

2M11.2808.9

Université de Montréal

Dissection moléculaire et essais fonctionnels d'une séquence régulatrice
5' non-traduite du récepteur des glucocorticoïdes de rat.

par

Marc-André Valiquette

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.)

en biologie moléculaire

Avril 2000

© Marc-André Valiquette 2000



⑤H
506
U54
2000
V.004

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des Études supérieures

Ce mémoire, intitulé :

Dissection moléculaire et essais fonctionnels d'une séquence régulatrice
5' non-traduite du récepteur des glucocorticoïdes de rat

présenté par :

Marc-André Valiquette


a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Edward Bradley, président-rapporteur

Dr Timothy L. Reudelhuber, directeur de recherche

Dr David W. Silversides, membre du jury

Mémoire accepté le




Le Temps est un excellent Maître...

Hector Berlioz

The rule is not "the best", but "the first".

Marilyn Kozak



SOMMAIRE

Les récepteurs stéroïdiens occupent une place centrale dans des phénomènes aussi variés que la tissu-spécificité, l'embryogénèse, la croissance et le développement, ainsi qu'à l'adaptation à l'environnement, chez les organismes supérieurs. Leurs fonctions double de récepteurs hormonaux et de facteurs transcriptionnels en font un modèle de choix pour tenter de comprendre une partie des mécanismes qui règlent la vie cellulaire.

Des séquences géniques, flanquant la partie codante du gène du Récepteur des Glucocorticoïdes (GR) immédiatement en 5', montrent une très grande hétérogénéité chez le rat. Elles semblent contenir les éléments régulateurs suffisants et nécessaires pour conférer un contrôle de l'expression au niveau des fonctions de l'ARN messenger (ARN m) de cette protéine. Nous avons utilisé les stratégies du génie génétique et les techniques de la culture cellulaire *in vitro*, ainsi que diverses procédures biochimiques de dosage, pour explorer le rôle putatif de deux de ces séquences non-traduites dans l'expression du GR de rat. Nous avons découvert que l'utilisation différentielle d'un choix putatif de ces séquences constitue une possibilité bien réelle de mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de ce récepteur. En outre, la grande similarité des réponses observées dans tous les types cellulaires suggère que ces mécanismes pourraient avoir été conservés au cours de l'évolution.

En outre, nous avons également démontré, par dissection moléculaire, que deux éléments, caractérisés antérieurement par des expériences de séquençage, confèrent un potentiel régulateur considérable sur l'efficacité de la traduction d'un gène rapporteur, celui de la luciférase de mouche à feu, dans les cellules de rat et de primate en culture. Ce sont, par ordre décroissant d'efficacité, les petits cadres de lecture ouverts (*sORF*), les structures secondaires stables et les structures secondaires labiles, ces dernières étant conférées par l'auto-appariement de certaines séquences palindromiques se trouvant au niveau de la molécule d'ARN*m*. De plus, des essais fonctionnels conçus pour étudier l'influence de la longueur de la région 5' non-traduite sur l'efficacité de la traduction, ont permis de découvrir que le promoteur associé à une de ces régions 5' non-traduites possède la capacité de réduire substantiellement l'efficacité du promoteur viral RSV-LTR.

Il semble donc que les niveaux cellulaires du GR soient en partie gouvernés par des mécanismes génétiques d'une grande versatilité chez le rat, pouvant assurer un contrôle efficace et précis de l'abondance de cette molécule au sein du cytoplasme.

Mots clés : Récepteur des Glucocorticoïdes
Régulation post-transcriptionnelle, *sORF*, traduction, 5'UTR,
ARN*m* et structures secondaires, cellules cultivées, gène.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE.....	i
TABLE DES MATIERES.....	iii
LISTE DES FIGURES & TABLEAUX.....	vii
LISTE DES SIGLES & ABRÉVIATIONS.....	viii
DÉDICACE.....	x
REMERCIEMENTS.....	xi

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1 Les glucocorticoïdes et la vie animale.....	1
1.1.1 Structure chimique.....	2
1.1.2 Rôles systémiques.....	4
1.1.3 Rôles cellulaires.....	6
1.1.4 Pathophysiologie.....	6
1.2 L'importance de la régulation de l'expression génétique.....	10
1.2.1 Les niveaux de contrôle de l'expression génétique.....	10
1.2.1.1 Au niveau transcriptionnel.....	12
1.2.1.2 Au niveau post-traductionnel.....	15
1.2.1.3 Au niveau post-transcriptionnel.....	17
1.2.1.4 Au niveau traductionnel.....	21

1.2.2 Les éléments du contrôle traductionnel.....	21
1.2.2.1 Éléments agissant en <i>cis</i> sur l'ARN messenger.....	21
1.2.2.1.1 L'effet de la coiffe.....	22
1.2.2.1.2 Les effets de la région 3' non-traduite.....	22
1.2.2.1.3 Les effets de la région 5' non-traduite.....	29
1.2.2.1.3.1 L'influence de la longueur.....	31
1.2.2.1.3.2 L'influence des sites de liaison.....	34
1.2.2.1.3.3 L'influence des structures secondaires.....	39
1.2.2.1.3.4 L'influence de la position du codon AUG.....	44
1.2.2.1.3.5 L'influence du contexte.....	45
1.2.2.1.3.6 L'influence des sORFs.....	49
1.2.2.2. Les éléments agissant en <i>trans</i> sur l'ARN messenger.....	55
1.2.2.2.1. Les facteurs traductionnels.....	55
1.2.2.2.2 La Gymnastique du ribosome.....	56
1.2.2.2.2.1 Les sauts.....	57
1.2.2.2.2.2 Le <i>frameshifting</i>	58
1.2.2.2.2.3 Le <i>readthrough</i>	59
1.3 Le Récepteur des Glucocorticoïdes comme modèle de régulation post-transcriptionnelle.....	61
1.3.1 Le GR est un facteur transcriptionnel.....	61
1.3.2 La distribution tissulaire du GR.....	73
1.3.3 La distribution cellulaire du GR.....	74
1.3.4 L'organisation du gène du GR de rat.....	75
1.3.5 La régulation du GR.....	80
1.4 Description du projet.....	84

CHAPITRE 2. MATÉRIEL & MÉTHODES

2.1 Construction des fusions de gènes.....	87
2.1.1 Construction du vecteur d'expression JMC 100.....	87
2.1.2 Construction des vecteurs d'expression avec l'exon 1B entier.....	89
2.1.3 Construction des mutants de délétion partielle.....	90
2.1.4 Construction des mutants de délétion complète.....	92
2.1.5 Construction des vecteurs d'expression avec l'exon 1A.....	92
2.1.6 Amplification et quantification des plasmides.....	93
2.2 Culture des lignées cellulaires établies.....	94
2.3 Transformation des cellules.....	95
2.4 Quantification des protéines et de l'activité du gène rapporteur.....	97

CHAPITRE 3. ANALYSE DES RÉSULTATS

3.1 Survol des méthodes d'investigation employées.....	102
3.1.1 Les techniques de la biologie moléculaire comme outil d'investigation.....	103
3.1.2 Les techniques de la culture cellulaire comme outil d'investigation.....	108
3.1.2.1 Compatibilité de la méthode utilisée avec le type cellulaire.....	109
3.1.2.2 L'effet de la Compétition.....	110
3.1.2.3 L'effet de la Dose de transfectant.....	113
3.1.2.4 L'effet de la Cinétique de l'expression transitoire.....	116
3.1.3 Les techniques biochimiques comme outil d'investigation.....	119
3.2 Analyse des Résultats obtenus pour chaque groupe testé.....	122
3.2.1 Résultats obtenus avec le contrôle positif.....	122
3.2.2 Résultats obtenus avec l'exon 1B entier.....	130
3.2.3 Résultats obtenus avec les mutants de délétion partielle.....	131
3.2.4 Résultats obtenus avec les mutants de délétion complète.....	137
3.2.5 Résultats obtenus avec l'exon 1A entier.....	140

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

- 4.1 Les travaux antérieurs concernant la régulation du GR suggèrent certaines possibilités de contrôle au niveau génétique et traductionnel..... 141**
- 4.2 L'utilisation différentielle d'un choix putatif de certaines séquences 5' non-traduites constitue une possibilité bien réelle de mécanisme de régulation post-transcriptionnelle du GR..... 144**
- 4.3 Les sORF, les structures secondaires de l'ARNm et la longueur excessive du 5'UTR peuvent conférer un potentiel régulateur bien réel..... 155**
- 4.4 Ces mécanismes de régulation post-transcriptionnels semblent ubiquitaires, et pourraient avoir été conservés au cours l'ontogénèse et au cours de l'évolution.....159**

CHAPITRE 5 : CONCLUSION

Les résultats de cette étude exploratoire peuvent être confirmés par des approches expérimentales plus détaillées, plus variées et mieux ciblées..... 165

BIBLIOGRAPHIE

Liste des publications scientifiques et ouvrage de référence consultés.... 171

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

- 1.1 Stéroïdes surrenaliens et leurs analogues chimiques
- 1.2 La régulation systémique des glucocorticoïdes
- 1.3 Épissage alternatif et Promoteurs alternatifs
- 1.4 Les éléments du contrôle traductionnel dans la région 3' non-traduite
- 1.5 L'hypothèse du balayage (scanning) de l'ARNm
- 1.6 Les éléments du contrôle traductionnel dans la région 5' : l'influence de la longueur
- 1.7 L'influence des sites de liaison
- 1.8 L'influence des structures secondaires
- 1.9 L'influence des sORF
- 1.10 Les domaines modulaires du Récepteur des Glucocorticoïdes
- 1.11 L'effet des glucocorticoïdes s'effectue par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique
- 1.12 L'organisation génomique du GR chez le rat

- 2.1 Structures primaires des différentes séquences 5' non-traduites étudiées dans ce projet
- 2.2 Structures secondaires putatives de l'ARNm transcrit à partir de l'exon 1B

- 3.1 Représentation des constructions faisant l'objet des essais fonctionnels cellulaires
- 3.2 Effets de la Compétition
- 3.3 Effets de la dose de transfectant dans les cellules COS-7
- 3.4 Effets de la dose de transfectant dans les cellules HTC
- 3.5 Cinétique de l'expression transitoire dans les cellules COS-7
- 3.6 Cinétique de l'expression transitoire dans les cellules HTC
- 3.7 Courbe standard de l'activité luciférase
- 3.8 Courbe standard des concentrations de protéines cellulaires totales
- 3.9 Expression des chimères génétiques dans les cellules COS-7
- 3.10 Expression des chimères génétiques dans les cellules HTC
- 3.11 Expression des chimères génétiques dans les cellules L6
- 3.12 Les séquences promotrices associées à l'exon 1B peuvent affaiblir le promoteur de RSV

- 4.1 L'utilisation différentielle d'un choix putatif de certaines séquences 5' non-traduites constitue une possibilité bien réelle de mécanisme de régulation post-transcriptionnelle du GR chez le rat
- 4.2 Une comparaison de l'organisation génétique du GR chez le rat, la souris et l'humain
- 4.3 Les sORF, les structures secondaires de l'ARNm et la longueur excessive du 5' UTR peuvent conférer un potentiel régulateur bien réel
- 4.4 Un modèle moléculaire de régulation post-transcriptionnelle du GR chez l'humain.

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

3'UTR	Région non-traduite en 3' (<i>3' Untranslated Region</i>)
5'UTR	Région non-traduite en 5' (<i>5' Untranslated Region</i>)
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
α GR	GR activé
AMP _c	Adénosine 3'-5' monophosphate
ARN	Acide ribonucléique
ARN _m	ARN messenger
ARN _t	ARN de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
CAT	Chloramphenicol acetyl transferase
CIT	Complexe d'Initiation de la Transcription
CRF	<i>Corticotropin Releasing Factor</i>
Dex	Dexaméthasone
DLA	Domaine de liaison à l'ADN
DO _x	Densité optique à <i>x</i> nanomètres
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétate
ES	Écart standard
GR	Récepteur des Glucocorticoïdes
GRE	Élément de réponse aux glucocotricoides
hGH	Hormone de croissance humaine
axe HPA	axe <i>Hypothalamic-pituitary-adrenal</i>
Hsp 90	<i>Heat shock protein 90</i>
iGR	Récepteur des Glucocorticoïdes inactif
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Sites</i>
kb	kilobase
KDa	kilodalton
L	litre
LTR	Long Terminal Repeat (promoteur viral)

... suite

mg	milligramme
mL	millilitre
nm	nanomètre
nt	nucléotide
nt ⁱ	nuclear transfer increased
pb	paires de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polyéthylèneglycol
pg	picogramme
polII	ARN polymérase de type II
poly(A)	polyadénylation
POMC	Pro-opiomélanocortine
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA ends</i>
RSV	Virus du sarcome de Rous
RU-486	Roussel-UCLAF 486 (antagoniste des glucocorticoïdes et de la progestérone)
SDS	<i>Sodium dodecylsulphate</i>
SF	Séquences 5' flanquantes
sORF	cadre de lecture ouvert (<i>short Open Reading Frame</i>)
SV40	Simian virus 40
Tris	Tris (<i>hydroxymethyl</i>) aminomethane
µL	microlitre

DÉDICACE

À mes parents ...

... pour qui, telle une rose, la Science se cultive.

REMERCIEMENTS

Je voudrais, en tout premier lieu, saisir l'occasion qui m'est présentée ici pour remercier sincèrement mes parents, Monsieur Roger Valiquette, et Madame Irène Saindon-Valiquette, pour leurs encouragements continuels et leur support indéfectible tout au long de ma carrière universitaire. Sans eux, l'accomplissement de tout ce travail aurait été chose impossible.

J'aimerais aussi remercier les Drs Jacques Drouin et Mona Nemer, de l'Université de Montréal. L'expérience de travail que j'ai antérieurement acquise grâce à eux à titre de technicien de recherche m'a beaucoup aidé à entreprendre un tel projet, et j'en garde un souvenir impérissable. Merci également au Dr André Royal, pour ses recommandations et ses conseils au cours des nombreuses semaines qu'a nécessité la rédaction de ce document.

Des remerciements également au Dr Keith Yamamoto et au Dr Mike Jacobson, de l'Université de Californie à San Francisco, pour avoir fourni les constructions génétiques de base indispensables aux expériences de sous-clonage qui furent effectuées ici, avec l'aide de Messieurs Claude Fortin et Jude Beaudoin. Finalement, un merci spécial au Dr T. Antakly, pour m'avoir permis l'utilisation de ses installations de recherche au Département de Pathologie de l'Université de Montréal.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1 Les glucocorticoïdes et la vie animale.

L'importance du système hormonal a été remarquée pour la première fois par les travaux des physiologistes anglais Bayliss et Starling en 1902 (Tortora et al., 1982). On sait aujourd'hui que les hormones jouent des rôles-clés dans le métabolisme, la croissance, le développement, la reproduction, le stress, et dans l'équilibre des fluides, des électrolytes, du système acido-basique et énergétique de l'organisme. Elles peuvent faire la différence entre la vie et la mort.

Le système hormonal, ou endocrinien, est le deuxième grand système de transmission d'informations de nature physiologique pour l'organisme, le premier étant le système nerveux. Une hormone est un messager de nature chimique, véhiculé par le sang, qui règle la vie cellulaire dans les organes ciblés où s'exerce son action. Les impulsions nerveuses et les hormones n'exercent pas exactement le même mode de régulation, pas plus qu'elles ne régularisent exactement les mêmes structures, ni les mêmes fonctions. L'organisme animal peut ainsi exercer un contrôle mieux réparti et plus précis de ses différents besoins vitaux, dans un but ultime d'adaptation à tout événement qui poserait un défi à sa capacité de survivre. Les glucocorticoïdes sont une classe d'hormones dont l'importance est capitale dans ces processus.

1.1.1 La structure chimique des glucocorticoïdes.

En terme de structure chimique, les hormones se répartissent en trois catégories: les dérivés des acides aminés (ces derniers allant du simple acide aminé à de très grosses protéines), les dérivés des acides gras, comme les prostaglandines, et les stéroïdes, comme les glucocorticoïdes.

Ces derniers sont des lipides (matières grasses) simples dont la structure moléculaire est constituée d'une partie centrale faite d'une chaîne carbonée refermée quatre fois sur elle-même: c'est le noyau stérol, sur lequel sont greffés certains résidus dont la nature et la position caractérisent les propriétés biologiques de la molécule elle-même. Les glucocorticoïdes les plus communs sont le cortisol, la cortisone et la corticostérone. Ils sont caractérisés par la présence d'un atome d'oxygène sur le onzième atome de carbone du noyau stérol (figure 1.1).

Ces hormones sont synthétisées par une population très particulière de cellules: les cellules de la zone fasciculée (médiane) de la glande cortico-surrénale, que l'on retrouve sur la partie supérieure des reins chez les mammifères, à proximité des grands vaisseaux sanguins centraux. La vascularisation considérable des glandes surrénales témoigne de la grande importance de cet organe dans son rôle en tant que glande endocrine.

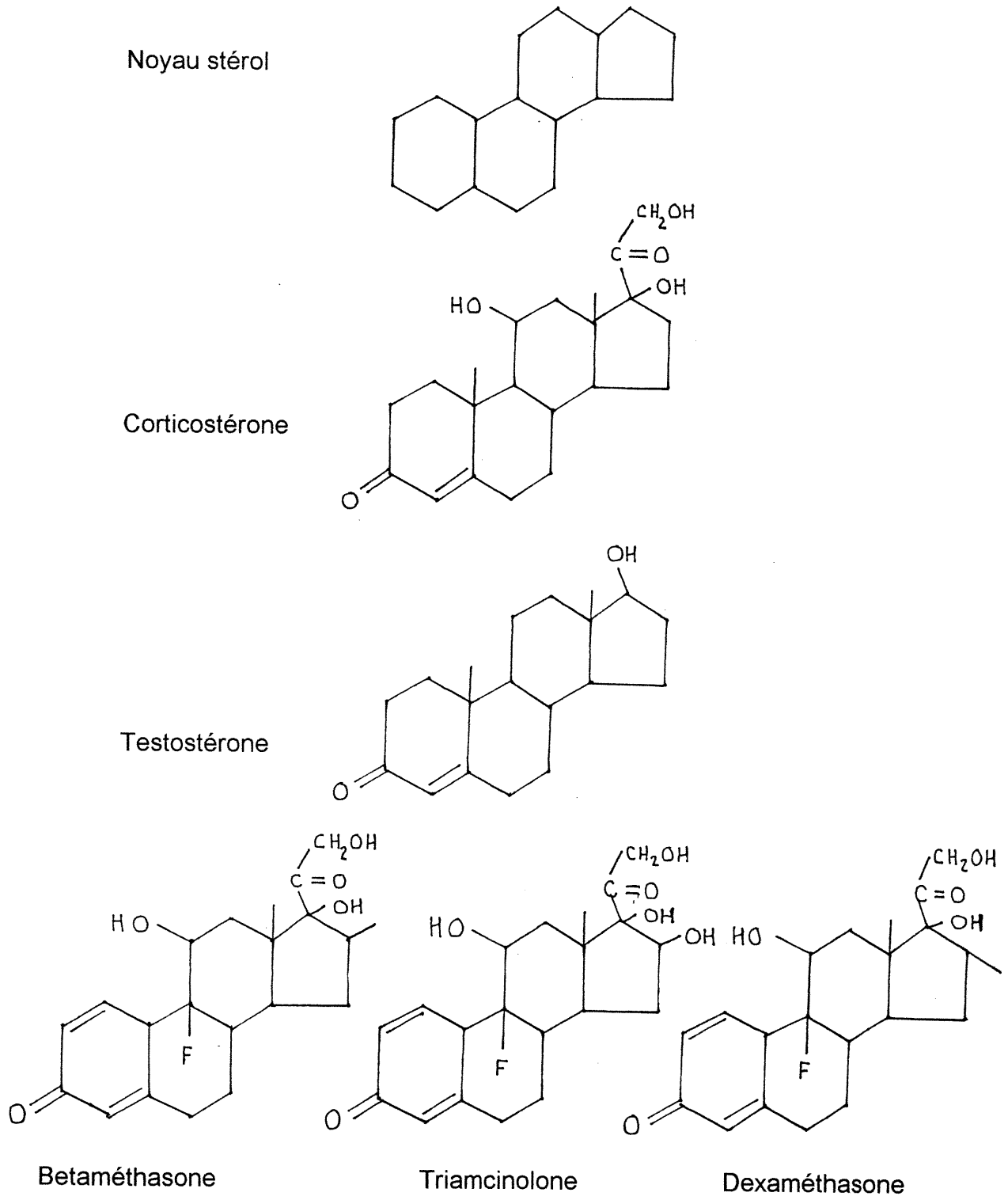


Figure 1.1 Stéroïdes surrénaliens et leurs analogues chimiques.

1.1.2 Les rôles systémiques des glucocorticoïdes.

Comme leur nom l'indique, ces hormones interviennent dans le métabolisme des glucides, mais aussi des lipides et des protéines.

Dans le métabolisme des glucides, le cortisol agit comme un antagoniste de l'insuline: il est hyperglycémiant, car il provoque une augmentation du taux de glucose sanguin. Elle se produit pour deux raisons: tandis que l'utilisation du glucose par les tissus (sauf le cerveau) est freinée, la production de glucose par le foie est accélérée. Ainsi, les réserves de glycogène hépatique diminuent, car elles sont transformées en glucose, c'est la glucogénèse. De plus, le foie transforme en glucose les protéines (essentiellement les acides aminés) et le glycérol dont il dispose, par le phénomène de la *néoglucogénèse*. Apparaît alors un "diabète surrénalien" que l'administration d'insuline ne corrige guère.

Les acides aminés, quant à eux, proviennent de la plupart des tissus: le cortisol arrête la synthèse des protéines dans toutes les cellules, sauf les cellules hépatiques. Ainsi, la teneur en protéines tissulaires diminue, et les protéines détruites sont à l'origine des acides aminés qui sont mobilisés dans le sang. Au niveau du foie, par contre, la teneur en protéines augmente peu à peu, surtout la teneur en protéines du plasma sanguin, qui sont normalement presque toutes synthétisées dans cet organe.

Comme le cortisol mobilise les acides aminés, de même il mobilise les lipides à partir des réserves adipeuses de l'organisme. Ces graisses peuvent

s'accumuler en certains endroits très caractéristiques: on observe non pas de l'obésité, mais plutôt une répartition anormale des graisses. Une manifestation particulière de ces dépôts dans la nuque est désignée par l'éloquente expression "*buffalo hump*", dans la littérature anglophone. Le catabolisme des glucides est donc substitué par celui des lipides. Une bonne partie des lipides est détruite par le foie: s'ils ne sont pas suffisamment utilisés à des fins énergétiques, les corps cétoniques qui en dérivent s'accumulent dans le sang, et des symptômes d'acidose se manifestent.

D'autres effets notables des glucocorticoïdes consistent à aider l'adrénaline et la noradrénaline dans leurs effets vasoconstricteurs au niveau des artéioles de la peau et des reins. Ils favorisent aussi les fonctions rénales en aidant le tubule contourné distal à réabsorber le sodium et à excréter le potassium. Une autre propriété importante des glucocorticoïdes se manifeste sur le site d'une lésion: en empêchant la formation de tissu fibreux et de mucopolysaccharides dans la matrice du tissu conjonctif, en limitant l'afflux de liquide au niveau de la blessure, et en modérant l'arrivée des globules blancs sur les lieux touchés, le cortisol, et les médicaments analogues, ont une très forte action anti-inflammatoire, très appréciée dans les traitements contre l'arthrite rhumatoïdale, quoique non dépourvue de sérieux inconvénients.

1.1.3 Les rôles cellulaires des glucocorticoïdes.

Au niveau cellulaire, l'effet le plus notable du cortisol est de stabiliser les membranes. Ainsi, la membrane cytoplasmique devient de moins en moins perméable, et la survie cellulaire est favorisée dans des conditions de vie difficiles. En outre, le cortisol renforce la solidité de la membrane des lysosomes. C'est ainsi que la mobilisation du glucose, des acides aminés et des lipides facilite la réparation des cellules et des tissus atteints, pendant que le renforcement de la membrane des lysosomes évite leur destruction.

1.1.4 La pathophysiologie des glucocorticoïdes.

Les travaux que **Hans Selye** a effectués durant les années trente à l'Université de Montréal constituent des études pionnières dans le mécanisme des changements qui surviennent lorsqu'un organisme animal est soumis à des facteurs d'agression physiologiques et psychologiques, ou à des émotions agréables ou désagréables, et qui nécessitent une réponse adaptative très particulière, qu'il a appelé " le *stress*".

Selye fit la découverte du *stress* en 1935 lorsqu'il observa plusieurs changements considérables chez des animaux de laboratoire dont les conditions normales de vie étaient modifiées par différents traitements particuliers, tels des injections d'hormones, d'extraits rénaux, spléniques, hypophysaires ou de substances plus ou moins toxiques. Tous les animaux

présentaient les mêmes changements: le cortex surrénalien était hypertrophié, leurs organes lymphoïdes étaient atrophiés et il y avait même des ulcères gastro-duodénaux. Tous ces changements furent caractérisés sous l'appellation de "syndrome général d'adaptation" , ou SGA, qui est produite par toute forme d'agression prolongée appelée "*stresseur*".

Le SGA est une partie cruciale du mécanisme complexe de défense dont dispose l'organisme, et provoque d'importantes modifications physiologiques et même psychologiques qui se succèdent chronologiquement en plusieurs étapes aux caractéristiques bien définies. Ce sont des modifications qui ont pour but de rendre l'organisme capable de lutter vigoureusement contre la situation stressante. Quant à eux, les stresseurs sont multiples. Ils peuvent être de nature physique (comme le froid ou la chaleur ou le bruit intenses), chimique (comme le tabac ou les autres drogues), biologique (comme l'exercice intense, l'infection) ou même psychique: la solitude, les préoccupations constantes, la douleur, la peur, l'incarcération, les grandes foules... Car les stresseurs ne sont pas les mêmes pour tout le monde, tout dépendant des habitudes de vie de chacun. Dans toutes ces situations d'agression prolongée, la réponse de base est la même: on constate invariablement une augmentation de la sécrétion des glucocorticoïdes; à vrai dire, le terme de stress est même devenu synonyme de situation qui entraîne une sécrétion accrue de cortisol.

Les effets des glucocorticoïdes sont parfaitement adaptés pour faire face

à une situation de stress. Par exemple, un animal est contraint de s'abstenir de manger devant une menace éventuelle, or les changements métaboliques entraînés par le cortisol sont essentiels pour toute survie en état de jeûne. En outre, les acides aminés qui enrichissent le plasma sanguin peuvent fournir de l'énergie supplémentaire, de même qu'une source d'acides aminés permettant une rapide réparation tissulaire dans l'éventualité d'une blessure. Il est du même coup raisonnable de se demander si des augmentations progressives et chroniques du cortisol, qui surviennent durant les situations de stress prolongé offertes par les trépidations de la vie moderne, ne contribueraient-elles pas à la survenue de divers genres de maladies particulières qui accompagnent l'évolution de notre société.

Le concept actuel au sujet du stress est presque identique à celui de Selye, quoique le mécanisme d'action peut maintenant être expliqué jusque dans ses moindres détails. Les mécanismes neuro-physiologiques impliqués dans le contrôle de la sécrétion des glucocorticoïdes sont de mieux en mieux connus (Figure 1.2), surtout à cause de l'explosion des connaissances scientifiques et technologiques qu'a connu la recherche dans les domaines de la physiologie, et surtout, de la génétique moléculaire, depuis la découverte de la structure de la molécule d'ADN par Watson & Crick, en 1953.

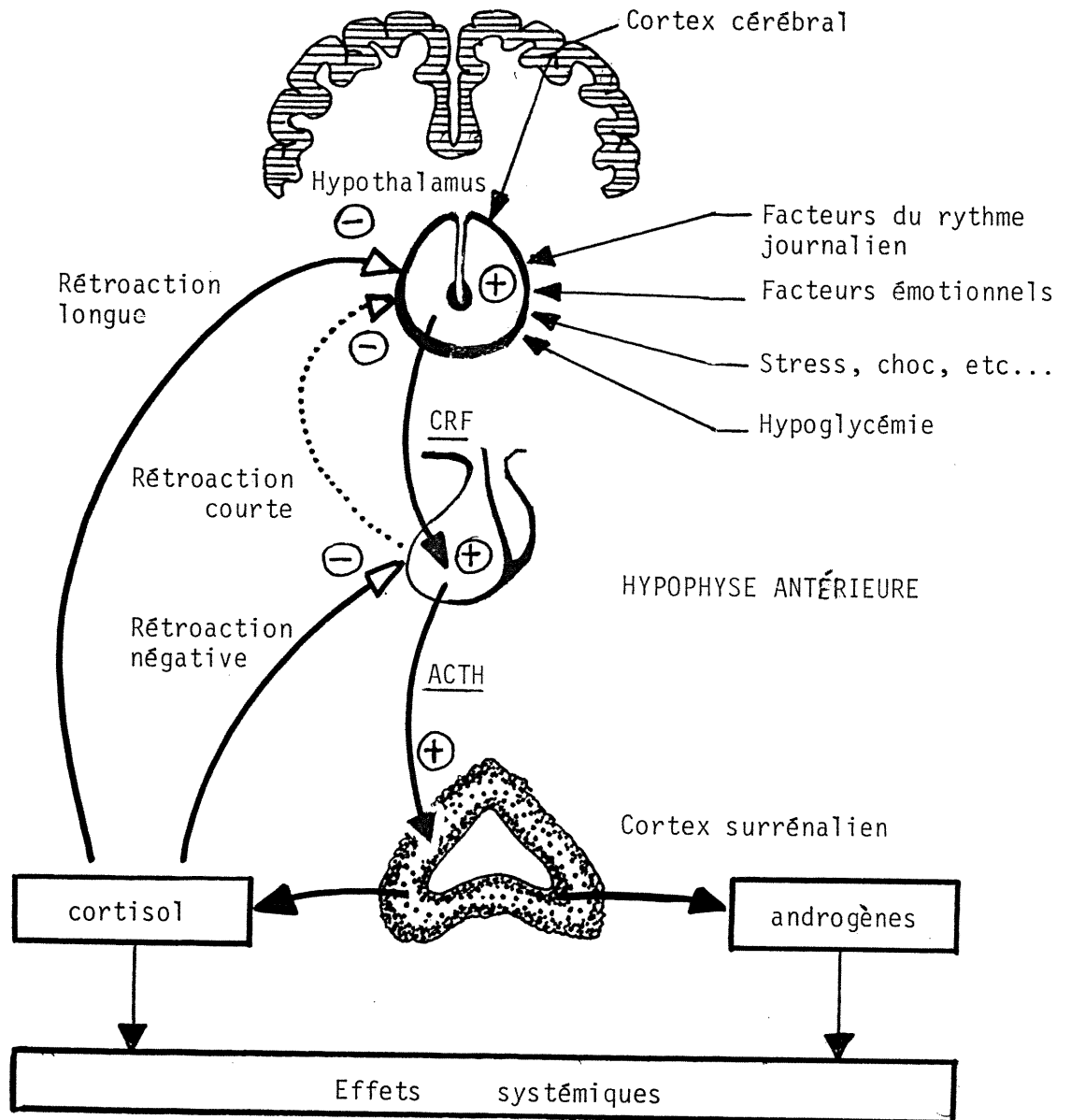


Figure 1.2 La régulation systémique des glucocorticoïdes.

- La sécrétion de cortisol est régulée par l'hypothalamus, lequel exerce un contrôle sur l'hypophyse antérieure par le biais du CRF, favorisant la sécrétion d'ACTH.
- L'ACTH stimule la sécrétion des glucocorticoïdes, accroissant ainsi la concentration sanguine de cortisol. Ce dernier agit en retour sur l'adénohypophyse, pour réduire la libération d'ACTH. C'est le principe de la rétroaction (*feedback*) négative.
- Le cortisol agit sur l'hypothalamus pour inhiber la sécrétion de CRF (rétroaction longue)
- L'ACTH exerce un effet inhibiteur sur la sécrétion de CRF (rétroaction courte).

1.2 L'importance du contrôle de l'expression génétique.

Au niveau de l'organisme biologique tout entier, les mécanismes permettant le contrôle des fonctions vitales sont très diversifiés. Par exemple, le système de rétroaction négative, qui caractérise si bien la régulation de la sécrétion du cortisol par la corticotrophine (ACTH), est essentiel pour permettre à un animal de s'adapter à une situation de stress. A l'échelle cellulaire, les processus biochimiques permettant la vie sont gouvernés principalement par l'information génétique codée dans la molécule d'ADN située dans le noyau. La coordination parfaite de l'expression de gènes particuliers, que ce soit à un temps donné lors de l'ontogenèse ou en réponse à un stimulus quelconque, est un phénomène qui dépend de plusieurs mécanismes moléculaires complexes et subtils, qui ont été retenus par le vivant au cours de l'évolution, et qui sont essentiels à la survie de tous les organismes. On sait maintenant que cette coordination peut être exercée à plusieurs étapes de l'expression d'un gène donné.

