a chez l'humain (Christenson, Osborne *et al.* 2001) et chez le rat (Shea-Eaton, Trinidad *et al.* 2001), ainsi que SREBP-1c chez le porc (Ruiz-Cortes, Martel-Kennes *et al.* 2003).

Les SREBPs sont généralement perçus comme de faibles transactivateurs, ils demandent donc l'intervention de partenaires pour produire une réponse physiologique adéquate (Shimano 2002). La protéine stimulatrice 1 (Sp1) est fréquemment retrouvée au niveau des régions promotrices de plusieurs gènes. Des expériences avec des lignées cellulaires de drosophile ont suggéré que SREBP et Sp1 fonctionneraient en synergie pour activer la transcription du gène codant pour le récepteur des lipoprotéines à faible densité (LDLr; Sanchez, Yieh *et al.* 1995).

D'autres études utilisant des modèles acellulaires, ou des gabarits d'ADN nu, n'ont révélé que des niveaux additifs de transcription en présence de SREBP et de Sp1 seulement. La synergie observée entre ces deux facteurs de transcription n'était reconstituée qu'en présence de la protéine de liaison à CREB, CBP (Naar, Beurang *et al.* 1998). CBP abrite des domaines pouvant interagir avec plusieurs facteurs de transcription différents, et il appartient à une catégorie de cofacteurs que l'on croit être en mesure de former un pont reliant la machinerie transcriptionnelle de base et des facteurs de transcription spécifiques à l'ADN (Ericsson and Edwards 1998).

CBP est également reconnu pour posséder une activité acétyltransférase d'histones (activité HAT) intrinsèque (Bannister and Kouzarides 1996; Ogryzko, Schiltz *et al.* 1996). La restructuration de la chromatine et les modifications covalentes des histones jouent un rôle primordial au niveau de la régulation de la transcription génétique. L'acétylation des histones suit la formation du complexe de pré-initiation et précède immédiatement l'induction de la transcription (Fry and Peterson 2002). Certaines expérimentations ont associé une augmentation de l'acétylation des histones H3 (et non H4) à la région proximale du promoteur de *StAR* durant le processus de lutéinisation (Christenson, Stouffer *et al.* 2001). D'autres ont révélé une hyperacétylation des histones H3 associées au promoteur du gène *LDLr* dans des cultures de lignées cellulaires privées de cholestérol (Bennett and Osborne 2000).

Contrairement, il existe un autre type de molécule pouvant modifier la structure de la chromatine, qui mène à une hypoacétylation des histones et qui se traduit par un effet dominant de répression sur la transcription, il s'agit des déacétylases d'histones (HDAC; Kadosh and Struhl 1998; Rundlett, Carmen *et al.* 1998). Plusieurs études génétiques et analyses de promoteurs suggèrent que ces deux enzymes n'agissent pas indépendamment et que leurs activités puissent être interreliées (Perez-Martin and Johnson 1998; Vogelauer, Wu *et al.* 2000; Wittschieben, Otero *et al.* 1999). Néanmoins, on se demande encore comment les activités de ces deux types d'enzymes, qui exercent des fonctions opposées, sont mutuellement balancées dans la cellule (Roth, Denu *et al.* 2001).

Les inhibiteurs de HDAC comprennent une gamme variée de différents composés chimiques non apparentés qui induisent une hyperacétylation réversible des histones en influençant l'équilibre entre l'acétylation et la déacétylation des histones (Saunders, Dicker *et al.* 1999). Paradoxalement, même si l'hyperacétylation des histones est souvent associée à une augmentation de l'expression génétique, ce n'est pas le cas pour certains gènes (Van Lint, Emiliani *et al.* 1996). L'acétylation des histones pourrait donc être une modification post-traductionnelle multiforme en regard à l'expression génétique.

La stéroïdogénèse est donc initiée par l'importation de cholestérol dans la mitochondrie, qui est accomplie par la protéine StAR. Il a été démontré que l'expression de cette dernière est modulée par SREBP. Toutefois, aucune corrélation fonctionnelle n'a été établie avec l'homéostasie intracellulaire du cholestérol. Dans ce mémoire, je vais vous montrer que l'expression d'ARNm de *StAR* est augmentée par une carence en cholestérol dans des cultures primaires de cellules de granulosa porcines. Je traiterai également d'une technique, utilisant la luciférase comme gène rapporteur, qui a révélé un effet positif de SREBP et de CBP sur l'activation du promoteur de *StAR*. Vous constaterez aussi le recrutement de différents facteurs de transcription/cofacteurs incluant SREBP, Sp1 et CBP, ainsi qu'une augmentation de l'acétylation des

histones H3, à la région proximale du promoteur de *StAR* en condition de déplétion de cholestérol intracellulaire, par une stratégie d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Enfin, je vous démontrerai par la même méthode de ChIP et par une analyse Northern que le traitement des cultures primaires avec des inhibiteurs de HDAC augmente significativement l'acétylation des histones H3 associées au promoteur de *StAR*, mais inhibe complètement sa transcription.

## II. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

### 1. LE CHOLESTÉROL

#### 1.1. Généralités

Le cholestérol est un alcool complexe que l'on retrouve dans toutes les huiles et graisses animales. Malgré sa mauvaise réputation, le cholestérol est absolument essentiel à la vie animale : il module la fluidité des membranes et est un composant essentiel de la membrane plasmique des cellules animales, il constitue le précurseur de la vitamine D qui stimule l'absorption intestinale de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), il est lui-même la source des hormones stéroïdiennes qui déterminent les caractères sexuels, et des sels biliaires qui contribuent à la digestion des graisses (Marieb 1999). Même si la majorité des cellules animales sont en mesure de fabriquer leur propre cholestérol par l'action du coenzyme A 3-hydroxy-3-méthylglutaryl (HMG-CoA), la biosynthèse de cholestérol est prédominante dans les cellules hépatiques (Horton 1994). Le cholestérol obtenu des aliments ainsi que celui formé dans le foie seront transportés dans le sang par des lipoprotéines jusqu'aux différentes cellules de l'organisme où ils pourront s'acquitter de leurs tâches (Horton 1994). Celle qui nous intéresse ici, c'est l'état de substrat pour la synthèse d'hormones stéroïdiennes. Nous verrons dans cette section où doit se rendre le cholestérol dans la cellule afin que démarre la stéroïdogénèse, comment fonctionne la stéroïdogénèse, comment elle est contrôlée ainsi que les principaux éléments impliqués dans l'homéostasie intracellulaire du cholestérol.

#### 1.2. Destination

On retrouve ces cellules capables de stéroïdogénèse dans la glande surrénale et dans les gonades, où elles sécrètent les hormones corticosurrénales et les hormones sexuelles, respectivement. Par exemple, la surrénale fabrique le cortisol, un

glucocorticoïde qui agit sur le métabolisme afin de maintenir un taux normal de glucose sanguin. Elle synthétise aussi l'aldostérone qui, par son action sur les reins, contribue à la régulation de l'équilibre des électrolytes et de l'eau. Les oestrogènes et la progestérone (hormones sexuelles femelles du système ovarien et placentaire) ainsi que la testostérone (hormone sexuelle mâle des testicules) régulent les fonctions reproductives et les caractéristiques sexuelles secondaires (Marieb 1999).

Ces cellules stéroïdogéniques peuvent se servir du cholestérol transporté dans le sang sous forme de lipoprotéines à haute densité (HDL) et/ou à basse densité (LDL) comme substrat pour la stéroïdogénèse. Même s'il existe certaines différences quant à la préférence entre les HDL et les LDL, ces deux sources de cholestérol peuvent être utilisées par les cellules lutéales chez la plupart des espèces grâce à des récepteurs membranaires spécialisés (Murphy and Silavin 1989). En effet, la prise cellulaire du cholestérol relié aux HDL s'effectue par l'intermédiaire du récepteur HDL que l'on nomme SR-BI (récepteur piègeur de classe B, type I). Les SR-BI favorisent la cueillette sélective des esters de cholestérol pour un transfert efficace à la membrane (Mizutani, Sonoda *et al.* 1997). Cependant, nous allons nous concentrer sur les LDL, qui sont la principale source de substrat pour la stéroïdogénèse chez plusieurs mammifères (Murphy and Silavin 1989). Chaque molécule de LDL peut transporter 2 500 molécules de cholestérol, ce qui en fait un transporteur efficace (Grummer and Carroll 1988). La prise de LDL par les cellules stéroïdogéniques se produit par endocytose ou internalisation de ses récepteurs (LDLr) formant un complexe de liaison avec les LDL au niveau de la membrane plasmique (Brown and Goldstein 1986). Les endosomes ainsi formés s'associent aux lysosomes où se produit la dissociation du complexe, le recyclage ou la dégradation des récepteurs, la lyse des lipoprotéines, et la libération ou l'estérification du cholestérol (Grummer and Carroll 1988).

Une fois disponible, le cholestérol doit se rendre jusqu'à la membrane interne de la mitochondrie, site des réactions chimiques menant à la production des hormones stéroïdiennes. Cependant, à cause de son hydrophobie, le cholestérol ne peut s'y rendre par simple diffusion dans le cytosol. Il nécessite encore une fois certains transporteurs. La première étape du transport du cholestérol vers la membrane

externe de la mitochondrie demande un cytosquelette cellulaire intact, ce qui a été démontré par l'utilisation d'inhibiteurs de microtubules et de microfilaments qui empêchaient l'accumulation du cholestérol dans les mitochondries (Crivello and Jefcoate 1978). Ensuite, on a identifié quelques protéines pouvant jouer le rôle de transporteur de cholestérol dans le cytoplasme à différents endroits comme la calvéoline-1 (Garver, Erickson *et al.* 1997), la protéine transporteuse de stérols (SCP-2) (LaVoie, Benoit *et al.* 1997) et la protéine Niemann-Pick C1 (NPC1; Carstea, Morris *et al.* 1997). Nous savons également que le transport du cholestérol vers les mitochondries est augmenté lors de la stimulation de la stéroïdogénèse par les hormones trophiques (Stocco 2001a). Arrivé à la membrane externe de la mitochondrie, le cholestérol est relocalisé à la membrane interne de la mitochondrie par la protéine StAR (protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse), dont on verra les caractéristiques détaillées un peu plus loin. Et c'est au niveau de la membrane interne de la mitochondrie que l'on retrouve le complexe de l'enzyme cytochrome P450 coupant la chaîne latérale (P450scc) et que l'on pourra débiter la synthèse des stéroïdes (Farkash, Timberg *et al.* 1986).

### 1.3. Stéroïdogénèse

Les hormones stéroïdiennes, indépendamment du tissu d'origine ou de leurs différentes actions dans l'organisme, sont toutes synthétisées à partir d'un seul substrat commun, le cholestérol (Strauss, Schuler *et al.* 1981), et partagent toutes la même structure à quatre anneaux. Par contre, chaque stéroïde diffère légèrement par sa forme spécifique obtenue par la présence de divers groupements chimiques latéraux fixés sur différents sites sur les anneaux, ce qui leur confère d'étonnantes fonctions très distinctes. Ils peuvent être groupés selon leur structure chimique ou bien selon leur fonction physiologique. Par exemple, les hormones stéroïdiennes sexuelles femelles peuvent être distinguées en trois grandes classes : les androgènes, les oestrogènes et les progestatifs.

En réponse aux hormones trophiques et autres stimuli stéroïdogéniques, la biosynthèse des hormones stéroïdiennes débute avec le clivage enzymatique de la

chaîne latérale du cholestérol pour fabriquer le premier stéroïde produit dans n'importe quel tissu stéroïdien, la prégnénolone, grâce à l'action du complexe enzymatique P450<sub>scc</sub> (Farkash, Timberg *et al.* 1986). L'enzyme 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 $\beta$ -HSD) convertit ensuite la prégnénolone en progestérone dans les microsomes de certains tissus. La stéroïdogénèse requiert alors différentes enzymes oxydatives situées dans les mitochondries et dans le réticulum endoplasmique pour produire une variété de stéroïdes. Le produit final est le résultat du complément des enzymes présentes dans différents tissus stéroïdogéniques (Miller 1998). Par exemple, les cellules de la thèque synthétisent et sécrètent les androgènes qui peuvent par la suite être convertis en oestradiol par les cellules de granulosa. Le corps jaune et le syncytiotrophoblaste du placenta fabriquent la progestérone et les cellules de Leydig des testicules, la testostérone. Aussi, les cellules de la zone glomérulée de la glande surrénale synthétisent et sécrètent des minéralocorticoïdes comme l'aldostérone, et les cellules de la zone fasciculée synthétisent et sécrètent des glucocorticoïdes comme le cortisol et la corticostérone. (Marieb 1999) De plus, certaines régions spécialisées du cerveau fabriquent des neurostéroïdes comme la prégnénolone, la progestérone, la 5  $\alpha$ -dihydroprogestérone, l'allopregnenolone et le déhydroépiandrostérone (DHEA; Baulieu 1997). Le plus important progestatif produit par l'ovaire est la prégnénolone étant donné sa position clé comme précurseur de toutes les hormones stéroïdiennes.

La stéroïdogénèse est donc effective dans des tissus spécialisés comme la glande surrénale, le placenta, les gonades et le cerveau qui sont formés d'enzymes qui catalysent les réactions menant à la synthèse de stéroïdes à partir du cholestérol.

#### **1.4. Régulation de la stéroïdogénèse**

Les principaux déclencheurs de la synthèse d'hormones stéroïdiennes dans les ovaires et les testicules sont les gonadotrophines. Leur action débute par la liaison à des récepteurs membranaires spécifiques à la surface des cellules stéroïdogéniques pour ensuite stimuler certaines voies métaboliques qui mèneront à l'expression de

gènes codant pour des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse. Par exemple, la gonadotrophine chorionique (CG) ou hormone lutéinisante (LH) augmente la synthèse de progestérone dans les cellules du corps jaune et augmente la synthèse de testostérone dans les cellules de Leydig des testicules, et l'hormone folliculo-stimulante (FSH) augmente la production de progestérone dans les cellules de granulosa (Cooke 1999). L'hormone adrénocorticotrophique (ACTH) n'est pas une gonadotrophine mais elle augmente la synthèse de glucocorticoïdes dans la zone fasciculée de la glande surrénale, et l'ACTH ou l'angiotensine II augmente la synthèse de minéralocorticoïdes dans la zone glomérulée de la glande surrénale (Waterman and Keeney 1996). Les récepteurs de la LH et de la FSH font partie d'une sous-famille unique de protéines possédant sept domaines transmembranaires et une longue région extracellulaire pour capter le ligand. Ils sont couplés à l'adénylyl cyclase et à la phospholipase-C (McFarland, Sprengel *et al.* 1989). Les gonadotrophines, par leur liaison à leur récepteur, engagent la cascade de signalisation de la protéine kinase A dépendante de la 3',5'-monophosphate d'adénosine cyclique à travers l'activation des protéines G. Les protéines G sont des hétérotrimères formés des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , mais elles fonctionnent comme des hétérodimères à cause d'une très forte affinité entre les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  (Johnson and Dhanasekaran 1989). L'activation des protéines G survient quand le ligand occupe le récepteur en libérant le GDP des protéines G et en permettant au GTP de prendre la place libre. L'activation déclenche la dissociation de la sous-unité  $\alpha$  des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ , pour qu'elles stimulent l'adénylyl cyclase. Cette dernière est appelée effecteur, c'est-à-dire enzyme qui convertit une molécule précurseure inactive en forme active dite "second messenger" (Linder and Gilman 1992). L'activation de l'adénylyl cyclase aboutit en l'hydrolyse de l'ATP en AMPc, lequel activera par la suite certaines protéines kinases dans le cytoplasme en produisant une cascade de réactions moléculaires qui vont phosphoryler les protéines impliquées dans la stéroïdogénèse (Leung and Steele 1992).

Même si le principal mécanisme d'action de la LH et de la FSH est le même, la réponse de la cellule est différente. On associe plusieurs facteurs à cette variation : une multitude de transcrits codant pour les récepteurs des gonadotrophines (Richards

1994), plusieurs isoformes de l'adénylyl cyclase (Tang and Gilman 1992) et la complexité de la famille des protéines G (Simon, Strathmann *et al.* 1991). Il y a de multiples isoformes des protéines kinases dépendantes de l'AMPc dans l'ovaire. Ces isoformes incluent les sous-unités RIa, RIIa et RIIb (sous-unité régulatrice de type I ou II des protéines kinases PKA dépendantes) et C (sous-unité catalytique; Richards and Rolfes 1980). Ces protéines vont être dissociées et la sous-unité C sera relocalisée au noyau où elle pourra phosphoryler des facteurs de transcription spécifiques (Adams, Harootunian *et al.* 1991). Les cellules synthétisent d'autres peptides, en plus des sous-unités régulatrices des kinases A, qui peuvent agir comme inhibiteurs de l'activité de la sous-unité catalytique : ce sont les inhibiteurs des protéines kinases (PKI), pour lesquels il existe également plusieurs isoformes (Scarpetta and Uhler 1993). L'action des PKI serait de moduler ou de contrôler (Tash, Welsh *et al.* 1981), voire bloquer les effets des gonadotrophines (Olsen and Uhler 1991).

De plus, il est connu que les gonadotrophines peuvent stimuler la voie des protéines kinases C (PKC) dans l'ovaire (Davis, Weakland *et al.* 1986). L'activation de la voie PKC par un traitement *in vitro* avec un ester du phorbol (phorbol 12-myristate 13 acétate, PMA) module la stéroïdogénèse et l'expression d'enzymes qui en sont responsables, dont le P450<sub>scc</sub> (Trzeciak, Duda *et al.* 1987) et la 3 $\beta$ -HSD (Chedrese, Zhang *et al.* 1990). La synthèse d'hormones stéroïdiennes est donc régie par plus d'une voie métabolique.

La réponse des cellules aux hormones LH et FSH implique des variations dans l'expression des facteurs de transcription qui règlent l'expression de gènes spécifiques. Un des éléments de réponse de l'ADN connu pour sa réaction au système AMPc/PKA a été identifié comme une séquence consensus courte TGACGTCA appelée CRE (élément de réponse à l'AMPc; Lalli and Sassone-Corsi 1994). La protéine de liaison CREB (protéine de liaison aux éléments de réponse à l'AMPc) se fixe au CRE sous forme de dimère (Hoeffler, Meyer *et al.* 1988). L'ADNc de CREB code pour une protéine de 327 acides aminés, laquelle doit être phosphorylée afin d'avoir la capacité d'activer la transcription (Yamamoto, Gonzalez *et al.* 1988).

D'autres facteurs de transcription entrent aussi en jeu dans l'expression de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse. Cependant, nous ne verrons que ceux concernés par la régulation de l'expression de StAR, un peu plus loin.

### 1.5. Homéostasie intracellulaire du cholestérol

Les concentrations intracellulaires de cholestérol sont régulées par une panoplie de mécanismes de rétrocontrôle (Ioannou 2001). Le cholestérol importé ou synthétisé *de novo* peut être estérifié par l'enzyme acyl-Co : acyltransférase du cholestérol (ACAT) pour son entreposage sous forme de gouttelettes lipidiques (Strauss, Schuler *et al.* 1981). Les éléments importants dans sa synthèse, sa dégradation et sa mobilisation sont HMG-CoA, LDLr, ACAT et l'enzyme 17 $\alpha$ -hydroxylase (Russell 1992). L'activité de ces protéines impliquées dans l'homéostasie intracellulaire du cholestérol est sous le contrôle, entre autres, de domaines sensibles aux stérols qui sont indirectement modulés par le cholestérol et ses précurseurs (Skalnik, Narita *et al.* 1988). Les plus puissantes molécules de rétrocontrôle sont les oxystérols produits par l'oxydation enzymatique et non enzymatique du cholestérol, qui donne des groupes cétones ou hydroxyles fortement hydrosolubles (Luu 1995; Tamasawa, Hayakari *et al.* 1997). Les oxystérols activent la transcription à travers les récepteurs nucléaires orphelins LXR $\alpha$  (Janowski, Willy *et al.* 1996) et LXR $\beta$  (Lehmann, Kliewer *et al.* 1997). Aussi, le récepteur nucléaire orphelin facteur stéroïdogénique-1 (SF-1) est activé par les oxystérols à des concentrations qui vont inhiber la synthèse du cholestérol (Lala, Syka *et al.* 1997).

En outre, les régions du promoteur de gènes comme la *réductase HMG-CoA*, le *récepteur LDL* et la *synthétase HMG-CoA* contiennent des séquences de 10 nucléotides appelées éléments de réponse aux stérols 1 et 2 (SRE-1 et SRE-2; Dooley, Millinder *et al.* 1998; Goldstein and Brown 1990), sur lesquelles se lient des facteurs de transcription essentiels pour l'homéostasie du cholestérol que l'on appelle protéines de liaison aux éléments de réponse aux stérols (SREBP). SREBP est un membre de la grande famille des facteurs de transcription à fermeture leucine/hélice-

boucle-hélice-basale et il existe actuellement deux gènes, *SREBP-1* et *SREBP-2*, encodant trois différentes protéines SREBP qui ont chacune une masse moléculaire d'environ 125 kDa (Brown and Goldstein 1997). Le gène *SREBP-2* code pour une seule protéine qui a environ 50 % d'homologie avec *SREBP-1*, alors que le gène *SREBP-1* code pour deux différentes protéines obtenues après épissage alternatif et utilisation d'un promoteur alternatif, *SREBP-1a* et *SREBP-1c* (Brown and Goldstein 1997). *SREBP-1c* est aussi appelé facteur de différenciation et de détermination des adipocytes 1 (*ADD1*) (Tontonoz, Kim *et al.* 1993). Elles ont toutes une structure et un comportement similaire (Sato, Yang *et al.* 1994), et leur partie amino-terminale est suffisante pour induire les transcriptions dépendantes des SRE (Hampton 2000). La forme complète et inactive de SREBP est transmembranaire et demeure ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique et du noyau (Brown and Goldstein 1999). Cependant, lors d'une diminution de la concentration de cholestérol intracellulaire, SREBP est transportée par SCAP (protéine de clivage activée par les stérols), fonctionnant comme une protéine chaperonne, jusqu'à l'appareil de Golgi (DeBose-Boyd, Brown *et al.* 1999) où la partie amino-terminale et transcriptionnellement active de SREBP (environ 68 kDa) est coupée et relâchée par l'action orchestrée de deux protéases, S1P (protéase site 1) et S2P (protéase site 2; Brown and Goldstein 1999). Ce produit de clivage se dirige ensuite à l'intérieur du noyau où il se lie aux SRE et transactive ainsi les gènes promus par ces éléments de réponse aux stérols (Edwards, Tabor *et al.* 2000). À l'inverse, on a prévenu le clivage de SREBP dans des cultures de cellules auxquelles on a ajouté un mélange cholestérol/oxystérols ; on a ainsi obtenu de faibles concentrations nucléaires de SREBP et un taux chétif de transcription des gènes ciblés par SREBP (Brown and Goldstein 1990; Brown and Goldstein 1997; Edwards and Ericsson 1999).

Il est également important de mentionner que pour effectuer une activation transcriptionnelle optimale, SREBP requiert certains facteurs de transcription additionnels, présentement limités à la protéine de stimulation 1 (*Sp1*), au facteur nucléaire-Y (*NF-Y*) et à *CREB* (Dooley, Bennett *et al.* 1999; Edwards and Ericsson 1999; Magana, Koo *et al.* 2000). En effet, des études *in vitro* ont démontré que la liaison de *NF-Y* à l'ADN est associée avec la liaison synergique de SREBP à un SRE adjacent (Ericsson, Jackson *et al.* 1996), laissant croire à une interaction directe entre

les deux protéines (Dooley, Millinder *et al.* 1998). D'autres études avec le promoteur du *récepteur LDL* ont montré que Sp1 interagit aussi avec SREBP pour former un complexe ADN-protéine encore plus stable (Sanchez, Yieh *et al.* 1995; Yieh, Sanchez *et al.* 1995). On a également révélé une augmentation du recrutement de NF-Y ou de CREB au promoteur de la *réductase HMG-CoA* ou de Sp1 au promoteur du *récepteur LDL* dans des cultures de cellules en jeûne de cholestérol (Bennett and Osborne 2000). Des travaux ont aussi indiqué que SREBP-1a interagit avec certaines protéines co-activatrices comme la protéine de liaison à CREB (CBP; Ericsson and Edwards 1998; Naar, Beurang *et al.* 1998) et le cofacteur recruté activé (ARC) ou la protéine interagissant avec le *récepteur de la vitamine D* (Naar, Beurang *et al.* 1999). Par contre, une autre protéine aurait pour fonction d'atténuer la transcription de gènes répondant à SREBP, il s'agit du facteur de transcription multifonctionnel Yin Yang 1 (YY1; Bennett, Ngo *et al.* 1999; Ericsson, Usheva *et al.* 1999).

Les concentrations intracellulaires de cholestérol sont donc très efficacement gérées par des mécanismes de rétrocontrôle impliquant d'importantes molécules dont SREBP, qui y joue un rôle majeur.

## **2. PROTÉINE DE RÉGULATION RAPIDE DE LA STÉROÏDOGÉNÈSE**

### **2.1. La découverte**

Au début des années soixante, d'importants travaux ont permis de découvrir que des inhibiteurs de la synthèse de protéines perturbaient l'induction hormonale de la stéroïdogénèse (Stocco 2001a; Strauss, Kallen *et al.* 1999). Par la suite, d'autres études ont démontré que ces inhibiteurs paralysaient le mouvement du cholestérol de la membrane externe vers la membrane interne de la mitochondrie (Stocco 1999). De plus, en détruisant les membranes mitochondriales, on s'est vite aperçu que la stéroïdogénèse augmentait et que les inhibiteurs de synthèse de protéines n'arrivaient plus à la bloquer, suggérant que l'accès du cholestérol au système de clivage de la

chaîne latérale était restreint aux mitochondries intactes (Simpson, McCarthy *et al.* 1978). Et contrairement au cholestérol, les stérols hydroxylés solubles stimulaient fortement la synthèse stéroïdienne même en présence d'inhibiteurs de synthèse protéique ou en absence de stimulation par les gonadotrophines (Strauss, Kallen *et al.* 1999). En rassemblant toutes ces observations, on a suggéré l'existence d'une protéine dont l'activité est contrôlée par les hormones trophiques et qui augmente le mouvement du cholestérol de la membrane externe à la membrane interne de la mitochondrie.

On a ensuite identifié un groupe de phosphoprotéines mitochondriales de 30 kDa dans des cellules surrénales stimulées par l'ACTH et dans des cellules gonadiques stimulées à la LH, et ces protéines disparaissaient suite aux traitements avec les inhibiteurs de synthèse protéique (Pon, Hartigan *et al.* 1986). Finalement, des travaux d'identification, de clonage ainsi que des études d'expression de la protéine ont été menés dans le laboratoire du Dr Douglas M. Stocco sur des cellules tumorales de Leydig murines (MA-10) stimulées à l'AMPc et ont permis d'identifier la même famille de protéines mitochondriales de masse moléculaire de 37 kDa, 32 kDa et 30 kDa (Clark, Wells *et al.* 1994). L'analyse des protéines de 30 kDa a révélé qu'elles sont dérivées d'un même précurseur de 37 kDa produit dans le cytosol qui est importé et transformé dans la mitochondrie (Stocco and Kilgore 1988). La protéine mitochondriale de 30 kDa est le résultat d'une modification post-transcriptionnelle du précurseur de 37 kDa qui contient une séquence de signalement des mitochondries dans sa partie amino-terminale (Epstein and Orme-Johnson 1991; Stocco and Sodeman 1991). L'ADNc a une longueur de 1456 nucléotides et contient un cadre de lecture ouvert (ORF) de 852 nucléotides qui code pour une protéine de 284 acides aminés semblable à celle du précurseur de 37 kDa (Clark, Wells *et al.* 1994). Tous ces travaux ont enfin mené à l'identification d'une nouvelle protéine chez la souris (Clark, Wells *et al.* 1994) et chez l'humain (Sugawara, Holt *et al.* 1995) que l'on a nommé protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse (StAR). Nous verrons le rôle joué par StAR dans la cellule, le mécanisme par lequel elle arrive à réaliser sa vocation ainsi que les éléments concernés par la régulation positive et négative de la transcription du gène *StAR*.

## 2.2. Rôle

Le principal rôle de StAR est de servir de médiateur pour la livraison du substrat pour la biosynthèse de tous les stéroïdes, le cholestérol, à la membrane mitochondriale interne et au cytochrome P450<sub>scc</sub> où il sera converti en prégnénolone, le premier stéroïde synthétisé (Stocco, Clark *et al.* 2001). On dit de cette étape qu'elle est limitante dans la stéroïdogénèse et après plusieurs décennies de recherche, on suppose que StAR serait la protéine nouvellement synthétisée qui régule ce processus (Stocco and Clark 1996a).

On a confirmé ce rôle critique de StAR dans la stéroïdogénèse par la présence d'une mutation dans le gène codant pour StAR qui cause une hyperplasie surrénalocorticale lipidique congénitale (CAH). Le CAH est une condition létale caractérisée par une incapacité du nouveau-né de synthétiser des stéroïdes, causée par un élargissement de la glande surrénale contenant un haut niveau de cholestérol et par la présence d'une grande quantité de lipides dans les cellules de Leydig (Lin, Sugawara *et al.* 1995). Toutes les souris mutantes pour *StAR* ont une apparence féminisée du système génital externe, ne croissent pas normalement et meurent prématurément dû à une insuffisance du cortex de la surrénale. Le niveau de corticostérone et d'aldostérone sanguin est diminué et le niveau d'ACTH et de CRH est élevé, indiquant un manque dans la production des stéroïdes interférant avec la régulation de la rétroaction de l'axe hypothalamo-hypophysaire. La médulla de la surrénale est normale mais la zone fasciculée contient un haut niveau de dépôt de lipides. Les testicules des nouveau-nés contiennent quelques dépôts de lipides dans la région interstitielle. Cependant, à huit semaines, il y a une accumulation considérable de lipides dans la région interstitielle qui est associée avec une hyperplasie des cellules de Leydig. La même chose se produit au niveau des ovaires. Ils semblent normaux à la naissance mais après la puberté, les ovaires montrent une accumulation de dépôts de lipides dans la région interstitielle accompagnée d'une lutéinisation marquée des cellules du stroma et une maturation folliculaire incomplète qui amènent une défaillance prématurée de l'ovaire (Hasegawa, Zhao *et al.* 2000).

### 2.3. Mécanisme d'action

De diligentes études ont été conduites afin d'élucider un mécanisme précis et unique par lequel StAR effectuerait son action de transport du cholestérol d'une membrane mitochondriale à l'autre. Quelques-uns ont été proposés jusqu'à maintenant (Christenson and Strauss 2001): le modèle de la désorption du cholestérol, le modèle de la navette intermembranaire et le modèle de la phosphorylation. Les deux premiers impliquent que la séquence de ciblage mitochondriale située sur la partie amino-terminale de StAR se lie à un ou plusieurs transporteurs mitochondriaux transmembranaires externes (TOM) et internes (TIM) connus, qui feraient le lien avec la machinerie d'importation. Dans le modèle de la désorption du cholestérol, le domaine de transfert lipidique relié à StAR (domaine START) de la partie carboxy-terminale de la protéine stimule la désorption du cholestérol (c'est le modèle biochimiquement et biophysiquement préféré). L'importation du domaine START déplace la protéine de son site d'action, ce qui provoque le mouvement des stérols vers la membrane interne. C'est donc pendant cette importation que la pré-protéine StAR subit les traitements qui la mèneront à sa forme mature. Pour le modèle de la navette intermembranaire, la protéine StAR est importée dans l'espace intermembranaire et sa séquence de ciblage est clivée protéolytiquement, délaissant ainsi le domaine START dans l'espace intermembranaire où il progresse rapidement de la membrane externe à la membrane interne de la mitochondrie en livrant une molécule de cholestérol à la fois. Ensuite, StAR est enlevée de l'espace intermembranaire par un mécanisme encore inconnu. En ce qui a trait au mécanisme de phosphorylation, deux modèles semblables sont exposés : a) la phosphorylation de la sérine 195, secondée par l'AMPc, située dans le domaine START de StAR réduit l'effet inhibitoire de la séquence cible amino-terminale sur la fonction de StAR, permettant ainsi une interaction plus efficace avec la mitochondrie, et b) la phosphorylation de la sérine 195, secondée par l'AMPc, réduit l'effet inhibitoire de la séquence cible amino-terminale sur le domaine START, permettant ainsi une plus grande activité de ces domaines transporteurs de stérols (Christenson and Strauss 2001).

Ces différents modèles tentent donc d'éclaircir le mécanisme d'action réel de StAR quant au transport du cholestérol de la membrane mitochondriale externe à la membrane mitochondriale interne, mais par contre, aucun ne semble être en mesure d'expliquer toutes les propriétés biochimiques et biophysiques attribuées à cette protéine.

#### 2.4. Régulation positive de la transcription

Depuis qu'on a découvert que la présence des ARNm de *Star* dans les cellules surrénales et gonadiques est en corrélation directe avec la stéroïdogénèse, les études sur la régulation transcriptionnelle de l'expression de StAR n'ont cessé de gagner en popularité. Les hormones trophiques stimulent la biosynthèse des stéroïdes principalement par la voie classique du second messenger AMPc, en passant par l'activation de la PKA et subséquemment, la phosphorylation du facteur de transcription en réponse à l'AMPc, CREB (Richards 2001). Cependant, pour permettre au gène cible de répondre aux signaux intracellulaires, des facteurs de liaison aux éléments de réponse du promoteur sont requis. La réponse à l'AMPc se produit au niveau de la séquence TGACGTCA qui réfère à l'élément de réponse CRE, vu précédemment. Par contre, on ne retrouve pas cette séquence consensus dans le promoteur de *Star* et plusieurs gènes de la famille des stéroïdes hydroxylases mais seulement la moitié du site de réponse (CGTCA; Manna, Dyson *et al.* 2002), lequel est moins actif que l'élément de réponse complet (Mayr and Montminy 2001). De plus, il a été démontré que l'AMPc active directement Sp1, le facteur de régulation en amont (USF) et les récepteurs oestrogènes dans des cellules de granulosa (Richards 2001). CREB existe sous trois formes : CREB, CREM (protéine modulatrice de CRE) et ATF-1 (facteur de transcription activateur), dont les gènes montrent une grande homologie constituant la sous-famille CREB/CREM (Foulkes and Sassone-Corsi 1996). L'augmentation de la transcription en réponse à l'AMPc survient après la phosphorylation de CREB sur la sérine-133 (Chrivia, Kwok *et al.* 1993; Gonzalez and Montminy 1989) ou de CREM sur la sérine 117 (Fimia, De Cesare *et al.* 1999), et par sa liaison à la protéine nucléaire CBP (Mayr, Canettieri *et al.* 2001). On observe la phosphorylation de CREB très tôt durant la lutéinisation dans les cellules de granulosa

de rat. Par contre, ces cellules deviennent alors réfractaires à d'autres stimulations par l'AMPc (Gonzalez-Robayna, Alliston *et al.* 1999). En outre, l'expression des différentes isoformes disparaissent pendant la lutéinisation chez les primates (Somers, Benyo *et al.* 1995). Mais à long terme, il y a un maintien de la phosphorylation de CREB via l'interaction de l'AMPc et de la voie des kinases mitogènes activées (MAPK; Maizels, Mukherjee *et al.* 2001).

SF-1, qu'on a vu activé par les oxystérols en homéostasie intracellulaire du cholestérol, est un membre de la famille des facteurs de transcription nucléaires récepteurs d'hormones stéroïdiennes. Il a d'abord été identifié dans des cellules corticosurrénales et intervient évidemment dans la régulation transcriptionnelle de *StAR* (Ikeda, Lala *et al.* 1993). Au moins six sites de liaison pour cette protéine ont été trouvés le long du promoteur de *StAR* (Caron, Ikeda *et al.* 1997; Sandhoff, Hales *et al.* 1998; Sugawara, Kiriakidou *et al.* 1997). Des souris mutantes ont révélé le rôle essentiel de SF-1 dans le développement de la stéroïdogénèse (Luo, Ikeda *et al.* 1995; Shinoda, Lei *et al.* 1995). SF-1 est avant tout requis pour les interactions ADN-protéines nécessaires à la transactivation maximale du promoteur de *StAR* (Wooton-Kee and Clark 2000). SF-1 pourrait également jouer un rôle clé dans le développement de la régulation de l'expression de *StAR*. En effet, on ne détecte aucun ARNm de *StAR* dans la crête urogénitale de souris mutantes pour SF-1, et l'ablation de certains sites de liaison pour SF-1 sur le promoteur de *StAR* diminue son activité basale (Caron, Ikeda *et al.* 1997). Nonobstant, ces mêmes mutations ne diminuent pas la réponse du promoteur de *StAR* murin à l'AMPc, suggérant que la liaison de SF-1 ne soit pas requise dans le cas de la régulation dépendante à l'AMPc (Caron, Ikeda *et al.* 1997). Il reste encore beaucoup de travail à s'acquitter avant d'y voir plus clair, mais l'implication de SF-1 dans la régulation transcriptionnelle positive de *StAR* est notoire.

Un autre important facteur intervenant dans le contrôle de la transcription de *StAR* est la protéine de liaison au rehausseur CCAAT (C/EBP), membre de la famille des facteurs de transcription à fermeture leucine de base et impliqué dans la différenciation et la fonction de plusieurs types cellulaires (Lekstrom-Himes and Xanthopoulos 1998). C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  sont exprimés dans des cellules

stéroïdogéniques incluant les cellules de Leydig (Nalbant, Williams *et al.* 1998) et les cellules de granulosa (Sirois and Richards 1993). C/EBP $\beta$  est un composant de la voie de signalisation engagée par la LH dans l'ovaire et est requis pour une ovulation efficace (Pall, Hellberg *et al.* 1997). Deux sites potentiels de liaison ont été remarqués sur le promoteur de *StAR*, qui est transactivé par C/EBP $\beta$  lors de transfections transitoires. De plus, la transactivation du promoteur de *StAR* par SF-1 dépend de la présence de sites fonctionnels de liaison pour C/EBP, ce qui nous laisse croire que SF-1 et C/EBP $\beta$  pourraient former un complexe sur ce promoteur. Néanmoins, l'induction du promoteur de *StAR* par l'AMPc ne semble relativement pas affectée par des mutations sur les sites de C/EBP, ce qui indique que C/EBP $\beta$  pourrait être plus impliqué dans un niveau d'expression basal et développemental que dans un niveau accru, comme lors de l'activation de l'expression de *StAR* par l'AMPc (Stocco, Clark *et al.* 2001).

Deux facteurs de transcription que l'on a également survolés dans la section traitant de l'homéostasie intracellulaire du cholestérol, SREBP et Sp1, sont de bons candidats pour les études futures sur la régulation transcriptionnelle de *StAR* car peu d'informations sont présentement disponibles à ce niveau. On a identifié quelques sites de liaison pour SREBP sur les promoteurs de *StAR* humain et de rat, et on sait que la surexpression des formes actives de SREBP-1a, -1c et -2 accroît la transcription de *StAR* (Christenson, Osborne *et al.* 2001; Shea-Eaton, Trinidad *et al.* 2001). Pour Sp1, membre de la famille des facteurs de transcription en doigt de zinc, plusieurs sites de liaison ont été trouvés sur le promoteur de *StAR* humain (Momoi, Waterman *et al.* 1992; Sugawara, Lin *et al.* 1995). On reconnaît de plus en plus l'interaction de Sp1 avec des facteurs de transcription participant à la régulation de l'expression de *StAR* comme le récepteur œstrogène (Sun, Porter *et al.* 1998) et C/EBP $\beta$  (Lee, Williams *et al.* 1997; Rodenburg, Holthuizen *et al.* 1997). SREBP et Sp1 sont donc des facteurs intéressants pour l'étude de l'expression de *StAR*.