1.2.1 Les niveaux de contrôle de l'expression génétique.

La plus grande partie de la régulation génétique chez les eucaryotes supérieurs comme chez les procaryotes se produit au niveau de la transcription. Cependant, on ne peut négliger le contrôle de l'expression génétique à d'autres niveaux. La littérature fournit beaucoup d'explications sur les événements se

produisant durant les étapes précoces (comme l'initiation de la transcription au niveau de l'ADN, la relaxation de la chromatine) et durant les étapes tardives de l'expression génétique, comme la stabilité des protéines ou leur modification post-traductionnelle. Cependant, il reste beaucoup de choses à apprendre sur l'existence fugace des molécules d'ARN messenger (ARN*m*) qui assurent les étapes de transition entre le code génétique et la protéine exprimée. Cette existence débute par les modifications post-transcriptionnelles qui assurent la production d'une molécule mature pouvant effectuer son rôle dans le cytoplasme, et elle se poursuit par les événements entourant la biosynthèse des protéines, jusqu'à la dégradation de ce messenger. Cette existence peut elle aussi être régulée de diverses façons, et un même gène peut être régulé par toutes sortes de combinaisons entre ces différents mécanismes. Ainsi, l'expression du gène de la protéine *hsp70* se régule au niveau transcriptionnel et au niveau traductionnel (Theodorakis & Morimoto, 1987). Notons également que la présence de groupements méthyl au niveau de certaines bases azotées de la molécule d'ADN peut contribuer au contrôle de l'expression génétique: en général, l'ADN des gènes inactifs a tendance à être plus méthylé que celui des gènes plus actifs (Naveh-Many, 1981). De même, les segments de génome qui correspondent à des séquences promotrices sont souvent retrouvés au niveau des sites hypersensibles à l'enzyme ADNase I, à cause de leur grande accessibilité (Alberts et al., 1989).

1.2.1.1 Le contrôle au niveau transcriptionnel.

La transcription du gène est la toute première étape de son expression, et ce niveau constitue le mode majeur et souvent unique de la régulation génétique (Lewin, 1990). C'est à ce niveau que plusieurs investigateurs trouvent les meilleurs éléments de réponse pour expliquer la tissu-spécificité de l'expression de certains gènes (Therrien & Drouin, 1993). Chez les eucaryotes, un gène typique de classe II (transcrit en ARNm) possède des séquences codantes pour un polypeptide donné. Elles sont flanquées de séquences non-codantes, ou intergéniques. Ce sont les régions flanquantes situées en 5' qui contiennent de courtes séquences reconnues par les protéines régulatrices intervenant dans l'expression ou l'extinction des gènes. On y retrouve notamment le promoteur et autres éléments de régulation, tels les enhancers, les silencers ou les divers sites spécifiques pour la liaison de bon nombre de facteurs transcriptionnels, incluant les récepteurs stéroïdiens. L'interaction résultante entre toutes ces protéines ainsi liées à l'ADN favoriserait plusieurs événements ultérieurs, dont l'expression ou l'extinction des gènes.

Plusieurs hypothèses ont été formulées pour proposer un mécanisme moléculaire de l'activation du départ de la transcription au niveau de l'ADN (Ptashne et al., 1988). Plusieurs résultats expérimentaux proposent que les protéines activatrices contactent, directement ou indirectement, les composantes du complexe d'initiation de la transcription, et même l'ARN

polymerase (Liao et al., 1991, Koleske et al., 1992, Mc Ewan et al, 1994). C'est ainsi qu'un contact protéine-protéine expliquerait l'effet positionnel de certains sites activateurs lorsqu'ils sont placés à proximité d'un promoteur (Takahashi et al., 1986). On a aussi proposé que ces contacts protéine-protéine favoriseraient le déroulement de la chromatine (Su et al., 1991, Su et al., 1991b). C'est l'hypothèse du *DNA-looping*. On sait aussi que la liaison des facteurs transcriptionnels modifie la topologie locale de la molécule d'ADN sur leur site de liaison (Kerppola & Curran, 1991, Wasylyk, 1988). L'hypothèse la plus retenue est que certains facteurs seraient impliqués pour recruter les différents facteurs de transcription de base à proximité du promoteur lors de l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription, ou CIT (Carey, 1991). En plus de pouvoir recruter les protéines du CIT de façon directe, il a été proposé que certains activateurs pourraient encourager ce recrutement de façon indirecte : ici, l'activateur contacterait une même cible qui, à son tour, recruterait les facteurs transcriptionnels faisant partie du CIT. En outre, plusieurs groupes ont observé qu'une surabondance d'activateurs peut mener à une diminution de l'activité transcriptionnelle. C'est le phénomène de *squelching*, attribué à la titration, ou enlèvement, des facteurs essentiels à la formation du CIT (Martin et al., 1990, Martinez et al., 1991). Il faut également noter l'existence du phénomène de *synergisme*: l'activation observée avec plusieurs activateurs travaillant ensemble est plus forte que la somme de l'effet

engendré par chacun des activateurs pris séparément (Lin et al., 1990, Schüle et al., 1988, Therrien & Drouin, 1991, Pascal & Tjian, 1991, Cserjesi et al., 1992).

Un même gène peut avoir un choix de promoteurs qui peuvent être utilisés à tour de rôle, le tout dépendant des conditions physiologiques de la cellule. On parle alors de promoteurs alternatifs (figure 1.3). L'utilisation de sites alternatifs pour le départ de la transcription permet la production de deux ou plusieurs formes d'ARN m de longueurs différentes, à partir d'un seul gène. Dans le cas où le transcrit allongé possède un codon de départ de la traduction (AUG) qui possède le même cadre de lecture que celui de l'espèce la plus courte, on aura deux versions de la même protéine, qui diffèrent dans leur région amino. Plusieurs investigateurs ont rapporté les conséquences biologiques considérables de cette extension du domaine amino (Beltzer et al., 1988, Chrétien et al., 1988, Kwiatkowski et al., 1988, Barbosa, 1988). Plus récemment, des expériences de localisation de sites hypersensibles à l'ADNaseI dans le gène du récepteur des estrogènes humains a permis de découvrir que ce gène peut être transcrit à partir de deux promoteurs distincts (Keaveney et al., 1991, Grandien et al., 1993).

Dans d'autres cas, l'utilisation de promoteurs alternatifs permet l'utilisation différentielle de toute une panoplie de régions 5' non-traduites en amont du codon AUG. La transcription de plusieurs proto-oncogènes (Bentley, 1986,

Propst et al., 1987, Seto et al., 1988) et de plusieurs autres gènes (Perlino et al., 1987, Stanley et al., 1985, de Thé et al., 1988, Zelent et al., 1991) peut alterner entre deux promoteurs; l'un produisant une forme allongée de l'ARN m avec une longue séquence 5' non-traduite de forme souvent compliquée, et un autre transcrit beaucoup plus court dont le cadre de lecture diffère de celui de l'autre, ce qui produit deux protéines différentes, aux rôles tout aussi différents. La production d'une protéine particulière peut être favorisée par rapport à l'autre, selon le promoteur utilisé, le tout dépendant des conditions de vie de la cellule.

1.2.1.2 Le contrôle au niveau post-traductionnel.

Il existe des phénomènes de régulation qui se produisent durant les étapes les plus tardives de l'expression d'un gène particulier, c'est-à-dire au niveau de la protéine elle-même. La phosphorylation ou la méthylation sont parmi les modifications post-traductionnelles les mieux connues (Hershey, 1991 et refs.). Ainsi, plusieurs protéines ne sont actives que dans leur forme phosphorylée, et les événements conduisant à l'activation des protéine-kinases caractérisent les mécanismes de la transduction intracellulaire, qui sont généralement déclenchés par diverses interactions entre une hormone et son récepteur. Par exemple, l'hyperphosphorylation du domaine d'activation de l'onco-protéine *c-jun* expliquerait l'augmentation de son activité (Karin et al., 1991). D'autres investigateurs proposent que c'est la déphosphorylation qui

favoriserait l'activité de plusieurs protéines, incluant certains facteurs transcriptionnels. En fait, la phosphorylation ou la déphosphorylation de plusieurs composantes de l'appareil traductionnel constitue un mécanisme important dans le contrôle de la synthèse des protéines, dans son ensemble. Une grande quantité de phosphoprotéines ont été identifiées, dont au moins une douzaine de sous-unités de facteurs d'initiation de la traduction, plusieurs facteurs d'élongation, plusieurs riboprotéines et amino-acyl t-RNA synthétases. Dans certains cas, la phosphorylation entraîne une augmentation de l'activité du facteur traductionnel comme c'est le cas chez le facteur eIF-4F (Morley et al., 1991), dans d'autres cas, elle peut entraîner une diminution de l'activité d'un autre facteur, comme eIF-2 (Merrick, 1992 et réfs). La phosphorylation du facteur d'initiation eIF-2 est un des mécanismes de répression de la traduction les mieux caractérisés chez les cellules de mammifères (Duncan, 1987, Hershey, 1991).

Plusieurs protéines peuvent aussi être régulées par la présence ou l'absence de molécules plus simples. Ainsi, certains récepteurs, tel le récepteur des glucocorticoïdes, est auto-régulé de façon négative par la présence de son ligand (Dong et al., 1988 et réfs). En fait, les récepteurs de plusieurs neurotransmetteurs et d'hormones sont régulés par leurs ligands respectifs. Par exemple, il fut démontré (Poste & Crooke, 1985) que l'insuline diminue la demi-vie de son propre récepteur, ce qui contribue à sa rétroaction négative.

1.2.1.3. Le contrôle au niveau post-transcriptionnel.

La transformation d'un transcrit primaire (ARN hn) en une molécule d'ARN m fonctionnelle se produit en plusieurs étapes dont chacune peut faire l'objet de mécanismes de contrôle.

Les modifications majeures comprennent la pose de la coiffe en 5' (Shatkin, 1976), la polyadénylation en 3', et l'épissage (Breathnach & Chambon, 1981). Le passage de la molécule mature au cytoplasme peut lui aussi faire l'objet d'un contrôle serré. La demi-vie de la molécule d'ARN m peut également être régulée au niveau des étapes de la traduction proprement dite, ou par sa dégradation pure et simple. Il existe en effet des mécanismes qui régulent la stabilité de l'ARN m . La présence de courtes séquences sensibles ou résistantes à l'action des nucléases peuvent contrôler le *turnover* de l'ARN m , et furent identifiées chez les procaryotes et les eucaryotes (Brawerman, 1987).

La découverte des introns et des exons fut un événement capital dans l'évolution des connaissances en génétique moléculaire (Breathnach & Chambon, 1981). Une molécule d'ARN m mature se constitue lorsque son précurseur, de taille généralement plus grande (L'ARN hn), subit une série de modifications qui se caractérisent par l'enlèvement de certaines séquences particulières, les introns. Les séquences restantes, ou exons, sont mis bout à bout pour constituer le messager définitif. Ce phénomène d'épissage (*RNA splicing*) est très répandu, et il existe des mécanismes par lesquels certains

exons sont retenus préférentiellement par rapport à d'autres.

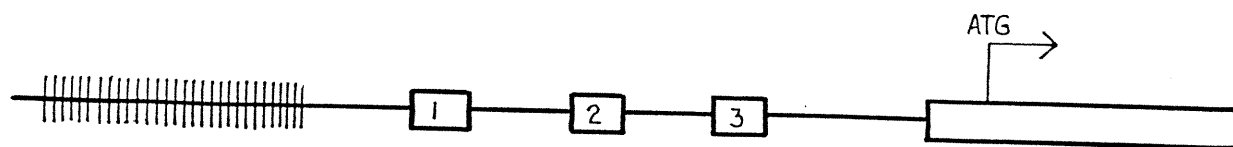
Ainsi, la nature modulaire des gènes permet l'existence du phénomène d'épissage alternatif (*alternate RNA splicing*), qui possède d'importantes conséquences sur l'expression de plusieurs gènes eucaryotes (Breitbart et al., 1987). Par exemple, c'est ce phénomène qui permet l'obtention de deux formes du récepteur des glucocorticoïdes, la forme alpha et la forme beta, chez l'humain. Ces deux protéines diffèrent dans leur région carboxy terminale (Hollenberg et al., 1985). Ainsi, plusieurs formes fonctionnelles différentes d'un même ARNm peuvent être produites.

De même, l'absence d'épissage (*default RNA splicing*) peut considérablement interférer avec l'expression d'un gène donné, par la synthèse d'une protéine modifiée possédant soit des séquences superflues d'acides aminés pouvant interférer avec le repliement correct de la protéine, ou soit un premier codon AUG ne se situant pas dans le même cadre de lecture que celui de la protéine fonctionnelle. Une variation sur ce thème existe chez la drosophile: le transcrit primaire d'un gène impliqué dans l'ontogenèse devient fonctionnel par le biais de l'enlèvement de tous les introns, ou bien, il peut rester non-fonctionnel par la rétention temporaire d'une partie d'un de ses introns (Boggs et al., 1987, Laski et al., 1986). On parle alors d'épissage incomplet (*aberrant RNA splicing*).

Chez l'oursin de mer, les ARNm maternels non-traduits font également

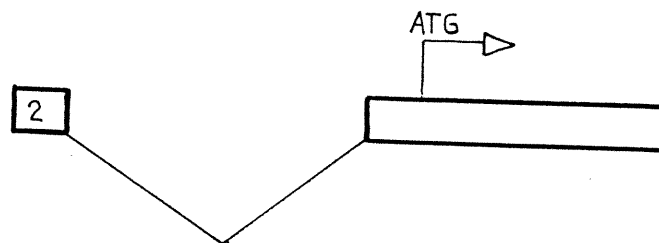
l'objet d'une régulation similaire (Ruzdijic & Pederson, 1987), tout comme le gène *Krüppel* chez la drosophile: ici, l'intron sujet à la régulation est situé près de la partie 5' du messenger et contient sept codons AUG en amont du cadre de lecture de la protéine. Une telle profusion de codons de départ dans différents cadres de lecture expliquerait la répression de la synthèse d'une protéine fonctionnelle (Gaul et al., 1987).

De même, dans le cas du récepteur des glucocorticoïdes de souris, un épissage incomplet du deuxième exon provoque la synthèse d'un récepteur tronqué dans sa partie amino. Un tel mutant, nommé ntⁱ, possède un codon de départ situé au début du troisième exon (met 406), étant heureusement positionné dans le même cadre de lecture que le premier codon AUG du messenger complet et fonctionnel. Ceci résulte en l'expression d'un récepteur pouvant se lier à son ligand et à l'ADN, mais éprouvant des difficultés au niveau de sa capacité de transactivation (Dieken et al., 1990 , Miesfeld et al., 1992).

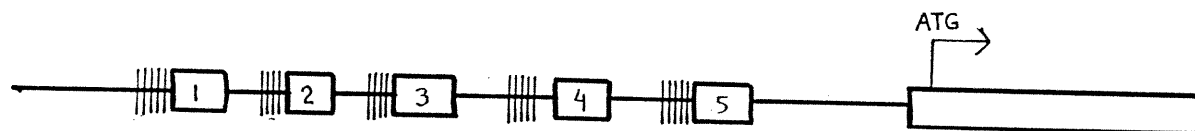
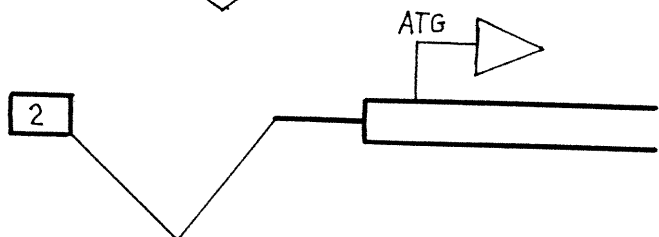


Un seul promoteur en amont d'un choix d'exons 5' UTR.

Épissage alternatif



Épissage incomplet



Chaque promoteur possède son propre exon 5' UTR.

Utilisation de promoteurs alternatifs

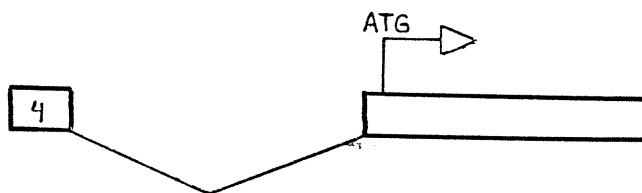


Figure 1.3 Épissage alternatif et Promoteurs alternatifs.

- Figure du haut : Un épissage **alternatif** permet la transcription d'un exon distinct parmi plusieurs séquences génomiques d'exons putatifs.
Plus bas : épissage **incomplet** : un transcrit primaire peut bénéficier d'une extension de sa région 5' non-traduite par la rétention d'un intron.
- Figure du bas : Le choix d'un promoteur particulier permet la transcription d'un exon distinct qui lui est directement associé.

1.2.1.4 Le contrôle au niveau traductionnel.

La synthèse des protéines, aussi appelée traduction, est la partie centrale du chemin d'expression des gènes, et représente aussi une voie importante dans les mécanismes qui servent à ajuster minutieusement les quantités de produits génétiques disponibles pour le fonctionnement cellulaire. La synthèse protéique est une grande consommatrice d'énergie, et ceci implique que son contrôle doit être intégré dans l'activité métabolique générale de la cellule (Hershey, 1991).

C'est au niveau de l'initiation de la traduction que ce contrôle s'exerce principalement. Une revue générale des éléments impliqués dans le contrôle traductionnel est tout-à-fait appropriée, à ce stade, pour l'interprétation ultérieure des résultats obtenus au cours de ce projet de recherche.

1.2.2 Les éléments du contrôle traductionnel.

Plusieurs éléments agissant en *cis* et en *trans* au niveau de la molécule d'ARN m sont impliqués dans le contrôle de la traduction.

1.2.2.1 Éléments agissant en *cis* sur l'ARN m .

Une cible importante pour le contrôle de la traduction est l'attachement de la molécule d'ARN m au ribosome, et les éléments agissant en *cis* impliqués dans cet attachement sont la coiffe, la région non-traduite en 3' , et surtout les séquences et les structures secondaires situées dans la région 5' non-traduite.

1.2.2.1.1 L'effet de la coiffe.

La présence d'une coiffe située à l'extrémité terminale en 5' (m⁷GpppN) constitue un trait commun à la plupart des ARNm eucaryotiques (Shatkin, 1976). La pose de la coiffe est une modification post-transcriptionnelle effectuée sur le transcrit primaire, et est catalysée par des enzymes nucléaires, les guanylyl- et méthyltransférases. Il fut même découvert que plusieurs virus possèdent les gènes codant pour la fabrication de ces enzymes.

C'est une réaction durant laquelle la 7-méthylguanosine se condense dans la direction 5'-5' plutôt que dans la direction 5'-3'. Elle sert au transfert du noyau au cytoplasme, à stabiliser la molécule d'ARNm dans le noyau (Green, 1983) et dans le cytoplasme (Furuichi et al., 1977), vu que les exonucléases ne peuvent reconnaître cette structure, et surtout, elle sert à faciliter l'attachement au ribosome. Le facteur d'initiation eIF-4F peut reconnaître la coiffe afin de permettre à la sous-unité 40S du ribosome de se fixer à l'ARNm (Merrick, 1992, 1994 et refs).

1.2.2.1.2 Les effets de la région 3' non-traduite.

Cette région est caractérisée par la présence de séquences de polyadénylation qui permettent à l'enzyme poly-A polymérase d'ajouter une structure particulière: une longue chaîne de résidus d'adénine, le poly (A), à l'extrémité 3' de l'ARNm. Une des principales fonctions de cette queue de poly(A) est d'augmenter la stabilité de la molécule d'ARNm (Bernstein & Ross, 1989).

Il existe également les protéines se liant spécifiquement et de façon très stable à la queue de poly A, appelées *Poly(A) Binding Proteins* (PABP). Une fois que ces protéines se détachent, la dégradation du poly(A) s'effectue rapidement, pour se poursuivre par le reste de la molécule d'ARN m , et ce dans la direction 3'-5' (Schéma 1.4).

De plus, la région 3' non-traduite de plusieurs ARN m possède des copies multiples d'un motif riche en A et U, dont la séquence consensus est UAUUUUAU (Caput et al., 1986, Wilson & Treisman, 1988), et qui confèrent une diminution de la stabilité de l'ARN m (Shaw & Kamen, 1986) par la suite du transfert des PABP de l'extrémité de poly(A) à ces séquences plus internes (Bernstein & Ross, 1989).

L'introduction de ces séquences dans un ARN m stable comme celui de la globine en diminue de beaucoup la stabilité (Shaw & Kamen, 1986). Toutefois, il a été démontré que pour que la séquence AU-riche puisse permettre la dégradation du messenger, il faut que l'ARN m soit tout d'abord traduit (Kruys et al., 1989, Sachs, 1993).

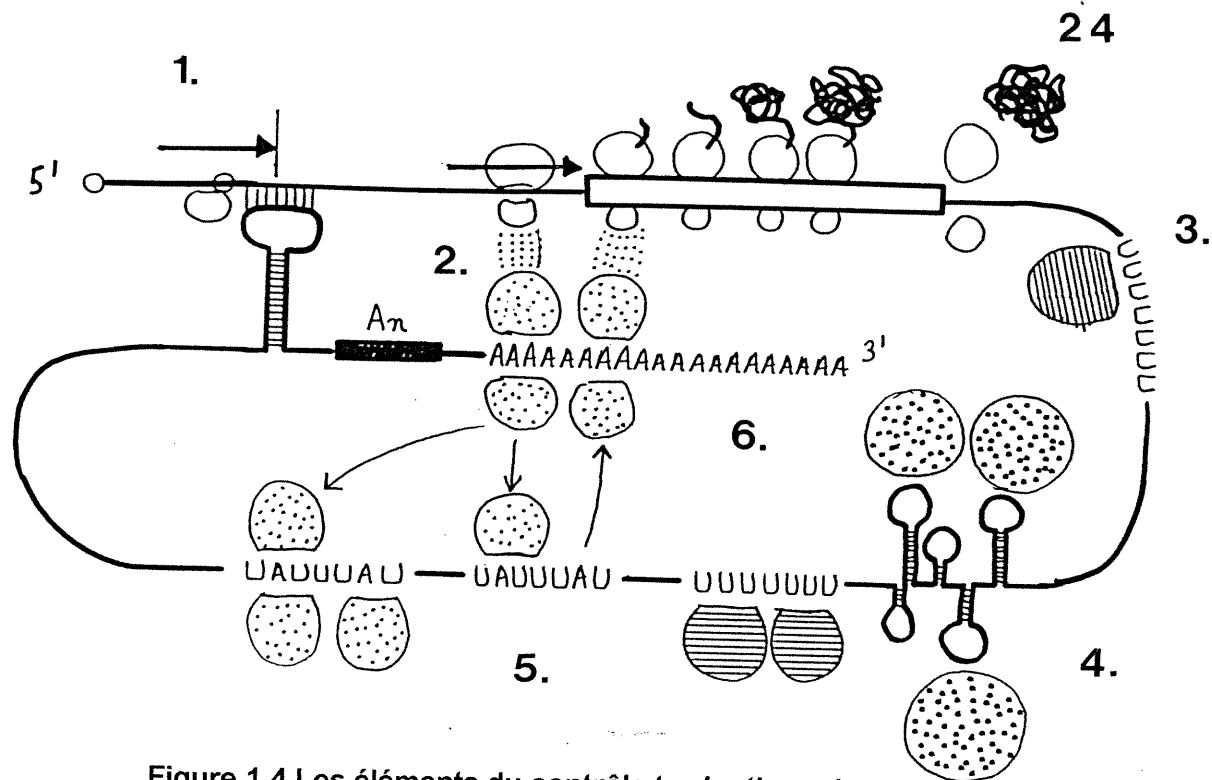


Figure 1.4 Les éléments du contrôle traductionnel dans la région 3' non-traduite.

De 5' à 3' :

1. Des structures secondaires situées en aval de l'ARN *m* peuvent s'apparier avec la région 5' non-traduite, et bloquer le balayage de la sous-unité 40S du ribosome.
2. Les poly(A)-binding proteins peuvent, dans une certaine mesure, interagir positivement avec le ribosome lors du processus de la traduction.
3. Les séquences de poly(U) sont reconnues par des protéines de stabilisation.
4. Certaines séquences situées en 3' peuvent former des structures secondaires liant des protéines de régulation.
5. Les séquences riches en A et U diminuent la stabilité de l'ARN *m*, en appauvrissant la queue de poly(A) de ses protéines de stabilisation.
6. La queue de poly(A) et les protéines qui y sont associées protègent l'ARN *m* d'une dégradation trop rapide par les exonucléases.

Plusieurs équipes ont mis en évidence le fait que certaines séquences AU riches peuvent lier des protéines cytoplasmiques et nucléaires. Il existerait deux classes de ces protéines (Sachs, 1993): celles qui se lient aussi bien aux séquences poly(U) que les séquences AU-riches, et d'autres qui ne reconnaissent que certaines séquences AU-riches particulières. Cela permet à la cellule de réguler différemment la dégradation de certains ARNm codant pour une protéine particulière, et de favoriser la stabilité de l'ARNm d'un autre type de protéine. Ainsi, la dégradation des ARNm codant pour certaines lymphokines peut se produire à une vitesse différente de ceux de certains proto-oncogènes. Donc, la région 3' non-traduite peut jouer un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes par le biais de certaines protéines particulières qui reconnaissent des séquences-cibles (Standardt & Jackson, 1994).

En outre, des études effectuées avec l'ARNm de la zeine microinjectée dans des oocytes de xénope montrent qu'un ARNm déadénylé est traduit avec 50% moins d'efficacité qu'une forme polyadénylée (Galili et al., 1988), ce qui suggère que la queue de poly(A) joue un rôle dans le contrôle de la traduction de l'ARNm (Jackson & Standardt, 1990). On propose que la queue de poly(A) permet une interaction avec les séquences 5' non-traduites, ce qui favoriserait l'attachement des ribosomes à l'ARNm. On pense aussi que l'absence du poly(A) puisse réduire le taux d'attachement des deux sous-unités du ribosome,

ce qui réduirait l'efficacité de la traduction (Munroe & Jacobson, 1990). Cela suggère que le poly(A) couvert de PABP agirait comme un facteur actif en *trans* sur le ribosome lors du début de la traduction, ce qui suppose un repliement de la molécule d'ARN m pour faire contact avec le ribosome situé à l'autre extrémité de la molécule (Jackson & Standart, 1990, 1994). Certaines exceptions se retrouvent lors de l'ontogenèse chez les oocytes de xénope, ainsi, les ARN m des histones deviennent déadénylés à mesure que leur taux de traduction augmente (Ballantine et al., 1985). D'une manière générale, il existe un rapport entre l'activation de la traduction et le fait qu'un ARN m soit polyadénylé (Vassalli et al., 1989).

Il existe d'autres modèles pour expliquer le rôle de l'extrémité 3' non-traduite dans la régulation de l'expression des gènes, et une des structures les plus étudiées dans la molécule d'ARN consiste en une formation en épingle à cheveux. Dans l'environnement cellulaire, les molécules d'ARN sont rarement linéaires. Elles sont plutôt repliées sur elles-mêmes, et il est fréquent que plusieurs régions linéaires puissent s'hybrider et former une double-hélice dont la taille dépend de l'homologie entre les deux régions ainsi appariées. Ces structures prennent alors une forme qui ressemble à une épingle à cheveux (*hairpin structure*) qui peuvent contenir des sites de reconnaissance pour certains facteurs stabilisants ou déstabilisants qui sont actifs en *trans*. Un bel exemple est illustré dans l'étude de la régulation du récepteur de la transferrine.

Le fer est un élément indispensable à la survie de la cellule, mais sa toxicité fait en sorte qu'il soit soumis à un contrôle serré de sa concentration intracellulaire. Le récepteur de la transferrine permet d'internaliser le fer déjà lié à la transferrine dans le plasma, et de relâcher le fer dans le milieu intracellulaire pour ensuite être séquestré par la ferritine. Dans des situations de carence en fer, il est important que la membrane cellulaire s'enrichisse en récepteur de la transferrine, et la traduction accrue de ce récepteur est permise par la stabilisation de son ARNm (Mullner & Kuhn, 1988). Cette stabilisation est possible à cause de la liaison d'une protéine cytoplasmique de 87 kd (Basilion, 1994) qui se lie dans une région située en 3' et contenant cinq structures en épingle à cheveux (Koeller et al., 1989). Cette protéine est facile à isoler (Rouault et al., 1989), et elle peut prendre une conformation particulière lorsque les réserves de fer intracellulaire sont déplétées, et se lier à des séquences particulières d'ARN appelées IRE (pour *Iron-Responsive Elements*). Les IRE sont situés au niveau des boucles, lesquelles sont également présentes dans tout une variété de messagers, comme celui de la ferritine, de l'aconitase mitochondriale, et de la 5-ALA synthétase des érythrocytes (Basilion et al., 1994), impliqué dans la biosynthèse de l'hème. Ainsi, la présence ou l'absence de cette protéine se liant spécifiquement aux IRE (appelée *IRE-Binding Protein*, ou IRE-BP) constitue le commutateur responsable de la régulation traductionnelle du récepteur de la transferrine et

joue donc un rôle-clé dans la vie cellulaire.

Les épingles à cheveux peuvent aussi constituer des cibles de choix pour certaines exonucléases. Un bon exemple est fourni par le contrôle de l'expression des histones. La plupart des ARNm des histones sont rapidement et sélectivement dégradés à partir de l'extrémité 3' (Ross & Kobs, 1986) quand la synthèse de l'ADN est inhibée (Peltz & Ross, 1987). Or, on retrouve une épingle à cheveux dans la partie 3' non-traduite du messager des histones (Levine et al., 1987), et le positionnement artificiel de cette épingle à cheveux dans la partie 3' non-traduite du gène de l'alpha-globine permet à cette dernière d'être régulée de la même façon que les histones (Pandey & Marzluff, 1987).

Plusieurs cas de complémentarité entre la région 3' non-traduite et la région 5' non-traduite d'un même messager ont été documentés dans les systèmes bactériens (Bram et al., 1980, Carter-Muenchau et al., 1989, Petersen, 1989), et un tel événement a été rapporté chez les systèmes eucaryotes (Spéna et al., 1985). Des essais utilisant des cellules animales en culture ont également démontré la probabilité de tels appariements de longue portée (Kozak, 1990) dans leur rôle inhibiteur sur la traduction, et une telle inhibition dans ce cas particulier semble dépendre de la composition du milieu de culture et de la position exacte de la structure secondaire responsable de ce genre d'interaction.

1.2.2.1.3 Les effets de la région 5' non-traduite.

L'étape limitante de la traduction du messenger se produit habituellement lors de l'initiation du processus de synthèse des protéines, c'est pourquoi on y retrouve un grand nombre d'éléments de contrôle.

Au niveau de la région 5' non-traduite, ce sont: la longueur de cette région proprement dite, la présence de sites de liaison à des protéines, la présence de structures secondaires en amont ou en aval du codon initiateur AUG, la position de ce codon (c'est-à-dire s'il est le tout premier codon AUG dans cette région), la nature des nucléotides flanquant ce codon initiateur comparativement à la séquence consensus de Kozak, et la présence de courts cadres de lecture ouverts (sORF).

L'effet de tous ces éléments sur le processus d'initiation est souvent additif, et le mécanisme peut être expliqué par l'hypothèse généralement admise de l'attachement du ribosome à son ARNm. Les sous-unités 40S des ribosomes qui doivent traduire un message opèrent généralement par un processus de balayage (*scanning*) de l'ARNm en commençant par la coiffe (Kozak, 1994, 1992, 1989, 1978). Elles migrent linéairement le long de la molécule, dans une seule direction, i.e. de 5' à 3', sans arrêter, ni reculer (Kozak, 1995), jusqu'à rencontrer le *premier* codon AUG, situé dans un contexte favorable, pour se joindre à la grande sous-unité 60S et former un ribosome entier (schéma 1.5) pouvant synthétiser le premier lien peptidique.

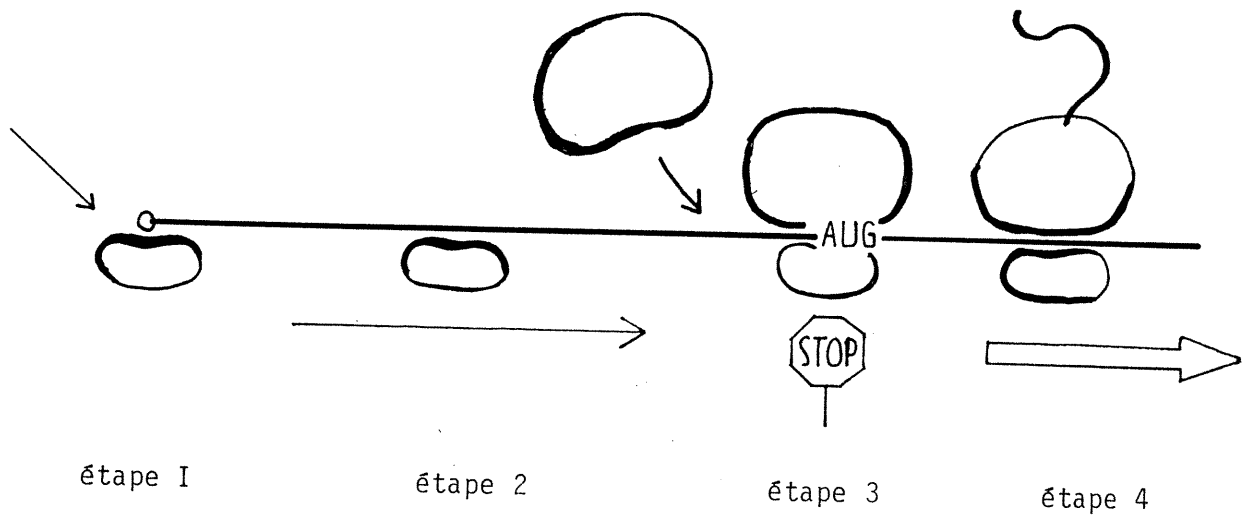


Figure 1.5 L'hypothèse du balayage (*scanning*) de l'ARNm.

1. Attachement de la sous-unité 40 S à la coiffe.
2. Migration linéaire le long de la molécule d'ARNm
3. Arrêt (*pause*) de la migration et assemblage du ribosome complet et fonctionnel
4. Synthèse de la protéine.

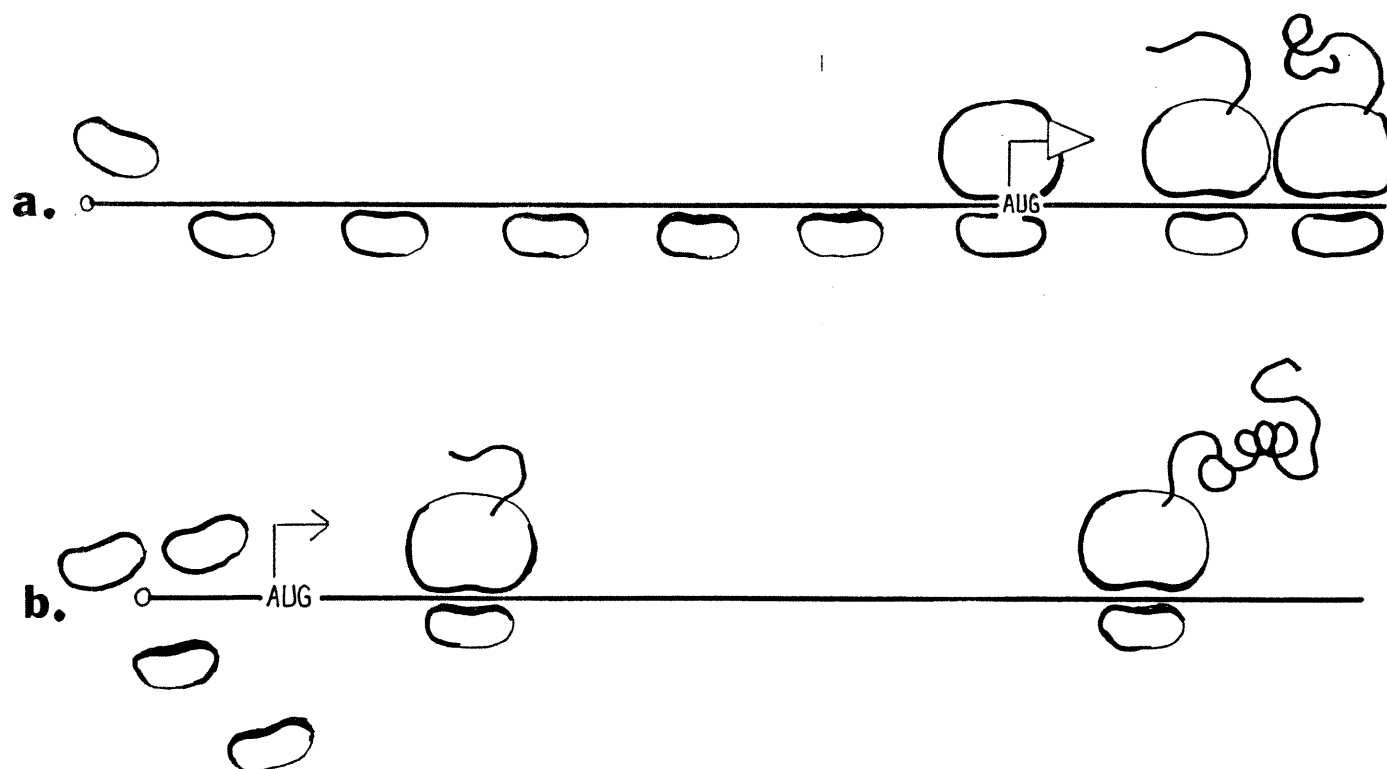
Il existe plusieurs événements connexes à cette hypothèse de base, comme le balayage incomplet (*leaky scanning*) ou la réinitiation, qui se produisent à cause de la nature même de la région 5' non-traduite et des structures particulières qui pourraient s'y trouver. Dans tous les systèmes bactériens et dans certains systèmes viraux, cependant, il existe un mécanisme d'initiation interne (Pelletier & Sonenberg, 1988) afin de permettre l'accès au site de départ de la traduction sans commencer par la coiffe. Plusieurs (Yang & Sarnow, 1997, Stein et al., 1998) ont rapporté que des séquences particulières, appelées IRES, pour *Internal Ribosome Entry Sites*, permettent une interaction entre l'ARN m et certaines protéines cytoplasmiques, ce qui favoriserait un mécanisme encore obscur d'initiation interne au niveau des cellules eucaryotes (Makrides, 1999).

1.2.2.1.3.1 L'influence de la longueur.

La longueur constitue un premier élément structural de la région 5' non-traduite pouvant déterminer l'efficacité d'un messager et avoir une influence sur le balayage effectué par la petite sous-unité du ribosome (Kozak, 1994, 1991, 1988, 1987), illustré au schéma 1.6. La reconnaissance du premier codon d'initiation par la sous-unité 40S devient une tâche difficile quand ce codon est positionné trop près de la coiffe, c'est-à-dire à 12 nucléotides de cette dernière (Kozak, 1991). Plusieurs investigateurs ont également remarqué de mauvais taux de traduction lorsque la séquence 5' non-traduite est trop courte

(van der Heuvel et al., 1989, Sedman et al., 1990). Un allongement de la région 5' non-traduite au-delà de 20 nucléotides a permis de constater une augmentation significative de l'efficacité de la traduction (Kozak, 1991), à la condition que ces séquences ne contiennent pas un taux élevé de résidus C et G pouvant constituer des structures secondaires assez stables pour empêcher le balayage (Kozak, 1991). En fait, les messagers de la plupart des vertébrés possèdent des régions 5' non-traduites dont la longueur moyenne est de 90 nucléotides (Kozak, 1987). À l'heure actuelle, aucune séquence spécifique d'ARN m pouvant constituer un site de liaison à des facteurs ubiquitaires favorisant la traduction n'a été découverte (Kozak, 1994), ce qui suppose qu'une région 5' non-traduite de bonne longueur permettrait plutôt aux sous-unités 40S de s'aligner les unes à la suite des autres sur toute la longueur du messenger à traduire par le biais d'un recrutement précoce (Kozak, 1991). Donc, une région 5' non-traduite de plus en plus courte ne contiendrait pas autant de ribosomes en attente qu'une région plus allongée. Cet allongement peut augmenter considérablement l'efficacité de la traduction *in vitro* (Kozak, 1991) ainsi que *in vivo*, quoique dans certaines conditions de croissance bien particulières (Kozak, 1988). Des études récentes effectuées sur la région 5' non-traduite d'un messenger très efficace (celui de la globine) confirment que l'excellent taux de traduction de cet ARN m s'explique par la présence d'une région 5' non-traduite de bonne longueur (54 nucléotides), avec une coiffe et

très peu de séquences pouvant permettre la formation de structures secondaires (Kozak, 1994). Le fait que ces séquences d'ARN*m* ont été incorporées dans des vecteurs d'expression (Annweiler et al., 1991, Krieg & Melton, 1984, Needham et al., 1992) témoigne de leur efficacité dans la régulation positive de la traduction.



**Figure 1.6 . Les éléments du contrôle traductionnel dans la région 5' non-traduite:
L'influence de la longueur.**

Schéma du haut : Une région 5' non-traduite longue favorise
l'accumulation des sous-unités 40 S.

Schéma du bas : Une région 5' non-traduite trop courte ne permet pas un
bon taux de traduction.

1.2.2.1.3.2 L'influence de sites de liaison.

La présence éventuelle de sites de liaison particuliers à des protéines dans la région 5' non-traduite constitue un sujet de recherche très en vogue (McGarry & Lindquist, 1985, Sleat et al., 1988, Schöffl et al., 1989, Dolph et al., 1990, Schafer et al., 1990, Falcone & Andrews, 1991, Lee et al., 1991, Dix et al., 1992, Gallie & Walbot, 1992, Kaspar et al., 1992 et bien d'autres). En dépit de bien des attentes, personne n'a encore identifié de séquences d'ARN m ubiquitaires et conservées (comme des "enhancers traductionnels") qui favoriseraient la liaison de divers facteurs actifs en *trans* dont l'action de modulation positive sur la traduction pourrait se comparer à celle des facteurs transcriptionnels chez les eucaryotes.

Il existe cependant des séquences particulières retrouvées au niveau de la région 5' non-traduite de certains ARN m qui favorisent le contrôle post-transcriptionnel de l'expression de certains gènes. Une de ces séquences est encore le IRE (*Iron Responsive Element*) retrouvé au niveau des régions 3' non-traduites de l'ARN m du récepteur de la transferrine, et aussi au niveau de la région 5' non-traduite de la ferritine (schéma 1.7). La ferritine est une protéine pouvant séquestrer le fer dans les cellules de mammifères, et la synthèse de cette molécule est régulée par la disponibilité en fer (Klausner & Harford, 1989). Cette régulation est effectuée par le répresseur IRE-BP, une protéine de 90kd qui se lie à des séquences IRE situés dans une épingle à

cheveux localisée dans la partie 5' non-traduite du messenger de la ferritine et située à 10 nucléotides de la coiffe (Wang et al., 1990). Si la séquence est éloignée de la coiffe, on perd progressivement la régulation (Melefors & Hentze, 1993). La séquence liée est une région monocaténaire située au sommet de la boucle, de motif **CAGUGN**, de même qu'un résidu de cytosine sur la tige de l'épingle. Quand les niveaux de fer sont faibles, la IRE-BP se trouve dans la forme réduite et peut lier aux IRE et provoquer un encombrement stérique sur la région 5' non-traduite du messenger de la ferritine, pour inhiber la traduction de cette dernière. Quand le fer est abondant, la forme oxydée de la protéine IRE-BP se dissocie du messenger et ce dernier peut être traduit afin de produire la protéine pouvant séquestrer le fer et lui enlever la toxicité qui le caractérise lorsqu'il se trouve en trop grande concentration (Haile et al., 1989, Barton et al., 1990, Rouault et al., 1991, Constable et al., 1992).

D'autres séquences de nucléotides situés près de la coiffe et qui semblent lier des protéines sont retrouvées dans les ARNm de certaines protéines de la famille Mst87F, retrouvées dans les spermatocytes de *Drosophila melanogaster*. Il s'agit d'une série conservée de 12 nucléotides situés à 28 nucléotides de la coiffe (Schäfer et al., 1990, 1993). La régulation de la traduction de ces protéines est perdue si on bouge cette séquence plus en aval.

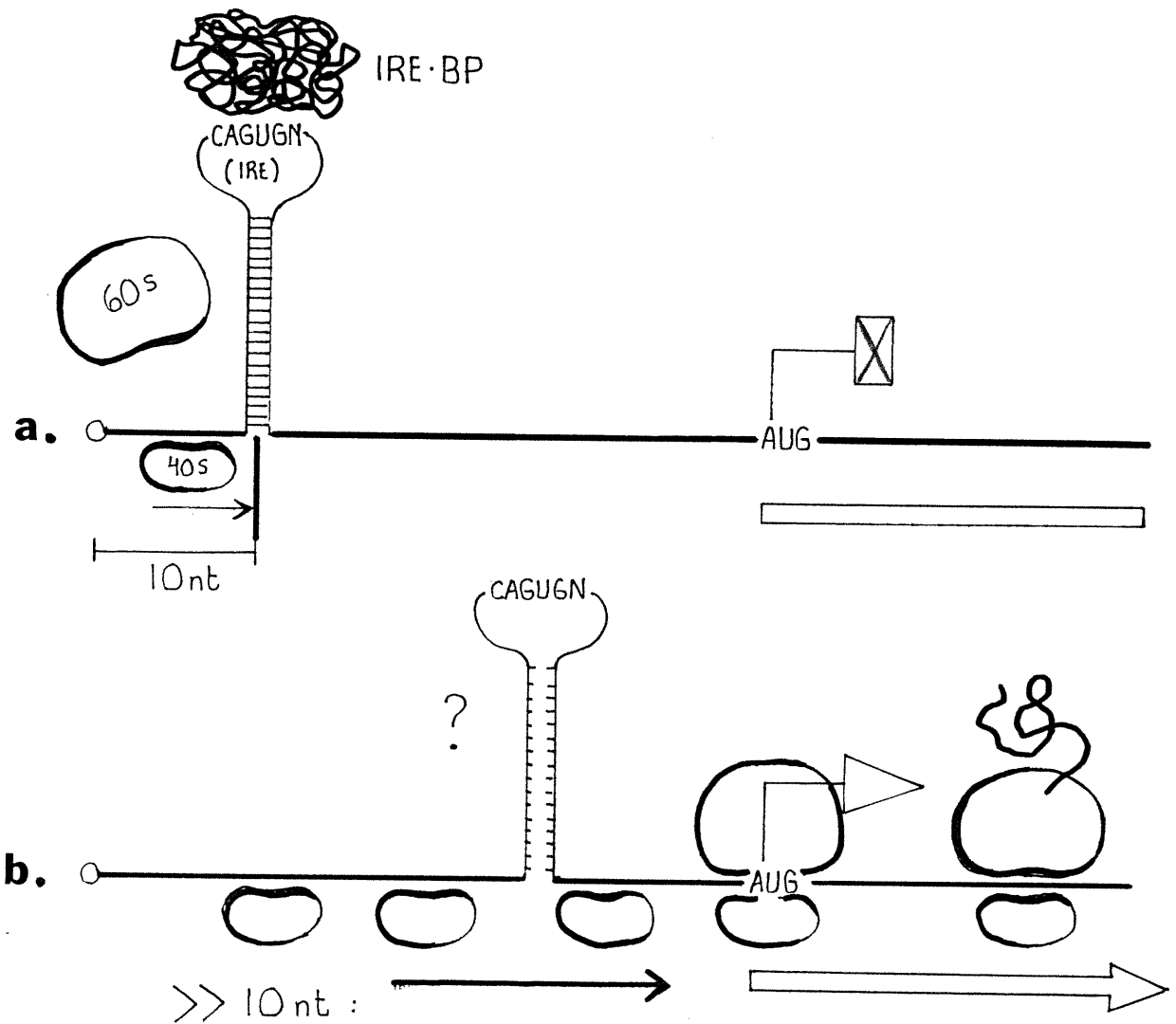
Un autre effet de position est retrouvé au niveau de motifs situés dans la

région 5' non-traduite de l'ARN m des protéines ribosomales chez les vertébrés. Ce motif consiste en une suite de 7 à 13 résidus de pyrimidines situés immédiatement en aval de la coiffe. Plusieurs autres ARN m possèdent cette séquence (Levy et al., 1991, Kaspar et al., 1992, Loreni et al., 1993).

L'ARN m de la thymidilate synthétase est autorégulé par la liaison de cette protéine sur une séquence particulière de 35 nucléotides très riche en C et G située autour du codon AUG. La régulation de la traduction est perdue si on mute le codon AUG et trois résidus situés immédiatement en amont (Chu et al., 1993). On pense que la protéine reconnaît une structure secondaire. Un mécanisme similaire a été proposé dans le contrôle des *poly(A) binding proteins* au niveau des séquences de poly-A situées dans une région 5' non-traduite de ces protéines (Lefrère et al., 1990). L'autorégulation est donc un mécanisme de contrôle de la traduction qui est fréquemment rencontré.

Un autre système particulier consiste au rôle de certaines protéines rétrovirales sur des sites de liaison situés au niveau de la région 5' non-traduite de certains ARN m produits par HIV. Les progrès considérables de la recherche entreprise au sujet de l'agent étiologique du SIDA ont permis la découverte de deux petites protéines régulatrices, appelées *tat* et *rev*, qui sont essentielles à la réplication virale dans les cellules en culture (Cullen & Greene, 1989). Ces protéines virales effectuent la régulation de l'expression de HIV par le biais de plusieurs mécanismes dont la reconnaissance de séquences cibles sur l'ARN m .

Tous les transcrits de HIV-1 possèdent une structure en épingle à cheveux de 59 nucléotides, appelée *élément tar*, située très près de la coiffe. L'élément *tar* peut lier la protéine *tat* (Dingwall, 1989), et favoriser le taux de transcription des ARNm viraux (Sharp & Marciniak, 1989, Cullen, 1990). Cette protéine est donc un activateur de la transcription, et on obtient une grande quantité de transcrit viral pleine grandeur (revu par Cullen, 1990). Une autre protéine, appelée *rev*, peut se lier à une séquence particulière appelée RRE (*Rev Response Element*) situé sur plusieurs transcrits de HIV pour en réguler l'expression au niveau post-transcriptionnel (Heaphy et al., 1990). Tous ces mécanismes sont impliqués dans le contrôle des protéines devant être exprimées à des étapes particulières du cycle de vie de HIV.



**Figure 1.7 . Les éléments du contrôle traductionnel dans la région 5' non-traduite:
L'influence des sites de liaison.**

Schéma du haut : Un site de liaison situé près de la coiffe possède un effet inhibiteur sur le taux de traduction du messager.

Schéma du bas : Si on déplace le site de liaison, on perd la régulation.

1.2.2.1.3.3 L'influence des structures secondaires.

Les structures secondaires se trouvant dans la région 5' non-traduite jouent un rôle régulateur très important que les travaux de Marilyn Kozak ont bien mis en évidence (Kozak, 1988, 1989, 1990, 1991, 1994). En plus de constituer le siège principal des séquences reconnues par des protéines comme la IRE-BP (Klausner, 1989) ou des endonucléases, ces structures secondaires possèdent la capacité de raccourcir la structure primaire de la région 5' non-traduite et rapprocher ainsi la coiffe du premier codon AUG, et peuvent également constituer des obstacles pour l'attachement ou le processus de balayage du ribosome le long de la molécule (schéma 1.8). Plusieurs observateurs ont rapporté que la traduction de plusieurs ARNm est inhibée lorsqu'une structure secondaire, un hybride ARN-ADN ou un hybride avec un ARN antisens sont introduits près de l'extrémité d'un messager sans barrer le codon de départ AUG ni la coiffe (Crum et al., 1988, Harr et al., 1985, Kozak, 1986). Il ne fait aucun doute que de telles barrières encombrant le messager et peuvent interrompre le balayage. Les études de Marilyn Kozak sur ce sujet furent effectuées avec des modifications artificielles du messager de la préproinsuline de rat comme modèle, et ont permis d'apporter plusieurs explications. L'introduction d'une structure secondaire dans la région 5' non-traduite de l'ARN peut avoir un impact sur la traduction, tout dépendant de la stabilité et de la position de cette structure. Si une structure très stable est

introduite, elle inhibera toute traduction à une étape très hâtive lors du processus d'initiation, et ce, peu importe sa position dans le messager. D'une manière générale, les structures secondaires introduites entre la coiffe et le premier codon AUG ne facilitent pas la traduction. Une structure vraiment inhibitrice doit avoir une énergie libre de -60 Kcal/mol ou plus selon les calculs de Gibbs. Par contre, une structure plus labile, ayant une énergie libre de -30 Kcal/mol ou moins, pourra inhiber la traduction seulement si elle est placée à une très faible distance de la coiffe, comme une dizaine de nucléotides. Ce phénomène s'explique à cause du fait que la structure secondaire est trop massive pour permettre à la sous-unité 40S de s'engager sur le messager, et cela confirme que la plupart des ribosomes dans la cellule doivent commencer leur balayage à partir de la coiffe et non à partir d'un site d'attachement interne comme chez certains virus (Sonenberg et al., 1989). Si une structure secondaire labile est placée à une plus grande distance de la coiffe, comme à une cinquantaine de nucléotides de cette dernière, il n'y a plus d'inhibition de la traduction. Cela suppose que la sous-unité 40s peut dénaturer ou linéariser les structures secondaires à la condition qu'elle soit bien engagée sur le messager, et ce, même si le codon d'initiation fait partie de la structure en épingle à cheveux. On ne sait pas exactement comment le ribosome peut faire fondre la structure secondaire qui pourrait l'arrêter dans son balayage, mais on suppose que certains facteurs d'initiation pourraient avoir une activité hélicase (Merrick,

1992, 1994).

Contrastant avec l'incapacité de la sous-unité 40S à dénaturer les structures secondaires stables de -60 Kcal/mol, les ribosomes entiers 80S peuvent, dans une certaine mesure, linéariser ces structures. Il est clair, cependant, que les ribosomes ne peuvent pas se détacher de la molécule d'ARN m pour "sauter" par dessus les épingles à cheveux. Dans les systèmes bactériens, par contre, le ribosome peut s'installer sur la molécule d'ARN m à des endroits adjacents au codon AUG plutôt qu'à partir de la coiffe, et éviter les structures secondaires. Une autre notion importante est que la présence d'une structure secondaire facile à dénaturer située en aval d'un codon de départ AUG peut augmenter l'efficacité de la traduction en ralentissant la vitesse de balayage, et en empêchant le ribosome de passer outre le codon d'initiation. Il peut ainsi mieux reconnaître le codon de départ situé légèrement en amont du site de ralentissement offert par la boucle, et une meilleure fidélité en résulte. Le meilleur effet est rencontré lorsque 14 nucléotides séparent la base d'une épingle à cheveux du codon AUG situé en amont, et cette distance correspond justement à la surface d'ARN m recouverte par le ribosome, tel qu'indiqué par des expériences de protection à la ARNase (Kozak, 1992). Des expériences de positionnement artificiel de structures secondaires ont démontré que ces dernières peuvent augmenter substantiellement le taux de traduction à partir de codons AUG cryptiques (Kozak, 1990), et presque tous les ARN m

qui utilisent un codon de départ autre qu'un AUG (comme un CUG) possèdent des séquences 5' non-traduites très riches en C et G, qui permettent un haut degré d'appariement, permettant la formation d'une épingle à cheveux à cet endroit. D'autre part, la présence d'une structure secondaire près de la coiffe peut jouer un rôle régulateur si elle est la cible d'une protéine qui agirait comme activateur de la traduction en déstabilisant la boucle et en laissant ainsi au ribosome tout le champ libre pour reconnaître l'extrémité 5' du messager. En dépit de beaucoup de recherches, il n'existe pas de tels activateurs de l'initiation de la traduction. Les cellules de mammifères contiennent pourtant bel et bien des protéines qui se lient à l'extrémité 5' de messagers viraux (Kozak, 1992 et réfs), mais rien n'indique que ces protéines seraient des activateurs de la traduction.

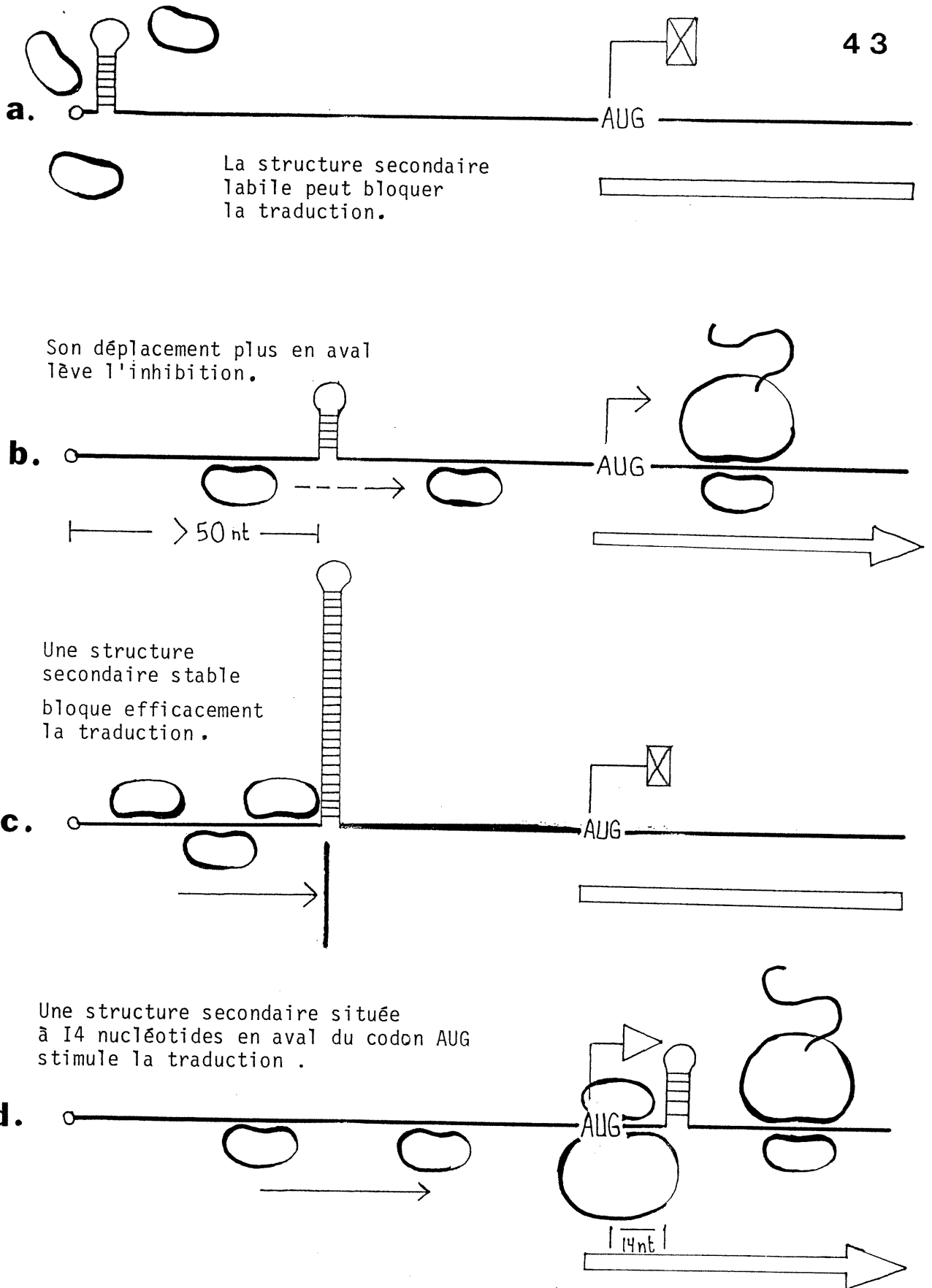


Figure 1.8 . Les éléments du contrôle traductionnel dans la région 5' non-traduite:
L'influence des structures secondaires.

1.2.2.1.3.4 L'influence de la position du codon AUG.

La position du codon d'initiation joue un rôle majeur dans la fidélité du processus de traduction. La haute fidélité du processus de lecture du messager est une notion fondamentale pour la vie cellulaire: les protéines dont la synthèse est mal initiée à cause d'un mauvais choix de codon d'initiation sont soit trop longues, soit tronquées. Plusieurs résultats de recherches démontrent que de telles protéines sont soit instables, mal maturées, ou carrément non-fonctionnelles, ou pire, elles peuvent interférer avec les protéines correctement synthétisées et gêner ces dernières dans leurs fonctions essentielles. La fidélité de la traduction est avant tout déterminée par la position du codon AUG sur la région 5' non-traduite du messager, de même que par la structure primaire qui entoure ce codon. Une structure secondaire située légèrement en aval du codon AUG peut aussi jouer un rôle dans le choix de ce codon, tel que décrit précédemment. Expérimentalement, le rôle de la position d'un codon AUG a été testé par l'introduction artificielle de codons AUG supplémentaires en amont du site de départ de la traduction d'un messager efficacement traduit, celui de la préproinsuline de rat (Kozak, 1989). L'insertion d'un codon de départ efficace dans un cadre de lecture différent de celui normalement utilisé inhibe la traduction de la préproinsuline pour faire place à une protéine différente de poids moléculaire plus élevé et sans fonction. Si le codon AUG est inséré dans le même cadre de lecture, il supprime le

codon indigène, et une version rallongée de la protéine est ainsi synthétisée (Kozak, 1983). Cette expérience démontre l'importance fondamentale de la position du codon de départ: c'est le premier codon qui est utilisé lors de la traduction, à la condition qu'il soit situé dans un contexte favorable. L'initiation ne se fera pas à partir d'un autre codon AUG bien contexté lui aussi mais situé en aval du premier et ce, peu importe si la distance entre les deux est courte ou longue (Kozak, 1995).

1.2.2.1.3.5 L'influence du contexte.

Le contexte entourant le premier codon AUG joue un rôle crucial dans la reconnaissance correcte de ce codon d'initiation par le ribosome. On sait que les structures secondaires peuvent jouer un rôle significatif dans la reconnaissance de ce codon: s'il fait partie intégrante d'une épingle à cheveux de grande stabilité, il ne sera pas reconnu, de même, s'il est situé en amont et à proximité d'une telle structure, le ribosome pourra le reconnaître lors de sa pause forcée, avant de dénaturer l'épingle et entreprendre la traduction à partir de ce point. Rappelons-nous que le postulat fondamental de l'hypothèse de balayage stipule que l'interaction entre la région 5' non-traduite de l'ARN m et un ribosome se produit essentiellement en trois étapes chez les eucaryotes:

Étape 1 : Liaison entre la sous-unité 40S et la coiffe

Étape 2 : Migration linéaire le long de la molécule d'ARN m , de la même façon que le ferait une perle le long d'un fil (*beads on a string*)

Étape 3 : Arrêt au niveau de la position du codon d'initiation, et

liaison de la sous-unité 60S pour former le ribosome entier.

L'observation attentive des régions 5' non-traduites de 699 séquences d'ARNm différents chez les vertébrés (Kozak, 1987) a permis d'établir une séquence-consensus entourant le codon d'initiation, et fut vérifiée expérimentalement pour sa véritable efficacité (Kozak, 1986, 1987, 1989). Une série d'expériences de mutagenèse dirigée de chacun des nucléotides flanquant le site d'initiation de la traduction du messenger de la préproinsuline de rat a permis d'établir une séquence primaire de nucléotides qui constitue un *contexte optimal* pour l'arrêt de la migration du ribosome et le départ de la traduction. Le contexte favorable est :

5' GCCACCAUGG 3'.

C'est la *Séquence-Consensus de Kozak*. Dans cette nomenclature, le A du codon AUG est numéroté +1, et les autres nucléotides sont désignés avec le signe + ou - s'ils sont situés en 3' ou en 5', respectivement. Plusieurs expériences ont prouvé que les contributeurs de premier plan dans l'efficacité de ce consensus sont une *purine* en position - 3 (préféablement un résidu *adénine*), et une *guanine* en position +4. L'effet combiné de ces deux résidus dans le contexte de Kozak ont un effet remarquable sur l'efficacité de la traduction (Kozak, 1989), et il s'avère que ces deux positions sont très conservées dans la plupart des régions 5' non-traduites de la plupart des

eucaryotes. Si on retrouve une pyrimidine en -3, le contexte devient suboptimal, et la présence d'une purine en +4 devient d'une importance capitale pour restaurer l'efficacité du consensus. Si on retrouve une purine en -3, tout nucléotide présent en position +4 possède alors une importance négligeable. En contre-exemple, certains ARNm possèdent des pyrimidines en positions -3 et +4, et sont très mal traduits. Le ribosome peut stopper sa migration linéaire et initier la traduction s'il rencontre le contexte optimal, et ce, sans être affecté par la nature des nucléotides situés plus en aval, comme ceux situés en positions +5 et +6 (Kozak, 1997). C'est de cette façon que le contrôle de l'expression génétique dans les systèmes de mammifères peut être modulé le plus efficacement au niveau de la traduction. Au niveau des autres systèmes, le contrôle est moins efficace, notamment chez les plantes (Kozak, 1989, Jones et al., 1988, Taylor, 1987), les insectes (Feng et al., 1991) et la levure (Altmann et al., 1994, Looman et al., 1993, Slusher et al., 1991).