Une autre famille de facteurs de transcription présents dans l'activation du promoteur de *StAR* est une famille de protéines à deux doigts de zinc que l'on nomme GATA et qui reconnaît la séquence (A/T)GATA(A/G), d'où son nom (Molkentin

2000). On les a nommées GATA-1, -2, -3, -4, -5 et -6 mais seule GATA-4 semble impliquée dans l'induction de la transcription du gène *StAR* dans des cellules de granulosa de rat, par son interaction avec C/EBP $\beta$  (Silverman, Eimerl *et al.* 1999). Des analyses de mutations ont révélé que ces deux facteurs sont requis pour la transactivation du promoteur de *StAR* induite par la FSH dans les cellules de granulosa de rat (Stocco, Clark *et al.* 2001). GATA-4 y jouerait un rôle permissif alors que le rôle de C/EBP $\beta$  serait plus actif et régulateur dans le niveau de rapidité de transcription de *StAR* (Sugawara, Kiriakidou *et al.* 1997).

On a récemment démontré qu'en plus de l'augmentation des niveaux d'AMPc intracellulaires qui surviennent après stimulation de cellules stéroïdogéniques par les hormones trophiques, le relâchement d'acide arachidonique (AA) par les phospholipides et probablement par d'autres sources intracellulaires est aussi requis pour que la stéroïdogénèse puisse avoir lieu (Wang, Walsh *et al.* 1999). On a ensuite montré que l'inhibition du relâchement des AA se traduisait par l'inhibition de l'expression de *StAR* (ARNm et protéine; Wang, Walsh *et al.* 2000). Par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, on a pu révéler qu'un ou plusieurs métabolites générés par la voie métabolique des AA, impliquant l'enzyme lipoxygénase, sont nécessaires à la transcription de *StAR*. L'acide 5(S)-hydroperoxy-(6E,8Z,11Z,14Z)-eicosatétraénoïque (5-HPETE) serait probablement le métabolite qui agirait comme ligand pour des facteurs de transcription encore inconnus mais essentiels à l'activation du promoteur de *StAR* (Stocco, Clark *et al.* 2001).

Finalement, de nouvelles études ont établi que le récepteur arylhydrocarbène (AhR) pourrait bénéficier d'un rôle dans l'expression du gène *StAR* (Sugawara, Nomura *et al.* 2001). Des transfections dans des cellules tumorales de la glande surrénale de souris (Y-1) avec AhR et son partenaire de liaison hétérodimère, le relocalisateur nucléaire arylhydrocarbène (ARNT), ont indiqué une augmentation de l'activité du promoteur de *StAR* (Sugawara, Nomura *et al.* 2001). Ces résultats suggèrent donc que certains polluants environnementaux puissent avoir un effet sur l'expression de *StAR* via AhR, surtout depuis que l'on sait que AhR peut agir comme récepteur de toxines comme la dioxine. Plus encore, on a récemment prouvé que des

polluants environnementaux comme l'insecticide organophosphate Diméthoate (Walsh, Webster *et al.* 2000), l'herbicide Roundup (Walsh, McCormick *et al.* 2000), l'insecticide organochloré lindane (Walsh and Stocco 2000) et les fongicides econazole et myconazole (Walsh, Kuratko *et al.* 2000) inhibent la stéroïdogénèse dans les cellules tumorales de Leydig (MA-10) en réduisant l'expression de la protéine StAR, et que certains de ces agents inhibent la transcription du gène *StAR*. Par contre, on n'a pas encore identifié les éléments de régulation du promoteur de *StAR* impliqués dans ces inhibitions.

## 2.5. Régulation négative de la transcription

Il paraît évident que la plupart des études sur le promoteur de *StAR* impliquent sa régulation positive mais plusieurs travaux ont aussi montré que ce promoteur contient également plusieurs éléments jouant un rôle dans sa régulation négative. C'est le cas d'un membre inhabituel de la superfamille des récepteurs hormonaux nucléaires, DAX-1 (inversion du sexe sensible au dosage-hypoplasie surrénale congénitale, chromosome X, gène 1). Des mutations dans le gène *DAX-1* humain sont tenues responsables de l'hypoplasie surrénale congénitale liée au chromosome X (Muscatelli, Strom *et al.* 1994). La surexpression de DAX-1 dans les cellules Y-1 entraînent autant un blocage de la synthèse de stéroïdes que de l'expression d'au moins deux enzymes impliquées dans la biosynthèse de stéroïdes, P450<sub>scc</sub> et 3 $\beta$ -HSD (Lalli, Melner *et al.* 1998; Zazopoulos, Lalli *et al.* 1997). Ces études indiquent aussi que DAX-1 inhibe l'expression de StAR, et qu'elle le fait via sa liaison à une structure en tête d'épingle située dans une région 5' avoisinante du promoteur de *StAR* (Zazopoulos, Lalli *et al.* 1997).

Un second joueur important dans la régulation transcriptionnelle négative de *StAR* est le facteur de transcription multifonctionnel Yin Yang 1 (YY1). On a découvert trois sites de liaison auxquels se lie YY1 sur le promoteur de *StAR* chez le rat (Nackley, Shea-Eaton *et al.* 2002). Des essais de cotransfections ont permis de démontrer que la surexpression de YY1, en présence ou en absence de surexpression de SREBP1a, était capable de répression transcriptionnelle (Nackley, Shea-Eaton *et*

*al.* 2002). YY1 inhibe l'activation de *StAR* par SREBP1a/NF-Y, et empêche également la liaison de SREBP1a aux SRE en présence ou en absence de NF-Y (Nackley, Shea-Eaton *et al.* 2002). En plus, YY1 interfère dans la liaison de NF-Y à des sites nonconsensus de liaison de NF-Y sur le promoteur de *StAR* (Nackley, Shea-Eaton *et al.* 2002). Ce facteur est donc capable de réprimer l'activation du gène *StAR*.

Par conséquent, en plus de tous les facteurs de transcription qui jouent un rôle dans la régulation transcriptionnelle positive de *StAR*, il y a DAX-1 et YY1 qui eux, jouent un rôle dans la régulation transcriptionnelle négative de *StAR*.

Enfin, on peut dire de la protéine StAR qu'elle est sans aucun doute un pilier majeur dans la stéroïdogénèse. Sa découverte, il y a maintenant presque dix ans, a immanquablement donné à la recherche en reproduction animale un outil important de plus pour la compréhension de la stéroïdogénèse.

### 3. RESTRUCTURATION DE LA CHROMATINE

#### 3.1. Généralités

La régulation de la transcription génétique n'est pas opérée que par l'arsenal de facteurs et cofacteurs de transcription que l'on connaît mais aussi par un autre type de protéine, les histones, dont les modifications covalentes sont à la base de la régulation épigénétique. Les histones, charpentes de l'architecture de la chromatine, sont parmi les protéines les mieux conservées du patrimoine génétique (Kornberg and Lorch 1999). Elles condensent l'ADN eucaryotique sous forme d'unités répétitives, les nucléosomes, constitués d'environ 146 paires de bases enroulées autour d'un octamère d'histones qui contient un tétramère H3-H4 et deux dimères H2A-H2B (Kornberg 1974). Il est maintenant bien accepté que la partie carboxy-terminale de ces protéines adopte des conformations qui sont critiques dans l'assemblage des nucléosomes en servant de médiateur dans les interactions histone-histone et histone-ADN (Cheung,

Allis *et al.* 2000). Au contraire, la queue amino-terminale des histones est moins bien structurée et n'est pas essentielle au maintien de l'intégrité des nucléosomes (Ausio, Dong *et al.* 1989). Ces queues d'histones engendreraient cependant des contacts secondaires et plus flexibles avec l'ADN et avec d'autres nucléosomes avoisinants, ce qui permettrait des changements dynamiques au niveau de l'accessibilité du génome pour la transcription (Luger, Mader *et al.* 1997).

Afin de pouvoir moduler ces changements dans l'architecture de la chromatine, les queues amino-terminales des histones bénéficient d'une collection élaborée de modifications post-traductionnelles incluant l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation, l'ubiquitination, la glycosylation et l'ADP-ribosylation, qui gèrent les contacts entre l'ADN et les histones (Strahl and Allis 2000). Ces modifications étant réversibles, elles peuvent agir à la manière d'un interrupteur "on/off" basé sur la chromatine. De plus, les facteurs de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP comme Swi/Snf et NURF constituent une autre voie de contrôle de l'architecture de la chromatine pour les histones (Georgel, Tsukiyama *et al.* 1997; Krebs, Fry *et al.* 2000; Lee, Sif *et al.* 1999). Nous ne verrons pas toutes ces modifications en détails, mais seulement ce qui concerne l'acétylation des histones ainsi que les éléments impliqués dans la déacétylation et l'inhibition de la déacétylation des histones.

### **3.2. Acétylation des histones**

L'acétylation des histones a été découverte il y a presque quarante ans et on l'associe depuis longtemps à l'activation de la transcription (Allfrey 1966). Cependant, la première activité acétyltransférase d'histones (HAT) n'a été identifiée qu'en 1996 chez la levure avec la protéine Gcn5 (Brownell, Zhou *et al.* 1996). L'acétylation a pour effet de neutraliser les charges positives sur les résidus lysine localisés sur la queue amino-terminale des histones H3 et H4. On pensait auparavant que cette neutralisation permettait aux protéines de se dissocier de l'ADN, chargée négativement, mais elle permet plutôt à l'ADN d'interagir avec les facteurs de transcription et toute la machinerie transcriptionnelle (Mizzen and Allis 1998).

Néanmoins, de récentes études ont démontré que l'acétylation peut quand même activer la transcription sans le déplacement de la queue amino-terminale. D'autres études *in vivo* ont aussi montré que cette partie amino-terminale est un domaine très bien structuré d'abord impliqué dans les interactions protéine-protéine. L'acétylation des histones augmente le caractère alpha-hélicale du domaine amino-terminal (Wang, Moore *et al.* 2000). Ce changement dans la structure peut influencer les interactions des histones avec d'autres protéines de la chromatine, menant à la déstabilisation du repliement de la chromatine (Wang, He *et al.* 2001).

On a proposé que l'acétylation et les autres modifications post-traductionnelles représentent un "code des histones" qui pourrait déterminer la séquence et la nature des interactions des protéines qui facilitent la transcription et/ou la réplication de l'ADN (Strahl and Allis 2000). Toutefois, cette hypothèse intéressante nécessite une évaluation critique par d'autres expérimentations. On soupçonne depuis longtemps un lien entre l'acétylation des histones et la transcription génétique, et la découverte des protéines co-activatrices possédant une activité acétyltransférase a révélé une évidence directe de l'existence de ce lien (Brownell, Zhou *et al.* 1996). On croit pour l'instant que les protéines de liaison à l'ADN recrutent des co-activateurs de transcription qui acétylent les histones associées aux promoteurs des gènes, permettant ainsi l'accès et/ou le recrutement d'autres protéines (les protéines de liaison aux boîtes TATA, l'ARN polymérase II, etc.) à l'ADN pour promouvoir la transcription.

### 3.3. Familles d'acétyltransférases d'histones

Un grand nombre de cofacteurs peuvent posséder une activité HAT (Marmorstein and Roth 2001). Parmi eux, on retrouve la famille des Gcn5/PCAF, les cofacteurs récepteurs d'hormones nucléaires comme SRC-1 et ACTR, ainsi que les protéines multifonctionnelles CBP/p300. Nous savons maintenant qu'il existe quelques facteurs de transcription qui abritent également une activité HAT. C'est le cas de ATF-2, qui se lie à des séquences d'ADN spécifiques (Kawasaki, Schiltz *et al.* 2000), et des deux facteurs de transcription généraux TAFII250 (Mizzen, Yang *et al.*

1996) et Nut1 (Lorch, Beve *et al.* 2000). Les patrons d'acétylation observés sur différents gènes reflètent indubitablement la combinaison d'enzymes requises à diverses étapes de la transcription, contribuant peut-être à la complexité du code des histones proposé comme gouverneur de la régulation génétique (Strahl and Allis 2000). De plus, chaque famille de protéines HAT semble avoir une préférence pour son substrat. Par exemple, la famille Gcn5/PCAF qui interagit avec une série de facteurs de transcription acétyle préférentiellement le résidu lysine 14 sur les histones H3 (Kuo, Brownell *et al.* 1996; Kuo, Zhou *et al.* 1998; Wang, Liu *et al.* 1998), et les membres de cette famille possèdent un module bromodomaine carboxy-terminal contenant un motif de reconnaissance de la lysine pour l'acétylation (Dhalluin, Carlson *et al.* 1999).

Le mécanisme catalytique de l'acétylation des histones est très complexe mais en analysant la structure de différentes HAT, on a découvert que le domaine central de ces protéines est capable d'interactions avec le coenzyme A, et que ces interactions seraient médiées par le squelette de la protéine et les interactions de Van der Waals au niveau des résidus du motif A des protéines de la famille Gcn5/PCAF. En effet, le résidu glutamate 173 situé au niveau du feuillet  $\beta$ 4 sur la protéine Gcn5 chez la levure serait la base de la catalyse (Trievel, Rojas *et al.* 1999).

En somme, l'acétylation des histones peut être perçue comme un excellent marqueur de l'activité génétique. À l'inverse, les déacétylases d'histones sont discernées comme atténuantes de la transcription génétique.

### 3.4. Déacétylation des histones

On a séparé les déacétylases d'histones (HDAC) humaines en quatre grandes classes (Wade 2001). La première comprend HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC8, qui sont des enzymes semblables au facteur de transcription Rpd3p chez la levure et qu'on associe aux répresseurs de transcription classiques comme Sin3, NcoR et les protéines de liaison aux îlots CpG méthylés (Buggy, Sideris *et al.* 2000; Hu, Chen *et al.* 2000; Van den Wyngaert, de Vries *et al.* 2000). La deuxième classe inclut

HDAC4, HDAC5, HDAC6 et HDAC7, qui ressemblent plus au facteur de transcription de levure Hda1p qu'à Rpd3p, mais on en connaît présentement très peu sur la biochimie de ces enzymes (Grozinger, Hassig *et al.* 1999; Kao, Downes *et al.* 2000; Verdel and Khochbin 1999). C'est également le cas des deux dernières classes de déacétylases, les familles Sir2 et HD2, au sujet desquelles on en sait très peu. Les deux premières classes partagent un motif catalytique commun et ne sont différenciées que par des séquences amino-terminales uniques que l'on retrouve seulement dans la deuxième classe (Grozinger, Hassig *et al.* 1999; Kao, Downes *et al.* 2000; Verdel and Khochbin 1999).

Un paradigme classique de régulation transcriptionnelle par les HDAC implique son recrutement au niveau d'une région génétique régulée par une série d'interactions protéine-protéine. Ce sont les propriétés de liaison à l'ADN des répresseurs transcriptionnels qui leurs indiquent la spécificité de répression (Wade 2001). Ces répresseurs interagissent directement avec les HDAC ou indirectement par des liens avec des corépresseurs (Wade 2001). L'augmentation des concentrations locales de HDAC mène à une hypoacétylation de la chromatine, qui se traduit par un effet dominant de répression sur la transcription (Kadosh and Struhl 1998; Rundlett, Carmen *et al.* 1998).

Même si de considérables progrès ont été accomplis au niveau de la compréhension de la structure et de la fonction des HAT et des HDAC, la question qui demeure est comment les activités de ces deux types d'enzyme, qui exercent des fonctions opposées, sont mutuellement balancées dans la cellule (Roth, Denu *et al.* 2001). Plusieurs études génétiques et analyses de promoteurs suggèrent que ces deux enzymes n'agissent pas indépendamment et que leurs activités puissent être interreliées (Perez-Martin and Johnson 1998; Vogelauer, Wu *et al.* 2000; Wittschieben, Otero *et al.* 1999). On indique aussi que les HAT et les HDAC occupent le même espace dans le noyau et qu'ils régulent la même liste de gènes cibles de façon coordonnée. Par exemple, l'activation de la transcription induite par des récepteurs nucléaires comme le récepteur de l'acide rétinoïque et le récepteur de la rétinoïde X implique une association dépendante du ligand ainsi qu'une

dissociation de HAT et de HDAC, respectivement, sur un promoteur donné (Blanco, Minucci *et al.* 1998; Wolffe 1997).

### 3.5. Inhibition de la déacétylation des histones

L'isolement et la synthèse de nouveaux inhibiteurs de HDAC potentiels ont permis de connaître l'aboutissement des manipulations de l'activité HDAC. Par exemple, il est maintenant bien connu que des traitements de cellules *in vitro* et *in vivo* avec des inhibiteurs de HDAC peuvent mener à des résultats spécifiques fonctionnels tels que l'arrêt du cycle cellulaire (Archer, Meng *et al.* 1998; Saito, Yamashita *et al.* 1999; Sambucetti, Fischer *et al.* 1999), la mort cellulaire par apoptose (Dangond and Gullans 1998; Janson, Brandner *et al.* 1997; Qiu, Kelso *et al.* 1999) ou la différenciation (Janson, Brandner *et al.* 1997; Parsons, Hansen *et al.* 1997; Saunders, Dicker *et al.* 1999). Ces résultats, spécifiques au type cellulaire, ont soulevé la possibilité que les inhibiteurs de HDAC représentent une importante nouvelle classe d'agents thérapeutiques anticancéreux (Saunders, Popa *et al.* 1999).

Les inhibiteurs de HDAC comprennent une gamme variée de différents composés chimiques non apparentés, mais qui induisent tous une hyperacétylation réversible des histones en influençant l'équilibre entre l'acétylation et la déacétylation des histones (Saunders, Dicker *et al.* 1999). On pense que les effets biologiques de ces composés (arrêt du cycle cellulaire, mort cellulaire par apoptose, différenciation) sont causés par l'hyperacétylation des histones et l'activation de la transcription consécutives à l'usage de ces composés (Brinkmann, Dahler *et al.* 2001). Pour l'instant, les principaux inhibiteurs de HDAC connus qui induisent l'hyperacétylation des histones sont le butyrate de sodium (NaBu), le trichostatin A (TSA), l'acide subéroyl anilide hydroxamique (SAHA) et l'acide subéroyl bis-hydroxamique (SBHA; Richon, Emiliani *et al.* 1998; Saunders, Dicker *et al.* 1999).

Même si l'hyperacétylation des histones est souvent associée à une augmentation de l'expression génétique, ce n'est pas le cas pour certains gènes (Van Lint, Emiliani *et al.* 1996). Ceci soulève l'intrigante possibilité que l'acétylation des

histones, comme la phosphorylation des protéines, pourrait être une modification post-traductionnelle multiforme en regard à l'expression génétique (Davie 1998). Par exemple, des études ont montré les effets inhibitoires de l'hyperacétylation des histones induite par des inhibiteurs de HDAC sur l'expression de gènes activés par des stéroïdes comme les gènes codants pour l'ovalbumine (McKnight, Hager *et al.* 1980), la tyrosine aminotransférase (Plesko, Hargrove *et al.* 1983), le récepteur de la prolactine (Ormandy, de Fazio *et al.* 1992), l'interleukine-2 (Takahashi, Miyaji *et al.* 1996), le virus oncogène mammaire de souris (MMTV; Bartsch, Truss *et al.* 1996; Bresnick, John *et al.* 1990) et, plus récemment, sur la régulation par la vitamine D du gène de l'ostéocalcine (Montecino, Frenkel *et al.* 1999). De plus, d'autres recherches ont révélé une diminution de l'expression des gènes de la cycline A et B1 par des traitements avec le TSA, qui causerait une inhibition de l'activité HAT associée à NF- $\kappa$ B par la phosphorylation de Gcn5 (Nair, Boersma *et al.* 2001). Il est connu que l'activité enzymatique de Gcn5 est inhibée par sa phosphorylation (Barlev, Poltoratsky *et al.* 1998).

Le mécanisme par lequel cet effet paradoxal des inhibiteurs de HDAC fonctionne est probablement très complexe et spécifique à chaque gène dont l'expression est diminuée par les inhibiteurs de HDAC. Même si, en général, les inhibiteurs de HDAC activent l'expression génétique, il y a des cas où ils la répriment. Donc, dans ces cas, on pourrait aussi les appeler "inhibiteurs de HAT", dans la mesure où ils influencent l'équilibre entre l'acétylation et la déacétylation des histones.

Cette revue de littérature me permet donc de formuler l'hypothèse qu'une déplétion de cholestérol augmente l'expression de StAR et que cette stimulation implique l'hyperacétylation des histones.

### III. MÉTHODOLOGIE

#### 1. COLLECTION DES TISSUS, CULTURES CELLULAIRES ET MILIEUX DE CULTURE

Les cellules de granulosa de l'ovaire porcine ont été aspirées à partir de follicules de taille moyenne (3-5 mm) provenant d'ovaires de truies prépubères et cultivées comme décrit précédemment (Li, Juorio *et al.* 1995). Les cellules ont été groupées ( $6-8 \times 10^6$  cellules/ml) dans un milieu de culture essentiel minimal (MEM; Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) contenant 1 mg/L insuline (Sigma, Oakville, ON, Canada), 0.1 mM acides aminés non essentiels (Gibco BRL),  $5 \times 10^4$  UI/L pénicilline (Gibco BRL), 50 mg/L streptomycine (Gibco BRL), 0.5 mg/L fungizone (Gibco BRL) et 10% (vol/vol) sérum bovin foetal (FBS; Gibco BRL). Les incubations ont été menées à 37°C avec 95 % d'humidité relative et 5% CO<sub>2</sub>. Soixante-dix heures après la mise en culture, les cellules étaient lavées et le milieu remplacé par un milieu de déplétion de cholestérol contenant 10% (vol/vol) sérum bovin foetal délipidé (FBLDS; Gibco BRL) au lieu du FBS, 50 µM mevastatin (Sigma) et 50 µM mévalonate (Sigma). Les groupes contrôles ont été nourris avec un milieu de déplétion constitué du milieu de déplétion dans lequel on a ajouté 10 µg/ml cholestérol (Sigma) et 1 µg/ml 22-OH-cholestérol (Sigma). Un deuxième groupe de cellules a été incubé avec du milieu sans sérum comme milieu de déplétion, ou du milieu sans sérum contenant 2 µg/ml 22-OH-cholestérol comme contrôle (milieu de déplétion). Certaines cellules ont aussi été traitées avec 1 mM 8-bromo-AMPc (Sigma) et/ou 0,33 µM TSA (Biomol, Plymouth Meeting, PA), 5 mM NaBu (Sigma) ou 100 µM SBHA (Biomol) pendant six heures, débutant à 94 h. Toutes les cultures ont été terminées à 100 h pour l'extraction de l'ARN ou pour les essais de ChIP. Les milieux ont été gardés pour les RIA de progestérone.

La lignée cellulaire de granulosa porcine PGC-2 nous a gracieusement été fournie par le Dr Bruce R. Downey (Kwan, Farookhi *et al.* 1996), et maintenue dans

le milieu de culture Opti-MEM (Gibco BRL) supplémenté de 4% FBS et des antibiotiques.

## 2. TRANSFECTIONS ET ACTIVITÉ DU PROMOTEUR DE *StAR* PORCIN

Des analyses à l'aide du site internet de "Genomatix MatInspector" ont été effectuées afin de déterminer la présence de sites potentiels de liaison de SREBP dans la région 5' près du promoteur de *StAR* porcin. Les PGC-2 ( $0.9 \times 10^5$  cellules/puits) ont été transfectées avec 200 ng/puits de la construction du promoteur de *StAR* exprimant la luciférase (pStAR1423/luc; 1553 paires de base) aimablement fournie par le Dr H. LaVoie (Université de la Caroline du Sud, Columbia, SC; Sekar, Lavoie *et al.* 2000), ou avec le plasmide sans promoteur pGL3-basic (Promega Corp., Madison, WI), en utilisant le réactif Effectene (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) selon le protocole du manufacturier. Afin de normaliser les résultats pour l'efficacité de transfection, les cellules ont été cotransfectées avec le vecteur pRL.SV40 (Promega) contenant le gène luciférase de *Renilla* sous le contrôle de la région proximale du promoteur-rehausseur de SV40 dans un ratio de 10:1 pour pStAR1423/luc:pRL.SV40. La technique a été effectuée en utilisant «Dual Luciferase Reporter Assay System» (Promega) selon les instructions du manufacturier, et l'activité luciférase a été mesurée avec un luminomètre 20/20 (Lumat, LB-9507, version 5.03; Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Les cotransfections ont été faites avec 25 ng/puits des vecteurs d'expression pCMV-CSA10 pour SREBP-1a, pSVSPORT1-ADD1-403 pour SREBP-1c et pCMV-CS2 pour SREBP-2 (cadeaux du Dr Kristina Schoojans, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France) et/ou 75 ng/puits du vecteur d'expression pRc/RSV-CBP pour CBP (cadeau du Dr R.H. Goodman, Oregon Health Sciences University, Portland, Oregon) et un vecteur d'expression vide pour la correction d'ADN totale. Les techniques de luciférase ont aussi été effectuées avec des traitements de déplétion de cholestérol dans les cellules

PGC-2, avec du Opti-MEM sans sérum pour le milieu de déplétion de cholestérol et Opti-MEM supplémenté de 2 µg/ml de 22-OH-cholestérol comme contrôle.

J'ai également transfecté de façon stable la lignée de granulosa PGC-2 avec le vecteur d'expression pour SREBP-1a en utilisant le réactif Effectene, et les cellules ont été sélectionnées dans un milieu contenant de la néomycine pendant plus de deux semaines. Une colonie unique a été sélectionnée et cultivée dans le Opti-MEM supplémenté de 4% FBS et des antibiotiques. Cette nouvelle lignée cellulaire surexprimant SREBP-1a a par la suite été transfectée transitoirement avec le système de promoteur *StAR* porcine-luciférase de *renilla*.

### 3. ANALYSES NORTHERN

L'ARN a été purifié à partir des cultures primaires de granulosa porcines à l'aide de «Easy Spin columns» (Qiagen). Des aliquots de 20 µg d'ARN total, quantifiés par densité optique à 260 nm, ont été soumis à des gels d'électrophorèse d'agarose-formaldéhyde 1% en utilisant 20 mM d'acide morpholinopropanesulfonique (pH 7.0) comme tampon, transférés sur des membranes de nylon pour la nuit et liés en croix pendant 30 sec à 150 mJ dans une chambre à UV (GS Gene Linker, Bio-Rad Laboratories Inc., Richmond, CA). Les membranes ont été hybridées avec des séquences d'ADNc de 0.85 kilobase (kb) représentant la région codante du gène *StAR* porcine générées dans notre laboratoire à partir de la séquence d'ADNc complète (Pilon, Daneau *et al.* 1997), comme décrit précédemment (Pescador, Houde *et al.* 1997), et ensuite dépouillées et réhybridées avec un fragment de 1.4 kb provenant de la région interne du gène de l'ARNr 28S humain, gracieuseté du Dr G. Schultz (Université de Calgary, Calgary, AB, Canada) pour contrôler les variations dues au pipetage et au transfert. Les sondes ont été marquées au <sup>32</sup>P avec une activité spécifique approximative de 1.5 à 3.0 x 10<sup>9</sup> dpm/µg par synthèse fortuite en utilisant le «DNA Random Prime Kit» (Roche Diagnostics,

Laval, QC, Canada). Les hybridations ont été menées comme décrit précédemment (Pescador, Houde *et al.* 1997), suivies de deux lavages à forte stringence à 65°C. Les membranes hybridées ont alors été autoradiographiées ou soumises à une phosphorimagerie pour la visualisation et l'estimation quantitative des ARNm de *Star*, et la densité optique a été déterminée individuellement pour les deux plus fortes bandes, avec la bande 28S correspondante sur l'autoradiogramme en utilisant un système d'imagerie informatique. Les moyennes du ratio des dimensions des ARNm de *Star* sur l'ARNr 28S ont été calculées pour une représentation graphique des données.

#### **4. RADIOIMMUNOESSAIS DE PROGESTÉRONE**

L'accumulation de progestérone a été quantifiée dans les milieux conservés avant et après les traitements de déplétion de cholestérol selon des procédures préalablement établies (Pescador, Houde *et al.* 1997) en employant un anticorps fourni par le Dr G. D. Niswender (Université de l'État du Colorado, Ft. Collins, CO). Le coefficient de variation calculé entre les duplicata variait de 3% à 9%. La valeur d'interface, basée sur un échantillon de 0.1 ng qui déplaçait approximativement 50% du traceur, était de 9.8%. Les valeurs intra-essais, calculées à partir de quatre échantillons présents dans tous les essais, variaient de 5% à 11%. Au début des expérimentations, des puits individuels ont été quantifiés pour la progestérone afin d'estimer les variations entre les expérimentations individuelles. Les coefficients de variations inter-puits variaient de 0.1% à 16.9%, avec une moyenne générale de 6.8%.

#### **5. IMMUNOPRÉCIPITATION DE LA CHROMATINE (ChIP)**

J'ai utilisé la stratégie de l'immunoprécipitation de la chromatine préalablement décrite par Kuo and Allis (Kuo and Allis 1999), avec de légères modifications. Les

protéines liées à l'ADN ont été fixées en croix dans des cultures primaires de granulosa porcines, traitées par déplétion de cholestérol, par l'ajout de formaldéhyde dans les milieux de culture à une concentration finale de 1% pendant 10 min à la température de la pièce. Les cellules ont ensuite été lavées et grattées dans un tampon phosphaté salin (PBS) 1X glacé contenant des inhibiteurs de protéases (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 µg/ml aprotinin and 1 µg/ml pepstatin A), purifiées par centrifugation (4 min à 2500 rpm) et resuspendues dans 200 µl de tampon de lyse (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.1 et des inhibiteurs de protéases). Les cellules ont été incubées pendant 10 min sur glace et ensuite soniquées avec un «Branson Sonifier 450» à la puissance 2, avec 3 fois des pulsations de 10 sec, au cycle 90. Les débris cellulaires ont été enlevés par centrifugation (10 min, 13 000 rpm à 4°C) et la solution de chromatine a été diluée 10 fois dans un tampon de dilution (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris, pH 8.1, 167 mM NaCl et des inhibiteurs de protéases). Un centième du lysat a été utilisé pour la purification de l'ADN total. Chaque échantillon a été pré-nettoyé en l'incubant avec 80 µl d'ADN de sperme de saumon/protéine A-agarose 50% (Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY) pendant 60 min à 4°C sur une plateforme rotative pour réduire l'activité non spécifique. Un échantillon (2 ml) était divisé en deux ml séparés, chaque ml incubé avec 5 µg d'anticorps, et immunoprécipité pendant toute la nuit à 4°C avec rotation. Les anticorps utilisés dans ces expérimentations étaient : anti-histones H3 et H4 acétylées (Upstate Biotechnology Inc.), anti-SREBP-1 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), anti-CBP (Upstate Biotechnology Inc.) et anti-Sp1 (Upstate Biotechnology Inc.).

Les immunocomplexes, purifiés avec 60 µl d'ADN de sperme de saumon/protéine A-agarose pendant 2 h à 4°C avec rotation, ont été lavés une fois selon la séquence suivante: tampon de lavage faible en sel (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 150 mM NaCl); tampon de lavage fort en sel (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 500 mM NaCl); tampon de lavage LiCl (0.25 M LiCl, 1% NP40, 1% sodium

deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.1); TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA). Les immunocomplexes ont alors été élués par l'addition de 250 µl de tampon d'éluion (1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>) et les liens en croix protéines-ADN ont été déliés par incubation à 65°C pendant 6 h suivi par un traitement à la protéinase K. L'ADN a finalement été purifié à l'aide des colonnes de purification des produits de PCR «Qiaquick» (Qiagen). Un fragment de 0.5 kb du promoteur a été amplifié par PCR à partir de l'ADN total, comme contrôle, et à partir de l'ADN immunoprécipité en présence de 2 µCi de α-<sup>32</sup>P-dCTP pendant 30 sec à 94°C, 45 sec à 67°C et 40 sec à 72°C. Les amorces utilisées pour la PCR étaient : sens (5'-CC ATCCCCTTGCACCACAAC-3') et anti (5'-TTTCCTGGTAGCGGAGGCAGG CC-3'). J'ai employé une autre paire d'amorces pour l'amplification par PCR d'un fragment du cadre de lecture ouvert du gène *StAR* comme contrôle pour démontrer la spécificité de l'amplification de l'ADN associé aux histones immunoprécipitées ou aux différents facteurs de transcription/co-activateur: contF (5'-CATGTGCG CAACATGAAGGG-3') et contR (5'-GAGCAGCCAGGTGAGTTTGG-3'). Comme autre contrôle, des immunoglobulines G de lapins ont été utilisées pour précipiter le lysat cellulaire au lieu des anticorps dirigés contre les facteurs de transcription ou contre les histones acétylées pour assurer un haut niveau de purification des fragments de chromatine liés aux anticorps. Les produits de PCR ont été purifiés sur gel de polyacrylamide 6% non dénaturant et soumis à une phosphorimagerie pour la visualisation et la quantification.

## 6. ANALYSES STATISTIQUES

Chaque expérience a été répétée en triplicata et les données sont exprimées par leur moyenne ± SEM. J'ai également effectué une analyse de variance. En présence d'une valeur F significative, l'analyse était suivie des tests Tukey-Kramer ou *t* de Student pour établir les différences entre les moyennes des traitements. Le niveau minimum significatif accepté était  $p < 0.05$ .

## IV. RÉSULTATS

### 1. ARTICLE

**Activation of the *Steroidogenic Acute Regulatory Protein* Gene by Cholesterol Depletion in Porcine Granulosa Cells is Associated with Histone H3 Acetylation**

ERIC DENEALT, NICOLAS Y. GÉVRY , AND BRUCE D. MURPHY<sup>1</sup>

*Centre de Recherche en Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire,  
Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S7C6*

<sup>1</sup>Corresponding author: [REDACTED] Tel. 450 773 8521, Fax.  
450 778 8103

Running title : StAR regulation by cholesterol

Keywords : cholesterol depletion, StAR, H3 acetylation, SREBP

Supported by Grant MT11018 from the Canadian Institutes of Health Research to  
BDM.

## Abstract

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) plays a major role in steroid hormone synthesis. Its transcription is stimulated primarily by tropic hormones acting through the classic cAMP-dependent pathway. Steroidogenesis results in intracellular cholesterol depletion and consequent activation of the sterol regulatory element binding protein (SREBP) pathway, believed to stimulate StAR gene transactivation. Gene transcription engenders chromatin modification, including covalent acetylation of histones H3 and H4. We studied the effects of cholesterol depletion on StAR transactivation, and the involvement of acetylation of H3 and H4 in this process. Incubation of primary cultures of luteinized porcine granulosa cells in cholesterol depleted medium stimulated a 1.7 fold increase in StAR mRNA abundance. Transcriptionally active fragments of SREBP-1a, -1c and -2 were transiently cotransfected into a porcine granulosa cell line increased StAR promoter activation 3-10 fold, as did stable transfection of SREBP-1a into the same line (9 fold). CREB binding protein (CBP), a known histone acetyltransferase, interacted with SREBP-1a in stimulation of the promoter in an additive manner. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) demonstrated increased histone H3 acetylation associated with the proximal StAR promoter in sterol depleted granulosa cultures, relative to sterol repleted control cultures. The immunoprecipitation strategy demonstrated that SREBP, CBP and stimulating protein 1 (Sp1) bound to the porcine StAR promoter in greater concentrations in cholesterol depleted cultures relative to cholesterol replete cultures. These results provide evidence in support of the hypothesis that sterol depletion, acting via the SREBP pathway, transactivates the StAR gene. Induction of transcription engenders acetylation of histone H3, and it is likely that this is effected by CBP.

## Introduction

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) mediates the rate-limiting step in steroid hormone biosynthesis, the transfer of cholesterol from the outer to the inner mitochondrial membrane (1). In steroidogenic cells, stimulation of steroid biosynthesis is induced by tropic hormones and usually occurs through the cAMP-dependent protein kinase A (PKA) pathway under control of the transcription factor cAMP response element binding protein (CREB) (2). Indeed, StAR mRNA abundance increases under the influence of cAMP in primary cultured porcine luteinized granulosa cells (3). Other second messenger systems appear to participate in StAR gene regulation including the protein kinase C (PKC), calcium-calmodulin and growth factor signaling pathways (4). The resulting augmentation of steroid synthesis requires substrate, and steroidogenesis leads to intracellular cholesterol depletion.

Intracellular cholesterol homeostasis is maintained by local feedback mechanisms that regulate import, intracellular transport and *de novo* synthesis (5). Transcriptional regulation of genes in the cholesterol homeostatic pathway in response to cholesterol depletion acts via transcription factors known as sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) (6). SREBPs have the unusual property of being anchored to the ER membrane until released by cholesterol-regulated proteolysis of a 68-kDa amino-terminal fragment that contains the basic helix-loop-helix-leucine zipper transactivation/dimerization domain and a nuclear targeting motif (5). SREBPs exist in three isoforms with variable tissue distribution. SREBP-1a and -1c are derived from alternative splicing of a single gene (7). SREBP-2 is derived from separate gene and has approximately 50% homology to SREBP-1 (8). SREBP-1c is also known as adipose differentiation dependent factor-1 for its role in adipogenesis (9). Previous studies have shown that StAR transcription is modulated by SREBP (2), particularly SREBP-1a in both humans (10) and rats

(11). There is evidence from StAR promoter assays that SREBP-1c also regulates the porcine StAR promoter (12).

SREBPs are generally viewed as weak transactivators, and are believed require co-activating partners to produce appropriate physiological responses (13). Stimulating protein-1 (Sp1) is a transcription factor frequently implicated as acting in concert with other transactivators. Experiments with *Drosophila* cell lines suggest that SREBP and Sp1 function synergistically to activate transcription of the low density lipoprotein receptor (LDLr) gene (14). Experiments with naked DNA templates demonstrated additive transcription in the presence of Sp1 and SREBP, and synergy between these factors occurred in the presence of CREB binding protein (CBP) (15). CBP is comprised of domains that can interact with a number of transcription factors, and it belongs to a class of co-activators believed to form a bridge between DNA-specific transcriptional activators and the basal transcriptional machinery (16). Recent investigation has revealed that the co-activator CBP interacts with the SREBP activation domain, such that the first 682 amino acids of CBP and the amino-terminal 50 amino acids of the activation domain of SREBP-1a bind strongly together (15).

In addition to transcriptional co-activator properties, CBP also has histone acetyltransferase (HAT) activity (17, 18). Remodeling of chromatin structure and covalent modification of histones play a major role in the regulation of gene transcription. Acetylation of histones follows formation of the pre-initiation complex and immediately precedes the induction of transcription (19). It has been shown that increased H3 (but not H4) acetylation is associated with the proximal StAR promoter during luteinization (20) and that H3 acetylation of LDLr increases with sterol depletion in cell lines (21). Moreover, inhibitors of histones deacetylases are known to induce reversible hyperacetylation of histones by influencing the equilibrium between acetylation and deacetylation of histones (22).

StAR protein is essential for the importation of cholesterol into mitochondria to initiate steroidogenesis (1). While it is known that its transcription is modulated by SREBP, functional correlation with intracellular cholesterol homeostasis has not been demonstrated (10). In the current study, we show that expression of StAR mRNA is increased by cholesterol depletion in primary granulosa cells. Luciferase assays show that SREBP and CBP both increase StAR transcription. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays indicate that recruitment of transcription factors and co-activators to the proximal StAR promoter results from cholesterol depletion.