Quand le ribosome ne reconnaît pas le premier codon d'initiation à cause du fait qu'il se trouve dans un contexte suboptimal, le ribosome continue son processus de balayage afin de s'arrêter au prochain codon AUG qui se trouverait dans un meilleur contexte vis-à-vis les positions -3 et/ou +4, et c'est souvent le deuxième codon AUG à partir de la coiffe qui est choisi dans ces conditions, et plus rarement le troisième. Un tel balayage incomplet (*leaky scanning*) explique pourquoi deux protéines peuvent être produites à partir d'un

seul messenger. Si le premier codon AUG se trouve trop près de la coiffe, c'est le deuxième codon d'initiation qui sera choisi, s'il se trouve dans un contexte optimal (Slusher et al., 1991, Spiropoulou et al., 1993). L'influence positive du contexte est également mise en valeur lorsqu'un codon non-AUG constitue le site de départ, comme les CUG, ACG, UUG ou GUG (Kozak, 1994). Lorsque le ribosome reconnaît un deuxième codon d'initiation, et s'y arrête après avoir sauté le premier, on parle de réinitiation. Ces phénomènes de balayage incomplet et de réinitiation se produisent couramment lorsque la région 5' non-traduite contient plusieurs codons AUG, et constituent les deux façons d'éviter l'application de la Loi du premier codon (*first-AUG rule*) (Kozak 1994). L'importance de l'observation de cette loi est bien illustrée lorsque l'on soumet une séquence de cADN quelconque pour en déduire la structure primaire du polypeptide y correspondant. L'erreur la plus courante est celle de choisir comme codon d'initiation le codon AUG situé au sein du meilleur consensus, alors que le véritable codon d'initiation est souvent situé plus en amont, en 5'. *The rule is not "the best", but "the first" !* (Kozak, 1996).

L'existence de la séquence-consensus de Kozak et de ses conséquences dans le phénomène de la synthèse des protéines sont des réalités propres aux cellules de mammifère, et nous invite à faire un parallèle avec la séquence de Shine-Dalgarno des systèmes procaryotes! Dans ce cas bien particulier, cette séquence (Shine & Dalgarno, 1974) est une séquence-consensus bactérienne

composée de plusieurs purines, avec la séquence **AGGAGG**, retrouvée dans la région 5' non-traduite des ARNm bactériens, située légèrement en amont du codon d'initiation AUG, et complémentaire avec l'extrémité 3' de l'ARNr 16S du ribosome procaryote (Lewin, 1985). Son rôle est d'aider le ribosome à se lier à l'ARNm, car rappelons-nous que le ribosome procaryote peut avoir directement accès au site AUG sans avoir à migrer le long du messager comme chez les eucaryotes. On ne sait pas si la séquence-consensus de Kozak peut interagir avec une composante du ribosome eucaryote lors de l'initiation, mais son efficacité ne fait aucun doute et est exploitée avantageusement dans plusieurs vecteurs d'expression utilisés dans les cellules de mammifères. Il est cependant important de souligner que ce ne sont pas tous les messagers cellulaires qui possèdent une séquence-consensus de Kozak, ce qui pourrait jouer un rôle dans la régulation de la protéine y correspondant.

1.2.2.1.3.6 L'influence des sORFs.

Il peut arriver que des codons d'arrêt de la traduction (UGA, UAG et UAA) soient retrouvés en aval d'un codon de départ, dans une région 5' non-traduite (schéma 1.9). On observe alors la présence de courts cadres de lecture ouverts (ou sORF, *short Open Reading Frames*) en amont du codon d'initiation du gène proprement dit, dont le code génétique est porté par le messager considéré. Si un codon d'arrêt est situé dans le même cadre de lecture que le premier codon de départ, on obtient alors un court cadre de lecture

ouvert en amont de la séquence codante du gène principal portée par le messenger. L'observation des règles proposées par Marilyn Kozak dans ces cas bien précis ouvre une fenêtre intéressante sur un autre moyen d'effectuer la régulation post-transcriptionnelle de certains gènes par le biais de ces séquences.

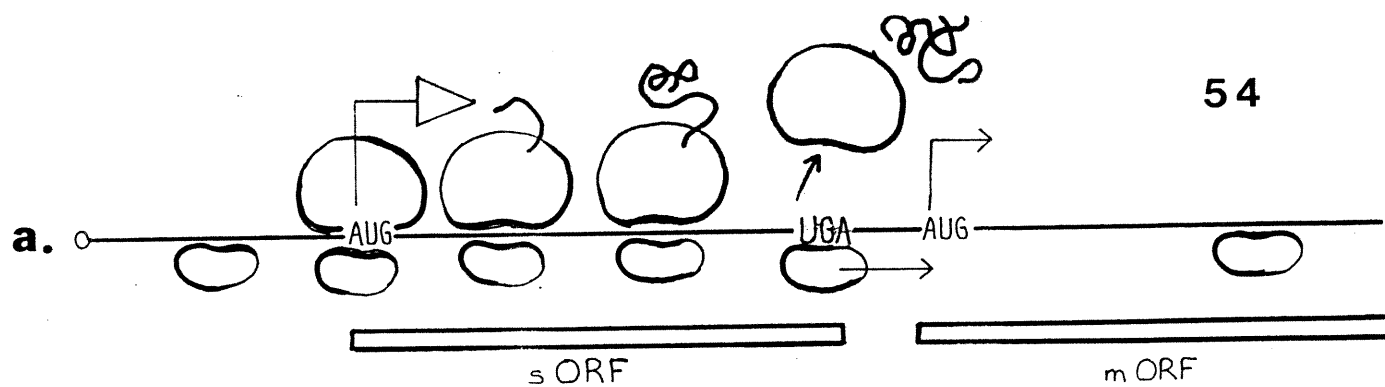
Si la règle du premier codon est observée (ie quand le premier AUG se trouve dans un contexte le moins favorable), presque tous les ribosomes vont initier à cet endroit, pour se dissocier au prochain codon de terminaison situé non loin de là après avoir traduit le sORF et produire une *agnoprotéine*. La sous-unité 60S se détache, et la petite sous-unité 40S demeure attachée au messenger pour poursuivre sa migration et réinitier au prochain codon AUG (Kozak, 1984, 1986, 1987, 1989, 1991, 1994, 1996, 1998). Un corollaire à ce mécanisme est que la réinitiation est un processus souvent inefficace dans la région 5' non-traduite. Elle est possible en autant que le ribosome se trouve dans une région 5' non-traduite (ce qui lui permet de traduire un sORF), mais devient impossible à la suite de la traduction d'une région codante pleine grandeur (Kozak, 1994). De plus, l'utilisation de messagers chimériques de préproinsuline de rat a démontré que l'efficacité de la réinitiation peut être modulée par la distance entre le codon de terminaison d'un sORF et le codon AUG du cadre de lecture ouvert qui se trouve plus loin. En fait, l'efficacité de la réinitiation augmente à mesure que la distance intercistronique augmente.

Lorsque la distance est très courte, il n'y a pas de réinitiation. Lorsque cette distance est de 79 nucléotides ou plus, les ribosomes réinitient avec une plus grande efficacité, et produisent autant de messenger que s'il n'y avait aucun sORF en amont du gène codant (Kozak, 1987). De plus, les mêmes règles concernant l'efficacité d'un contexte favorable à l'initiation de la traduction s'appliquent dans le cas du codon de départ du deuxième cistron, mais, à cause de l'effet de distance, l'efficacité de la réinitiation ne se limite pas au premier codon AUG optimal qui serait situé en aval du sORF. La réinitiation est efficace si le sORF est court (Abastado et al., 1991 Werner et al., 1987, Sedman et al., 1988), et elle peut cependant être bloquée en introduisant une structure secondaire non-labile entre le sORF et la deuxième région codante. Dans la plupart des cas, vu que les distances sont généralement courtes entre un sORF et la deuxième région codante située plus loin, l'inefficacité de la traduction qui en résulte suggère que la présence d'un sORF a pour effet de réduire le taux de traduction du messenger, et apporte un élément de contrôle supplémentaire. C'est un mécanisme qui semble important pour le contrôle de certains gènes impliqués dans le développement (Han et al., 1993, Zelent et al., 1991), la tissu-spécificité (Sergeev et al., 1993) ou la régulation de la réplication (Moustakas et al., 1993) et de la pathogénicité (Petty et al., 1990, Hofmann et al., 1993, Ozawa et al., 1988) de certains virus. Afin d'expliquer pourquoi une grande distance intercistronique est essentielle pour favoriser la

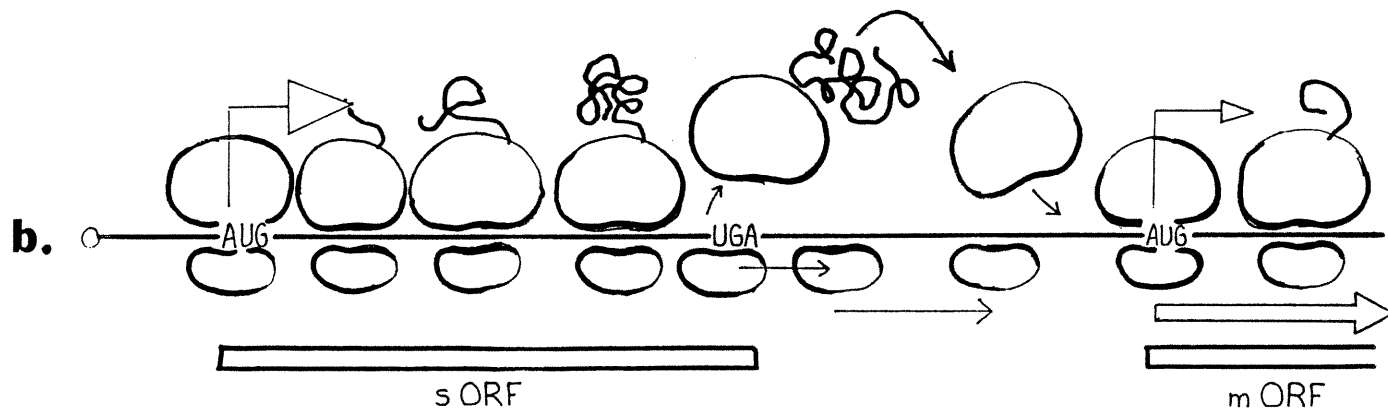
réinitiation, il fut suggéré (Kozak, 1987) que la sous-unité 40S ne peut reconnaître un codon AUG à cause du fait qu'il n'y a pas de résidu méthionine-ARNt_{met} sur le site A de la sous-unité 40S, et qu'une distance de migration assez grande le long de l'ARN_m donnerait assez de temps à la sous-unité de trouver un autre Met-ARNt_{met} et avoir ainsi la compétence de réinitier la traduction.

Chez le gène GCN4 de la levure, il existe un système de régulation génétique qui utilise les mécanismes régissant la réinitiation. Le gène GCN4 code pour un ARN_m possédant quatre sORFs dans sa région 5' non-traduite. Il est présent de façon constitutive dans la cellule, et le produit de sa traduction est un facteur transcriptionnel qui active l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés. Le messenger est traduit uniquement quand la cellule est privée d'acides aminés. Dans ce cas précis, l'accumulation des ARN de transfert non-jumelés à leurs acides aminés respectifs permet l'activation d'une kinase qui phosphoryle et inactive eIF-2 (Dever, 1992), un facteur d'initiation essentiel à la synthèse des protéines. Le mécanisme de contrôle ne s'arrête pas à ce niveau, car les ribosomes, à leur tour, ne commencent que difficilement la synthèse des protéines à partir du premier des nombreux sORF du messenger de GCN4 à cause du manque d'acides aminés et de l'inactivation du facteur eIF-2. Les ribosomes migrent donc le long du messenger, et se rapprochent de plus en plus du cinquième codon AUG à partir de la coiffe.

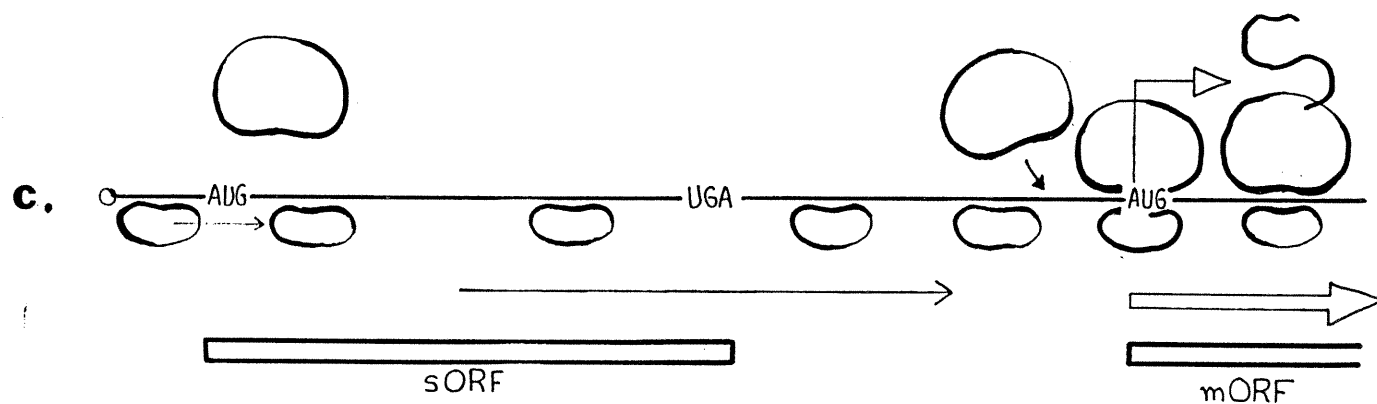
Pendant tout ce temps, au moins un ribosome peut trouver un Met-ARN^t_{met} pour devenir compétent et initier la synthèse de GCN4, qui activera les gènes impliqués dans les voies métaboliques de la synthèse *de novo* des acides aminés manquants. Dans le cas d'une abondance d'acides aminés, les sORF en amont de la région codante de GCN4 sont efficacement traduits, et virtuellement aucun ribosome ne peut atteindre le cinquième AUG, étant donné que les chances de réinitiation s'amenuisent au fur et à mesure de la migration le long d'un messenger. Le contrôle de la synthèse de la protéine GCN4 se fait donc au niveau de l'initiation de la traduction, et peut être intimement relié à la quantité d'acides aminés se trouvant dans la cellule (Hinnebusch, 1990).



Une distance trop courte entre le sORF et le mORF inhibe l'efficacité de la traduction.



Un allongement de la distance favorise la réinitiation du ribosome.



Une distance trop courte entre la coiffe et le début du sORF ne permet pas la traduction de l'agnoprotéine, et favorise la traduction du mORF.

**Figure 1.9 . Les éléments du contrôle traductionnel dans la région 5' non-traduite:
L'influence des sORF.**

1.2.2.2 Éléments agissant en *trans* sur l'ARN*m*.

1.2.2.2.1 Les facteurs traductionnels.

Le principal élément régulateur de la traduction consiste en la disponibilité des facteurs d'initiation qui permettent la formation d'un complexe ternaire et d'un ARN*m* activé (Merrick, 1992). Les éléments actifs en *trans* peuvent se dissocier facilement de l'ARN*m*, et consistent en plusieurs facteurs agissant durant les étapes de l'initiation, de l'élongation et de la terminaison de la traduction. L'utilisation des facteurs purifiés et des systèmes artificiels reconstitués, a permis de comprendre ce processus (Henshaw et al., 1971, Pain & Clemens, 1983, Merrick, 1992, 1994). Par exemple, l'initiation, première étape dans la synthèse des protéines, se déroule en quatre étapes, et on y retrouve plusieurs facteurs actifs en *trans*, et soumis à des contrôles très serrés par le processus de phosphorylation. De même, un facteur d'initiation bien particulier, eIF-4E, est un proto-oncogène: il joue un rôle important dans la régulation de la prolifération cellulaire. Il coopère directement avec deux oncogènes immortalisants, E1A et *v-myc*, en induisant la transformation de cellules fibroblastiques d'embryon de souris (Sonenberg et al., 1992). On pense aussi que eIF-4E est complémentaire à la voie d'activation du proto-oncogène *ras*, puisque son activité est grandement augmentée dans les cellules surexprimant eIF-4E (Sonenberg et al., 1992). On peut donc penser que la

dérégulation de l'activité de plusieurs facteurs d'initiation (comme eIF-4B ou eIF-2) ou l'inhibition de leur phosphorylation résulte en une transformation aiguë des cellules. La connaissance des phénomènes de prolifération et de différenciation cellulaires au cours de l'ontogenèse nous permet d'obtenir une meilleure compréhension des effets combinés de la phosphorylation des différents facteurs d'initiation de la traduction et de l'augmentation de la traduction spécifique des ARNm (Sonenberg et al., 1993).

1.2.2.2 La *gymnastique* du ribosome.

Un survol des différents mécanismes du contrôle de la traduction ne pourrait être complet si on omettait de mentionner que le ribosome entier est lui-même capable de diverses prouesses lorsqu'il s'engage dans la lecture d'un message. C'est pourquoi la séquence d'une protéine ne peut pas toujours être déduite d'après la simple observation de la structure primaire de son ARNm correspondant. La recherche sur la gymnastique du ribosome a permis la découverte de plusieurs mécanismes qui nous invitent à qualifier le ribosome lui-même d'élément actif en *trans* sur un message.

Il faut noter, toutefois, que toutes ces études ont été réalisées *in vitro*, avec des systèmes de traduction artificiels de lysats de réticulocytes, et la plupart des modèles étudiés sont des systèmes bactériens ou viraux. Il faut également noter que les événements entourant la gymnastique du ribosome se

produisent quand ce dernier effectue la lecture de la région *codante*.

1.2.2.2.1 Les *sauts* du ribosome.

Ce phénomène se produit lorsque la paire codon-anticodon se déstabilise et permet au ribosome de glisser le long de l'ARN*m*. Cet événement n'a rien à voir avec la migration de la sous-unité 40S lors de l'initiation. Puis, un nouvel appariement codon-anticodon s'effectue, et la traduction se poursuit. On obtient ainsi une protéine beaucoup plus petite que ce qui est attendu s'il n'y avait pas eu de tels sauts. Si le réengagement du ribosome s'effectue dans un cadre de lecture différent, une protéine totalement différente à ce qui est attendu d'après la structure primaire est obtenue. Un tel changement de cadre de lecture est nommé **frameshifting**.

Un saut requiert un site de départ et un site d'arrivée plus en aval. Il peut également y avoir superposition des deux sites, comme dans la séquence GUGUA. Un autre élément de ce système consiste en la nature du polypeptide naissant. Cet élément accroché au ribosome peut permettre à ce dernier d'avoir une conformation particulière et effectuer un saut. C'est le mécanisme qui a été proposé dans l'autorégulation de la tubuline.

Le mécanisme d'autorégulation de la synthèse de la beta-tubuline illustre comment le ribosome, ainsi que le produit de la traduction, peuvent agir comme éléments de régulation agissant en *trans* sur l'ARN*m* (Cleveland, 1988). La beta-tubuline peut former un hétérodimère avec l'alpha-tubuline, et il

existe un équilibre entre les monomères de tubuline libre et celle qui est polymérisée dans les microtubules. La stabilité de l'ARN m de la beta-tubuline est régulée par la concentration d'hétérodimères libres. À mesure que la beta-tubuline nouvellement synthétisée émerge du ribosome, le tetrapeptide naissant possède une structure particulière (Yen et al., 1988) qui attire un monomère d'alpha-tubuline, ou un facteur cellulaire non-identifié (Theodorakis & Cleveland, 1992). Puis, une liaison s'effectue. Cette liaison active une ARNase qui se situe dans le ribosome, et l'ARN m de la beta-tubuline est alors dégradé. Cet événement se produit seulement si la concentration d'hétérodimères libres est élevée, et si l'ARN m est traduit. Dans le cas inverse, il ne se produit aucune liaison au niveau du polypeptide naissant, et l'ARN m demeure intact. Ce mécanisme d'auto-régulation n'est peut-être pas unique à la tubuline, et comme il a été démontré que la déstabilisation de l'ARN m requiert une translocation du ribosome (Gay et al., 1989), il fut suggéré que la présence du polypeptide naissant aide le ribosome à effectuer des sauts sur l'ARN m , ce qui nuirait au processus traductionnel (Atkins et al., 1990).

1.2.2.2.2 Le *frameshifting*.

Cet événement se produit quand il existe un changement du cadre de lecture, et la plupart de ces changements surviennent lorsqu'il y a un glissement très bref de l'ARN t sur le messenger. Cela se produit à cause de la présence de séquences très particulières, comme A AAA AAC, U UUU UUA, et G GGA

ACC chez les rétrovirus. Une séquence qui favorise particulièrement les frameshifts est A AAA AAG. Il faut noter aussi que ces séquences glissantes ne suffisent pas pour expliquer les incidences élevées de changement de cadre de lecture. Des séquences adjacentes ou même des structures secondaires peuvent favoriser le glissement, surtout chez les rétrovirus. Dans d'autres systèmes viraux, un repliement de la molécule d'ARN m pour favoriser une interaction ARN-ARN entre certaines séquences situées en 3' et une structure secondaire située près d'une séquence glissante constitue un autre élément peu usuel favorisant le frameshifting. Un tel pseudonoeud est chose courante chez certains rétrovirus. Une délétion des séquences situées en 3' réduit beaucoup les événements de frameshifting dans un tel système. Notons aussi que lorsqu'un ribosome rencontre un codon d'arrêt peu de temps après avoir changé de cadre de lecture, une protéine tronquée est synthétisée, ce qui constitue une autre conséquence du frameshifting.

1.2.2.2.3 Le *readthrough*.

Cet événement se produit lorsque le ribosome ne reconnaît pas un codon d'arrêt de la traduction, et se résulte en la fabrication d'une protéine considérablement plus grande. Ces protéines allongées sont fonctionnelles dans bien des cas, notamment dans certains systèmes viraux où le produit d'un *readthrough* est impliqué dans la virulence (Ishikawa et al., 1986). Les événements de *frameshifting* et de *readthrough* ont des effets sur le produit de

la traduction qui ressemblent beaucoup aux effets de l'utilisation de promoteurs alternatifs ou d'épissage différentiel, car dans ces cas, une ou plusieurs protéines différentes sont obtenues à partir d'un même messager. Les systèmes viraux semblent moins privilégier l'épissage alternatif que les cellules eucaryotes, sauf pour quelques exceptions, comme le virus SV-40.

1.3 Le Récepteur des Glucocorticoïdes (GR) comme modèle de régulation post-transcriptionnelle

Plusieurs protéines cytoplasmiques ont pour rôle de se lier aux hormones stéroïdiennes. Ces récepteurs constituent en fait une famille de facteurs transcriptionnels qui partagent plusieurs caractéristiques communes, y compris la capacité d'interagir directement avec l'ADN. Pour ce faire, il faut tout d'abord que la protéine puisse être activée par le biais d'une liaison spécifique avec le stéroïde approprié, pour ensuite atteindre le noyau cellulaire où s'exercera une liaison avec une partie du matériel génétique qui s'y trouve. Cette interaction aura pour conséquence la synthèse de différents ARNm et de plusieurs protéines qui modifieront les fonctions cellulaires en réponse à la présence de l'hormone.

1.3.1 Le GR est un facteur transcriptionnel.

Les recherches qui furent entreprises sur le Récepteur des Glucocorticoïdes (GR) depuis plus de vingt-cinq ans (Gustafsson et al., 1987) ont beaucoup contribué à l'avancement des connaissances au sujet des récepteurs nucléaires et des facteurs transcriptionnels. On sait aujourd'hui que le GR est une protéine de 90-95 Kd, comportant 780 acides aminés et trois groupements phosphates, qui joue un rôle de premier plan dans le maintien de la vie cellulaire par le biais de sa capacité à se lier à l'ADN du noyau. Chez

l'être humain, tout comme chez le rat, le GR est un récepteur hormonal qui partage beaucoup de points communs avec les facteurs de transcription, même au niveau de sa structure chimique (Giguère et al., 1986, Zong et al., 1990, Encio & Detera-Wadleigh, 1991).

Le GR possède trois domaines modulaires: le domaine *central* est un domaine de liaison à l'ADN, pour lier une séquence spécifique, et est flanqué d'un domaine de *transactivation* situé à l'extrémité amino qui lui permet d'interagir avec d'autres facteurs transcriptionnels, et d'un domaine de *liaison au ligand* situé à l'extrémité C-terminale (Figure 1.10). Cette modularité est également représentée au niveau génétique: on sait que les différents domaines fonctionnels du GR sont codés par des exons distincts dans le gène de cette molécule (Jacobson 1991, Encio & Detera-Wadleigh, 1991, Strähle et al., 1992). Au point de vue purement comparatif, les récepteurs nucléaires ont été subdivisés en six régions (A à F) sur la base de l'homologie que l'on retrouve entre les structures primaires de ces molécules (Figure 1.10). Des études de mutagenèse définissent les régions C et E responsables de la liaison à l'ADN et au ligand, respectivement (Evans, 1988, Green & Chambon, 1988). Les régions A et B contiennent un domaine de transactivation qui peut être tissu-spécifique ou même promoteur-spécifique (Tora et al., 1988, Tasset et al., 1990), une fonction activatrice est associée à la région E, et les rôles des régions D et F restent encore à élucider (Zelent et al., 1991).

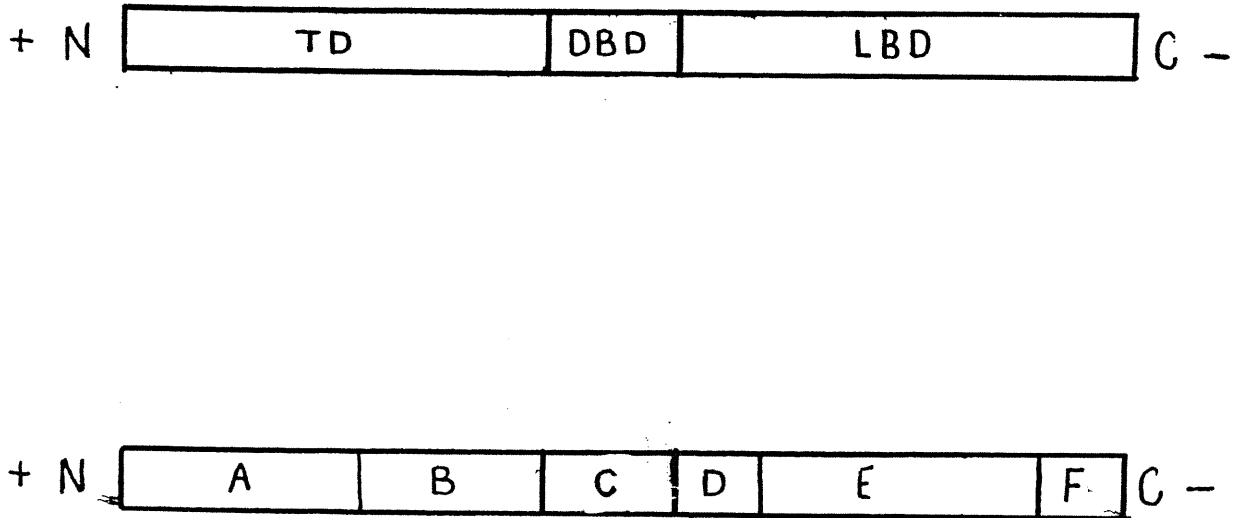


Figure 1.10 . Les domaines modulaires du Récepteur des Glucocorticoïdes.

Les récepteurs nucléaires sont subdivisés en six régions, sur la base de l'homologie que l'on retrouve entre les structures primaires de ces molécules.

Régions A et B : Domaine de transactivation.

Région C : Site de liaison à l'ADN.

Régions D et F : Varient considérablement d'un type de récepteur à l'autre.

Région E : Site de liaison au ligand, incluant une fonction activatrice.

Le récepteur des glucocorticoïdes est maintenu dans sa forme inactive dans le cytoplasme par une interaction protéine:protéine avec une molécule chaperon. C'est une protéine de choc thermique de 90 kd (hsp90, Mendel et al., 1986, Pratt et al., 1988). Les molécules chaperons sont d'une très grande importance pour la vie cellulaire (Rothman 1989, Georgopoulos 1992, Ellis & Van der Vies, 1991, Gething, 1992). Elles empêchent les interactions incorrectes entre les protéines qui ne sont pas encore repliées. Les *chaperons de classe I* escortent les protéines naissantes pour stabiliser les chaînes polypeptidiques en cours de synthèse et en créant un environnement favorable au repliement, à l'assemblage des protéines ou à leur maintien sous la forme dépliée. Les *chaperons de classe II*, ou chaperonines, sont d'énormes structures en forme de panier. La protéine se loge dans la cavité, protégeant ainsi les sites vulnérables à l'aggrégation. Les chaperonines mitochondriales hsp60 et hsp 10 sont de bons exemples, tout comme hsp 90. Cette dernière est une chaperonine spécialisée retrouvée en forte concentration dans le cytoplasme, et qui interagit avec deux classes de protéines particulières: certaines protéines kinases impliquées dans la transduction intracellulaire, et les protéines récepteurs des hormones stéroïdes, comme le GR. C'est sous la forme d'un complexe de deux molécules de hsp90 jumelées avec une molécule de GR que les glucocorticoïdes rencontrent leur récepteur dans le cytoplasme (Mendel & Orti, 1988).

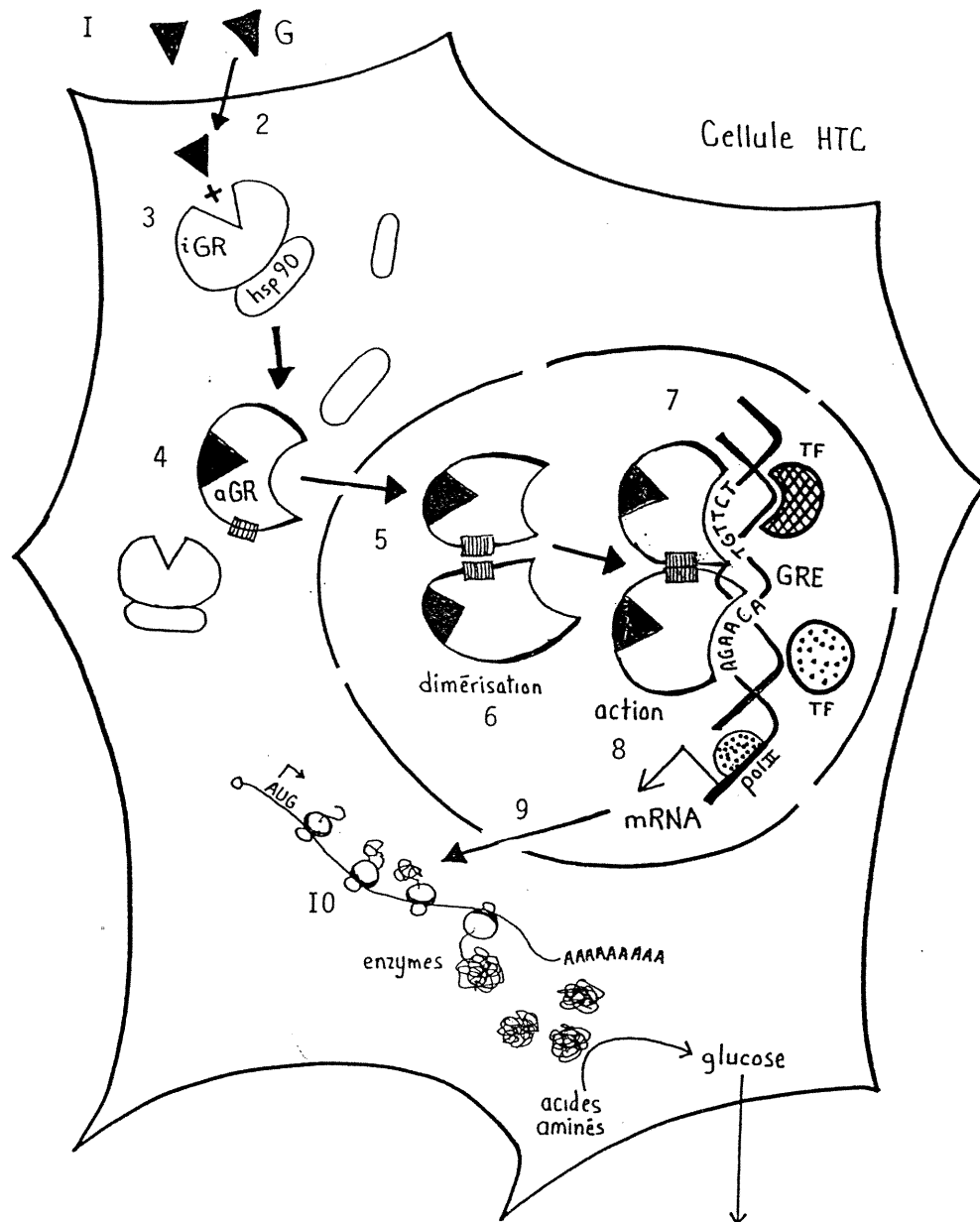


Figure 1.11 : L'effet des glucocorticoïdes s'effectue par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique pouvant se lier à certaines séquences particulières d'ADN au niveau du noyau cellulaire.

1. Présence du corticostéroïde dans l'environnement cellulaire.
2. Entrée du ligand dans la cellule.
3. Liaison au GR.
4. Activation du GR.
5. Translocation nucléaire.
6. Dimérisation du GR.
7. Liaison à l'ADN du noyau.
8. Action du GR en tant que facteur transcriptionnel.
9. L'ARN messager est dirigé vers le cytoplasme.
10. Synthèse des protéines, et action cellulaire.