## Materials and Methods

### *Tissue collection, cell culture and media*

Ovarian granulosa cells were aspirated from medium-sized (3-5 mm) follicles from prepubertal pig ovaries and cultured as previously described (23). Cells were pooled ( $6-8 \times 10^6$  cells/ml) in minimum essential medium (MEM; Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) containing 1 mg/L insulin (Sigma, Oakville, ON, Canada), 0.1 mM nonessential amino acids (Gibco BRL),  $5 \times 10^4$  IU/L penicillin (Gibco BRL), 50 mg/L streptomycin (Gibco BRL), 0.5 mg/L fungizone (Gibco BRL) and 10% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL). Incubations were carried at 37° C in 95 % humidified air with 5 % CO<sub>2</sub>. At 70 h after initiation of culture, the cells were washed and medium was replaced with depletion medium containing 10% (vol/vol) fetal bovine lipoprotein-depleted serum (FBLDS; Gibco BRL) instead of FBS, 50 µM mevastatin (Sigma) and 50 µM mevalonate (Sigma). Control cells were fed with repletion medium comprised of the depletion medium containing 10 µg/ml cholesterol (Sigma) and 1 µg/ml 22-OH-cholesterol (Sigma). A second pool of cells was incubated with serum-free medium as a depletion medium, or serum-free medium containing 2 µg/ml 22-OH-cholesterol as a control (repletion medium). Some cells were also treated with 1 mM 8-bromo-cAMP (Sigma) and/or 0.33 µM Trichostatin (TSA, Biomol, Plymouth Meeting, PA) or 5 mM NaBu (Sigma) for six hours, beginning at 94 h. All cells were harvested at 100 h for RNA extraction or immunoprecipitation assays. Medium was collected for radioimmunoassay of progesterone.

The porcine PGC-2 granulosa cell line provided by Dr Bruce R. Downey (24) was maintained in Opti-MEM (Gibco BRL) supplemented with 4% FBS and antibiotics.

### *The porcine StARpromoter, transfections and promoter activity assays*

Genomatix MatInspector analysis was employed to determine the occurrence of potential SREBP binding sites in the 5' flanking region of the porcine *StAR* promoter. PGC-2 granulosa cells ( $0.9 \times 10^5$  cells/well) were transfected with 200 ng/well of a porcine *StAR* promoter-luciferase construct (pStAR1423/luc; 1553 base pairs) kindly provided by Dr H. LaVoie (University of South Carolina, Columbia, SC (4)), or the promoterless plasmid pGL3-basic (Promega Corp., Madison, WI), using Effectene reagent (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's protocol. To normalize results for transfection efficiency, cells were cotransfected with the vector pRL.SV40 (Promega) containing the *Renilla luciferase* gene under control of the SV40 early enhancer/promoter region at a ratio of 10:1 of pStAR1423/luc:pRL.SV40. Luciferase assays were performed using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions, and luciferase activity was measured using a 20/20 luminometer (Lumat, LB-9507, version 5.03; Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). The cotransfection experiments were performed with 25 ng/well of expression vectors pCMV-CSA10 for SREBP-1a, pSVSPORT1-ADD1-403 for SREBP-1c and pCMV-CS2 for SREBP-2 (gifts from Dr J. Auwerx and Dr. Kristina Schoonjans, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France) and/or 75 ng/well of expression vector pRc/RSV-CBP for CBP (gift from Dr R.H. Goodman, Oregon Health Sciences University, Portland, Oregon) and an empty expression vector for correction of total DNA. Luciferase assay was also performed by cholesterol depletion treatment of PGC-2 cells, with serum-free Opti-MEM as cholesterol depletion medium and Opti-MEM supplemented with 2  $\mu\text{g/ml}$  22-OH-cholesterol as control.

The PGC-2 granulosa cell line was stably transfected with the expression vector for SREBP-1a using the Effectene reagent, and the cells were then selected in a neomycin-containing medium for two weeks. A single colony was selected and cultured in Opti-MEM supplemented with 4% FBS and antibiotics. This new

SREBP-1a-overexpressing cell line was transiently transfected with the porcine *StAR* promoter luciferase/*renilla* system.

#### *Northern blot analysis*

RNA was purified from cultured primary granulosa cells with Easy Spin columns (Qiagen). Aliquots of 20  $\mu\text{g}$  total RNA, assessed by optical density at 260 nm, were subjected to electrophoresis on 1% agarose-formaldehyde gels using a 20 mM morpholinopropanesulfonic acid buffer (pH 7.0), transferred overnight to nylon membranes and cross-linked for 30 sec at 150 mJ in a UV chamber (GS Gene Linker, Bio-Rad Laboratories Inc., Richmond, CA). Blots were hybridized with a 0.85 kilobase (kb) cDNA representing the coding region of the porcine *StAR* cDNA sequence generated in our laboratory from the full-length cDNA sequence (25), as previously described (26). Blots were stripped and rehybridized with a 1.4 kb fragment from an internal region of the human 28S rRNA gene provided by Dr G. Schultz (University of Calgary, Calgary, AB, Canada) to control for variation in pipetting and transfer. The probes were labeled with  $^{32}\text{P}$  to specific activities of approximately  $1.5$  to  $3.0 \times 10^9$  dpm/ $\mu\text{g}$  by random primer synthesis using a DNA Random Prime Kit (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). Hybridization was conducted as previously described (26), followed by two high-stringency washes at  $65^\circ\text{C}$ . Hybridized blots were then autoradiographed. To provide a quantitative estimate of *StAR* mRNA, the optical density of the two major positive bands was determined individually, along with the corresponding 28S band using a computer imaging system. The means of the dimensionless ratio of *StAR* mRNA to 28S rRNA were calculated for graphic representation of the data.

#### *Progesterone Radioimmunoassay*

Medium collected before and after cholesterol depletion treatment of cultures was assayed for progesterone accumulation, according to procedures previously described

(26) employing antibody provided by Dr G. D. Niswender (Colorado State University, Ft. Collins, CO). The intra-assay coefficient of variation, calculated between duplicates, ranged from 3% to 9%. The interface value, based on a sample of 0.1 ng that displaced approximately 50% of the tracer, was 9.8%. The intra-assay value, calculated from four samples present in all assays, ranged from 5% to 11%. In early experiments, individual culture wells were assayed for progesterone to estimate variation within individual experiments. Interwell coefficients of variation ranged from 0.1% to 16.9%, with an overall average of 6.8%.

#### *Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP)*

We performed ChIP assay as described by Kuo and Allis (27) with minor modifications. Primary granulosa cells, treated as described above, were cross-linked by addition of formaldehyde to the culture medium at a final concentration of 1% for 10 min at room temperature. Cells were washed and scraped in ice-cold 1X phosphate-buffered saline (PBS) containing protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 µg/ml aprotinin and 1 µg/ml pepstatin A), collected by centrifugation (4 min at 2,500 rpm) and resuspended in 200 µl of ChIP lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.1 and protease inhibitors). Cells were incubated 10 min on ice and then sonicated with a Branson Sonifier 450 at power setting 2 with 3 x 10 sec-pulse at duty cycle 90. Cell debris were removed by centrifugation (10 min, 13,000 rpm at 4°C) and the chromatin solution was diluted 10 fold in ChIP dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris, pH 8.1, 167 mM NaCl and protease inhibitors). One hundredth of the lysates was used for purification of total DNA. Each sample was precleared by incubating with 80 µl salmon sperm DNA/protein A-agarose 50% gel slurry (Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY) for 60 min at 4°C on a rotating wheel to reduce nonspecific background. One sample (2 ml) was divided in two separate ml, each ml incubated with 5 µg of antibody and immunoprecipitated overnight at 4°C with rotation. The antibodies used in this experiment were against the acetylated forms of

histone H3 and H4 (Upstate Biotechnology Inc.), anti-SREBP-1 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), anti-CBP (Upstate Biotechnology Inc.) and anti-Sp1 (Upstate Biotechnology Inc.).

Immunocomplexes collected with 60  $\mu$ l of salmon sperm DNA/protein A-agarose for 2 hours at 4°C with rotation were washed once with the following buffers in sequence: low salt wash buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 150 mM NaCl); high salt wash buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 500 mM NaCl); LiCl wash buffer (0.25 M LiCl, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.1); TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA). Immunocomplexes were then eluted by adding 250  $\mu$ l of elution buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>) and DNA-protein cross-links were reversed by incubation at 65°C for 6 hours followed by proteinase K treatment. DNA was recovered by purification with the Qiaquick PCR purification column (Qiagen). A promoter fragment of 0.5 kb was amplified by PCR in both total DNA as control and immunoprecipitated DNA in presence of 2  $\mu$ Ci  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP with a temperature cycle of 30 sec at 94°C, 45 sec at 67°C and 40 sec at 72°C. The primers used for the PCR were sense (5'-CCATCCCCTTGCACCACAAC-3') and antisense (5'-TTTCCTGGTAGCGGAGGCAGGCC-3'). We employed another pair of primers for PCR amplification of a fragment of the open reading frame of the StAR gene as a control to demonstrate specificity of amplification of DNA associated with immunoprecipitated histones or the different transcription factors/cofactor : contF (5'-CATGTGCGCAACATGAAGGG-3') and contR (5'-GAGCAGCCAGGTGAGTTTGG-3'). As another control, rabbit IgG was used to precipitate cell lysates in place of histones or transcription factor antibodies to assure high level of purification of antibodies-linked sonicated chromatin fragments. PCR products were separated on 6% nondenaturing polyacrylamide gels and subjected to phosphorimaging for visualization and quantification.

*Statistical analysis*

Each experiment was performed in triplicate and data are expressed as the means  $\pm$  SEM. Analysis of variance was performed. In the presence of a significant F value, a Tukey-Kramer or Student *t* test was employed to establish differences between treatment means. The minimum level of significance accepted was  $p < 0.05$ .

## Results

### *Effects of cholesterol depletion on steroidogenesis*

Reduction in cholesterol availability and intracellular concentrations directly reduces steroid synthesis in ovarian cells by depriving them of substrate (28). We demonstrated this principle in the present study by varying the cholesterol in the medium for incubation of granulosa cells. In the first instance, incubation with intact FBS (10 %) resulted in accumulation of  $\mu\text{g}$  amounts of progesterone over the first 70 h of culture (Fig. 1). Restriction of cholesterol supply by incubation of cells in lipid deficient medium (MEM + lipid depleted serum), coupled with the inhibition of cholesterol synthesis with HMG-CoA reductase inhibitors, mevastatin and mevalonate profoundly reduced the progesterone accumulation. Repletion of this depleted medium with a combination of native cholesterol and 22-OH cholesterol resulted in increases in progesterone accumulation in all cultures (Fig. 1). Incubation of granulosa cell cultures in serum free medium (MEM) likewise resulted in substantially lower accumulation of progesterone relative to cultures to which cholesterol had been added (Fig. 1). Comparison of progesterone accumulation between MEM alone and MEM with inhibitors of cholesterol synthesis provided a difference that approached significance ( $p=0.08$ ) suggesting that the intracellular synthesis of cholesterol provides an important component of the total cholesterol supply for steroidogenesis. Fig. 1 further reveals that a transient cAMP (6 h) treatment at the end of incubation did not significantly increase the progesterone accumulation in sterol-depleted or sterol replete cells presumably due to the StAR-independent movement of soluble cholesterol into mitochondria.

### *Cholesterol depletion upregulates StAR mRNA transcription*

To demonstrate that StAR expression is under the control of intracellular sterol concentration, we examined its mRNA abundance by Northern blot in primary

cultures of porcine granulosa cells that were deficient or replete in cholesterol (Fig. 2). Incubation of cells with MEM in the presence of lipid-deficient serum and inhibitors of cholesterol synthesis did not significantly alter the unstimulated expression of the StAR message relative to cultures replete with cholesterol (Fig. 2). In contrast, StAR transcript abundance was reduced by nearly half in cultures incubated in serum-free MEM to which soluble cholesterol had been added ( $p < 0.01$ ) relative to those in serum-free MEM alone (Fig. 2). A greater reduction in StAR message accumulation was effected in cells incubated in serum-free MEM and subjected to 6 h treatment with 1 mM cAMP, relative to cholesterol replete cultures stimulated with cAMP (Fig. 2,  $p < 0.01$ ).

#### *Cholesterol depletion and SREBP stimulate the porcine StAR promoter*

Genomatix Matinspector analysis revealed that the fragment of the porcine StAR promoter in the luciferase construct has 5 putative SREBP consensus sites, with core similarities of 1.0, located at -1425, -1112, -587, -393 and -202 base pairs from the translation start site. Transient transfections of the porcine StAR promoter-luciferase construct (pStAR1423/luc) into the porcine granulosa cell line (PGC-2) resulted in discernable promoter activity (Fig. 3). Cells incubated in cholesterol-depleted medium (CDM) displayed significantly greater StAR promoter activity relative to cells in medium to which cholesterol had been added (Fig 3a,  $p < 0.01$ ), suggesting that cholesterol depletion transactivates the porcine StAR promoter.

To examine the role of SREBP in StAR gene transactivation, we cotransfected these cells with vectors constitutively expressing its three isoforms, SREBP-1a, SREBP-1c and SREBP-2. Each induced significant increases in StAR promoter activity, with SREBP-1c producing the most profound effect, in excess of six fold ( $p < 0.001$ , Fig. 3B). CBP cotransfection tended to increase StAR promoter activity ( $p = 0.08$ , Fig 3B). Individual comparison of means revealed that CBP in combination with SREBP-1a resulted in greater StAR promoter activity relative to either factor alone ( $p < 0.05$ ), indicating an additive interaction of the co-activator with SREBP-1a.

In PGC-2 cells stably transfected with SREBP-1a, there was substantially greater luciferase accumulation relative to the same cell line with the basic luciferase construct and the PGC-2 cells with pStAR alone (Figs. 3B and 3C).

#### *Association of SREBP, CBP and Sp1 with the StAR promoter*

If StAR expression is under the control of SREBP, this transcription factor would be expected to bind DNA in a functional pattern suggestive of transactivation of the promoter. Fig. 4 depicts the results of ChIP assays employing an antibody recognizing SREBP-1 isoforms in primary porcine granulosa cells incubated in cholesterol depleted or cholesterol replete medium. The association of SREBP with the proximal porcine StAR promoter was profoundly increased in cell populations subjected to cholesterol depletion. Genomatix MatInspector analysis revealed one Sp1 consensus site in the amplified fragment, located at -268 from the ATG. ChIP analysis of the SREBP partner, Sp1, revealed a similar profound increase in StAR promoter interaction with this transcription factor in primary cultures subjected to cholesterol depletion (Fig. 4). Differences of lower magnitude were evident between cells incubated in cholesterol depleted versus cholesterol replete medium using antibodies raised against the co-activator CBP in the ChIP assay (Fig. 4).

#### *Cholesterol depletion hyperacetylates H3 associated with the StAR promoter*

Among the functions of CBP is histone acetyltransferase (HAT) activity (17, 18), and it is known that chromatin modifications play a major role in the regulation of gene transcription. It has previously been shown that acetylated forms of histones H3 and/or H4 associate with the human proximal StAR promoter of human granulosa cells undergoing differentiation (10). In this study, treatment of primary cultures with inhibitors of histone deacetylases increased the StAR promoter association with acetylated H3 (Fig. 5). From the lower panels in Fig. 4, it can be seen that cholesterol depletion of primary porcine granulosa cells resulted in greater association of

acetylated H3 with the StAR promoter, while H4 appeared unaffected by this treatment.

## Discussion

The StAR protein has recently been shown to be a member of larger family that have been come to be known as START domain proteins based on their common cholesterol binding domain (29, 30). The subcellular role played by some family members is currently ambiguous. In contrast, StAR protein is well known to mediate the delivery of cholesterol, the substrate for all steroids, to the inner mitochondrial membrane the site of its catalysis to pregnenolone by cytochrome P450 side chain cleavage enzyme (P450scc) (31). Previous studies have demonstrated multiple transcriptional regulation of the StAR gene, with the cAMP, PKA, CREB pathway predominating (32). As with many other genes in the steroid synthetic pathway, transcriptional regulation of StAR is also mediated by the orphan nuclear receptor, SF-1 (33). A number of other elements have been identified that modulate StAR transcription, including C/EBP $\beta$ , and GATA-4 (2).

Progesterone accumulation was compromised in cultures incubated in lipid-deficient serum in the presence of inhibition of cholesterol synthesis, as well as in serum free cultures. Steroidogenesis employs cholesterol as substrate, and it is expected that cholesterol depletion induced by steroid synthesis will bring about its increased synthesis and importation (34), by SREBP dependent mechanisms (9). In common with the human (10) and rat (11) StAR genes, the porcine sequence bears promoter elements consistent with binding and transactivation by SREBP. Both transient and stable transfection of SREBP into a porcine granulosa cell line increased porcine StAR promoter activity, consistent with result with the rat (11) and human genes (10). Given SREBP regulation of StAR, it was expected that the principal mechanism of SREBP activation (9), reduction of intracellular cholesterol concentrations, would likewise regulate StAR transactivation. Our results show, for

the first time, that manipulation of cholesterol in primary culture and in an immortalized granulosa cell line influences the expression and promoter activity of StAR. These results extend the observations by Shea-Eaton et al. (11) that blockade of intracellular cholesterol synthesis in a hepatic cell line increases the activity of the transfected StAR promoter and provide a physiological model to explain the SREBP regulation of the StAR gene. Expression of other members of the StAR family, including StarD4 is upregulated by cholesterol depletion (30). Nonetheless, cholesterol depletion had no effect on activity on human StAR promoter activity in either COS-7 and human granulosa lutein cells (10). There is no clear explanation for this disparity, it may reflect the cell lines employed or differences in experimental paradigms.

SREBPs alone are relatively inefficient transcriptional activators, and they depend on co-regulators to produce high level activation (35). Sp1 acted in synergy with SREBP in induction of transcription of the LDL receptor in a cell-free system (15). Further, Sp1 increased SREBP binding to oligonucleotide sequences of the rat StAR promoter, but did not enhance SREBP transactivation in promoter assays (11). A Sp1 consensus site can be found in the porcine StAR promoter in similar proximity to the SREBP site found in the rat (11). Further, we show by ChIP assay that Sp1 binding to the StAR promoter increases in sterol-depleted cells, correlating with changes in SREBP binding. Together these results suggest a Sp1-SREBP interaction similar to seen in other species and cholesterol-dependent contexts.

CBP coactivates gene transcription by at least three mechanisms. The best known CBP action is the bridging between DNA specific activators and the general transcription machinery that initiates gene expression by providing a scaffold for the assembly of transcription factors (36). Ericsson and Edwards (16) report that transcriptional activation of four genes related to cholesterol homeostasis is dependent on a specific interaction between SREBP and CBP in sterol-depleted cells. Our transfection studies show that CBP alone had an effect, albeit not

profound, on StAR promoter activity, while the combination of CBP and SREBP was mildly additive, suggesting a functional connection.

The third mechanism of CBP function is based on its acetylase activity and consequent ability to covalently modify both transcription factors and chromatin (36). In a cell free system employing the LDL receptor promoter, it was shown that the SREBP-1a/Sp1 synergy depends on the presence of CBP and chromatin (15). In the present investigation, ChIP assays indicated that hyperacetylation by inhibition of histone deacetylases increased the association of histone H3 with the StAR promoter. It has been shown that increased acetylated H3 (but not H4) associates with cAMP dependent differentiation events in human granulosa cells (20). Further, H3 acetylation of the LDL receptor increases with sterol depletion in cell lines (21). Herein, we have demonstrated that cholesterol depletion increases the association of the StAR promoter with acetylated histone H3 but not H4. These results confirm findings that H3 modification is involved in induction of StAR transcription, and provide strong evidence supporting the view that cholesterol depletion of steroidogenic cells modulates the expression of the StAR gene.

In summary, we have shown that the abundance of StAR transcripts, StAR transactivation and modification of histones associated with the StAR promoter are modulated by cholesterol depletion. These studies provide physiological rationale to explain the SREBP regulation of this important steroidogenic gene.

### *Acknowledgements*

The authors thank Mira Dobias for excellent technical work and Dr. Flavia L. Lopes for review of the manuscript.

## References

1. **Stocco DM** 2000 Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim Biophys Acta* 1486:184-97
2. **Stocco DM, Clark BJ, Reinhart AJ, et al.** 2001 Elements involved in the regulation of the StAR gene. *Mol Cell Endocrinol* 177:55-9
3. **Pescador N, Stocco DM, Murphy BD** 1999 Growth factor modulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinization in the pig ovary. *Biol Reprod* 60:1453-61
4. **Sekar N, Lavoie HA, Veldhuis JD** 2000 Concerted regulation of steroidogenic acute regulatory gene expression by luteinizing hormone and insulin (or insulin-like growth factor I) in primary cultures of porcine granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 141:3983-92
5. **Brown MS, Goldstein JL** 1997 The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89:331-40
6. **Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A** 2000 Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta* 1529:103-13
7. **Goldstein JL, Rawson RB, Brown MS** 2002 Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch Biochem Biophys* 397:139-48
8. **Miserez AR, Cao G, Probst LC, Hobbs HH** 1997 Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF2). *Genomics* 40:31-40
9. **Brown MS, Goldstein JL** 1999 A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11041-8
10. **Christenson LK, Osborne TF, McAllister JM, Strauss JF, 3rd** 2001 Conditional response of the human steroidogenic acute regulatory protein gene promoter to sterol regulatory element binding protein-1a. *Endocrinology* 142:28-36

11. **Shea-Eaton WK, Trinidad MJ, Lopez D, Nackley A, McLean MP** 2001 Sterol regulatory element binding protein-1a regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *Endocrinology* 142:1525-33
12. **Ruiz-Cortés ZT, Martel-Kennes Y, Gévry NY, Downey BR, Palin M-F, Murphy BD** 2003 Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 68:789-796
13. **Shimano H** 2002 Sterol regulatory element-binding protein family as global regulators of lipid synthetic genes in energy metabolism. *Vitam Horm* 65:167-94
14. **Sanchez HB, Yieh L, Osborne TF** 1995 Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* 270:1161-9
15. **Naar AM, Beaurang PA, Robinson KM, et al.** 1998 Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev* 12:3020-31
16. **Ericsson J, Edwards PA** 1998 CBP is required for sterol-regulated and sterol regulatory element-binding protein-regulated transcription. *J Biol Chem* 273:17865-70
17. **Bannister AJ, Kouzarides T** 1996 The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384:641-3
18. **Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y** 1996 The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87:953-9
19. **Fry CJ, Peterson CL** 2002 Transcription. Unlocking the gates to gene expression. *Science* 295:1847-8
20. **Christenson LK, Stouffer RL, Strauss JF, 3rd** 2001 Quantitative analysis of the hormone-induced hyperacetylation of histone H3 associated with the steroidogenic acute regulatory protein gene promoter. *J Biol Chem* 276:27392-9
21. **Bennett MK, Osborne TF** 2000 Nutrient regulation of gene expression by the sterol regulatory element binding proteins: increased recruitment of gene-

- specific coregulatory factors and selective hyperacetylation of histone H3 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6340-4
22. **Brinkmann H, Dahler AL, Popa C, et al.** 2001 Histone hyperacetylation induced by histone deacetylase inhibitors is not sufficient to cause growth inhibition in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 276:22491-9
  23. **Li XM, Juorio AV, Murphy BD** 1995 Angiotensin II interferes with steroidogenesis in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 53:791-9
  24. **Kwan I, Farookhi R, Huynh HT, Murphy BD, Turner JD, Downey BR** 1996 Steroidogenic properties of a spontaneously established porcine granulosa cell line (PGC-2). *Mol Reprod Dev* 45:299-307
  25. **Pilon N, Daneau I, Brisson C, Ethier JF, Lussier JG, Silversides DW** 1997 Porcine and bovine steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression during gestation. *Endocrinology* 138:1085-91
  26. **Pescador N, Houde A, Stocco DM, Murphy BD** 1997 Follicle-stimulating hormone and intracellular second messengers regulate steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid in luteinized porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 57:660-8
  27. **Kuo MH, Allis CD** 1999 In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods* 19:425-33
  28. **Rajkumar K, Ly H, Schott PW, Murphy BD** 1989 Use of low-density and high-density lipoproteins in undifferentiated porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 41:855-61
  29. **Romanowski MJ, Soccio RE, Breslow JL, Burley SK** 2002 Crystal structure of the *Mus musculus* cholesterol-regulated START protein 4 (StarD4) containing a StAR-related lipid transfer domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6949-54
  30. **Soccio RE, Adams RM, Romanowski MJ, Sehayek E, Burley SK, Breslow JL** 2002 The cholesterol-regulated StarD4 gene encodes a StAR-related lipid transfer protein with two closely related homologues, StarD5 and StarD6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6943-8

31. **Ohno Y, Yanagibashi K, Yonezawa Y, Ishiwatari S, Matsuba M** 1983 A possible role of "steroidogenic factor" in the corticoidogenic response to ACTH; effect of ACTH, cycloheximide and aminoglutethimide on the content of cholesterol in the outer and inner mitochondrial membrane of rat adrenal cortex. *Endocrinol Jpn* 30:335-8
32. **Manna PR, Dyson MT, Eubank DW, et al.** 2002 Regulation of steroidogenesis and the steroidogenic acute regulatory protein by a member of the cAMP response-element binding protein family. *Mol Endocrinol* 16:184-99
33. **Manna PR, Eubank DW, Lalli E, Sassone-Corsi P, Stocco DM** 2003 Transcriptional regulation of the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene by the cAMP response-element binding protein and steroidogenic factor 1. *J Mol Endocrinol* 30:381-97
34. **Murphy BD, Silavin SL** 1989 Luteotrophic agents and steroid substrate utilization. *Oxf Rev Reprod Biol* 11:179-223
35. **Dooley KA, Millinder S, Osborne TF** 1998 Sterol regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase gene through a direct interaction between sterol regulatory element binding protein and the trimeric CCAAT-binding factor/nuclear factor Y. *J Biol Chem* 273:1349-56
36. **Janknecht R** 2002 The versatile functions of the transcriptional coactivators p300 and CBP and their roles in disease. *Histol Histopathol* 17:657-68



Figure 1. Progesterone accumulation in primary porcine granulosa cells. Progesterone was measured 70 h after initiation of culture in the presence of fetal bovine serum (FBS, 10%). Medium was changed at 70 h and replaced with cholesterol depleted medium comprised of bovine lipoprotein-depleted serum (FBLDS) containing 10  $\mu\text{g/ml}$  cholesterol and 1  $\mu\text{g/ml}$  22-OH-cholesterol; medium alone (MEM) or MEM containing 2  $\mu\text{g/ml}$  22-OH-cholesterol. Cultures were terminated at 100 h and progesterone determined in medium.

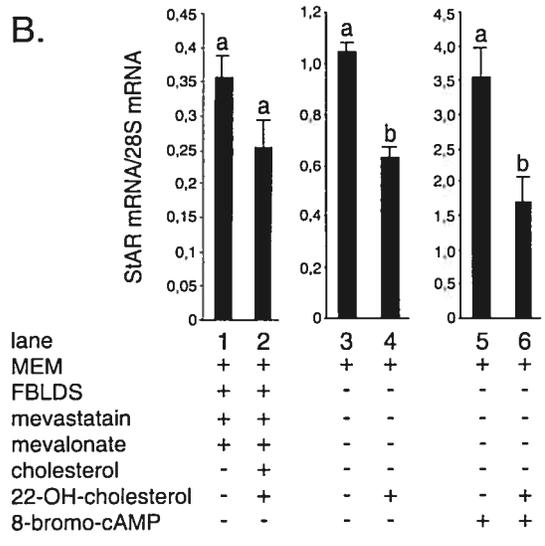


Figure 2. StAR mRNA abundance is regulated by cholesterol. At 70 h after initiation of culture, primary granulosa cells were washed and medium was replaced with the same medium (FBS) or depletion medium containing 10 % FBLDS, 50 mM mevastatin and 50 mM mevalonate. Control cells were fed with repletion medium containing 10  $\mu\text{g/ml}$  cholesterol and 1  $\mu\text{g/ml}$  22-OH-cholesterol. Some cells were incubated with serum-free medium as depletion medium, or serum-free medium containing 2  $\mu\text{g/ml}$  22-OH-cholesterol as control. Cells were treated or not with 1 mM 8-bromo-cAMP at 94 h for 6 h. 20  $\mu\text{g}$  of total RNA were subjected to Northern blot analysis (A) for StAR, with 28S as control for procedural errors. Panel (B) depicts mean ( $\pm$  SEM) densitometric quantification of StAR vs 28S in three replicates of the experiment.

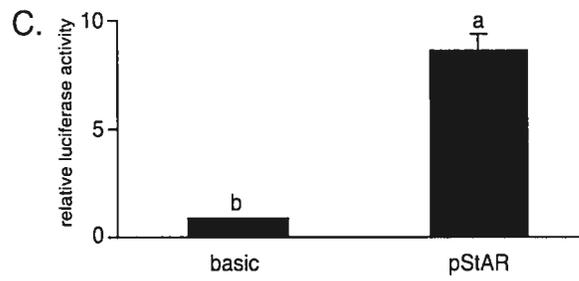
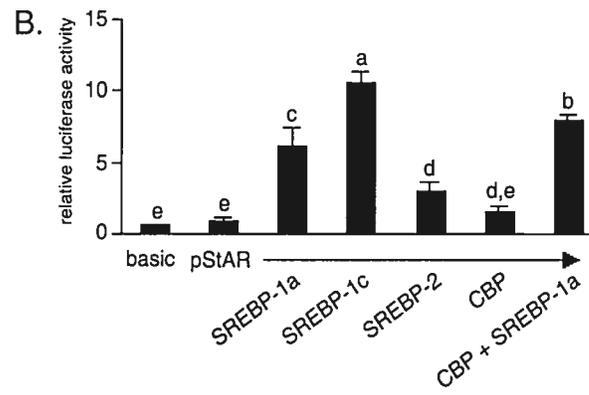
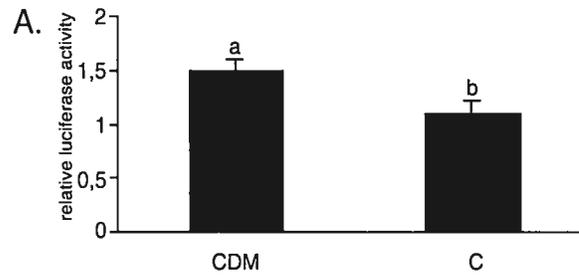


Figure 3. StAR promoter activity in porcine granulosa cell line. (A) PGC-2 granulosa cells were transfected with porcine StAR promoter-luciferase construct (pStAR1423/luc; 1553 base pairs) under cholesterol depletion treatment (CDM) or control (C). (B) cells were cotransfected with pStAR1423/luc and the transcriptionally active fragments of SREBP-1a (pCMV-CSA10), SREBP-1c (pSVSPORT1-ADD1-403), SREBP-2 (pCMV-CS2) and/or CBP (pRc/RSV-CBP). The control was the promoterless luciferase plasmid (basic). (C) A PGC-2 cell line overexpressing SREBP-1a was transfected with the porcine StAR promoter-luciferase construct (pStAR) or with promoterless luciferase plasmid (basic).

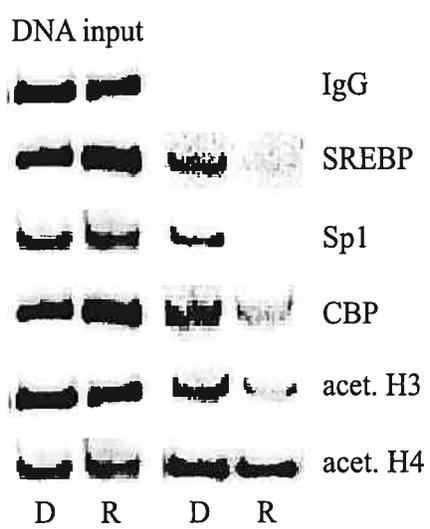


Figure 4. Chromatin immunoprecipitation assay of SREBP, Sp1, CBP, and acetylated H3 and H4. A 0.5 kb fragment of the porcine proximal StAR promoter was amplified by semi-quantitative PCR representing following immunoprecipitation with SREBP, Sp1, CBP, acetylated histone H3 or histone H4 from primary porcine granulosa cells incubated in cholesterol-depleted (D) or repleted (R) medium. As control, rabbit IgG was used to precipitate cell lysates in place of histone or transcription factors antibodies.

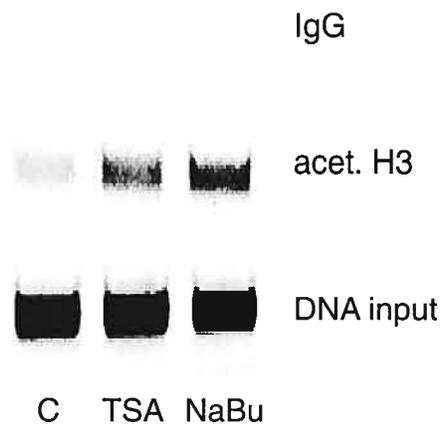


Figure 5. Chromatin immunoprecipitation assay of acetylated H3. Fragments were amplified by semi-quantitative PCR representing association of hyperacetylated H3 with porcine proximal StAR promoter in primary porcine granulosa cells (C) treated with Trichostatin A (TSA) or with sodium butyrate (NaBu). As control, rabbit IgG were used to precipitate cell lysates in place of histone H3 antibody.

## 2. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Nous avons démontré une amplification de l'acétylation des histones H3 associées au promoteur de *Star* en traitant les cultures primaires avec des inhibiteurs de HDAC (Fig. 5). L'hyperacétylation des histones étant souvent liée à une augmentation de la transcription génétique (Strahl and Allis 2000), nous avons vérifié cette affirmation au niveau de la transcription du gène *Star* dans les cultures primaires de granulosa porcines. Nous avons vérifié l'abondance des ARNm de *Star* après traitements des cultures à l'AMPc ainsi qu'avec différents inhibiteurs de HDAC (Fig. 6). À notre grande surprise, l'analyse Northern a révélé une inhibition totale de la transcription de *Star* autant avec le TSA qu'avec le NaBu, si l'on compare au contrôle traité seulement à l'AMPc pour s'assurer d'une forte expression du gène. L'effet a été un peu moins marqué avec le SBHA, inhibiteur à spectre moins large, mais la transcription a quand même été inhibée.

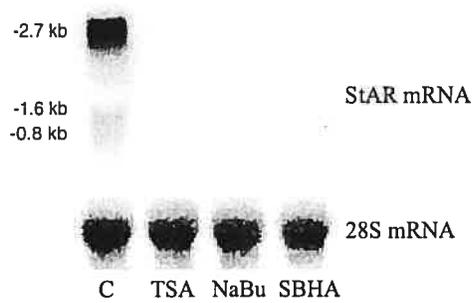


Figure 6. StAR mRNA abundance is regulated by HDAC inhibitors. At 70 h after initiation of culture, primary granulosa cells were washed and medium was replaced with the same medium (FBS) supplemented with 1 mM 8-bromo-cAMP at 94 h for 6 h. Some cells were also treated at 94 h for 6 h with 0,33  $\mu$ M TSA, 5 mM NaBu or 100  $\mu$ M SBHA. 20  $\mu$ g of total RNA were subjected to Northern blot analysis for StAR, with 28S as control for procedural errors.

## V. DISCUSSION GÉNÉRALE

Basé sur leur domaine commun de liaison au cholestérol, on a récemment démontré que la protéine StAR est un membre de la grande famille des protéines connues sous le nom de protéines à domaine START (Romanowski, Soccio *et al.* 2002; Soccio, Adams *et al.* 2002). Le rôle moléculaire joué par certains membres de cette famille demeure encore obscur. Par contre, celui de la protéine StAR est de servir de médiateur pour le transport du cholestérol, substrat de tous les stéroïdes, jusqu'à la membrane mitochondriale interne où l'on retrouve le complexe enzymatique cytochrome P450 coupant la chaîne latérale (P450<sub>scc</sub>) qui convertira le cholestérol en prégnénolone, le premier stéroïde synthétisé (Ohno, Yanagibashi *et al.* 1983). Des études antérieures ont mis à jour les multiples voies de régulation de l'expression de StAR, dont la prédominante qui implique l'AMPc, PKA, CREB et CBP (Manna, Dyson *et al.* 2002). Comme plusieurs autres gènes agissant dans le contrôle de la synthèse de stéroïdes, la régulation de la transcription de *StAR* est aussi sous le contrôle du récepteur nucléaire orphelin SF-1 (Manna, Eubank *et al.* 2003). Plusieurs autres éléments ont également été identifiés dans la modulation de l'expression de *StAR*, incluant C/EBP $\beta$  et GATA-4 (Stocco, Clark *et al.* 2001).

Nous avons d'abord vérifié l'accumulation de progestérone à chaque étape des cultures primaires de cellules de granulosa porcines dès le début des expérimentations, et nous nous sommes vite rendu compte qu'elle était compromise dans les cultures maintenues dans un milieu privé de cholestérol, aussi bien en présence de sérum délipidé et d'inhibition de synthèse *de novo* de cholestérol que dans les cultures sans sérum. La stéroïdogénèse emploie le cholestérol comme substrat, et la cellule s'attend de la conséquente déplétion de cholestérol qu'elle induise une augmentation de la synthèse et de l'importation de ce même substrat (Murphy and Silavin 1989), par des mécanismes dépendants de SREBP (Brown and Goldstein 1999). Tout comme les séquences du promoteur de *StAR* chez l'humain (Christenson, Osborne *et al.* 2001) et chez le rat (Shea-Eaton, Trinidad *et al.* 2001),

celles chez le porc abritent des éléments réceptifs à la liaison et à la transactivation par SREBP. Autant les transfections transitoires que stables de SREBP dans la lignée de granulosa porcine ont induit l'activation du promoteur de *StAR* porcine, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus chez le rat (Shea-Eaton, Trinidad *et al.* 2001) et chez l'humain (Christenson, Osborne *et al.* 2001). Donc, si SREBP intervient dans la régulation du gène *StAR*, on peut alors s'attendre à ce que le principal mécanisme d'activation de SREBP (Brown and Goldstein 1999), la réduction des concentrations intracellulaires de cholestérol, en fasse autant ou soit aussi impliqué dans la régulation de la transactivation de *StAR*. Nos résultats ont montré, pour la première fois, que la manipulation du cholestérol dans des cultures primaires influence l'expression et l'activité du promoteur de *StAR*. Ceci apporte un modèle physiologique pour expliquer la régulation du gène *StAR* par SREBP. Ceci concorde avec les observations de Shea-Eaton *et al.* qui révèlent que l'obstruction de la synthèse de cholestérol intracellulaire dans une lignée de cellules hépatiques accroît l'activité du promoteur de *StAR* transfecté (Shea-Eaton, Trinidad *et al.* 2001). L'expression d'autres membres de la famille de *StAR*, incluant *StarD4*, est également amplifiée par une carence en cholestérol (Soccio, Adams *et al.* 2002). Nonobstant, une déplétion de cholestérol n'a pas eu d'effet significatif sur l'activité du promoteur de *StAR* humain ni dans les cellules COS-7, ni dans les cellules lutéines de granulosa humaines (Christenson, Osborne *et al.* 2001). On ne peut trouver, pour l'instant, d'explication claire pour cette disparité, mais il est possible que ce soit causé par le simple fait que l'on utilise différentes lignées cellulaires ou que l'on emploie des protocoles expérimentaux différents.

Les SREBP sont généralement perçus comme de faibles activateurs de transcription, et leur effet dépend souvent de l'appui de corégulateurs pour produire de hauts niveaux d'activation coopératifs (Dooley, Millinder *et al.* 1998). Sp1 est reconnu pour agir en synergie avec SREBP au sujet de l'induction de la transcription du gène codant pour le récepteur des LDL dans un système acellulaire (Naar, Beaurang *et al.* 1998). De plus, Sp1 accroît la liaison de SREBP sur des séquences

oligonucléotidiques du promoteur de *StAR* chez le rat, mais n'aide pas SREBP pour la transactivation dans des essais de promoteurs (Shea-Eaton, Trinidad *et al.* 2001).