Dans le plasma sanguin, les corticostéroïdes voyagent en étant jumelés à une protéine, la transcortine, qui fait partie d'une famille de protéines sécrétées par le foie, les globulines. Les glucocorticoïdes font leur entrée dans la cellule-cible en suivant les lois de la diffusion simple, quoique des observations de diffusion facilitée ont déjà été décrites (Harrison et al., 1974, Rao et al., 1976, Rao et al., 1977). La liaison entre une molécule de glucocorticoïde et son récepteur se produit dans le ratio 1 pour 1, et il s'agit d'une réaction dont l'équilibre s'effectue selon les lois de Michaelis-Menten (1913). En absence d'hormone, le GR est séquestré dans une forme *inactive* par association avec hsp90 et d'autres protéines. Le complexe protéique maintient également le récepteur dans une conformation qui possède une haute affinité pour l'hormone (Nemoto et al., 1990) afin de favoriser une rencontre. Quand l'hormone se lie au récepteur, le complexe hsp90-GR est dissocié, un dimère de hsp90 est libéré (Denis et al., 1987) ce qui favorise le relâchement du récepteur *activé* dans le cytoplasme.

À la suite de son changement de conformation, le récepteur *activé* possède la capacité d'être dirigé vers le noyau cellulaire (schéma 1.11). Il faut souligner qu'il existe des signaux favorisant la localisation nucléaire du GR chez le rat, et ils sont situés à deux endroits de la molécule (Picard & Yamamoto, 1987). C'est près de cette région que réside le site responsable de

l'interaction avec les chaperonines (Pratt et al., 1988). Plusieurs autres protéines possèdent des signaux favorisant l'accumulation au niveau du noyau (Dingwall & Laskey, 1986, Silver & Hall, 1987, Nigg et al., 1991, et Dingwall & Laskey, 1992). Ce sont des segments de protéines favorisant la diffusion facilitée, la rétention intranucléaire ou l'interaction avec la machinerie du transport actif vers le noyau (de Robertis, 1983). Il est clair, cependant, que la localisation nucléaire du GR est hormono-dépendante. Certains auteurs réfutent la thèse de la translocation, en prétendant qu'il existerait un pool de GR strictement nucléaire, suite à certaines observations microscopiques (Akner et al., 1994).

Dans le but de reconnaître leurs gènes-cible sans ambiguïté, les facteurs transcriptionnels s'associent souvent deux par deux. Il ne fait aucun doute que la dimérisation du GR constitue une étape *très* importante qui précède son interaction avec l'ADN et/ou avec d'autres dimères situés sur le même promoteur afin de permettre une transactivation par synergisme (Schüle et al., 1988, Tsai et al., 1989). En fait, la dimérisation constitue un élément-clé dans l'interaction du GR avec un GRE (Dahlmann-Wright et al., 1991). Des études *in vitro* ont prouvé qu'un monomère de GR ne se lie que faiblement à l'ADN, et qu'un dimère possède une affinité beaucoup plus grande pour un GRE qu'un monomère. La force de liaison à l'ADN est donc augmentée. De plus, la liaison d'un monomère seul ne confère pas de réponse hormonale, et c'est la formation

d'un homodimère qui détermine la liaison du GR à l'ADN. (Drouin et al., 1992).

En outre, la séquence reconnue dans le génome est deux fois plus longue. Cela augmente beaucoup la sélectivité de la reconnaissance. Le facteur de transcription peut alors retrouver sans ambiguïté les séquences régulatrices de ses gènes-cibles au sein d'un génome cellulaire immense.

Le domaine de liaison à l'ADN est constitué de deux doigts de zinc, et chacun est codé par un exon bien distinct dans la région codante du gène du GR (Arriza et al., 1987, Huckaby et al., 1987). C'est également le cas pour le ER (Ponglikitmongkol et al., 1988). La séquence d'ADN reconnue par le GR est un GRE, pour *Glucocorticoid Response Element* (Yamamoto, 1985) C'est la même séquence d'ADN que celle reconnue par le récepteur des minéralocorticoïdes (MRE), des androgènes (ARE) et de la progestérone (PRE) (Strähle et al., 1987). Il s'agit d'une séquence-consensus de 15 bases azotées retrouvée dans ou à proximité des gènes hormono-dépendants (Chandler et al., 1983, Ponta et al., 1985, DeFranco & Yamamoto, 1986, Miksicek et al., 1986). La structure primaire d'un GRE complet est la suivante:

5' A G A A C A n n n T G T T C T 3'

Ce site contient donc deux séquences hexanucléotidiques et pseudo-palindromiques (*inverted imperfect repeats*) positionnées en directions opposées et séparés par trois bases. Les lettres "n" signifient que n'importe

quelles bases azotées peuvent se trouver entre les pseudo-palindromes. Ce site de liaison permet la formation d'une structure locale particulière au niveau de la double-hélice de la molécule d'ADN, et possède la géométrie requise pour une interaction intime avec le DBD de GR, et il semble même qu'un contact direct soit établi entre un acide aminé du DBD et le GRE (Wright, 1993).

La deuxième famille de récepteurs stéroïdiens est celle qui inclut les récepteurs des estrogènes (ER), de l'hormone thyroïdienne (TR), de l'acide rétinoïque (RAR) et de la vitamine D3. (Beato, 1988).

C'est l'étude comparative des séquences d'ADN liées par les récepteurs stéroïdiens ainsi que l'étude très précise de la nature et de la stéréochimie des résidus d'acides aminés des domaines de liaison à l'ADN de ces mêmes récepteurs, qui permettent de déduire l'origine évolutive des récepteurs stéroïdiens. On croit que ces molécules proviennent d'un même précurseur.

L'inhibition de la transcription par le GR a été très bien documentée. Ce mécanisme s'inscrit dans la régulation négative de certains gènes, et c'est un phénomène très répandu, qui a fait l'objet d'études très approfondies (Akerblom et al., 1987, Birnberg et al., 1983, Charron & Drouin, 1986, Drouin et al., 1989, Freneau et al., 1986, Frisch & Ruley, 1987, Guertin et al., 1983, Israel & Cohen, 1985, Sakai et al., 1988, Nakai et al., 1991 et beaucoup d'autres).

Par exemple, l'investigation des séquences promotrices en amont du gène de la prolactine bovine a permis la découverte de séquences particulières

qui jouent un rôle de premier plan dans la régulation négative par les glucocorticoides au niveau de l'hypophyse antérieure (Sakai et al., 1988). Il s'agit d'une séquence appelée *nGRE*, pour *negative glucocorticoid response element*. La séquence-consensus d'un *nGRE* est la suivante :

5' CGTCCA 3'

Cette séquence se retrouve au niveau du promoteur du GR humain (Zong et al., 1990), et aussi au niveau du promoteur de la pro-opiomélanocortine (POMC) (Drouin et al., 1993).

Ainsi, la régulation négative du gène POMC s'effectue par l'interaction qui existe au niveau de plusieurs facteurs transcriptionnels liant l'ADN au niveau des séquences promotrices de ce gène. Il fut observé (Drouin et al., 1993) qu'un homodimère de GR se lie à un *nGRE* sur un seul côté de la molécule d'ADN, et favorise la liaison d'un troisième monomère sur le côté opposé, par coopérativité. Le *nGRE* se trouve ainsi pris en sandwich entre les molécules de GR. Il a été montré qu'un tel complexe trimoléculaire n'a pas la capacité de réprimer l'initiation de la transcription peu importe la distance ou le contexte (Therrien & Drouin, 1991), ce qui suppose une interaction avec d'autres facteurs de transcription situés en amont ou en aval du *nGRE*. Un mécanisme d'interférence est également possible si on considère qu'un tel complexe situé de part et d'autre sur la double-hélice de l'ADN pourrait en changer la conformation. Ceci pourrait interférer avec les interactions normales

se produisant au niveau du promoteur (Therrien & Drouin, 1993), ce qui constitue un genre d'interaction d'une nature beaucoup plus élaborée qu'une simple encombrement stérique sur le promoteur (Nakai et al., 1991).

Un autre mécanisme fut proposé pour expliquer l'effet inhibiteur du GR sur le promoteur de l'ostéocalcine humaine. Il s'agit d'un événement de compétition entre le GR et le facteur d'initiation de la transcription TF-IID (Strömstedt et al., 1991). Ici, un GRE dégénéré dont la structure primaire possède quand même beaucoup d'homologie avec la séquence-consensus du motif GRE est superposé avec la boîte TATA du promoteur de l'ostéocalcine. Même si aucun test fonctionnel *in vivo* n'a été effectué pour vérifier cette hypothèse, on peut penser que le GR pourrait réprimer l'activité d'un promoteur en compétitionnant avec la liaison des facteurs impliqués dans l'initiation de la transcription, et effectuer la régulation négative de ce gène.

Un autre type de séquence pouvant lier le GR est le *dsGRE*, signifiant *delayed secondary glucocorticoid response element*. Les hormones stéroïdiennes peuvent en effet réguler l'expression de plusieurs gènes dont la réponse est tardive plutôt qu'immédiate. L'arrangement de ce site de liaison diffère beaucoup de celui retrouvé dans la séquence-consensus du GRE. Dans cette dernière, les demi-sites sont des séquences pseudo-palindromiques disposées dos-à-dos, en positions inversées, et obligatoirement séparées par trois bases. Cette séparation est essentielle au fonctionnement du site tout

entier, car elle favorise l'occupation coopérative du site par un dimère de récepteur (Chalepakis et al., 1990, Dahlman-Wright et al., 1990, Wrangé et al., 1989), le positionnement adéquat des domaines de transactivation du récepteur vis-à-vis les composantes de l'appareil transcriptionnel (Hard et al., 1990, Schena et al., 1989), et pour l'activité générale du récepteur (Dahlman-Wright et al., 1991). Si les demi-sites sont disposés autrement que dos à dos, la liaison du récepteur devient inefficace et perd toute sa spécificité hormonale (Dahlman-Wright et al., 1991). Par contre, l'arrangement des demi-sites de *dsGRE* peut être très hétérogène. La séparation peut aller jusqu'à cinq bases azotées, et les séquences pseudo-palindromiques peuvent être orientées en directions opposées ou identiques. Voici un exemple:

5' **AGTTCGTGTACGACCCGTGTGAGGCTTGA** 3'

Cela ouvre la porte à une foule d'interactions possibles entre les domaines de transactivation, et contribue probablement au délai attendu entre la liaison des GR et la réponse génétique dans les gènes à réponse lente (Chan et al., 1991).

La régulation positive de la transcription par le GR fut elle aussi très bien documentée. Car il fut découvert que le GR possède également une action stimulatrice sur l'expression génétique au niveau d'une foule de promoteurs et dans une foule de tissus, incluant même le promoteur du gène de l'ANF exprimé spécifiquement dans le muscle cardiaque (Argentin et al., 1991).

A l'échelle moléculaire, le GR possède une influence positive sur

l'appareil transcriptionnel en favorisant et en stabilisant la formation des complexes de pré-initiation au niveau de la boîte TATA des promoteurs eucaryotes (Freedman et al., 1989, Tsai et al., 1990, Tsai & O'Malley, 1994). Certains (Cordingley et al., 1987) ont proposé que la simple interaction entre le GR et son site de liaison sur l'ADN favorise le déroulement de la chromatine. Selon ce modèle, la charge ponctuelle négative du domaine de transactivation, qui est de grande taille, fait compétition avec les histones des nucléosomes et déplace ces derniers. Cela favoriserait ainsi le dénudement local de l'ADN au sein du chromosome.

1.3.2 La distribution tissulaire du GR

Le GR est une protéine retrouvée dans la plupart des tissus chez les mammifères, à cause de ses nombreuses fonctions essentielles pour assurer l'homéostasie cellulaire. Cependant, plusieurs équipes ont rapporté l'absence de cette molécule dans certains tissus particuliers chez le rat. Ce sont: le lobe intermédiaire de l'hypophyse (Antakly et al., 1985), les cellules de l'endothélium hépatique et les cellules de Kupffer (Antakly & Eisen, 1984), le tissu utérin, la prostate, les vésicules séminales, la vessie, le tissu adipeux et le jéjunum (Ballard et al., 1974). Le GR brille aussi par son absence dans les glomérules de Malpighi et le tubule contourné proximal du tissu rénal (Farman et al., 1991) de même que dans les cellules acinaires des glandes

sous-maxillaires (Antakly et al., 1991). Une controverse existe au sujet de la présence du GR dans les neurones et lymphocytes (Teasdale et al., 1986, Fuxe 1985, Gametchu, 1987).

1.3.3 La distribution cellulaire du GR.

Plusieurs investigateurs ont rapporté que le GR se trouve dans le cytoplasme et dans le noyau. Les techniques conventionnelles d'immunohistochimie concluent que le GR est deux fois plus abondant dans le noyau que dans le cytoplasme dans les cellules intactes de parenchyme hépatique HTC (Rossini & Malaguti, 1994). Plusieurs ont localisé la forme active et la forme inactive de cette molécule au niveau de la membrane plasmique, du noyau et de plusieurs organites cellulaires incluant le cytosquelette, en particulier les microfilaments et les microtubules (Akner et al., 1991), étant donné que le GR est invariablement co-localisé, co-purifié et co-polymérisé avec la tubuline (Akner et al., 1995). Le GR serait donc une protéine cellulaire faisant partie du vaste groupe des MAPs (*microtubule-associated proteins*). On a même observé que le récepteur de la vitamine D, qui est un autre récepteur stéroïdien, interagit transitoirement avec les microtubules à la suite de sa liaison avec son ligand (Barsony & McCoy, 1992). Dans le noyau, le GR est associé à un petit ARN (le *snRNA*) au sein de petites particules ribonucléoprotéiques (*snRNP*) qui sont bien connues pour leur participation active dans les processus de la maturation des ARN^m en

ARNm. Notons une observation importante: à la suite d'un traitement hormonal, aucune distribution préférentielle de GR ne fut observée dans les cellules en culture (Akner et al., 1994), ce qui suggère l'existence putative de deux populations indépendantes de GR au sein du cytoplasme d'une part, et du noyau d'autre part, ce qui invaliderait la théorie de la translocation intranucléaire du GR à la suite de sa liaison avec son ligand.

1.3.4 L'organisation du gène du GR de rat.

C'est au niveau du noyau cellulaire que l'activité du dimère de GR activé s'exerce, principalement (schéma 1.11). La position centrale de cet organite dans la vie cellulaire lui permet de contrôler les diverses fonctions essentielles du cytoplasme et des autres organites. De plus, la molécule d'ADN nucléaire constitue le dépositaire principal du patrimoine génétique de la cellule.

Le gène du GR est divisé en huit exons codants, distribués sur une longueur de 125 kb d'ADN. Chaque domaine du GR est codé par son propre exon, ou sa propre série d'exons (schéma 1.12). Le gène contient deux sites de polyadénylation, et au moins huit exons non-traduits situés en 5', chacun étant sous la gouverne de son propre promoteur distinct.

Les promoteurs associés à chaque exon non-codant, tels l'exon 1A et l'exon 1B, possèdent des séquences très riches en C et G. On parle alors d'*îlots*

C_pG. On y retrouve également des séquences-consensus pour le facteur transcriptionnel Sp-1, et un site de liaison au CTF (*CAAT Transcription Factor*), de même qu'une séquence-consensus *nGRE*. De plus, certains segments montrent une symétrie bilatérale de séquences inversées, suggérant un site de liaison probable pour d'autres facteurs transcriptionnels (schéma 2.1). Par contre, on ne retrouve pas de consensus de boîte TATA (*la séquence TATAAT*), bien que l'on retrouve plusieurs sites d'initiation de la transcription, tel que révélés par des expériences de *primer extension* sur l'ARN_m du GR de rat (Jacobson, 1991).

Ces séquences promotrices d'exon 5' non-traduits partagent une grande similarité avec celles des gènes de réponse aux facteurs de croissance, et aux gènes des enzymes du maintien des fonctions métaboliques de base de la cellule, les *housekeeping genes* (Hoffmann et al., 1987). Ces séquences sont également très similaires aux promoteurs associés à d'autres récepteurs stéroïdiens, tel le récepteur de la progestérone (PR) (Sakai et al., 1988).

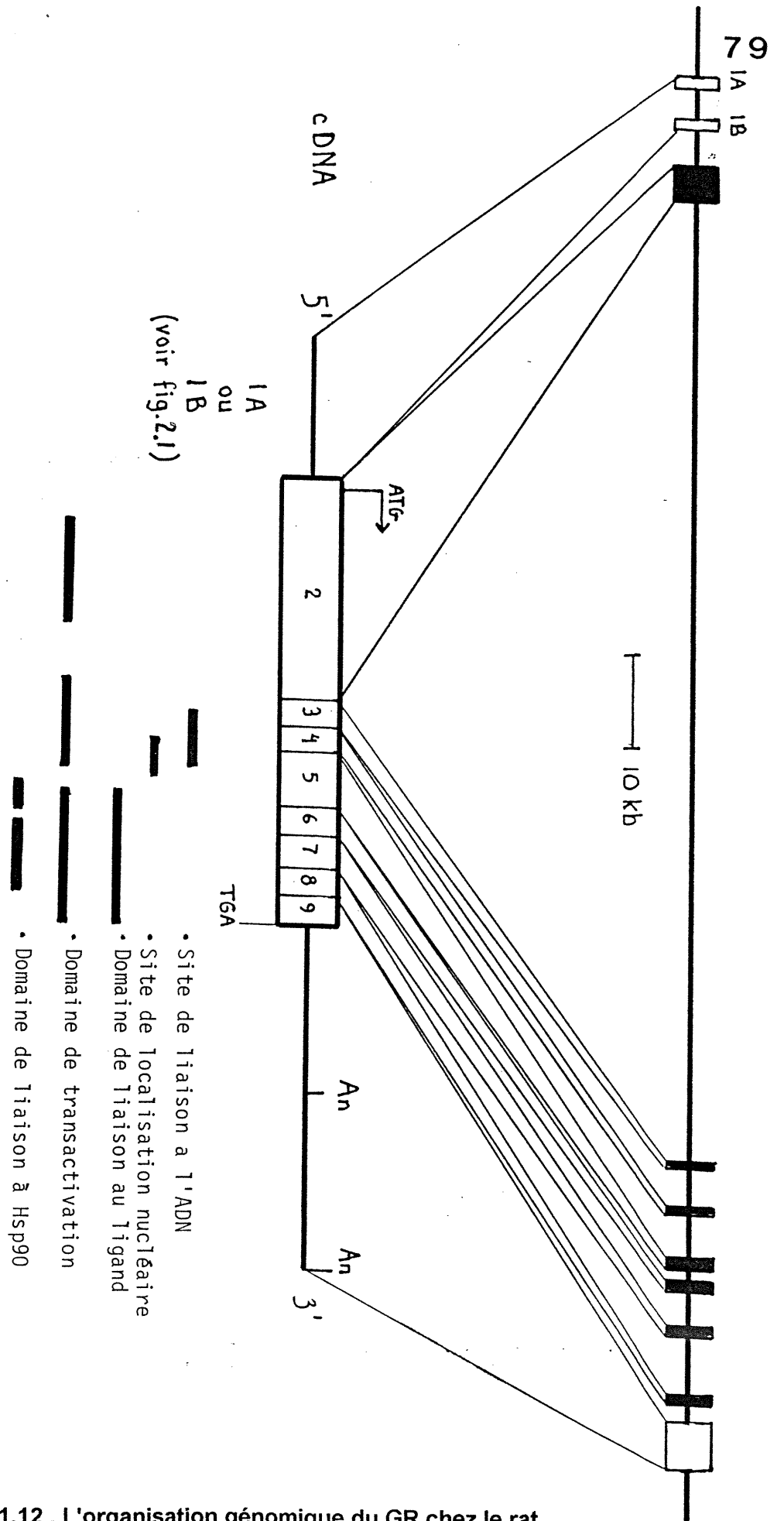
Il est clair que la transcription complète d'un gène d'une telle envergure par l'ARNpolIII est de très longue durée. L'immense intron de plus de 100 kb retrouvé entre l'exon 2 et l'exon 3 y contribue grandement. Il fut calculé (Ucker & Yamamoto, 1985) qu'à un taux d'élongation de 20 à 25 pb par seconde *in vivo*, la réaction de polymérisation requise pour la formation d'un ARN_{hn} complet prendrait plus d'une heure et demie. C'est la durée du délai attendu

entre le moment de l'application de glucocorticoïdes et un changement subséquent dans les taux cellulaires de GR (généralement une diminution des quantités de cette protéine), sans affecter la demi-vie de l'ARN*m*. C'est ce qui a été observé (Dong et al., 1988) par le biais d'expériences de *run on* nucléaires: suite à un traitement au dexaméthasone, aucune modification du taux de transcription de l'ARN*m* n'est observé dans les deux heures suivant l'administration de médicament dans une préparation de noyaux cellulaires de foie de rat. Les premiers effets sont mesurables dans les quatre heures suivant l'application de dexaméthasone, et cette diminution du taux de transcription correspond à une diminution du taux de traduction de la protéine, dans des conditions expérimentales *in vitro*.

L'existence de promoteurs multiples de ce genre suggère une ségrégation putative de régions de contrôle de l'expression génétique, ce qui implique que ces promoteurs seraient activés de façon différentielle, afin de générer toute une famille d'ARN*m* exprimés différentiellement en diverses périodes du cycle cellulaire ou de l'ontogénèse ou dans différents tissus. Nous verrons qu'au moins une de ces régions 5' non-traduites retrouvées dans cette région promotrice contient tous les éléments de régulation pouvant affecter l'efficacité de la traduction.

L'organisation du gène du GR chez le rat est très similaire avec celle d'un autre gène très complexe, le gène *Antennapedia* (*Antp*) chez la

drosophile. Ici aussi, le locus génétique est très long, de plus de 100kb (Schneuwly et al., 1986). Il possède au moins deux promoteurs alternatifs (Laughon et al., 1986), et deux sites de polyadénylation. Les exons 5' non-traduits codent pour des séquences situées dans le même cadre de lecture que le premier exon codant, et contiennent de nombreux codons d'initiation de la traduction AUG. Chaque région 5' non-traduite est associée à son propre promoteur, exprimé différemment selon le stade de maturation de l'insecte (Jacobson, 1991 et refs). Il semble aussi que plusieurs gènes de mammifères, tel celui du facteur transcriptionnel *cjun* (Vogt & Bos, 1990) possèdent plusieurs régions régulatrices fort complexes, ce qui suggère l'existence de nombreux mécanismes de contrôle.



(voir fig.2.1)

Figure 1.12 . L'organisation génomique du GR chez le rat.

1.3.5 La régulation du GR.

Dans la plupart des cellules étudiées qui contiennent le GR, il fut démontré que l'ampleur de la réponse biologique varie selon une relation directement proportionnelle avec le nombre de molécules qui y sont exprimées (Bourgeois et al., 1979, Bloom et al., 1980, Bloomfield et al., 1981). C'est donc la concentration de GR qui constitue en grande partie l'étape limitante du mécanisme de l'action biologique des glucocorticoïdes (Vanderbilt et al., 1987, Dong et al., 1989). Chez beaucoup de types cellulaires, la réponse aux glucocorticoïdes est modulée en *diminuant* la concentration intracellulaire de GR, et cette stratégie constitue en fait l'élément fondamental et généralement admis du mécanisme de la régulation négative, ou *down-regulation*, de ce récepteur (Okret et al., 1986, Rosewicz et al., 1988). La présence des glucocorticoïdes peut ainsi causer une diminution de jusqu'à 50% - 75% des quantités initiales de GR (Svec, 1985). Il faut noter, toutefois, que la réponse d'auto-régulation est tissu-spécifique, car certaines cellules démontrent un mécanisme de feedback positif (ou *up-regulation*) sur l'expression du messenger de GR (Eisen et al., 1988, Gomi et al., 1990, Gadson et al., 1990), de même que chez certains tissus chez le rat adrénalectomisé (Kalinyak et al., 1987, 1989).

Les niveaux cellulaires de GR peuvent varier à la suite de nombreuses situations. Par exemple, la quantité de glucocorticoïdes dans le liquide

extracellulaire (Svec et al., 1981, Cidlowski & Cidlowski, 1981, Sapolski et al., 1984, Turner, 1986), l'influence de certains neurones adjacents ou de contacts cellulaires spécifiques (McGinnis et al., 1981, Antakly et al., 1985), durant les différentes phases du cycle cellulaire (Cidlowski & Michaels, 1977, Crabtree et al., 1980), durant certaines étapes de l'ontogenèse (Brönnegard & Okret, 1988, Kalinyak et al., 1989) ou de la sénescence (Chang & Roth, 1979).

En outre, plusieurs études démontrent que l'expression de GR est autorégulée par un processus complexe impliquant des mécanismes transcriptionnels et post-traductionnels (Okret et al., 1991). Des expériences de run-on nucléaires furent effectuées pour connaître le taux de transcription du gène de GR. Il s'agissait d'isoler des noyaux cellulaires et leur présenter des nucléotides radioactifs pouvant être incorporés à l'ARN m , puis, de laisser la transcription s'effectuer par elle-même pendant un certain temps, l'incorporation graduelle des radionucléotides étant proportionnelle au nombre de polymérases transcrivant le gène étudié. La synthèse et la demi-vie de l'ARN m de GR (4 à 5 heures) ne sont pas affectées par la présence des glucocorticoïdes. Cela suggère donc un mode de régulation au niveau de la *transcription* (Dong et al., 1989, Okret et al., 1991, Walsh et al., 1987, Rosewicz et al., 1988).

Un autre aspect de l'autorégulation du récepteur est fourni par l'étude de la demi-vie de la protéine elle-même. En bloquant la synthèse des protéines

avec de la cycloheximide et en détectant la quantité de GR par immunobuvardage, on conclut que le GR a une demi-vie de 25 heures en absence de glucocorticoïdes synthétiques (en l'occurrence du dexaméthasone). Si la drogue est ajoutée, la demi-vie de la protéine diminue de moitié (Okret et al., 1991, McIntyre & Samuels, 1985, Hoeck et al., 1989), et ce processus nécessite un délai assez long, de l'ordre d'une dizaine d'heures (Dong et al., 1988). Par contre, aucun changement dans la demi-vie de la protéine n'est observé quand on utilise un antagoniste comme le RU486 (Rajpert et al., 1987). En outre, certaines cellules mutantes qui sont résistantes à l'action des glucocorticoïdes et qui ne peuvent autoréguler les niveaux de messenger de GR démontrent les mêmes caractéristiques. On suppose que la dissociation du complexe GR-hsp90 à la suite de la liaison hormone-récepteur encourage la dégradation du GR lorsque ce dernier n'a pas encore atteint le noyau. Ce deuxième niveau de contrôle s'exerce donc au niveau *post-traductionnel*, donc, au niveau de la protéine (Dong et al., 1988, Okret et al., 1991).

Une autre molécule qui assiste le GR dans ses fonctions pour lier les glucocorticoïdes est l'AMP cyclique. (Oikarinen et al., 1984, Gruol et al., 1986). La forskoline est un produit qui stimule la production d'AMP cyclique, et son application sur des cellules HTC en culture fait doubler la quantité d'ARN m , de GR et de l'activité du GR en seulement quatre heures (Okret et al., 1991). L'utilisation d'un inhibiteur transcriptionnel comme l'actinomycine D

indique aussi qu'il existe des mécanismes de régulation post-transcriptionnels qui peuvent être encouragés par l'AMP cyclique (Dong et al., 1989).

Des études plus poussées (Okret et al., 1991) ont suggéré que d'autres mécanismes seraient impliqués dans le contrôle du GR. Par exemple, les glucocorticoïdes jouent un rôle important dans l'ontogenèse du tissu pulmonaire, et une régulation négative du récepteur n'est pas souhaitable à ce stade. Il semble que les niveaux d'ARN m diminuent dans tous les tissus pulmonaires fœtaux et adultes qui ont été traités avec les glucocorticoïdes, mais que le GR foetal n'est pas soumise à la régulation négative conférée par cette hormone dans les tissus immatures. Il n'y a donc pas toujours de corrélation directe entre l'expression de l'ARN m de GR et l'activité de cette protéine. On ne connaît pas encore les mécanismes qui permettent à la protéine de passer outre au contrôle imposé par la rareté du messenger, ce qui suggère fortement l'existence de d'autres mécanismes de régulation. D'autres équipes ont déjà noté une faible corrélation entre la quantité de messenger et la synthèse du récepteur (McIntyre et al., 1985). Plusieurs autres investigateurs ont remarqué la même chose dans l'étude du récepteur des estrogènes (Ree et al., 1989, Saceda et al., 1988).

1.4 Description du projet.

La faible corrélation qui existe entre les niveaux d'ARN m du récepteur des glucocorticoïdes et de cette protéine, dans des modèles expérimentaux comme les cellules de foie en culture (cellules HTC), (Okret et al., 1986, Dong et al., 1988), indique que des mécanismes de régulation post-transcriptionnels pourraient être impliqués dans le contrôle de son expression (Okret et al., 1991). Un mécanisme probable dans l'exercice de ce contrôle serait l'utilisation différentielle de régions 5' non-traduites, par des mécanismes comme l'utilisation de promoteurs différentiels ou d'épissage alternatif. Des rapports plus récents (Dieken et al., 1990, Gearing et al., 1993) confirment qu'il existe beaucoup d'hétérogénéité au niveau des régions 5' non-traduites des différentes populations cellulaires d'ARN m du GR de rat, et il est connu que de telles régions sont fortement impliquées dans le contrôle translationnel et dans la stabilité de l'ARN m (Horiuchi et al., 1990, Rabbits et al., 1985, Kozak, 1992). L'organisation génomique du GR de rat a également été très bien caractérisée (Jacobson, thèse de doctorat, 1991).

Afin de mieux comprendre les rôles éventuels de certaines séquences génomiques pouvant être transcrites et faire partie intégrante de la région 5' non-traduite de plusieurs isoformes d'ARN m du GR de rat, nous avons entrepris d'utiliser deux de ces séquences d'exon retrouvées en amont de la région codante de ce gène, c'est-à-dire l'exon 1A et l'exon 1B (figure 1.12).

Ceci fut effectué dans le but de simuler les produits putatifs d'un épissage différentiel. Plus précisément, l'exon 1B a en outre fait l'objet d'une dissection de ses différentes composantes moléculaires, au cours de cette étude.

Ainsi, par des expériences de manipulations génétiques et de transfert transitoires de gènes dans des lignées de cellules cultivées de rat et de primate, nous avons voulu investiguer les effets de ces séquences non-codantes de GR sur l'expression d'un gène rapporteur, celui de la luciférase de mouche à feu, et qui pourraient être impliquées dans les processus encore obscurs de la régulation post-transcriptionnelle de ce récepteur hormonal d'une grande importance dans la vie cellulaire.

CHAPITRE 2. MATÉRIEL & MÉTHODES

Les expériences qui furent effectuées dans le cadre de ce projet de recherche comprenaient, dans un premier temps, les étapes requises dans la construction des fusions de gènes, puis, la maîtrise efficace des techniques de base de la culture des tissus, dans le but d'effectuer des essais fonctionnels sur les constructions génétiques obtenues.

La construction des fusions de gènes nécessite plusieurs étapes, comprenant l'obtention de bactéries compétentes, la sélection du clone bactérien approprié, l'amplification et la quantification des plasmides, sans oublier les procédures standard de l'utilisation des enzymes de restriction et de modification sur les séquences génétiques fournies au départ. Compte tenu de l'ampleur des tâches considérées ici, le travail fut effectué par une équipe de travail constituée de l'auteur, ainsi que de chacun des messieurs Jude Beaudoin et Claude Fortin. Les différentes étapes du travail de sous-clonage furent confiées à tour de rôle à chaque membre de l'équipe, afin d'accélérer l'obtention des constructions génétiques en vue de leur transfert dans des cellules en culture. Les travaux de culture cellulaire et de dosage biochimique furent effectués exclusivement par l'auteur.

Tous ces travaux mènent à une meilleure compréhension des événements entourant la régulation du GR au niveau de la traduction.

2.1 Construction des fusions de gènes.

Les segments de régions 5' non-traduites de rat sont illustrés dans les figures 2.1 et 2.2. Ils furent obtenus à partir des constructions originales *p0GR.Z*, *pGR.GR(l+).Z*, et *pGR.GR(l-).Z*, gracieusement fournies par le Dr Keith R. Yamamoto, de l'Université de Californie à San-Francisco. Ces plasmides contiennent les 5'UTR du GR de rat clonés en aval du promoteur viral SP6, et en amont du gène *lacZ* de *E.coli* (Jacobson, 1991). Les enzymes de restriction et de modification furent obtenus de *Bethesda Research Laboratories (BRL)* et de *Pharmacia*, et furent utilisés conformément aux directives et aux indications suggérées par les fournisseurs. Les constructions furent analysées sur gel d'agarose (1% p/v, *Ultrapure BRL*), et amplifiées dans la souche de bactéries compétentes *E.coli XL1Blue*, selon les méthodes conventionnelles (Sambrook et al., 1989).

2.1.1 Construction du vecteur d'expression **JMC100**.

Les séquences 5' non-traduites, clonées à l'origine dans des vecteurs d'expression bactériens, durent être sous-clonées dans un vecteur approprié pour étude dans les systèmes eucaryotes. Le vecteur choisi fut la construction **pRSV Luc** (de Wet et al., 1986). Ce vecteur d'expression contient le promoteur fort retrouvé dans RSV, flanqué en aval par le gène de la luciférase de la mouche à feu *Photinus pyralis* dépourvu d'introns,

puis, de l'intron de la protéine t du virus simien SV40, conférant au transcrit primaire la possibilité de subir un épissage par le biais de la machinerie cellulaire. Le tout est suivi des séquences propres aux signaux de polyA de SV40, qui ont pour rôle de favoriser la maturation du transcrit primaire en un ARNm eucaryote fonctionnel, et aussi de réduire l'initiation artéfactuelle pouvant être provoquée par la présence des séquences bactériennes contenues dans le vecteur (De Wet et al., 1986).