Une analyse avec le site internet «Genomatix MatInspector» a révélé un site consensus pour Sp1 situé à -268 du codon départ sur le promoteur de *StAR* porcine, qui se retrouve près de deux sites consensus pour SREBP (-1425, -1112, -587, -393 et -202), ce qui est similaire à ce qui a déjà été trouvé chez le rat (Shea-Eaton, Trinidad *et al.* 2001). De plus, nous avons démontré par la stratégie des CHIP que la liaison de Sp1 au promoteur de *StAR* est accentuée dans les cellules en déplétion de cholestérol, ce qui concorde avec les changements observés au niveau de la liaison de SREBP. Ensemble, ces résultats suggèrent une interaction Sp1-SREBP au même titre que celle observée chez d'autres espèces dans un contexte dépendant du cholestérol.

CBP co-active la transcription génétique par au moins trois mécanismes. Le mieux connu est l'établissement d'un pont entre des facteurs de transcription spécifiques à l'ADN et la machinerie transcriptionnelle de base qui initie l'expression génétique en fournissant l'échafaudage nécessaire à l'assemblage des facteurs de transcription (Janknecht 2002). Ericsson et Edwards ont rapporté que l'activation de la transcription de quatre gènes impliqués dans l'homéostasie intracellulaire du cholestérol dépend de l'interaction spécifique entre SREBP et CBP dans des cellules privées de cholestérol (Ericsson and Edwards 1998). Nos études de transfection montrent que CBP porte un effet, même s'il n'est pas profond, sur l'activité du promoteur de *StAR*, alors que la combinaison de CBP et SREBP est additive, suggérant une corrélation fonctionnelle entre ces deux facteurs. Le troisième mécanisme de la fonction de CBP est basé sur son activité acétylase et sa capacité d'entraîner des modifications covalentes sur des facteurs de transcription ainsi que sur la chromatine (Janknecht 2002). Il a été démontré dans un système acellulaire employant le promoteur du gène codant pour le récepteur des LDL que l'interaction synergique SREBP-1a/Sp1 dépend de la présence de CBP et de la chromatine (Naar, Beurang *et al.* 1998). D'autres études ont aussi montré que l'acétylation des histones H3 associées au promoteur de LDLr est plus prononcée par une déplétion de

cholestérol dans des cellules immortelles (Bennett and Osborne 2000). De même, nous rapportons que l'association du promoteur de *StAR* avec l'hyperacétylation des histones H3 (et non H4) est induite par une déplétion de cholestérol.

Finalement, la stratégie des CHIP a indiqué que l'hyperacétylation par inhibition de l'activité des déacétylases d'histones augmente l'association des histones H3 acétylées avec le promoteur de *StAR*. Ceci a déjà été démontré avec les histones H3 (et non H4) dans des conditions dépendantes de l'AMPc (Christenson, Stouffer *et al.* 2001). Cependant, l'étude du niveau d'expression du gène *StAR* par Northern a paradoxalement révélé une inhibition complète de la transcription en ARNm. Paralogisme à première vue, ceci a déjà été investigué. En effet, même si l'hyperacétylation des histones est souvent associée à une augmentation de l'expression génétique, ce n'est pas le cas pour certains gènes (Van Lint, Emiliani *et al.* 1996). Par exemple, des études ont montré les effets inhibitoires de l'hyperacétylation des histones induite par des inhibiteurs de HDAC sur l'expression de gènes activés par des stéroïdes comme les gènes codants pour l'ovalbumine (McKnight, Hager *et al.* 1980), la tyrosine aminotransférase (Plesko, Hargrove *et al.* 1983), le récepteur de la prolactine (Ormandy, de Fazio *et al.* 1992), l'interleukine-2 (Takahashi, Miyaji *et al.* 1996), le virus oncogène mammaire de souris (MMTV; Bartsch, Truss *et al.* 1996; Bresnick, John *et al.* 1990) et, plus récemment, sur la régulation par la vitamine D du gène de l'ostéocalcine (Montecino, Frenkel *et al.* 1999). D'autres études ont également révélé une diminution de l'expression des gènes de la cycline A et B1 par des traitements avec le TSA, qui causerait une inhibition de l'activité HAT associée à NF-Y par la phosphorylation de Gcn5 (Nair, Boersma *et al.* 2001). Il est connu que l'activité enzymatique de Gcn5 est inhibée par sa phosphorylation (Barlev, Poltoratsky *et al.* 1998). Dans le cas de *StAR*, l'activité HAT semble par contre être effectuée par CBP, au lieu de Gcn5, basé sur des résultats préliminaires que nous avons obtenus par immunoprécipitation de chromatine. Je n'ai pas inclus ces résultats car l'expérience n'a pas été répétée. Nous sommes probablement donc en présence d'un mécanisme différent d'inhibition

de l'activité HAT par des inhibiteurs de HDAC. Et il existe probablement plusieurs mécanismes pour expliquer ce paradoxe rencontré chez différents gènes. L'acétylation des histones pourrait donc être une modification post-traductionnelle multiforme en regard à l'expression génétique.

Nos résultats confirment donc clairement que cette modification des histones H3 est impliquée dans l'induction de la transcription de *Star* et supportent de manière évidente l'idée qu'une déplétion de cholestérol module l'expression du gène *Star* dans les cellules stéroïdogéniques.

## VI. CONCLUSION

Les résultats des expérimentations effectuées tout au long de ma maîtrise démontrent que les niveaux de transcription et de transactivation du gène *StAR*, ainsi que le degré d'acétylation des histones associées à son promoteur sont modulés, voire rehaussés, par une déplétion de cholestérol. Cet ouvrage apporte un modèle physiologique rationnel pour expliquer la régulation de *StAR* par SREBP.

L'homéostasie intracellulaire du cholestérol est primordiale à la biosynthèse des hormones stéroïdiennes, dont l'étape limitante est gérée par la protéine StAR, qui est transcriptionnellement contrôlée par le principal administrateur du maintien des niveaux de cholestérol dans la cellule, SREBP. Ce système apparaît crucial en stéroïdogénèse. Les modifications covalentes de la chromatine constituent un autre mode fascinant de régulation génétique. Énormément de chemin reste encore à parcourir avant de bien comprendre le langage encodé par le dynamisme des histones. Le destin d'une cellule en dépend, et la compréhension globale de ce phénomène nous propulsera vers une meilleure connaissance de la reproduction et de la vie.

## VII. SOURCES DOCUMENTAIRES

Adams SR, Harootunian AT, Buechler YJ, Taylor SS, Tsien RY (1991) Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* 349, 694-7.

Allfrey VG (1966) Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc Can Cancer Conf* 6, 313-35.

Archer SY, Meng S, Shei A, Hodin RA (1998) p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6791-6.

Ausio J, Dong F, van Holde KE (1989) Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of the histone "tails" in the stabilization of the nucleosome. *J Mol Biol* 206, 451-63.

Azhar S, Nomoto A, Leers-Sucheta S, Reaven E (1998) Simultaneous induction of an HDL receptor protein (SR-BI) and the selective uptake of HDL-cholesteryl esters in a physiologically relevant steroidogenic cell model. *J Lipid Res* 39, 1616-28.

Bannister AJ, Kouzarides T (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-3.

Barlev NA, Poltoratsky V, Owen-Hughes T, Ying C, Liu L, Workman JL, Berger SL (1998) Repression of GCN5 histone acetyltransferase activity via bromodomain-mediated binding and phosphorylation by the Ku-DNA-dependent protein kinase complex. *Mol Cell Biol* 18, 1349-58.

Bartsch J, Truss M, Bode J, Beato M (1996) Moderate increase in histone acetylation activates the mouse mammary tumor virus promoter and remodels its nucleosome structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10741-6.

Baulieu EE (1997) Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res* 52, 1-32.

Bennett MK, Ngo TT, Athanikar JN, Rosenfeld JM, Osborne TF (1999) Co-stimulation of promoter for low density lipoprotein receptor gene by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 is specifically disrupted by the yin yang 1 protein. *J Biol Chem* 274, 13025-32.

Bennett MK, Osborne TF (2000) Nutrient regulation of gene expression by the sterol regulatory element binding proteins: increased recruitment of gene-specific coregulatory factors and selective hyperacetylation of histone H3 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6340-4.

Blanco JC, Minucci S, Lu J, Yang XJ, Walker KK, Chen H, Evans RM, Nakatani Y, Ozato K (1998) The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev* 12, 1638-51.

Bresnick EH, John S, Berard DS, LeFebvre P, Hager GL (1990) Glucocorticoid receptor-dependent disruption of a specific nucleosome on the mouse mammary tumor virus promoter is prevented by sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3977-81.

Brinkmann H, Dahler AL, Popa C, Serewko MM, Parsons PG, Gabrielli BG, Burgess AJ, Saunders NA (2001) Histone hyperacetylation induced by histone deacetylase inhibitors is not sufficient to cause growth inhibition in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 276, 22491-9.

Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.

Brown MS, Goldstein JL (1990) Atherosclerosis. Scavenging for receptors. *Nature* 343, 508-9.

Brown MS, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-40.

Brown MS, Goldstein JL (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11041-8.

Brown RC, Papadopoulos V (2001) Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor in adrenal and brain steroidogenesis. *Int Rev Neurobiol* 46, 117-43.

Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-51.

Buggy JJ, Sideris ML, Mak P, Lorimer DD, McIntosh B, Clark JM (2000) Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem J* 350 Pt 1, 199-205.

Caron KM, Ikeda Y, Soo SC, Stocco DM, Parker KL, Clark BJ (1997) Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Endocrinol* 11, 138-47.

Carstea ED, Morris JA, *et al.* (1997) Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277, 228-31.

Chedrese PJ, Zhang D, Luu The V, Labrie F, Juorio AV, Murphy BD (1990) Regulation of mRNA expression of 3 beta-hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase in porcine granulosa cells in culture: a role for the protein kinase-C pathway. *Mol Endocrinol* 4, 1532-8.

Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P (2000) Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103, 263-71.

Christenson LK, Osborne TF, McAllister JM, Strauss JF, 3rd (2001) Conditional response of the human steroidogenic acute regulatory protein gene promoter to sterol regulatory element binding protein-1a. *Endocrinology* 142, 28-36.

Christenson LK, Stouffer RL, Strauss JF, 3rd (2001) Quantitative analysis of the hormone-induced hyperacetylation of histone H3 associated with the steroidogenic acute regulatory protein gene promoter. *J Biol Chem* 276, 27392-9.

Christenson LK, Strauss JF, 3rd (2000) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1529, 175-87.

Christenson LK, Strauss JF, 3rd (2001) Steroidogenic acute regulatory protein: an update on its regulation and mechanism of action. *Arch Med Res* 32, 576-86.

Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365, 855-9.

Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM (1994) The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* 269, 28314-22.

Cooke BA (1999) Signal transduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms in the control of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 151, 25-35.

Crivello JF, Jefcoate CR (1978) Mechanisms of corticotropin action in rat adrenal cells. I. The effects of inhibitors of protein synthesis and of microfilament formation on corticosterone synthesis. *Biochim Biophys Acta* 542, 315-29.

Dangond F, Gullans SR (1998) Differential expression of human histone deacetylase mRNAs in response to immune cell apoptosis induction by trichostatin A and butyrate. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 833-7.

Davie JR (1998) Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates. *Curr Opin Genet Dev* 8, 173-8.

Davis JS, Weakland LL, West LA, Farese RV (1986) Luteinizing hormone stimulates the formation of inositol trisphosphate and cyclic AMP in rat granulosa cells. Evidence for phospholipase C generated second messengers in the action of luteinizing hormone. *Biochem J* 238, 597-604.

DeBose-Boyd RA, Brown MS, Li WP, Nohturfft A, Goldstein JL, Espenshade PJ (1999) Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell* 99, 703-12.

Devoto L, Kohen P, Vega M, Castro O, Gonzalez RR, Retamales I, Carvallo P, Christenson LK, Strauss JF (2002) Control of human luteal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 186, 137-41.

Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491-6.

Dooley KA, Bennett MK, Osborne TF (1999) A critical role for cAMP response element-binding protein (CREB) as a Co-activator in sterol-regulated transcription of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase promoter. *J Biol Chem* 274, 5285-91.

Dooley KA, Millinder S, Osborne TF (1998) Sterol regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase gene through a direct interaction between sterol regulatory element binding protein and the trimeric CCAAT-binding factor/nuclear factor Y. *J Biol Chem* 273, 1349-56.

Edwards PA, Ericsson J (1999) Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu Rev Biochem* 68, 157-85.

Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A (2000) Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta* 1529, 103-13.

Epstein LF, Orme-Johnson NR (1991) Regulation of steroid hormone biosynthesis. Identification of precursors of a phosphoprotein targeted to the mitochondrion in stimulated rat adrenal cortex cells. *J Biol Chem* 266, 19739-45.

Ericsson J, Edwards PA (1998) CBP is required for sterol-regulated and sterol regulatory element-binding protein-regulated transcription. *J Biol Chem* 273, 17865-70.

Ericsson J, Jackson SM, Edwards PA (1996) Synergistic binding of sterol regulatory element-binding protein and NF-Y to the farnesyl diphosphate synthase promoter is critical for sterol-regulated expression of the gene. *J Biol Chem* 271, 24359-64.

Ericsson J, Usheva A, Edwards PA (1999) YY1 is a negative regulator of transcription of three sterol regulatory element-binding protein-responsive genes. *J Biol Chem* 274, 14508-13.

Farkash Y, Timberg R, Orly J (1986) Preparation of antiserum to rat cytochrome P-450 cholesterol side chain cleavage, and its use for ultrastructural localization of the immunoreactive enzyme by protein A-gold technique. *Endocrinology* 118, 1353-65.

Fimia GM, De Cesare D, Sassone-Corsi P (1999) CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT. *Nature* 398, 165-9.

Foulkes NS, Sassone-Corsi P (1996) Transcription factors coupled to the cAMP-signalling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1288, F101-21.

Fry CJ, Peterson CL (2002) Transcription. Unlocking the gates to gene expression. *Science* 295, 1847-8.

Gallegos AM, Atshaves BP, *et al.* (2001) Gene structure, intracellular localization, and functional roles of sterol carrier protein-2. *Prog Lipid Res* 40, 498-563.

Garver WS, Erickson RP, Wilson JM, Colton TL, Hossain GS, Kozloski MA, Heidenreich RA (1997) Altered expression of caveolin-1 and increased cholesterol in detergent insoluble membrane fractions from liver in mice with Niemann-Pick disease type C. *Biochim Biophys Acta* 1361, 272-80.

Georgel PT, Tsukiyama T, Wu C (1997) Role of histone tails in nucleosome remodeling by *Drosophila* NURF. *Embo J* 16, 4717-26.

Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343, 425-30.

Goldstein JL, Rawson RB, Brown MS (2002) Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch Biochem Biophys* 397, 139-48.

Gonzalez GA, Montminy MR (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59, 675-80.

Gonzalez-Robayna IJ, Alliston TN, Buse P, Firestone GL, Richards JS (1999) Functional and subcellular changes in the A-kinase-signaling pathway: relation to aromatase and Sgk expression during the transition of granulosa cells to luteal cells. *Mol Endocrinol* 13, 1318-37.

Grozinger CM, Hassig CA, Schreiber SL (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4868-73.

Grummer RR, Carroll DJ (1988) A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. *J Anim Sci* 66, 3160-73.

Hampton RY (2000) Cholesterol homeostasis: ESCAPE from the ER. *Curr Biol* 10, R298-301.

Hasegawa T, Zhao L, Caron KM, Majdic G, Suzuki T, Shizawa S, Sasano H, Parker KL (2000) Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. *Mol Endocrinol* 14, 1462-71.

Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Habener JF (1988) Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* 242, 1430-3.

Horton HR ML, Ochs RS, Rawn JD, Scrimgeour KG (1994) 'Principes de Biochimie.' (Bruxelles), 720 pages.

Hu E, Chen Z, *et al.* (2000) Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *J Biol Chem* 275, 15254-64.

Ikeda Y, Lala DS, Luo X, Kim E, Moisan MP, Parker KL (1993) Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol Endocrinol* 7, 852-60.

Ioannou YA (2001) Multidrug permeases and subcellular cholesterol transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 657-68.

Janknecht R (2002) The versatile functions of the transcriptional coactivators p300 and CBP and their roles in disease. *Histol Histopathol* 17, 657-68.

Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383, 728-31.

Janson W, Brandner G, Siegel J (1997) Butyrate modulates DNA-damage-induced p53 response by induction of p53-independent differentiation and apoptosis. *Oncogene* 15, 1395-406.

Johnson GL, Dhanasekaran N (1989) The G-protein family and their interaction with receptors. *Endocr Rev* 10, 317-31.

Kadosh D, Struhl K (1998) Targeted recruitment of the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex generates a highly localized domain of repressed chromatin in vivo. *Mol Cell Biol* 18, 5121-7.

Kao HY, Downes M, Ordentlich P, Evans RM (2000) Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev* 14, 55-66.

Kawasaki H, Schiltz L, Chiu R, Itakura K, Taira K, Nakatani Y, Yokoyama KK (2000) ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. *Nature* 405, 195-200.

Kiriakidou M, McAllister JM, Sugawara T, Strauss JF, 3rd (1996) Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 4122-8.

Kornberg RD (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-71.

Kornberg RD, Lorch Y (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98, 285-94.

Krebs JE, Fry CJ, Samuels ML, Peterson CL (2000) Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression. *Cell* 102, 587-98.

Kuo MH, Allis CD (1999) In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods* 19, 425-33.

Kuo MH, Brownell JE, Sobel RE, Ranalli TA, Cook RG, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD (1996) Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* 383, 269-72.

Kuo MH, Zhou J, Jambeck P, Churchill ME, Allis CD (1998) Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev* 12, 627-39.

Kwan I, Farookhi R, Huynh HT, Murphy BD, Turner JD, Downey BR (1996) Steroidogenic properties of a spontaneously established porcine granulosa cell line (PGC-2). *Mol Reprod Dev* 45, 299-307.

Lala DS, Syka PM, Lazarchik SB, Mangelsdorf DJ, Parker KL, Heyman RA (1997) Activation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by oxysterols. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4895-900.

Lalli E, Melner MH, Stocco DM, Sassone-Corsi P (1998) DAX-1 blocks steroid production at multiple levels. *Endocrinology* 139, 4237-43.

Lalli E, Sassone-Corsi P (1994) Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J Biol Chem* 269, 17359-62.

LaVoie HA, Benoit AM, Garmey JC, Dailey RA, Wright DJ, Veldhuis JD (1997) Coordinate developmental expression of genes regulating sterol economy and cholesterol side-chain cleavage in the porcine ovary. *Biol Reprod* 57, 402-7.

Lee KM, Sif S, Kingston RE, Hayes JJ (1999) hSWI/SNF disrupts interactions between the H2A N-terminal tail and nucleosomal DNA. *Biochemistry* 38, 8423-9.

Lee YH, Williams SC, Baer M, Sterneck E, Gonzalez FJ, Johnson PF (1997) The ability of C/EBP beta but not C/EBP alpha to synergize with an Sp1 protein is specified by the leucine zipper and activation domain. *Mol Cell Biol* 17, 2038-47.

Lehmann JM, Kliewer SA, *et al.* (1997) Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 272, 3137-40.

Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG (1998) Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem* 273, 28545-8.

Leung PC, Steele GL (1992) Intracellular signaling in the gonads. *Endocr Rev* 13, 476-98.

Li XM, Juorio AV, Murphy BD (1995) Angiotensin II interferes with steroidogenesis in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 53, 791-9.

Lin D, Sugawara T, Strauss JF, 3rd, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL (1995) Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 267, 1828-31.

Linder ME, Gilman AG (1992) G proteins. *Sci Am* 267, 56-61, 64-5.

Lorch Y, Beve J, Gustafsson CM, Myers LC, Kornberg RD (2000) Mediator-nucleosome interaction. *Mol Cell* 6, 197-201.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-60.

Luo X, Ikeda Y, Lala DS, Baity LA, Meade JC, Parker KL (1995) A cell-specific nuclear receptor plays essential roles in adrenal and gonadal development. *Endocr Res* 21, 517-24.