Ce vecteur initial fut modifié de la façon suivante: un oligomère synthétique de 93 pb de longueur, comportant 14 sites de restriction uniques, fut inséré immédiatement en amont du gène de la luciférase. Cet oligomère bicaténaire se compose des brins appariés **LNK3** et **LNK 4**. Le filament **LNK 3** possède la séquence suivante :

5'agctAGGCTTCCAGGTACCTGGCTCGAGCACATAGTGAAGCTTAGATCT
GTCGACATGCATCCATGGACTAGTGCGGCCGCCCGCGGCAGCTG 3'

Cette séquence correspond aux sites de restriction suivants:

5'agct.Stul.BstXI.KpnI.XhoI.DraIII.HindIII.BglIII.Sall.Nsil.NcoI.SpeI.NotI.SacII.PvuII 3'

L'oligomère **LNK4** constitue le brin complémentaire afin de générer le Site de Clonage Multiple (MCS) caractérisant le mutant **JMC100**. Les nucléotides furent assemblés par la méthode de synthèse organique de couplage de phosphoramidites (*Millipore*), et les fragments synthétiques furent élués sur colonne selon les directives du fournisseur, et appariés dans un tampon de renaturation (Tris 100mM pH 7.8 , EDTA 0.1 mM , NaCl 0.15 mM). La renaturation s'est effectuée graduellement, en laissant

refroidir un bain-marie bouillant jusqu'à la température de la pièce. Nous avons ensuite précipité l'oligomère, puis, il fut inséré par ligation (500ng d'ADN double brin) au site de restriction unique HindIII du vecteur **pRSV-Luc**. Une analyse de restriction sur minigel a pu confirmer le bon fonctionnement de tous les sites de restriction ajoutés, et retrouvés en une seule copie dans tout le vecteur. Le site de restriction HindIII de **pRSV-Luc** fut inactivé lors de l'insertion du MCS, mais il fut restauré dans le vecteur **JMC100**, étant donné qu'il fait partie intégrante du fragment inséré.

2.1.2 Construction des vecteurs d'expression avec l'exon 1B entier

L'exon 1B entier contenu dans le vecteur bactérien *pGR.GR(l+).Z* a été excisé aux sites de restriction XbaI et SspI. Ces sites sont compatibles avec, respectivement, les sites SpeI et PvuII de **JMC100**. La ligation de ce fragment a généré le mutant **JMC101**, qui fut analysé sur gel pour confirmer l'orientation correcte de l'insert. Cette construction s'accompagne de la délétion des sites NotI et SacII du vecteur d'origine. Le mutant **JMC107** fut construit de façon à introduire l'exon 1B dans l'orientation antisens par rapport à la configuration naturelle 5'-3'. Pour ce faire, **JMC100** fut soumis à une digestion double StuI-SalI. Ceci s'accompagne de la délétion d'un fragment de **JMC100** contenant les sites de restriction BstXI jusqu'à BglII, inclusivement. Puis, l'exon 1B fut excisé de son vecteur bactérien pour générer un fragment SalI-SspI. La ligation des extrémités cohésives SalI de l'insert et du vecteur a pu s'effectuer, de

même que celles des extrémités franches *Stu*I du vecteur et *Ssp*I de l'insert, pour circulariser le mutant inversé **JMC107**.

2.1.3 Construction des mutants de délétion partielle.

La digestion de **JMC101** avec l'enzyme *Nco*I élimine la première moitié 5' de l'exon 1B, ne laissant que la moitié 3' de l'exon 1B ainsi tronqué, c'est-à-dire le sORF, lui-même contenu dans une structure secondaire labile (Figure 2.2). Une ligation mène à la recircularisation du vecteur, pour générer le mutant de délétion **JMC102**.

La construction *pOGR.Z* contient les séquences génomiques d'intron à partir du site de restriction *Kpn*I jusqu'au site *Nco*I, lui-même situé au milieu de l'exon 1B (Schémas 2.1 et 2.2). C'est donc dire que ce fragment, de 470 pb de longueur, contient le promoteur (de 280 pb) associé à l'exon 1B (Jacobson, 1991), ainsi que la première moitié (de 190 pb) de cet exon, constitué majoritairement d'une structure secondaire stable (figure 2.2).

Afin de favoriser le sous-clonage de ce segment *Kpn*I-*Nco*I dans le vecteur **JMC100**, il a fallu déléter le site *Sac*I déjà présent dans **JMC100**. Ceci a généré le mutant **JMC100.1**. Puis, le site *Stu*I du MCS fut ouvert, pour générer une extrémité franche, à laquelle fut ligaturée un oligonucléotide (*linker*) contenant un site *Sac*I parfaitement fonctionnel. On obtient ainsi le mutant **JMC100.2**. Puis, une digestion avec *Nsi*I entraîne la délétion des sites *Bst*XI jusqu'à *Nsi*I du vecteur **JMC100.2**. Le

fragment KpnI-NcoI excisé de *pOGR.Z*, fut altéré par la modification du site KpnI, afin de permettre la ligature d'un *linker* SacI à cet endroit. L'insertion de ce segment SacI-NcoI ainsi obtenu a permis de générer le mutant **JMC103**.

Une digestion de **JMC103** avec l'enzyme SacI élimine l'intron, et permet l'obtention du mutant de délétion **JMC104**, contenant la première moitié de l'exon 1B et qui confère à l'ARN m une structure secondaire stable en épingle à cheveux (figure 2.2).

La digestion NcoI-SspI du vecteur bactérien *pGR.GR(l+).Z* génère un fragment pouvant être intégré au vecteur eucaryote **JMC100** après digestion double avec StuI-NcoI. Les extrémités NcoI reconstituent le site de restriction, et les extrémités franches StuI et SspI recircularisent le nouveau mutant, **JMC108**, contenant le sORF de l'exon 1B dans l'orientation antisens par rapport à la configuration 5'-3' naturelle. Les sites de restriction BstXI jusqu'à NsiI du vecteur sont délétés durant cette stratégie de sous-clonage.

L'obtention de la chimère **JMC109** fut effectuée en traitant le mutant **JMC107** avec l'enzyme NcoI. Le fragment ainsi excisé correspond à la première moitié 5' de l'exon 1B, conférant à l'ARN m une structure secondaire stable. Il fut inséré dans **JMC100** auparavant linéarisé au même site de restriction. Une analyse de restriction sur gel d'agarose a permis de trouver un mutant dans lequel l'insert se trouvait dans la direction antisens

par rapport à l'orientation naturelle. Par un hasard assez extraordinaire, nous avons découvert un *triplet d'inserts* dans un transformant bactérien lors de l'analyse génétique. Cette chimère fut baptisée **JMC112**, et testée dans les essais fonctionnels cellulaires ultérieurs.

2.1.4 Construction des mutants de délétion complète.

Le mutant **JMC106** fut obtenu suite à une modification du mutant **JMC100,2**, dans lequel le site PvuII fut ouvert et ligaturé à un polynucléotide (*linker*) contenant le site de restriction SacI. C'est le mutant **JMC105**. Sa digestion avec l'enzyme SacI élimine tout le MCS. La digestion de **JMC103** avec le même enzyme permet l'obtention d'un fragment d'intron de 280 pb situé immédiatement en amont de l'exon 1B. La ligature de cet insert dans **JMC105** en permet l'étude fonctionnelle dans les cellules cultivées, et simule, en quelque sorte, le produit putatif d'un épissage incomplet.

La construction **JMC111** fut obtenue par la ligation d'un fragment PvuII de 448 pb isolé du phagemide *pBluescriptIIKS+*. Les extrémités franches de cet insert sont compatibles avec le site PvuII de **JMC100** linéarisé, pour générer une extension exagérée de la région 5' non-traduite en amont du gène de la luciférase.

2.1.5 Construction du vecteur d'expression avec l'exon 1A entier.

La construction **JMC 110** fut effectuée en sous-clonant l'exon 1A situé dans le vecteur bactérien *pGR.GR(l-).Z*, dans le vecteur d'expression

eucaryote **JMC100**, en utilisant l'enzyme de restriction PstI, qui a servi au sous-clonage de cet insert dans son vecteur bactérien d'origine.

2.1.6 Amplification & quantification des plasmides.

Toutes ces constructions génétiques ont été amplifiées après sélection et identification du clone bactérien contenant le plasmide, et après analyse de restriction sur gel d'agarose.

Les bactéries furent cultivées pendant 6 heures à 37°C, et avec agitation modérée dans 1L de milieu enrichi (TY 2X) avec 100 à 250 µg/mL d'ampicilline comme agent de sélection. Quand la culture bactérienne atteignait la phase late log à une DO de 0,8 à 0,9 à 630 nm, une application de 200 mg de chloramphénicol en poudre (*Sigma*) inhibait la croissance bactérienne, sans affecter la réplication continue du plasmide. Les bactéries étaient récoltées par centrifugation après 24-36 heures de culture dans les mêmes conditions que précédemment. L'ADN fut extrait selon la technique de SDS/Lysozyme, et précipité par PEG/NaCl (Sambrook et al., 1989). Les plasmides furent purifiés des autres composantes bactériennes par le biais de deux centrifugations isopycniques successives sur CsCl (Sambrook et al., 1989). L'ADN a subi par la suite une série d'extractions au chloroforme/alcool isopropylique pour enlever le bromure d'éthidium, précipité, stérilisé à l'éthanol, solubilisé dans le TE stérile, et dosé au spectrophotomètre (DO 260 nm) et dilué pour obtenir une concentration de 1,0 mg/mL. L'ADN obtenu fut

visualisé par électrophorèse sur minigel d'agarose pour vérifier la qualité des formes d'ADN plasmidiques. La pureté fut évaluée par spectrophotométrie à 260 nm et 280 nm. Le rapport DO 260/280 nm obtenu pour chaque préparation atteignait la valeur de 1,8 à 2,0.

2.2 Culture des lignées cellulaires établies.

Trois lignées de cellules immortalisées ont été utilisées pour ce projet. Ce sont les cellules COS-7 (Gluzman, 1981), HTC (Thompson et al., 1966) et L6 (Yaffe, 1968). Toutes ont été maintenues en monocouche selon les techniques standard de la culture de tissus (décrites en détail par Freshney, 1983).

Les cellules COS-7 sont des fibroblastes de rein de singe vert africain (CV-1) transformées par sept copies du gène de l'antigène T de SV-40. Ces cellules possèdent un très faible taux de GR endogène (Miesfeld et al., 1988, Yamamoto et al., 1993), et servent, *a priori*, de témoins négatifs. Les cellules HTC sont des cellules d'hépatome de rat, dans lesquelles l'endogène du GR est fortement exprimé (Rossini & Malaguti, 1994). Ces cellules ont été maintenues en sous-confluence à des passages peu élevés (entre 5 et 20 passages) en milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum bovin foetal, et avec 100 u/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine, dans des conditions d'incubation standard (5% CO₂, 37°C, 97% HR).

Les cellules L6 sont des myoblastes de muscles squelettiques de

rat, maintenues dans du milieu DMEM avec 10% de sérum de cheval. Ce type de sérum est préférable afin d'éviter la différenciation des cellules immatures en fuseaux musculaires, car la présence des nombreux facteurs de croissance présents dans le sérum de veau foetal accélèrent la maturation des cellules embryonnaires.

Toutes ces cellules adhèrent bien à leur support de culture (*Nunclon Delta*), ont un temps de doublement de près de 20 heures, et poussent donc rapidement et acidifient beaucoup leur milieu de culture (*Gibco*).

Pour les passages et les transformations, les cellules ont été séparées par digestion à l'aide d'une solution préréchauffée de trypsine pancréatique porcine à 0,05% avec EDTA 0,53M (*Gibco*), et étalées à une densité de 3000 à 4000 cellules/cm carré dans des flacons et des pétris de culture (*Nunclon*), ce qui correspond à deux ou trois diamètres cellulaires de distance entre chaque cellule.

2.3 Transformation des cellules .

Les cellules ont été utilisées pour transformation 16 heures après leur ensemencement, afin de leur laisser tout le temps nécessaire pour se fixer au substrat, de s'étaler et de permettre la stabilisation du pH des milieux de culture. Les transfections ont été accomplies selon le protocole standard de la technique classique de précipitation au phosphate de calcium décrit par Bacchetti & Graham (1977) avec quelques

modifications. L'ADN fut au préalable précipité à l'éthanol afin de le rendre stérile, et dissous à une concentration de 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans du TE (Tris 1,0 mM pH 7,9 avec 0,1 mM EDTA) stérile, puis, ajouté au CaCl_2 250 mM afin d'arriver à une concentration d'ADN finale de 1,0 μg d'ADN/mL de milieu de culture. Le mélange ADN- CaCl_2 fut ajouté lentement, goutte à goutte, à un volume égal de HBS 2X stérile (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na_2HPO_4 pH 7,12) sous un barbottage d'azote afin de procurer une agitation constante. Le précipité d'ADN-phosphate de calcium fut préformé à la température de la pièce pendant une heure, et 1,0 ml de ce précipité a été ajouté aux 10 mL de milieu contenus par pétri de cellules bien étalées. Un précipité devenait facilement visible sur les cellules après une heure d'incubation à 37°C, 97% HR, 5% CO_2 et fut laissé tel qu'il pendant les prochaines 12 heures dans les mêmes conditions. Puis, le milieu fut remplacé par du nouveau milieu frais afin d'éviter l'effet toxique des concentrations de précipité de calcium. Les cellules furent incubées pendant 24 heures supplémentaires avant leur récolte. Afin de comparer les résultats obtenus d'une construction à l'autre au sein d'une même expérience, le plasmide **JMC100** était transfecté, et il constituait un contrôle positif pour un maximum d'expression du gène de la luciférase de mouche à feu (deWet et al., 1987). Les transfections ont été réalisées en triplicata, et chaque plasmide fut testé au moins trois fois afin de constituer un échantillonnage

statistiquement représentatif pour chaque construction, malgré l'absence de contrôle interne dans chaque expérience. Dans chaque essai, un contrôle négatif (mock) fut effectué en l'accomplissement de toute la procédure, mais en omettant l'addition d'ADN. Un fin précipité se préformait sur les cellules, mais aucune activité luciférase n'était mesurable dans aucun cas.

2.4 Quantification des protéines et de l'activité du gène rapporteur.

La récolte des cellules a été effectuée avec une solution tamponnée de phosphate contenant 1,0 mM EDTA par râclage à l'aide d'un *policeman*. Les cellules ont été centrifugées à 4°C et à 12,000 rpm pendant une minute avec une centrifugeuse réfrigérée Eppendorf de table, et le culot obtenu fut lysé par resuspension en va-et-vient dans 60 µL d'une solution de 100 mM KHPO₄ (pH 8,0), 0,5% Nonidet (NP-40) et 1,0 mM DTT fraîchement préparée. Les lysats ont été laissés sur glace pendant 5 minutes, puis centrifugés à nouveau à 12,000 rpm /10 min/4°C. C'est le surnageant cytoplasmique qui a été utilisé pour mesurer la quantité de protéines et de luciférase.

Les protéines ont été mesurées par la méthode de Bradford, et une courbe standard a été tracée à chaque essai effectué, en prenant l'albumine de sérum bovine comme témoin. Le graphique 3.8 permet de visualiser la relation directement proportionnelle qui existe entre la densité optique à 595 nm et la quantité de protéines, selon un échantillonnage d'une dizaine

d'expériences de dosages. Les protéines ont été dosées en utilisant des quantités de surnageant qui permettent de se situer dans la partie linéaire de cette droite.

Le dosage répété de l'activité de plusieurs échantillons de concentrations connues de luciférase commerciale (*Sigma*) permet encore une fois d'établir une courbe standard. Cette courbe (figure 3.7) démontre qu'il existe bel et bien une relation directement proportionnelle entre l'activité enzymatique de luciférase et la quantité testée. Le protocole de dosage de l'activité luciférase est le suivant: un volume de 52,5 μL contenant une solution aqueuse *fraîchement préparée* de 5mM ATP, 10 mM MgCl_2 , 100 mM KHPO_4 (pH 8,0) et 40,0 μL d'extrait cytoplasmique (ou de tampon de lyse pour un contrôle négatif), est placé dans une petite éprouvette en polystyrène parfaitement translucide à 25°C pendant deux minutes. Ensuite, exactement 100 μL d'une solution commerciale de 10 mM de luciférine (*Sigma*) sont ajoutés à ce mélange dans l'obscurité de la chambrette de mesure d'un luminomètre automatique (*LKB*), dont la petite fenêtre d'affichage (graduée en millivolts) témoigne de l'émission de lumière obtenue à la suite de la réaction entre la luciférase et son substrat, la luciférine. L'utilisation du gène de la luciférase comme gène rapporteur possède de nombreux avantages: en plus d'être un système rapide et d'une sensibilité jusqu'à mille fois plus grande que l'essai CAT (de Wet, 1987), il ne comporte pas l'utilisation d'isotopes radioactifs, et il

est exclusif pour les séquences d'ADN aliénigènes étudiées, vu qu'il n'existe aucune activité luciférase endogène dans les cellules de mammifères.

Les résultats furent calculés de la façon suivante: l'activité luciférase obtenue (en millivolts) pour 40 microlitres (μL) d'extrait cellulaire est rapportée sur la courbe standard de l'activité luciférase, elle-même construite à partir des valeurs obtenues avec des quantités connues et croissantes (graphique 3.7) de luciférase (en picogrammes). La valeur de quantité de luciférase correspondante, en picogrammes/40 μL , est multipliée par 25 pour correspondre à 1,0 mL (1000 μL) d'extrait cellulaire testé. Cette valeur est ensuite divisée par la quantité totale de protéines cellulaires, en mg/mL, cette dernière étant calculée à partir de la correspondance des DO à 595nm de chaque échantillon d'extrait cellulaire respectif à la courbe standard d'essai de protéines de Bradford (graphique 3.8). On obtient finalement la quantité de luciférase (ng) par milligramme (mg) de protéines cellulaires totales. Une molécule de luciférase fonctionnelle est une enzyme, donc, une protéine, qui doit être correctement synthétisée et repliée par la machinerie traductionnelle des cellules récoltées, afin de présenter un site actif intact et fonctionnel, qui permettra la réaction correcte avec son substrat, et produire les photons détectables par cette méthode quantitative.

1. *pRSV*....cctaAGCTTTGGAATTCTTTGTGTTACATTCTTGAATG TCG CTC GCA GTG
ACA TTA GCA TTC CGG TAC TGT TGG TAA A ATG GAA GACLuc

2. *pRSV*.....cctaAGCTAGGCCTCCAGGTACCTGGCTCGAGCACCTTGTGAAGCTTAGAT
CTGTCGACATGCATCCATGGACTAGTGCGGCCGCCCGCGGCAGCTGagcttgg... Luc
| 2 *** |
2 *** |
3. *pE1A*.....gggttctGCTTTGCAACTTCTCCCGTTGCGAGCGAGCGCGCGCGCGGCGG
CGGCGGCGGCGGCTGCAGACGGGGCCGCCAGACGCTGCGGGGGTGGGGGACCT
GGCGGCACGCGAGTCCCCCCCCGGGCTCACAgtatg.....*pE1B*
4. gtatg.....*pE1B*.....(*KpnI*)GGTACCGCGACTGGGAGAAAAGAGGGCGAGGGCCACG
GGCGCCCTTGCAGTTGCCGACAGTCGCCAACAGGTTGCACCGTTCCCCGCGGCCG
CCGCGCGGCCCTCGGGCGGGGAGCAGGCCGGGGTAGAGAAGTGGTGGAGCGG
CAGTGTGTGCGAGTGTGTGCGGCGCCGTGGCGCCCCCTCCGCCCGCCCCTGCGCT
CGGTCCCGCTCGCCGCCTGCCGCGGCCGGGCGCGGCCCTTTTGCGTGTCCGCGCT
CCCCCCCCTCCCTCCGCCTCCTCCattttgc(*SacI*)gagctc..... E1B
5. *pE1B*.....ctccATTTTTCGAGCTCGAGTCAGTGCCTGGTAGCCCGAGTCGCCGCCCG
CCGTCCGGGACGGATTCTAAGTGGGTGGAACAAGACGCCCGCAGCCGGGGCGGCGC
GGCGCCGGGACGGGGACGCGCGCGGGAGACGGGAGCGGCGCGGGGGCCGCT
TGTCAGCCGGGAACGGGTGACTTTCAGCGCTAGGGGCTCTCCCCCCCCATG GAG
AAG AGG GGG CGA CTG TTG ACT TCC TTC TCC GTG ACA CGC GCG CCT CCC
GCG TCC GCA CGC CGA CTT GTT TAT CTG GCT GCG GTG GGA GCC GCG AGC
GGG CGA GCG CGC GGC TGC TGA Ggtgagcggggg....intron1

1. RSV-Luc. 2. MCS 3. E1A 4. *promoteur* E1B 5. E1B.

Figure 2.1 : Structures primaires des différentes séquences 5' non-traduites étudiées au cours de ce projet de recherche.

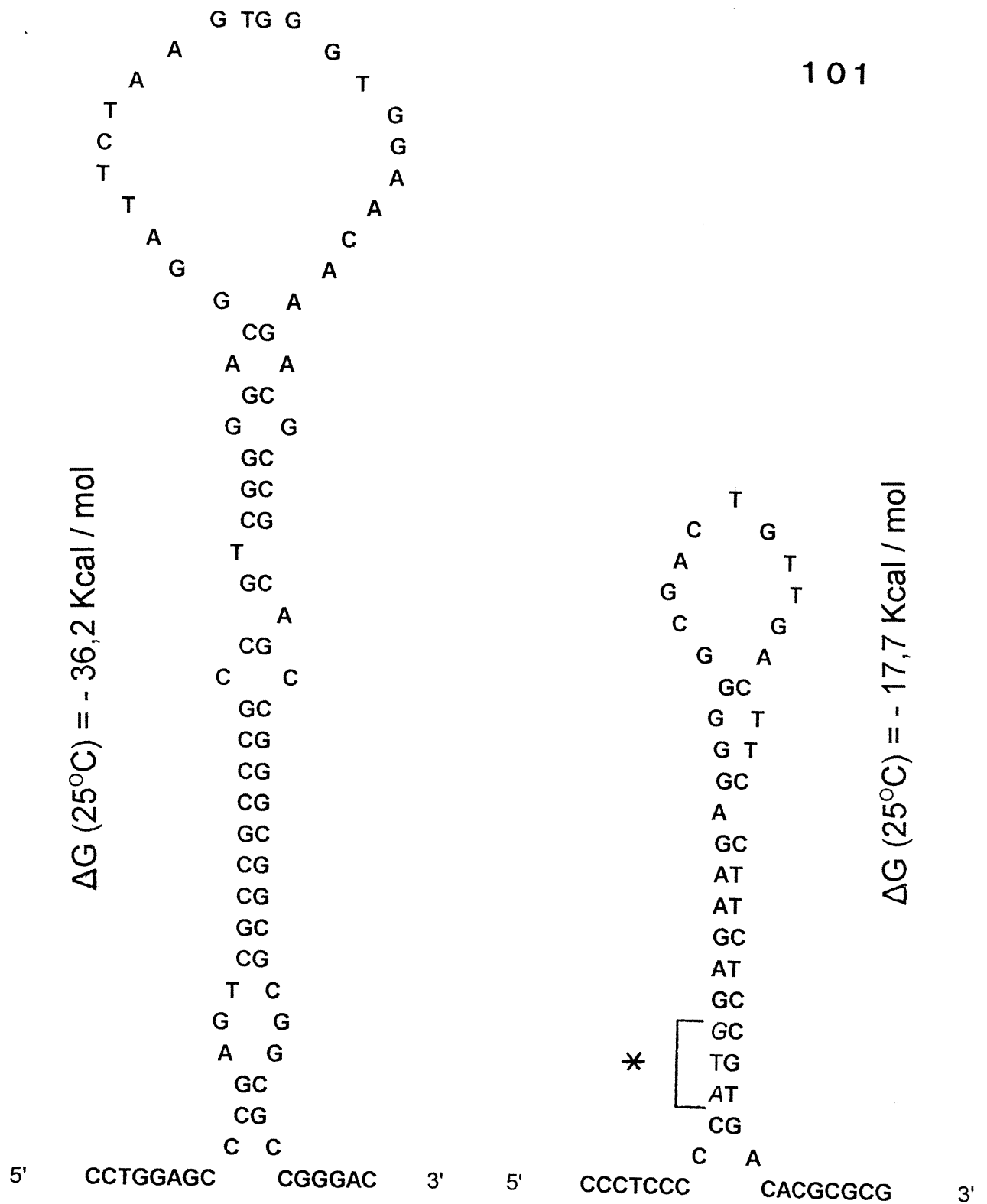


Figure 2.2 : Structures secondaires putatives de l'ARN*m* transcrit à partir de l'exon 1B.

La base de la structure secondaire la plus labile de ΔG : - 17,7 Kcal/mol, possède un codon ATG, conférant l'existence d'un cadre de lecture ouvert au sein de la molécule d'ARN*m*, avec un codon TGA situé plus en aval (figure 2.1).

CHAPITRE 3 : ANALYSE DES RÉSULTATS

Le but de cette recherche est de vérifier si la régulation du récepteur des glucocorticoïdes (GR) chez le rat pourrait s'effectuer par le biais de l'utilisation différentielle de certaines séquences 5' non-traduites situées en amont du gène de ce récepteur. Pour ce faire, certaines techniques de laboratoire furent utilisées, afin d'apporter plusieurs éléments de réponse dans ce type d'investigation exploratoire.

3.1. Survol des méthodes d'investigation employées.

Brièvement, l'approche expérimentale choisie fut d'abord d'emprunter les techniques standard de la biologie moléculaire dans le but d'utiliser les séquences 5' non-traduites du GR de rat déjà caractérisées, et de les installer en amont d'un gène rapporteur, celui de la luciférase, dans un vecteur d'expression eucaryote spécialement conçu dans ce but.

Les techniques de la culture cellulaire furent utilisées, quant à elles, pour procurer un contexte biologique favorable à l'expression de ces chimères génétiques, c'est-à-dire le système naturel fourni par la cellule vivante. Des cellules en culture *in vitro* de primate (cellules COS), ainsi qu'une lignée d'hépatocytes de rat (cellules HTC) et de myoblastes de rat (cellules L6), furent ainsi choisies dans le vaste catalogue proposé par les fournisseurs de lignées cellulaires transformées et immortalisées.

Finalement, certaines techniques biochimiques furent utilisées.

Entre autres, l'essai luciférase a servi à quantifier très précisément le niveau d'expression de la luciférase fonctionnelle présente dans les cellules, et l'essai de protéines par la méthode de Bradford a constitué un test colorimétrique simple et rapide, dans le but de déterminer la quantité totale des protéines présentes dans le lysat cellulaire obtenu à la suite de chaque récolte cellulaire.

3.1.1 Les techniques de la biologie moléculaire comme outil d'investigation.

Ce sont les techniques de la biologie moléculaire qui ont permis à Mike Jacobson *et al.* de découvrir les séquences génétiques du Récepteur des Glucocorticoïdes chez le rat (Jacobson, thèse de doctorat, 1991). Comme dans le cas de la plupart des gènes eucaryotes, les séquences génétiques du GR sont divisées en introns et en exons. Cette modularité dans la structure génétique du GR se retrouve également au niveau des séquences situées en amont du premier exon codant. On retrouve ainsi l'exon E1A, l'exon E1B, et bien d'autres (Jacobson, 1991), séparés par des séquences d'intron d'une longueur plus ou moins variable.

Ces séquences furent sous-clonées dans des vecteurs d'expression bactériens utilisant le système *LacZ* de *E.coli*, dans le but, entre autres, de favoriser l'identification et le séquençage de ces gènes. Ces constructions

ne sont pas du tout appropriées pour l'étude de leur efficacité dans des systèmes eucaryotes.

Afin de répondre aux besoins de ce projet, et afin de vérifier si l'épissage alternatif de ces séquences pourrait être un mécanisme cellulaire d'auto-régulation de l'activité du GR par l'utilisation différentielle de ces séquences 5' non-traduites, il était nécessaire de concevoir un vecteur d'expression eucaryote pourvu d'un promoteur à haut niveau d'expression (comme les séquences LTR de RSV) et d'un gène rapporteur très sensible. Le choix de la luciférase comme gène rapporteur permet une détection par bioluminescence, et constitue un test rapide, facile et précis, qui ne nécessite pas l'utilisation d'isotopes radioactifs, tout en étant jusqu'à 1000 fois plus sensible que l'essai CAT (de Wet et al., 1986).

Le vecteur d'expression **pRSV-Luc** (de Wet et al., 1986), fut amélioré par l'addition d'un site de clonage multiple de 93 paires de base de longueur, obtenu par la technologie de la synthèse d'oligonucléotides, et comprenant 14 sites de restriction couramment utilisés en biologie moléculaire, et qui ne se retrouvent qu'à ce seul site dans le plasmide tout entier. Ce site de clonage multiple (MCS) fut installé au niveau du site unique HindIII de **pRSV-Luc**, situé à une distance de 72 pb en amont du codon AUG propre à la région codante du gène de la luciférase (dépourvu d'introns).

Cette construction, appelée **JMC100**, fut utilisée afin de permettre l'insertion de plusieurs séquences naturellement retrouvées au niveau de la région 5' non-traduites du GR de rat. Cette stratégie a généré toute une famille de chimères génétiques.

Toutes ces constructions furent amplifiées après transformation dans des bactéries compétentes *E.coli* de souche *XLI blue*, dans un bouillon de culture complet avec traitement au chloramphénicol, et purifiées par centrifugation. Ces techniques éprouvées donnaient de très bons rendements (2 à 3 milligrammes de plasmide par litre de culture bactériennes), et des plasmides de très belle qualité lorsque visualisés sur minigel d'agarose. Cela démontre que ces séquences n'étaient pas toxiques pour les bactéries utilisées lors de l'amplification. Il est à noter que l'exactitude des séquences des régions sous-clonées n'a pas été vérifiée par la technique plus précise du séquençage de l'ADN par arrêt d'élongation aux didéoxynucléotides. Une précipitation subséquente dans l'éthanol garantissait la stérilité des préparations génétiques, en vue d'une transformation dans des cellules en culture.

Les chimères génétiques utilisées lors de ce projet sont décrites à la Figure 3,1 située à la page suivante:



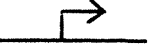

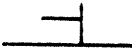


- JMC101** : L'exon 1B tout entier, comprenant deux structures en épingle à cheveux stables. Celle située en 3' est la plus labile, et contient un sORF de 123pb de longueur, codant une protéine de 40 aa.
- JMC102** : L'exon 1B tronqué, ne comprenant que le sORF de la structure secondaire située en 3'.
- JMC103** : L'exon 1B tronqué, ne comprenant que la première structure secondaire stable, flanquée en 5' de la deuxième moitié de l'intron naturellement retrouvé en amont de cette séquence
- JMC104** : L'exon 1B tronqué, ne comprenant que la première structure secondaire stable, aucune séquence d'intron en 5'
- JMC105** : idem à JMC 103, avec un site de restriction modifié, donc inopérant. Il n'a fait l'objet d'aucun essai fonctionnel cellulaire. Il fut nécessaire pour l'obtention de certaines constructions particulières.
- JMC106** : L'intron isolé du mutant JMC103
- JMC107** : idem à JMC101, antisens
- JMC108** : idem à JMC102, antisens
- JMC109** : idem à JMC104, antisens
- JMC110** : L'exon 1A tout entier
- JMC111** : Une séquence de 449 paires de base de longueur provenant d'un vecteur procaryote, *pBluescript KS+*
- JMC112** : idem à JMC109, comprenant trois répétitions de la première structure en épingle à cheveux, antisens.

Figure 3.1 :

Représentation des constructions faisant l'objet des essais fonctionnels cellulaires.