Luu B (1995) [From cholesterol to oxysterols. Current data]. *C R Seances Soc Biol Fil* 189, 827-37.

Magana MM, Koo SH, Towle HC, Osborne TF (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.

Maizels ET, Mukherjee A, Sithanandam G, Peters CA, Cottom J, Mayo KE, Hunzicker-Dunn M (2001) Developmental regulation of mitogen-activated protein kinase-activated kinases-2 and -3 (MAPKAPK-2/-3) in vivo during corpus luteum formation in the rat. *Mol Endocrinol* 15, 716-33.

Manna PR, Dyson MT, Eubank DW, Clark BJ, Lalli E, Sassone-Corsi P, Zeleznik AJ, Stocco DM (2002) Regulation of steroidogenesis and the steroidogenic acute regulatory protein by a member of the cAMP response-element binding protein family. *Mol Endocrinol* 16, 184-99.

Manna PR, Eubank DW, Lalli E, Sassone-Corsi P, Stocco DM (2003) Transcriptional regulation of the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene by the cAMP response-element binding protein and steroidogenic factor 1. *J Mol Endocrinol* 30, 381-97.

Marieb E (1999) 'Anatomie et physiologie humaine.' (Montréal), 1014 pages.

Marmorstein R, Roth SY (2001) Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev* 11, 155-61.

Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 599-609.

Mayr BM, Canettieri G, Montminy MR (2001) Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10936-41.

McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Kohler M, Rosemblyt N, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH (1989) Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* 245, 494-9.

McKnight GS, Hager L, Palmiter RD (1980) Butyrate and related inhibitors of histone deacetylation block the induction of egg white genes by steroid hormones. *Cell* 22, 469-77.

Miller WL (1998) Early steps in androgen biosynthesis: from cholesterol to DHEA. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12, 67-81.

Miserez AR, Cao G, Probst LC, Hobbs HH (1997) Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF2). *Genomics* 40, 31-40.

Mizutani T, Sonoda Y, Minegishi T, Wakabayashi K, Miyamoto K (1997) Cloning, characterization, and cellular distribution of rat scavenger receptor class B type I (SRBI) in the ovary. *Biochem Biophys Res Commun* 234, 499-505.

Mizzen CA, Allis CD (1998) Linking histone acetylation to transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci* 54, 6-20.

Mizzen CA, Yang XJ, *et al.* (1996) The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87, 1261-70.

Molkentin JD (2000) The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 275, 38949-52.

Momoi K, Waterman MR, Simpson ER, Zanger UM (1992) 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent transcription of the CYP11A (cholesterol side chain cleavage cytochrome P450) gene involves a DNA

response element containing a putative binding site for transcription factor Sp1. *Mol Endocrinol* 6, 1682-90.

Montecino M, Frenkel B, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Stein JL (1999) Chromatin hyperacetylation abrogates vitamin D-mediated transcriptional upregulation of the tissue-specific osteocalcin gene in vivo. *Biochemistry* 38, 1338-45.

Murphy BD, Silavin SL (1989) Luteotrophic agents and steroid substrate utilization. *Oxf Rev Reprod Biol* 11, 179-223.

Muscatelli F, Strom TM, *et al.* (1994) Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* 372, 672-6.

Naar AM, Beurang PA, Robinson KM, Oliner JD, Avizonis D, Scheek S, Zwicker J, Kadonaga JT, Tjian R (1998) Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev* 12, 3020-31.

Naar AM, Beurang PA, Zhou S, Abraham S, Solomon W, Tjian R (1999) Composite co-activator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation. *Nature* 398, 828-32.

Nackley AC, Shea-Eaton W, Lopez D, McLean MP (2002) Repression of the steroidogenic acute regulatory gene by the multifunctional transcription factor Yin Yang 1. *Endocrinology* 143, 1085-96.

Nair AR, Boersma LJ, Schiltz L, Chaudhry MA, Muschel RJ, Chaudry A (2001) Paradoxical effects of trichostatin A: inhibition of NF- $\kappa$ B-associated histone acetyltransferase activity, phosphorylation of hGCN5 and downregulation of cyclin A and B1 mRNA. *Cancer Lett* 166, 55-64.

Nalbant D, Williams SC, Stocco DM, Khan SA (1998) Luteinizing hormone-dependent gene regulation in Leydig cells may be mediated by CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *Endocrinology* 139, 272-9.

Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-9.

Ohno Y, Yanagibashi K, Yonezawa Y, Ishiwatari S, Matsuba M (1983) A possible role of "steroidogenic factor" in the corticoidogenic response to ACTH; effect of ACTH, cycloheximide and aminoglutethimide on the content of cholesterol in the outer and inner mitochondrial membrane of rat adrenal cortex. *Endocrinol Jpn* 30, 335-8.

Olsen SR, Uhler MD (1991) Inhibition of protein kinase-A by overexpression of the cloned human protein kinase inhibitor. *Mol Endocrinol* 5, 1246-56.

Ormandy CJ, de Fazio A, Kelly PA, Sutherland RL (1992) Transcriptional regulation of prolactin receptor gene expression by sodium butyrate in MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinology* 131, 982-4.

Pall M, Hellberg P, Brannstrom M, Mikuni M, Peterson CM, Sundfeldt K, Norden B, Hedin L, Enerback S (1997) The transcription factor C/EBP-beta and its role in ovarian function; evidence for direct involvement in the ovulatory process. *Embo J* 16, 5273-9.

Parsons PG, Hansen C, Fairlie DP, West ML, Danoy PA, Sturm RA, Dunn IS, Pedley J, Ablett EM (1997) Tumor selectivity and transcriptional activation by azelaic bishydroxamic acid in human melanocytic cells. *Biochem Pharmacol* 53, 1719-24.

Perez-Martin J, Johnson AD (1998) Mutations in chromatin components suppress a defect of Gcn5 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18, 1049-54.

Pescador N, Houde A, Stocco DM, Murphy BD (1997) Follicle-stimulating hormone and intracellular second messengers regulate steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid in luteinized porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 57, 660-8.

Pescador N, Stocco DM, Murphy BD (1999) Growth factor modulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinization in the pig ovary. *Biol Reprod* 60, 1453-61.

Pilon N, Daneau I, Brisson C, Ethier JF, Lussier JG, Silversides DW (1997) Porcine and bovine steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression during gestation. *Endocrinology* 138, 1085-91.

Plesko MM, Hargrove JL, Granner DK, Chalkley R (1983) Inhibition by sodium butyrate of enzyme induction by glucocorticoids and dibutyryl cyclic AMP. A role for the rapid form of histone acetylation. *J Biol Chem* 258, 13738-44.

Pon LA, Hartigan JA, Orme-Johnson NR (1986) Acute ACTH regulation of adrenal corticosteroid biosynthesis. Rapid accumulation of a phosphoprotein. *J Biol Chem* 261, 13309-16.

Qiu L, Kelso MJ, Hansen C, West ML, Fairlie DP, Parsons PG (1999) Anti-tumour activity in vitro and in vivo of selective differentiating agents containing hydroxamate. *Br J Cancer* 80, 1252-8.

Richards JS (1994) Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 15, 725-51.

Richards JS (2001) New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol* 15, 209-18.

Richards JS, Rolfes AI (1980) Hormonal regulation of cyclic AMP binding to specific receptor proteins in rat ovarian follicles. Characterization by photoaffinity labeling. *J Biol Chem* 255, 5481-9.

Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA (1998) A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3003-7.

Rodenburg RJ, Holthuisen PE, Sussenbach JS (1997) A functional Sp1 binding site is essential for the activity of the adult liver-specific human insulin-like growth factor II promoter. *Mol Endocrinol* 11, 237-50.

Romanowski MJ, Soccio RE, Breslow JL, Burley SK (2002) Crystal structure of the *Mus musculus* cholesterol-regulated START protein 4 (StarD4) containing a StAR-related lipid transfer domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6949-54.

Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70, 81-120.

Ruiz-Cortes ZT, Martel-Kennes Y, Gevry NY, Downey BR, Palin MF, Murphy BD (2003) Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 68, 789-96.

Rundlett SE, Carmen AA, Suka N, Turner BM, Grunstein M (1998) Transcriptional repression by UME6 involves deacetylation of lysine 5 of histone H4 by RPD3. *Nature* 392, 831-5.

Russell DW (1992) Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovasc Drugs Ther* 6, 103-10.

Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T, Suzuki T, Tsuruo T, Nakanishi O (1999) A synthetic inhibitor of histone deacetylase,

MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4592-7.

Sambucetti LC, Fischer DD, Zabudoff S, Kwon PO, Chamberlin H, Trogani N, Xu H, Cohen D (1999) Histone deacetylase inhibition selectively alters the activity and expression of cell cycle proteins leading to specific chromatin acetylation and antiproliferative effects. *J Biol Chem* 274, 34940-7.

Sanchez HB, Yieh L, Osborne TF (1995) Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* 270, 1161-9.

Sandhoff TW, Hales DB, Hales KH, McLean MP (1998) Transcriptional regulation of the rat steroidogenic acute regulatory protein gene by steroidogenic factor 1. *Endocrinology* 139, 4820-31.

Sato R, Yang J, Wang X, Evans MJ, Ho YK, Goldstein JL, Brown MS (1994) Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation domains of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1). *J Biol Chem* 269, 17267-73.

Saunders N, Dicker A, Popa C, Jones S, Dahler A (1999) Histone deacetylase inhibitors as potential anti-skin cancer agents. *Cancer Res* 59, 399-404.

Saunders NA, Popa C, Serewko MM, Jones SJ, Dicker AJ, Dahler AL (1999) Histone deacetylase inhibitors: novel anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs* 8, 1611-1621.

Scarpetta MA, Uhler MD (1993) Evidence for two additional isoforms of the endogenous protein kinase inhibitor of cAMP-dependent protein kinase in mouse. *J Biol Chem* 268, 10927-31.

Sekar N, Lavoie HA, Veldhuis JD (2000) Concerted regulation of steroidogenic acute regulatory gene expression by luteinizing hormone and insulin (or insulin-like growth factor I) in primary cultures of porcine granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 141, 3983-92.

Shea-Eaton WK, Trinidad MJ, Lopez D, Nackley A, McLean MP (2001) Sterol regulatory element binding protein-1a regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *Endocrinology* 142, 1525-33.

Shimano H (2002) Sterol regulatory element-binding protein family as global regulators of lipid synthetic genes in energy metabolism. *Vitam Horm* 65, 167-94.

Shinoda K, Lei H, *et al.* (1995) Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev Dyn* 204, 22-9.

Silverman E, Eimerl S, Orly J (1999) CCAAT enhancer-binding protein beta and GATA-4 binding regions within the promoter of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene are required for transcription in rat ovarian cells. *J Biol Chem* 274, 17987-96.

Simon MI, Strathmann MP, Gautam N (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802-8.

Simpson ER, McCarthy JL, Peterson JA (1978) Evidence that the cycloheximide-sensitive site of adrenocorticotrophic hormone action is in the mitochondrion. Changes in pregnenolone formation, cholesterol content, and the electron paramagnetic resonance spectra of cytochrome P-450. *J Biol Chem* 253, 3135-9.

Sirois J, Richards JS (1993) Transcriptional regulation of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. Evidence for the role of a cis-acting C/EBP beta promoter element. *J Biol Chem* 268, 21931-8.

Skalnik DG, Narita H, Kent C, Simoni RD (1988) The membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase confers endoplasmic reticulum localization and sterol-regulated degradation onto beta-galactosidase. *J Biol Chem* 263, 6836-41.

Soccio RE, Adams RM, Romanowski MJ, Sehayek E, Burley SK, Breslow JL (2002) The cholesterol-regulated StarD4 gene encodes a StAR-related lipid transfer protein with two closely related homologues, StarD5 and StarD6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6943-8.

Somers JP, Benyo DF, Little-Ihrig L, Zeleznik AJ (1995) Luteinization in primates is accompanied by loss of a 43-kilodalton adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein isoform. *Endocrinology* 136, 4762-8.

Stocco DM (1999) Steroidogenic acute regulatory protein. *Vitam Horm* 55, 399-441.

Stocco DM (2000) Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim Biophys Acta* 1486, 184-97.

Stocco DM (2001a) StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 63, 193-213.

Stocco DM (2001b) Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Mol Endocrinol* 15, 1245-54.

Stocco DM, Clark BJ (1996a) Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev* 17, 221-44.

Stocco DM, Clark BJ (1996b) Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem Pharmacol* 51, 197-205.

Stocco DM, Clark BJ, *et al.* (2001) Elements involved in the regulation of the StAR gene. *Mol Cell Endocrinol* 177, 55-9.

Stocco DM, Kilgore MW (1988) Induction of mitochondrial proteins in MA-10 Leydig tumour cells with human choriogonadotropin. *Biochem J* 249, 95-103.

Stocco DM, Sodeman TC (1991) The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors. *J Biol Chem* 266, 19731-8.

Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-5.

Strauss JF, 3rd, Kallen CB, Christenson LK, Watari H, Devoto L, Arakane F, Kiriakidou M, Sugawara T (1999) The steroidogenic acute regulatory protein (StAR): a window into the complexities of intracellular cholesterol trafficking. *Recent Prog Horm Res* 54, 369-94; discussion 394-5.

Strauss JF, 3rd, Schuler LA, Rosenblum MF, Tanaka T (1981) Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Adv Lipid Res* 18, 99-157.

Sugawara T, Holt JA, *et al.* (1995) Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4778-82.

Sugawara T, Kiriakidou M, McAllister JM, Kallen CB, Strauss JF, 3rd (1997) Multiple steroidogenic factor 1 binding elements in the human steroidogenic acute regulatory protein gene 5'-flanking region are required for maximal promoter activity and cyclic AMP responsiveness. *Biochemistry* 36, 7249-55.

Sugawara T, Lin D, Holt JA, Martin KO, Javitt NB, Miller WL, Strauss JF, 3rd (1995) Structure of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: StAR stimulates mitochondrial cholesterol 27-hydroxylase activity. *Biochemistry* 34, 12506-12.

Sugawara T, Nomura E, Sakuragi N, Fujimoto S (2001) The effect of the arylhydrocarbon receptor on the human steroidogenic acute regulatory gene promoter activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78, 253-60.

Sun G, Porter W, Safe S (1998) Estrogen-induced retinoic acid receptor alpha 1 gene expression: role of estrogen receptor-Sp1 complex. *Mol Endocrinol* 12, 882-90.

Takahashi I, Miyaji H, Yoshida T, Sato S, Mizukami T (1996) Selective inhibition of IL-2 gene expression by trichostatin A, a potent inhibitor of mammalian histone deacetylase. *J Antibiot (Tokyo)* 49, 453-7.

Tamasawa N, Hayakari M, Murakami H, Matsui J, Suda T (1997) Reduction of oxysterol levels up-regulates HMG-CoA reductase activity in rat liver. *Atherosclerosis* 131, 237-42.

Tang WJ, Gilman AG (1992) Adenylyl cyclases. *Cell* 70, 869-72.

Tash JS, Welsh MJ, Means AR (1981) Regulation of protein kinase inhibitor by follicle-stimulating hormone in Sertoli cells in vitro. *Endocrinology* 108, 427-34.

Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, Spiegelman BM (1993) ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol* 13, 4753-9.

Trievel RC, Rojas JR, Sterner DE, Venkataramani RN, Wang L, Zhou J, Allis CD, Berger SL, Marmorstein R (1999) Crystal structure and mechanism of histone acetylation of the yeast GCN5 transcriptional coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8931-6.

Trzeciak WH, Duda T, Waterman MR, Simpson ER (1987) Tetradecanoyl phorbol acetate suppresses follicle-stimulating hormone-induced synthesis of the cholesterol side-chain cleavage enzyme complex in rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 262, 15246-50.

Van den Wyngaert I, de Vries W, Kremer A, Neefs J, Verhasselt P, Luyten WH, Kass SU (2000) Cloning and characterization of human histone deacetylase 8. *FEBS Lett* 478, 77-83.

- Van Lint C, Emiliani S, Verdin E (1996) The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr* 5, 245-53.
- Verdel A, Khochbin S (1999) Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J Biol Chem* 274, 2440-5.
- Vogelauer M, Wu J, Suka N, Grunstein M (2000) Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* 408, 495-8.
- Wade PA (2001) Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum Mol Genet* 10, 693-8.
- Walsh LP, Kuratko CN, Stocco DM (2000) Econazole and miconazole inhibit steroidogenesis and disrupt steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression post-transcriptionally. *J Steroid Biochem Mol Biol* 75, 229-36.
- Walsh LP, McCormick C, Martin C, Stocco DM (2000) Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environ Health Perspect* 108, 769-76.
- Walsh LP, Stocco DM (2000) Effects of lindane on steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression. *Biol Reprod* 63, 1024-33.
- Walsh LP, Webster DR, Stocco DM (2000) Dimethoate inhibits steroidogenesis by disrupting transcription of the steroidogenic acute regulatory (StAR) gene. *J Endocrinol* 167, 253-63.
- Wang L, Liu L, Berger SL (1998) Critical residues for histone acetylation by Gcn5, functioning in Ada and SAGA complexes, are also required for transcriptional function in vivo. *Genes Dev* 12, 640-53.
- Wang X, He C, Moore SC, Ausio J (2001) Effects of histone acetylation on the solubility and folding of the chromatin fiber. *J Biol Chem* 276, 12764-8.
- Wang X, Moore SC, Laszckzak M, Ausio J (2000) Acetylation increases the alpha-helical content of the histone tails of the nucleosome. *J Biol Chem* 275, 35013-20.
- Wang X, Walsh LP, Reinhart AJ, Stocco DM (2000) The role of arachidonic acid in steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory (StAR) gene and protein expression. *J Biol Chem* 275, 20204-9.

Wang X, Walsh LP, Stocco DM (1999) The role of arachidonic acid on LH-stimulated steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein accumulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Endocrine* 10, 7-12.

Waterman MR, Keeney DS (1996) Signal transduction pathways combining peptide hormones and steroidogenesis. *Vitam Horm* 52, 129-48.

Wittschieben BO, Otero G, *et al.* (1999) A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell* 4, 123-8.

Wolffe AP (1997) Transcriptional control. Sinful repression. *Nature* 387, 16-7.

Wooton-Kee CR, Clark BJ (2000) Steroidogenic factor-1 influences protein-deoxyribonucleic acid interactions within the cyclic adenosine 3,5-monophosphate-responsive regions of the murine steroidogenic acute regulatory protein gene. *Endocrinology* 141, 1345-55.

Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH, 3rd, Montminy MR (1988) Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 334, 494-8.

Yieh L, Sanchez HB, Osborne TF (1995) Domains of transcription factor Sp1 required for synergistic activation with sterol regulatory element binding protein 1 of low density lipoprotein receptor promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6102-6.

Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM, Sassone-Corsi P (1997) DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature* 390, 311-5.



# ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE<sup>1</sup>

## IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

<b>Nom de l'étudiant</b> Eric Deneault		<b>Code permanent</b> [REDACTED]
<b>Sigle du programme</b> M.Sc.	<b>Titre du programme</b> Sciences vétérinaires	<b>Option</b> reproduction

## DESCRIPTION DE L'ARTICLE

<b>Auteurs</b> Eric Deneault, Nicolas Y. Gévry, Bruce D. Murphy	
<b>Titre</b> Activation of the steroidogenic acute regulatory protein gene by cholesterol depletion in porcine granulosa cells is associated with histone H3 acetylation.	
<b>Revue</b> Endocrinology	<b>Date de publication</b>

## DECLARATION DES COAUTEURS

<b>Déclaration</b>		
<p>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Eric Deneault inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Activation of the steroidogenic acute regulatory protein gene by cholesterol depletion in porcine granulosa cells is associated with histone H3 acetylation.</p>		
<b>Coauteur</b> Nicolas Y. Gévry	[REDACTED]	<b>Date</b> 20/06/03
<b>Coauteur</b> Bruce D. Murphy	[REDACTED]	<b>Date</b> 27/06/03
<b>Coauteur</b>	[REDACTED]	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>

Envoyé à la FES le