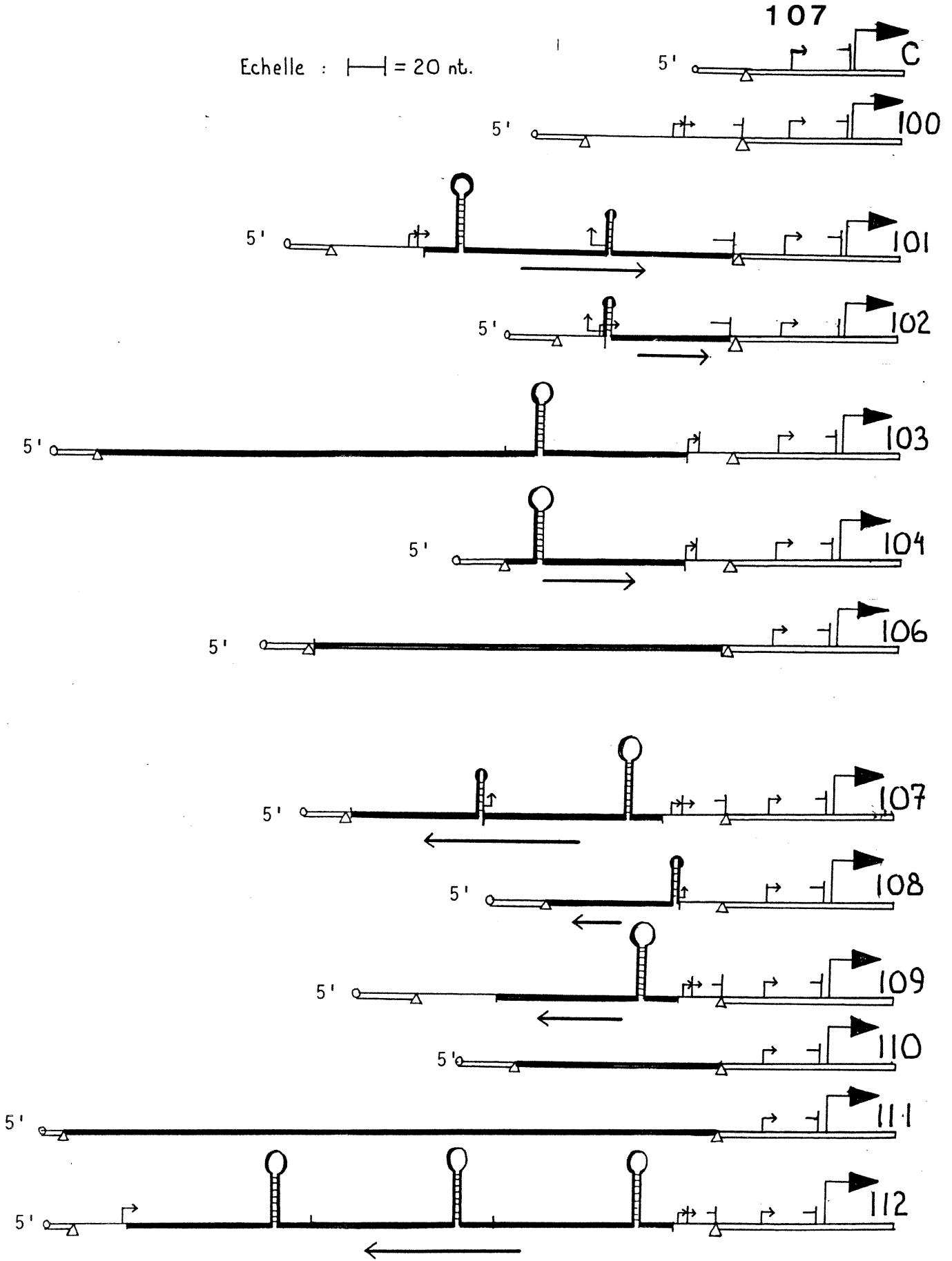
Il est important de souligner que ces représentations des structures secondaires de l'ARNm sont HYPOTHÉTIQUES, compte tenu du fait que l'on suppose que le site de départ de la transcription se situe à l'intérieur du promoteur viral RSV-LTR.

LÉGENDE:

Coiffe	Site HindIII	Codon de départ	MCS	Codon d'arrêt	Vecteur	Insert
						

107

Echelle : $\text{---|---} = 20 \text{ nt.}$



3.1.2 Les techniques de la culture cellulaire comme outil d'investigation.

Tout en constituant un système vivant qui se rapproche beaucoup de la réalité, les lignées de cellules transformées sont aussi des cellules immortalisées, donc, cancéreuses, dont les mécanismes intracellulaires ne correspondent pas exactement à ceux des cellules primaires, que l'on obtient directement à la suite de la digestion partielle des tissus animaux ou humains sains. Les réponses obtenues par des essais effectués sur des cellules *in vitro* ne peuvent pas non plus représenter fidèlement les effets observables dans un tissu, un organe ou un système d'organes retrouvés dans un organisme tout entier. Il s'agit pourtant d'une excellente base de départ pour des investigations pouvant devenir plus poussées, dont les résultats pourront confirmer ou infirmer ces découvertes préliminaires.

Dans le cas de la transformation des cellules *in vitro* par des constructions génétiques artificielles, on bénéficie directement des avantages offerts par la présence parfaitement fonctionnelle de toute la machinerie intracellulaire de transcription, de traduction et de modifications post-traductionnelles qui permettent l'obtention et le repliement correct des protéines, comme la luciférase. On peut aussi faire des déductions quant à l'effet de certaines séquences 5' non-traduites sous-clonées juste en amont des séquences de gène rapporteur.

Un avantage offert par les transformations transitoires des cellules en culture est que le transfectant n'est pas immédiatement dégradé par la

cellule une fois qu'il est internalisé. Les plasmides sont acheminés directement vers le noyau cellulaire, où débiteront les phénomènes de transcription, d'épissage, et de modifications post-transcriptionnelles, de façon à ce que l'ARN m ainsi obtenu soit acheminé vers le cytoplasme. Dans certaines situations, on peut même assister à l'intégration du plasmide au génome de la cellule, par recombinaison génétique, afin d'obtenir des transformants stables, qui expriment les gènes internalisés d'une façon constitutive.

Quand on considère l'utilisation des techniques de transfection pour introduire des séquences génétiques aliénigènes, il est important de considérer les éléments suivants :

3.1.2.1. *La compatibilité de la méthode utilisée avec le type cellulaire.*

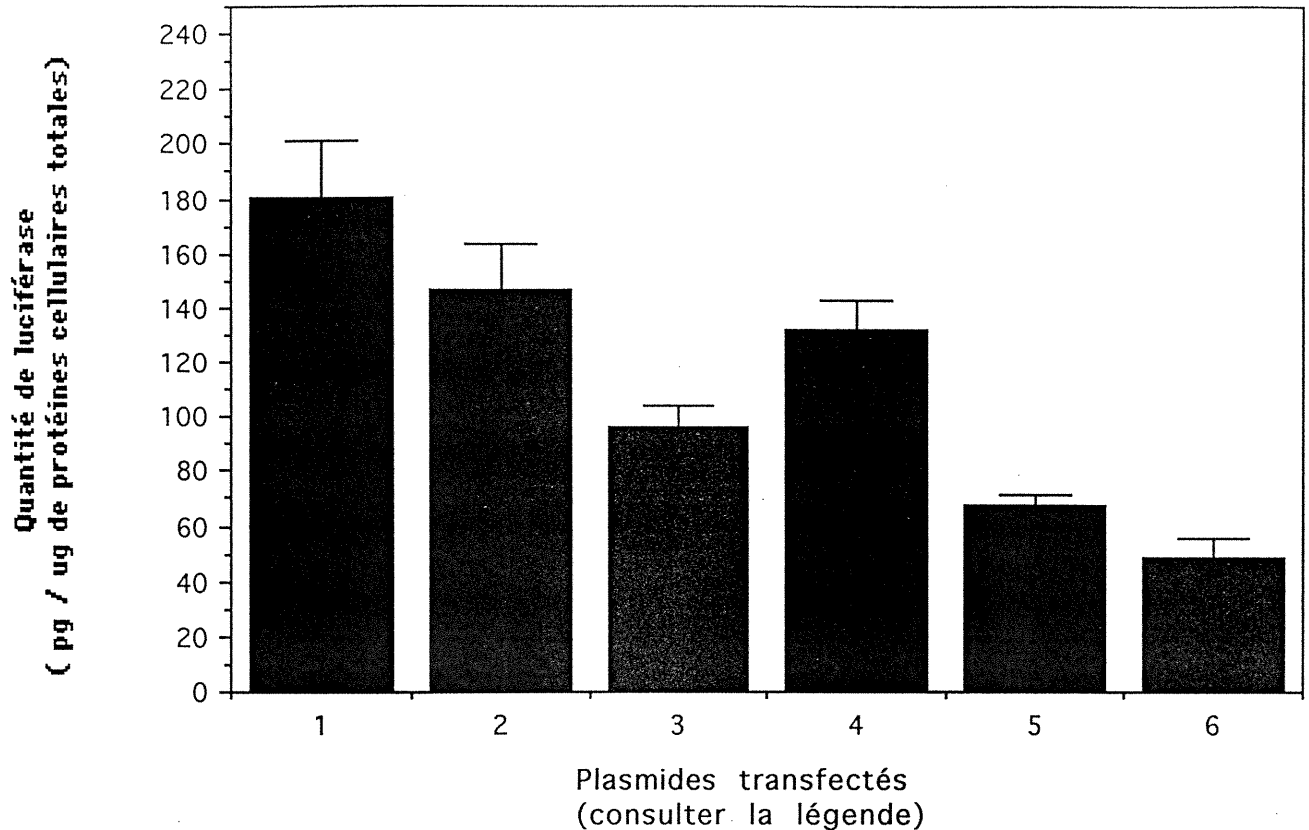
En effet, la transfection des cellules eucaryotes par la méthode classique de la co-précipitation des acides nucléiques avec les sels de phosphate de calcium est une technique qui ne fonctionne pas dans le cas de toutes les lignées cellulaires. Par exemple, des tests préliminaires ont démontré que les cellules GH3 et C7E2A ne répondent pas à cette manipulation. Par contre, les cellules utilisées dans le cadre de ce projet peuvent facilement être transformées par cette méthode, suite à de légères modifications de cette dernière, décrites au chapitre 2.

3.1.2.2. *L'effet de la compétition.*

Lorsque plusieurs plasmides sont co-transfectés dans des cellules en monocouche, il se produit fréquemment une meilleure expression dans un type de plasmide que dans un autre. C'est ce qui est démontré par le résultat 3.2. Dans les trois premières colonnes, une quantité totale d'ADN est demeurée constante à 20 µg, et dans ce total, la quantité de plasmide **JMC 100** demeure constante à 5 µg. Des quantités variables de **pRSV-GH** et de *pBluescriptKS+* (un vecteur d'expression bactérien qui n'est pas exprimé dans les eucaryotes) sont co-transfectées, et démontrent que, plus la quantité de **pRSV-GH** augmente, plus il y a compétition au détriment de l'expression de la luciférase, dont l'activité diminue progressivement. Dans les trois dernières colonnes, le même phénomène est observé au détriment de l'expression de **JMC100** à mesure de l'augmentation des quantités de **pRSV-GH**. Si on compare les colonnes 1 et 4, les quantités co-transfectées de **pRSV-GH** et de **JMC100** sont identiques à 5 µg chacune, sauf que l'addition de 10 µg de plasmide *pBluescriptKS+* semble apporter un effet facilitateur sur l'efficacité d'entrée des plasmides dans la cellule, ce qui donne des résultats plus élevés à l'activité luciférase.

La pertinence de co-transfecter un plasmide comme **pRSV-GH** (ou **pRSV-CAT** ou autre) permet d'apporter un contrôle interne, qui standardise les résultats d'activité luciférase obtenus au terme d'une expérience de transfection, par rapport à ceux obtenus lors d'une

répétition de la même expérience effectuée dans des conditions expérimentales qui ne sont jamais parfaitement identiques à celles du premier essai. Cependant, la pertinence d'effectuer un contrôle interne devient moindre si un grand nombre d'essais est effectué avec la même construction. Par exemple, quand le plasmide **JMC101** est transfecté à plus de 20 fois, comme ce fut le cas lors de ce projet, l'échantillonnage de données d'activité luciférase devient assez considérable pour justifier l'obtention d'un résultat global par le biais du calcul de la moyenne et de l'écart type. Les effets de la compétition sont illustrés à la Figure 3,2 :



Colonne 1 :	JMCI00 : 5 microgrammes	Colonne 4 :	JMCI00 : 5 microgrammes
	RSV•GH : 5 "		RSV•GH : 5 "
	p KS : 10 "		p KS : 0 "
Colonne 2 :	JMCI00 : 5 "	Colonne 5 :	JMCI00 : 5 "
	RSV•GH : 10 "		RSV•GH : 10 "
	p KS : 5 "		pKS : 0 "
Colonne 3 :	JMCI00 : 5 "	Colonne 6 :	JMCI00 : 5 "
	RSV•GH : 15 "		RSV•GH : 15 "
	p KS : 0 "		pKS : 5 "

Figure 3.2 : Effets de la compétition.

Effets de la Compétition offerts par la co-transfection de différentes constructions génétiques en mélange, sur des cellules HTC en phase exponentielle de croissance.

Les valeurs d'activité luciférase obtenues suggèrent que JMCI00 subit un effet de compétition par la présence du co-transfectant RSV•GH (Selden et al.1986).

La comparaison des activités luciférase obtenues suggère que l'entrée d'ADN dans la cellule est facilité par la co-transfection de plasmides non-utilisables ("carrier DNA").

3.1.2.3. *L'effet de la dose de transfectant.*

On serait porté à croire que, plus la cellule est en présence d'une grande quantité d'ADN, plus il y a internalisation, et plus l'expression devient considérable et facilement mesurable par des tests moins sensibles que l'essai luciférase. Les résultats 3.3 et 3.4 démontrent que, dans les cellules HTC, l'expression de la luciférase atteint un sommet vers des concentrations de 20 μg de **JMC100**, pour ensuite diminuer au fur et à mesure de l'augmentation de la quantité de transfectant. Les cellules COS-7 semblent démontrer une meilleure tolérance aux concentrations élevées soit d'ADN, ou soit des sels de phosphate et de calcium présents dans la mixture saline utilisée lors de la procédure de transfection. Dans le cas de toutes les expériences qui furent effectuées au cours de ce projet, une quantité de 10 μg de plasmide fut utilisée, par souci d'économie, pour la transformation des cellules, avec des résultats adéquats, faciles à mesurer, et avant tout, très reproductibles. Les graphiques 3.3 et 3.4, retrouvés aux pages suivantes, illustrent les effets de la dose de transfectant dans les cellules COS-7 et HTC, respectivement:

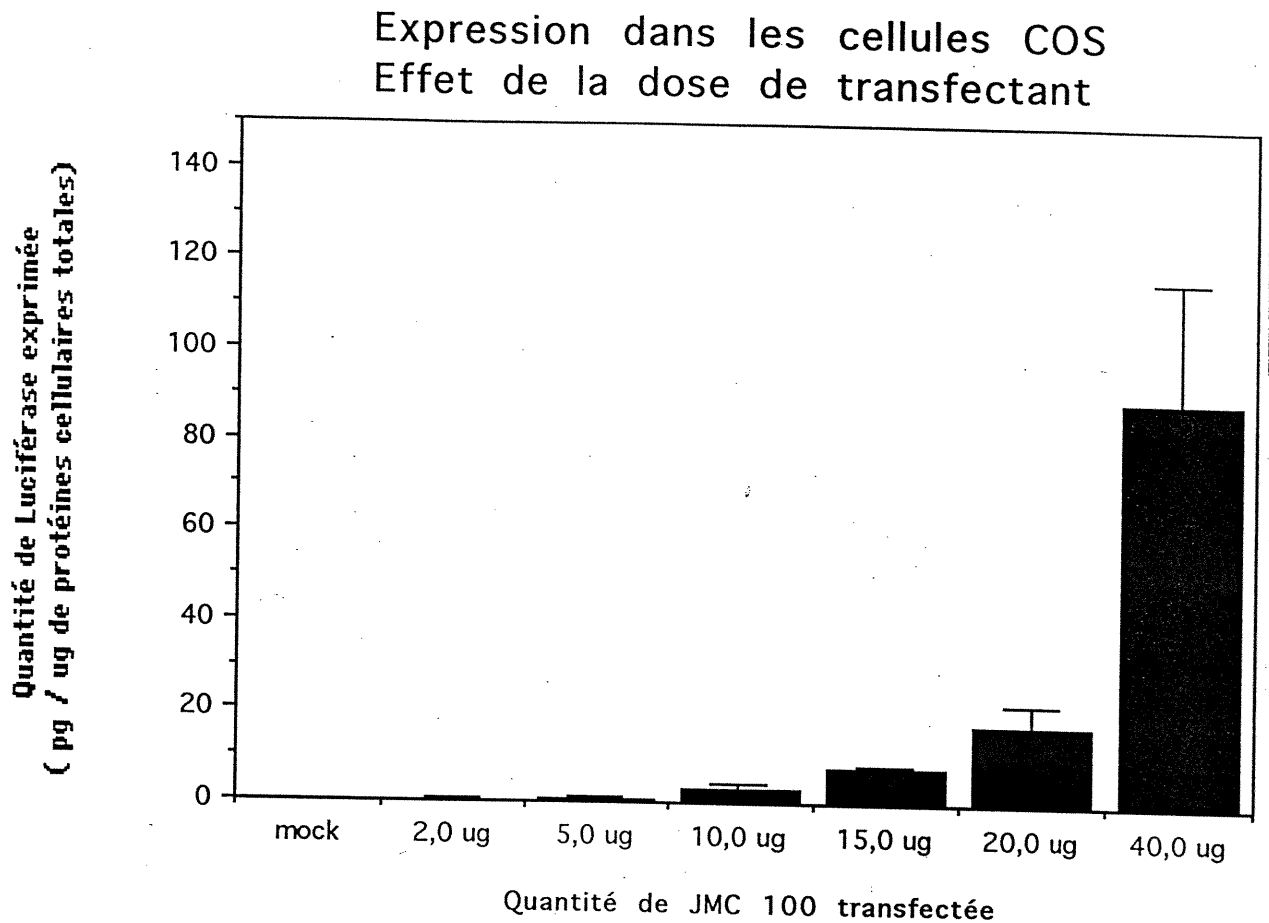


Figure 3.3 : Effet de la dose de transfectant dans les cellules COS-7.

L'effet toxique d'un précipité de phosphate de calcium est attendu lorsqu'une dose supérieure à 40 microgrammes d'ADN est appliquée sur les cellules COS-7 en phase exponentielle de croissance. Une quantité de 10 microgrammes constitue donc une dose idéale afin d'économiser l'utilisation de plasmide.

Expression dans les cellules HTC
Effet de la dose de transfectant

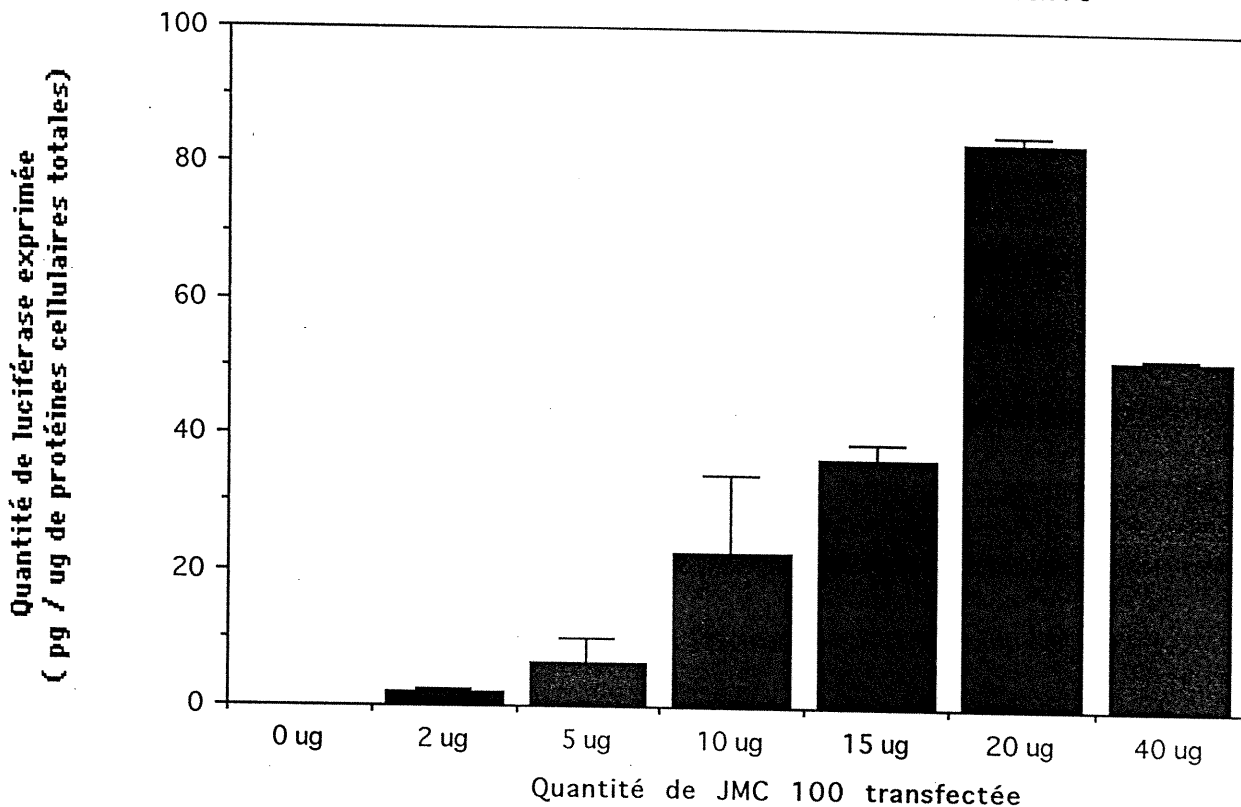


Figure 3.4 : Effet de la dose de transfectant dans les cellules HTC.

L'effet toxique d'un précipité de phosphate de calcium est observé lorsqu'une dose supérieure à 20 microgrammes d'ADN est appliquée sur les cellules HTC en phase exponentielle de croissance. Une quantité de 10 microgrammes constitue donc une dose acceptable pour effectuer des expériences de transformation.

3.1.2.4. *L'effet de la cinétique de l'expression transitoire.*

Il était important de vérifier à quel moment la récolte des cellules devait être effectuée, étant donné que ces expériences de transfection constituaient, en fait, des essais transitoires, et non stables.

Lors d'un essai transitoire, l'expression génétique s'effectue d'une manière évolutive dans le temps, jusqu'à atteindre un sommet où l'expression est maximale, puis, va en décroissant. Cette décroissance dans l'activité du gène rapporteur peut s'expliquer par le fait qu'une dilution progressive de l'épisome se produit au fur et à mesure de l'augmentation de la quantité cellulaire dans le récipient de culture. La luciférase fait également l'objet d'une telle dilution au sein de l'extrait cellulaire récolté. En outre, un plasmide qui ne s'intègre pas au génome et qui demeure sous une forme épisomale ne peut se répliquer par lui-même, et subit souvent les effets d'une attaque par les nucléases du cytoplasme.

Les graphiques 3.5 et 3.6 démontrent que le sommet de l'expression transitoire pour les cellules COS-7 et HTC est atteint dans les 66 heures et les 48 heures, respectivement, après la transfection. C'est pourquoi toutes les récoltes furent effectuées 36 heures après la transfection, ce qui nous place dans le point milieu de la partie ascendante de la courbe pour les deux types cellulaires étudiés ici.

Expression dans les cellules COS Effet du temps

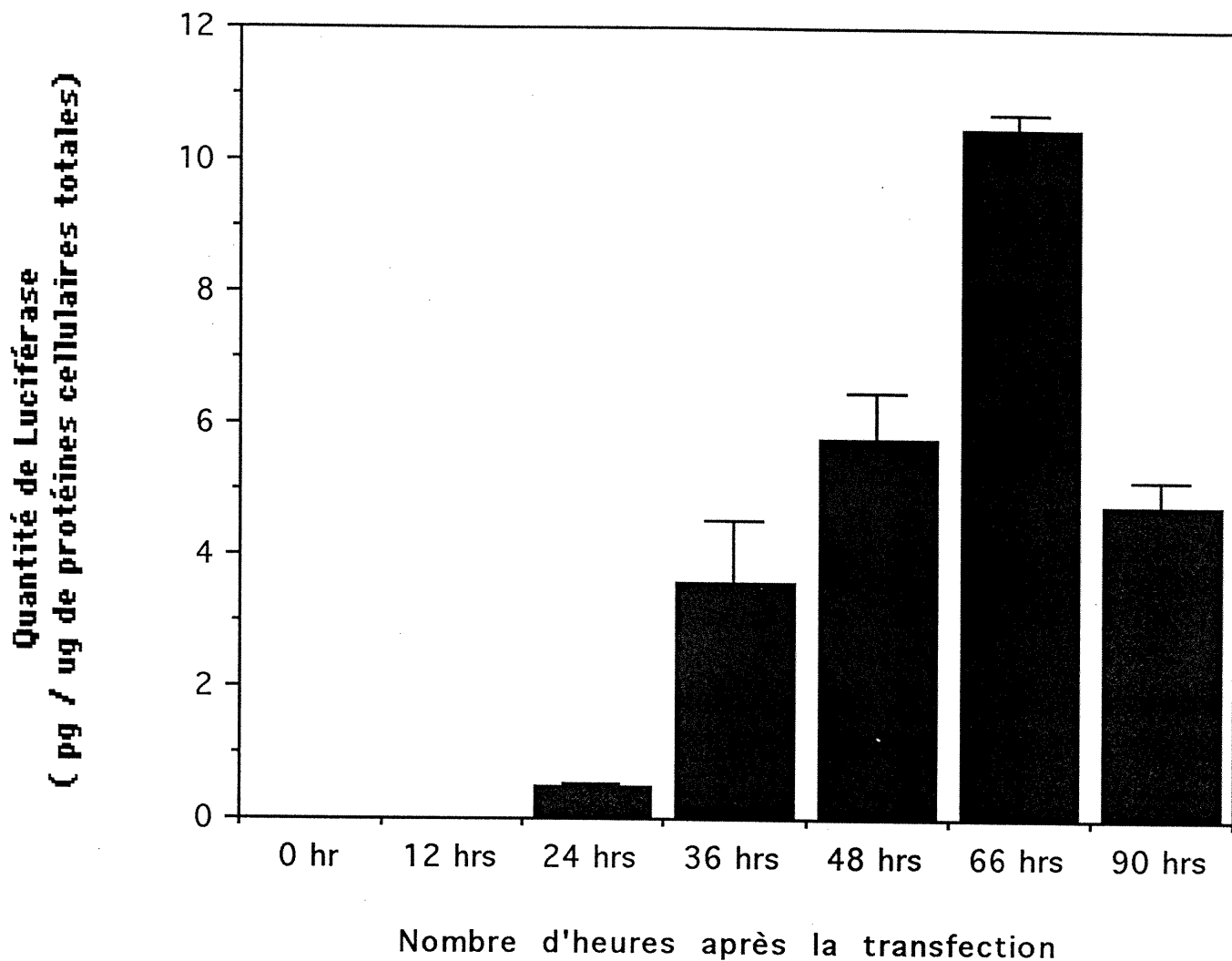


Figure 3.5 Cinétique de l'expression transitoire dans les cellules COS-7.

L'effet toxique d'une confluence cellulaire excessive est attendu 66 heures après la transformation des cellules HTC. Une récolte effectuée 36 heures après la transformation des cellules permet d'obtenir des extraits cellulaires de bonne qualité.

Expression dans les cellules HTC Effet du temps

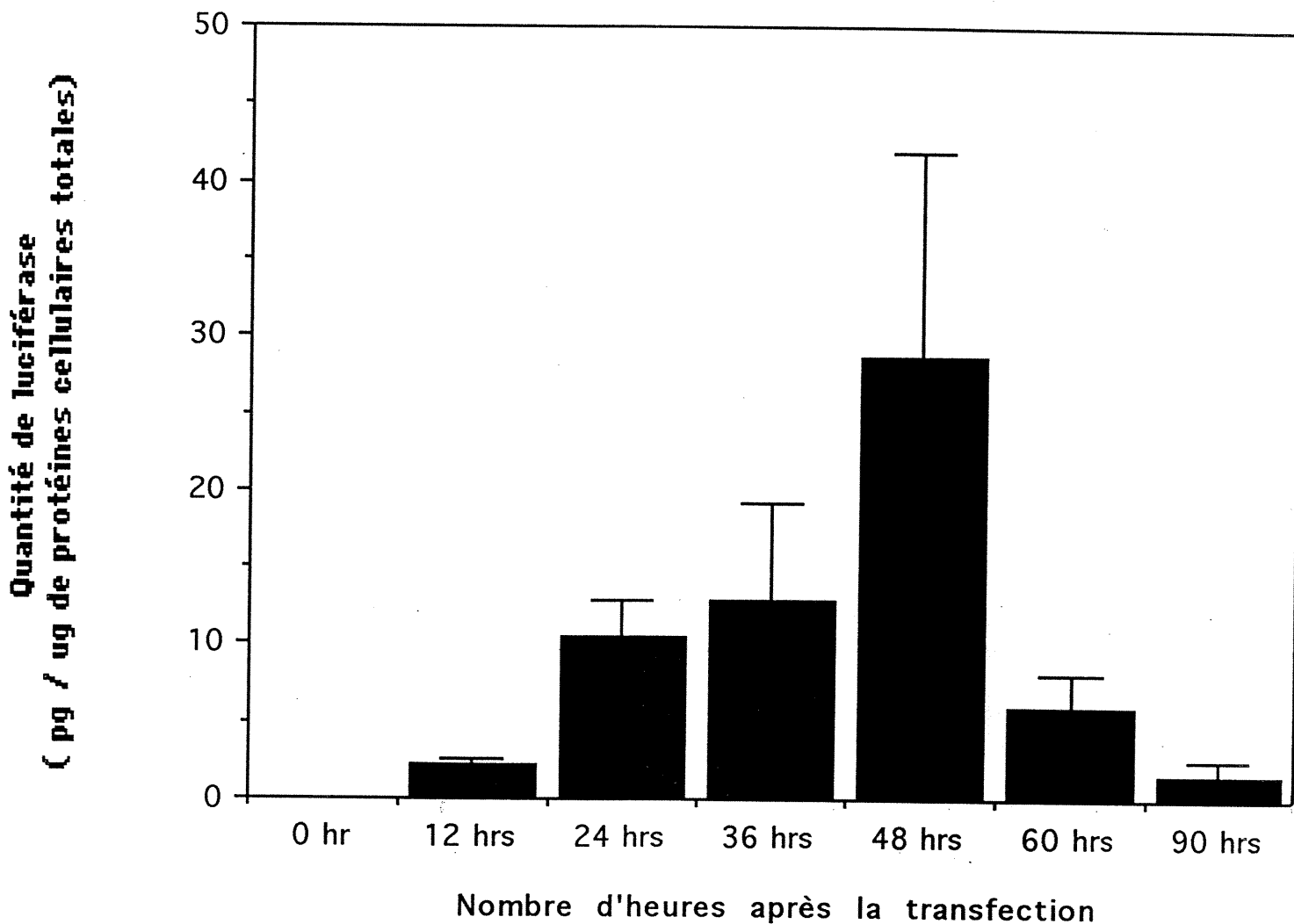
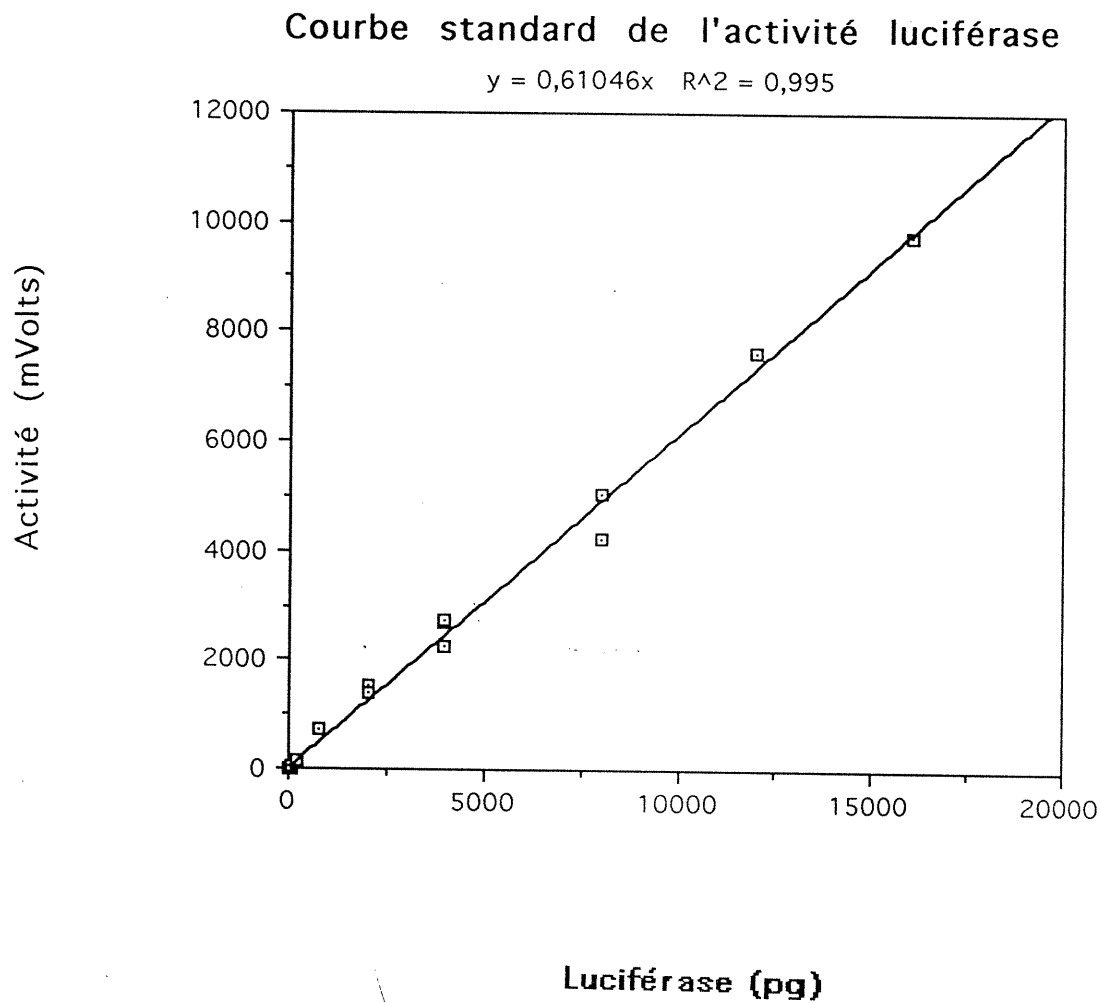


Figure 3.6 Cinétique de l'expression transitoire dans les cellules HTC.

L'effet toxique d'une confluence cellulaire excessive est attendu 48 heures après la transformation des cellules HTC. Une récolte effectuée 36 heures après la transformation des cellules permet d'obtenir des extraits cellulaires de bonne qualité.

3.1.3 Les techniques biochimiques comme outil d'investigation.

Les techniques biochimiques qui furent utilisées lors de cette recherche sont, premièrement, le test standard de la détermination de l'activité luciférase dans un échantillon de 40 μ L d'extrait cellulaire cytosolique (graphique 3.7), et deuxièmement, l'essai de protéines par la méthode de Bradford (graphique 3.8). Dans les deux cas, une courbe standard de l'activité luciférase, ainsi qu'une courbe standard de la densité optique à 595 nm doivent être tracées, en fonction, respectivement, de la concentration de luciférase et de la concentration de protéines totales présentes dans l'extrait cellulaire. Il est très important de s'assurer de la consistance de la relation directement proportionnelle observée pour les activités luciférase et des densités optiques mesurées, en fonction de la concentration de la luciférase et des protéines, et de calculer les concentrations d'inconnues à partir de points qui demeurent dans la partie linéaire des courbes standards. Dans les deux cas, cette règle de base pour assurer une fiabilité optimale dans la cueillette des données nécessaires pour les calculs et l'analyse subséquente des résultats a été bien observée.



$$pg = \frac{mV}{0,61046}$$

Figure 3.7. : Courbe standard de l'activité luciférase.

Courbe standard de protéines
Méthode de Bradford

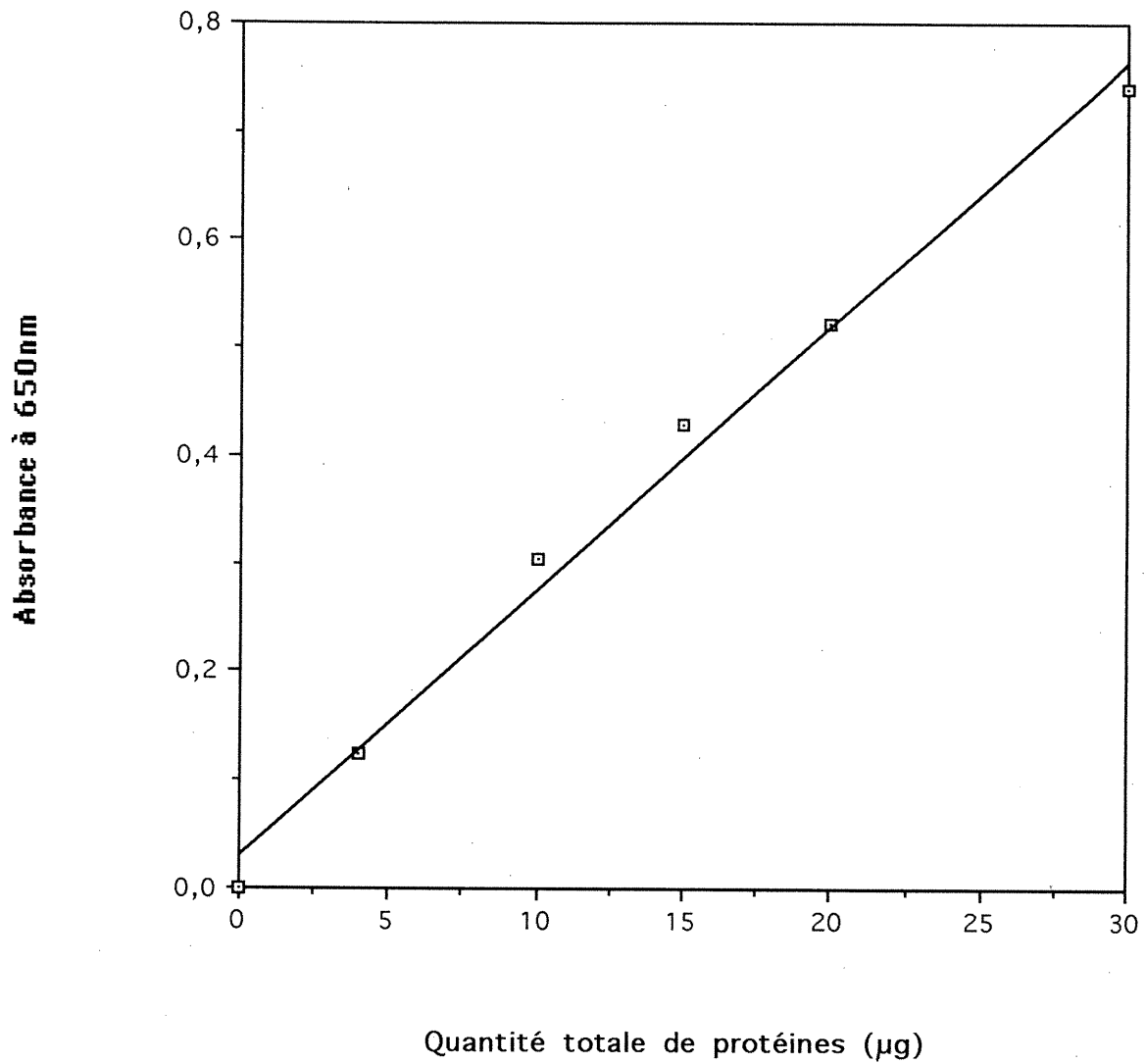


Figure 3.8. : Courbe standard des concentrations de protéines cellulaires totales.

3.2 Analyse des résultats obtenus pour chaque groupe testé.

3.2.1. Résultats obtenus avec le contrôle positif.

La construction **pRSV-Luc** comprend le promoteur LTR de RSV, flanqué d'un site HindIII complet et fonctionnel, qui fut introduit artificiellement lors de la construction de ce vecteur (de Wet et al., 1986). Puis, une séquence de 27 nucléotides suit immédiatement en aval (Figure 2.1) , jusqu'au premier codon AUG, situé dans le contexte suivant:

5' ATTCTTGAATGTCGCTCCAAGTG 3'

On remarque que ce premier codon d'initiation ne se retrouve pas dans un contexte idéal, car il ne s'agit absolument pas d'une séquence-consensus de Kozak. On retrouve ici des pyrimidines dans les positions -3 et +4 (soulignées), alors qu'un contexte de départ optimal devrait comprendre des résidus purine. Ce premier codon AUG est néanmoins utilisé (de Wet et al., 1986). Il constitue le codon de départ d'un *sORF* qui se termine 50 pb en aval. Puis, *un* nucléotide en aval du codon de terminaison, à la position +52, on retrouve le résidu adénine du premier codon véritable de l'enzyme luciférase de la mouche à feu *Photinus pyralis*, qui se situe dans le contexte suivant :

5' TGTTGGTAAAAATGGGAAGAC 3'

Cette construction constitue un véritable témoin positif, offrant les niveaux maximum d'activité luciférase mesurés par bioluminescence au

cours de cette recherche (graphiques 3.9, 3.10 et 3.11).

Si on considère les résultats des études de Marilyn Kozak dans ce secteur de recherche, la présence d'un codon AUG situé en amont d'un deuxième codon d'initiation possède un effet inhibiteur sur l'initiation de la traduction. Dans le cas présent, le premier codon AUG ne se situe pas dans un contexte favorable, ce qui ne ralentit pas à coup sûr le balayage de la sous-unité 40S le long de l'ARN m . Ceci contrevient au postulat du *first AUG rule*, et se solde par un balayage incomplet (*leaky scanning*). En outre, la construction **pRSV-Luc** est celle qui présente la séquence 5' non-traduite la plus courte, parmi tout l'éventail de plasmides utilisés au cours de ce projet.

On peut comprendre immédiatement l'importance d'utiliser un système de détection extrêmement sensible et précis pour ce genre d'expérience, car les valeurs obtenues avec **pRSV-Luc** constituent ici un rendement maximal, caractéristique d'un contrôle positif. On peut supposer que des expériences de mutagénèse dirigée effectuées au niveau du contexte d'initiation peu favorable offert par le premier codon AUG pourraient optimiser les niveaux d'expression du plasmide **pRSV-Luc**. Ceci apporterait une preuve supplémentaire pour appuyer la théorie de Marilyn Kozak, vu que tout changement dans les niveaux d'expression de la luciférase serait facilement détecté par la sensibilité du système de bioluminescence.

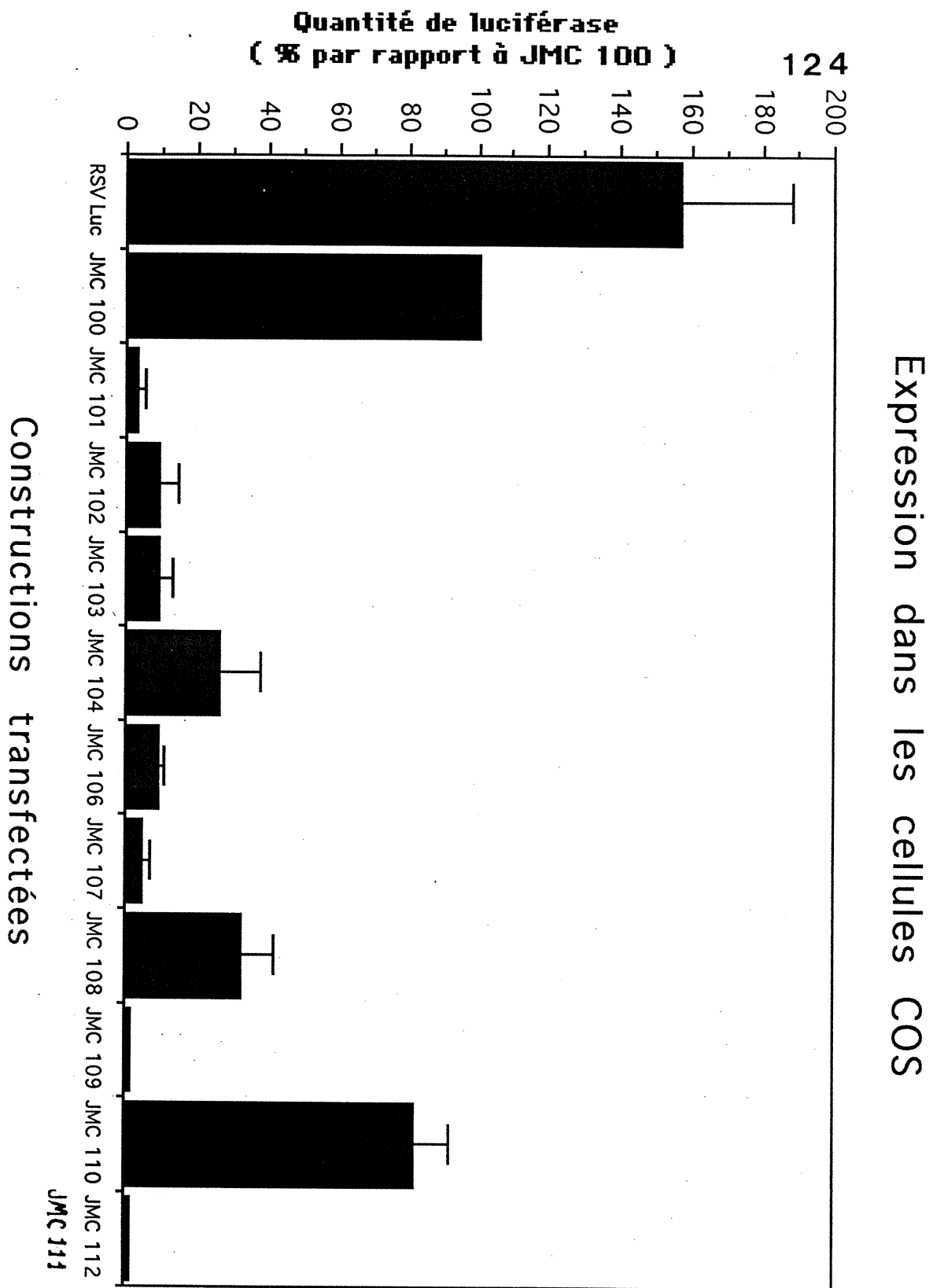


Figure 3.9. : Expression des chimères génétiques dans les cellules COS-7.

Expression dans les cellules HTC

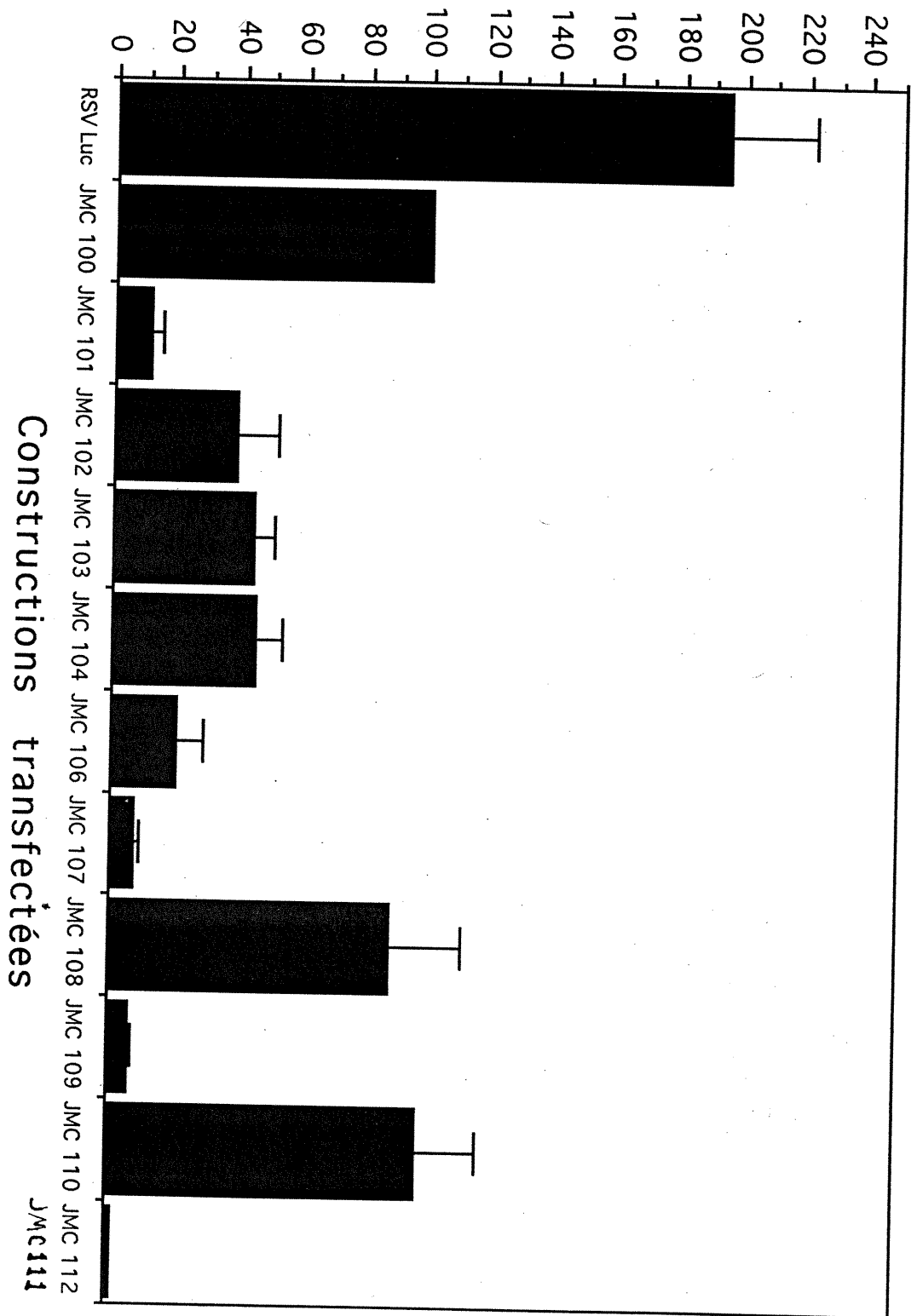


Figure 3.10. : Expression des chimères génétiques dans les cellules HTC.

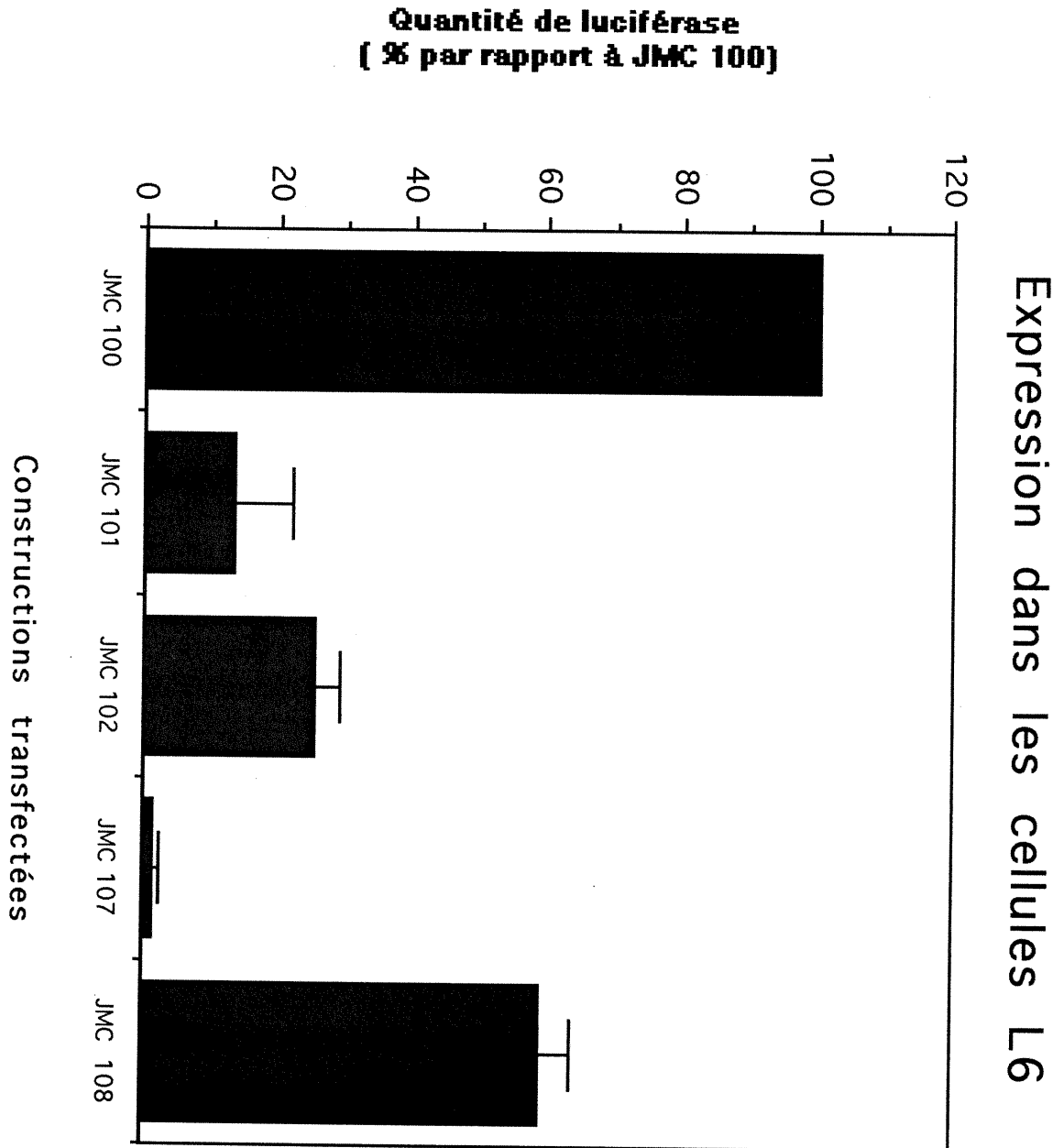


Figure 3.11. : Expression des chimères génétiques dans les cellules L6.

Dans cette lignée cellulaire, un nombre restreint de constructions génétiques furent testées, en l'occurrence, les plasmides JMC100, 101, 102, 107 et 108.

L'insertion d'un site de clonage multiple de 93 paires de bases de longueur au site HindIII de **pRSV-Luc** permet d'obtenir la construction **JMC100**, laquelle fut utilisée pour effectuer la plupart des autres constructions subséquentes. Le produit de la transcription de **JMC100** consiste en un ARN similaire à celui correspondant à **pRSV-Luc**, mais pourvu l'une séquence 5' non-traduite rallongée de 93 paires de bases, riche en petites séquences palindromiques. Chaque palindrome représente un des 14 sites de restriction retrouvés dans le site de clonage multiple inséré. Selon les résultats des investigations effectuées par Marilyn Kozak, l'allongement de la séquence 5' non-traduite devrait s'accompagner d'une augmentation de l'efficacité de la traduction, à cause du fait qu'un nombre de plus en plus élevé de sous-unités 40S peuvent s'aligner et attendre leur tour pour un assemblage définitif du ribosome au niveau du premier AUG, préférentiellement situé dans un contexte favorable. On devrait donc s'attendre à une augmentation du taux d'efficacité de traduction de l'ARN messager obtenu, mais ce n'est pas le cas. En fait, l'efficacité de traduction du messager est diminuée de moitié par rapport à **pRSV-Luc**.

Ce phénomène peut s'expliquer par une observation d'une partie de la séquence du MCS, au niveau des sites allant de SalI à SpeI :

5' GTCGAC ATGCAT CCATGG ACTAGT 3'

Sal I / Nsi I / NcoI / SpeI

On réalise que les sites de restriction Nsil et NcoI, qui furent essentiels pour construire les mutants de délétion partielles de l'exon 1B, et pour effectuer des analyses de restriction sur minigel d'agarose lors de l'obtention des transformants positifs, contiennent également des codons ATG, qui font automatiquement partie intégrante de la séquence d'ARN m située en amont de la luciférase.

Cette introduction (non désirée) de codons de départ supplémentaires diminue le taux de traduction du messenger, d'autant plus que les nucléotides situés dans les positions-clés entourant le site ATG sont justement des résidus purines. Les valeurs d'activité luciférase obtenues correspondent seulement à la moitié de celles fournies par le contrôle positif **pRSV-Luc**, à cause de cet effet de compétition offert par ces codons d'initiation supplémentaires. On obtient quand même des valeurs de luciférase assez substantielles pour comparer les efficacités de traduction offertes par d'autres constructions.

La présence de deux codons AUG situés au niveau du site de clonage multiple, et entourés d'un contexte favorable, se solde à coup sûr par l'arrêt de la sous-unité 40S à cet endroit, selon la *Loi du Premier Codon*. Ceci résulte en la synthèse d'une agnoprotéine putative de 12 acides aminés de longueur, si le ribosome s'assemble au niveau du premier AUG (Figure 2.1). Si ce premier codon n'est pas reconnu à cause d'un balayage incomplet, un arrêt putatif de la sous-unité 40S pourrait

s'effectuer au niveau du deuxième codon situé au site voisin NcoI. Dans ce cas, un dipeptide serait synthétisé, pour se solder par la dissociation du ribosome et la poursuite du balayage de la sous-unité 40S le long du messager. La luciférase fonctionnelle traduite ultérieurement serait alors le fruit d'une réinitiation. L'introduction d'un MCS double la longueur de la région 5'UTR, et favoriserait l'accumulation de tout un chapelet de sous-unités 40S à partir de la coiffe. On augmenterait ainsi l'efficacité du messager à favoriser la traduction d'une luciférase complète, afin de compenser pour une partie de la perte d'efficacité conférée par les *sORF* du MCS. Les taux d'activité luciférase obtenus avec **JMC100**, qui sont équivalents à la moitié des valeurs obtenues avec le contrôle positif **pRSV-Luc**, correspondent aux mêmes ordres de grandeur que ceux observé lors de l'analyse des mutants de délétion dépourvus de *sORF* en amont du gène de la luciférase lors de la construction de **pRSV-Luc** (de Wet et al., 1986). Un *sORF* aurait donc tendance à réduire le taux de traduction d'un messager de 50%.

Il serait séduisant de penser que l'agnoprotéine synthétisée par les séquences codantes d'un *sORF* situé en amont d'un gène donné puisse contribuer à un quelconque mécanisme de régulation biochimique qui nécessiterait la présence d'un facteur traductionnel. À date, aucun rôle distinct n'a été associé à de tels polypeptides.

3.2.2 Résultats obtenus avec l'exon 1B entier.

Les constructions **JMC101** et **JMC107** se caractérisent par la présence de l'exon 1B entier au sein du site de clonage multiple. **JMC101** se caractérise par les séquences de cet exon dans leur orientation naturelle 5' à 3' tel que suggéré par les expériences de séquençage effectuées antérieurement (Jacobson, 1991). L'orientation inverse fut effectuée dans la construction **JMC107**, pour éliminer l'effet du court cadre de lecture ouvert retrouvé dans **JMC101** tout en conservant les structures secondaires de l'ARN*m*. Dans les deux cas, les niveaux d'expression de la luciférase sont très faibles si on les compare au contrôle positif **JMC100**, et ce, pour les deux types cellulaires considérés. Ainsi, on observe des niveaux d'expression de luciférase de 4% et de 8% seulement, dans les cellules HTC et les cellules COS-7, respectivement, par rapport au témoin positif **JMC100**. Ces résultats sont concordants avec les travaux de Marilyn Kozak sur l'effet des structures secondaires stables placées en amont d'un codon AUG, qui ont pour rôle de bloquer le balayage de la sous-unité 40S le long de la séquence 5' non-traduite, par effet d'encombrement stérique.

3.2.3 Résultats obtenus avec les mutants de délétion partielle.

L'obtention de sections tronquées de l'exon 1B, et leur sous-clonage dans le vecteur d'expression **JMC100**, constituent des constructions tout-à-fait artificielles. Toutefois, ces expériences de dissection moléculaire apportent plusieurs informations sur l'efficacité des différentes composantes de l'exon 1B dans la possibilité d'une régulation post-transcriptionnelle de l'expression du GR dans les cellules en culture. Ainsi, les constructions **JMC102** et **JMC108** nous permettent de comprendre le rôle de la présence d'un court cadre de lecture ouvert situé en amont du codon de départ du gène rapporteur, et de juger de son efficacité dans le contrôle de son expression.

Dans les deux types cellulaires étudiés ici, la construction **JMC102** contribue à réduire substantiellement le niveau d'expression de la luciférase par rapport au contrôle positif **JMC100**, mais d'une façon moins drastique que la construction comprenant l'exon 1B tout entier. Le court cadre de lecture ouvert de **JMC102** permet la traduction d'une petite partie du messenger pour former une agnoprotéine de 40 acides aminés, et se solde par la dissociation complète du ribosome entier au niveau du codon d'arrêt de ce *sORF*, situé à une centaine de nucléotides en amont du codon d'initiation de la luciférase. Ceci diminue l'efficacité de la traduction du gène rapporteur situé en aval.

Le contexte du codon d'initiation du sORF est le suivant (Figure 2.1) :

5' TCCCCCATGGAGAAG 3'

Cet excellent contexte, avec une purine en position +4, nous permet de conclure que, encore ici, les événements permettant la traduction du gène rapporteur sont le balayage incomplet, et la réinitiation. Les résultats expérimentaux vont dans le même sens que les conclusions de Marilyn Kozak sur ce sujet. Le mutant **JMC102** montre un taux d'expression équivalant à près de la moitié (40%) de **JMC100** dans les cellules HTC, mais de seulement 10% , en moyenne, dans les cellules COS-7. L'écart observé entre ces deux types cellulaires par rapport à l'inhibition conférée par la présence d'un sORF est digne de mention. Ceci suggère que certaines cellules, ou certains tissus, seraient plus sensibles que d'autres, en montrant une régulation plus ou moins prononcée par le biais de l'utilisation de ces mécanismes de contrôle au niveau de l'ARN*m*.

En sachant que les systèmes naturels sont, en général, structurés et organisés dans le but de la conservation de l'énergie, l'utilisation d'un mécanisme nécessitant la synthèse d'une agnoprotéine de ce type paraît constituer un gaspillage d'énergie métabolique. L'avantage évolutif d'un tel mécanisme de régulation se retrouve probablement dans le fait que la traduction d'un petit polypeptide inutile représente, en fait, un moindre mal par rapport à la traduction d'une grosse protéine fonctionnelle dont la présence ne serait pas requise selon les conditions de vie de la cellule.

La construction **JMC108** démontre que l'insertion du *sORF* dans l'orientation inverse annule l'effet du codon d'initiation AUG, qui se lit maintenant GUA de 5' à 3', et résulte en fait en l'allongement de la région 5' non-traduite de 130 paires de base supplémentaires par rapport au contrôle positif **JMC100**. Les résultats obtenus suite à la transformation des cellules en culture avec cette construction sont très clairs : dans les deux lignées considérées, on assiste à une augmentation nette de l'expression de la luciférase. Ainsi, dans le cas des cellules HTC, les valeurs de **JMC108** sont presque aussi élevées (86%) que celles du contrôle positif. En outre, le taux d'expression de **JMC108** est le double de celui de **JMC102** dans le cas de cette lignée cellulaire (Figure 3.10). Dans les cellules COS-7, le taux d'expression de **JMC108** est de moitié moindre par rapport au contrôle positif, mais il est quatre fois plus élevé que dans le cas de l'orientation naturelle 5'-3' retrouvé dans **JMC102**. Ainsi, l'allongement de la région 5' non-traduite contribue efficacement à l'augmentation de l'efficacité de la traduction, probablement en favorisant l'accumulation de plusieurs sous-unités 40S le long de la molécule d'ARN messenger. Ce résultat suggère également que le processus de l'initiation de la traduction doit obligatoirement favoriser le balayage (*scanning*) de l'ARN m à partir de la coiffe, donc, de l'extrémité 5'. Si les sous-unités 40S pouvaient initier la traduction directement par attachement aléatoire le long de la région 5' non-traduite de l'ARN m sans reconnaître la coiffe au

préalable, il serait difficile d'observer un effet positif par le simple fait d'allonger la séquence 5' non-traduite. On pourrait s'attendre à ce que l'introduction d'une structure secondaire de faible stabilité près de l'extrémité 5' de ce mutant diminuerait l'efficacité de la traduction, en dépit d'un allongement supplémentaire de la structure primaire du messenger (Kozak, 1986).

Ces résultats de dissection moléculaire proviennent d'un design expérimental selon lequel chaque essai a été effectué en triplicata dans le cadre de plus de 6 expériences distinctes effectuées séparément au cours de plusieurs semaines d'investigation. Cela confirmerait la reproductibilité de ces résultats.

Les séquences d'ARN m du *sORF* peuvent former une structure secondaire de 14 paires de bases de longueur, avec une énergie libre ΔG : -17,7 Kcal/mol, mais qui est quand même facile à dénaturer (Kozak, 1992) par l'activité hélicase putative de la sous-unité 40S en cours de migration.

Ce résultat suggère également qu'une structure secondaire plus stable aurait un effet inhibiteur plus prononcé sur la traduction. C'est ce qui est observé avec les mutants **JMC104** et **JMC109**. Ces constructions contiennent la première moitié de l'exon 1B, dans les orientations sens et antisens, respectivement. Cette région se caractérise par la présence d'une structure en épingle à cheveux, dont la tige contient 20 paires de bases

appariées, constituée surtout de résidus C et G, et ayant une énergie libre ΔG : -36,2 Kcal/mol, ce qui constitue une structure très stable. Les valeurs de l'activité luciférase obtenues pour les deux types de constructions sont considérablement inférieures à celles obtenues dans le cas du contrôle positif **JMC100**, ce qui suggère bel et bien un effet inhibiteur de cette structure secondaire sur l'efficacité de la traduction, et ce, dans les deux lignées cellulaires étudiées dans ce projet. L'examen détaillé de la structure primaire du transcrit putatif de **JMC104** suggère qu'il n'y a pas de cadre de lecture ouvert au niveau de cette construction, et que l'effet inhibiteur est avant tout causé par une structure secondaire qui n'est pas assez encombrante pour arrêter totalement la traduction. Ainsi, dans le cas des cellules HTC, la construction **JMC104** montre un niveau d'expression de presque la moitié du contrôle positif. Dans les cellules de primate, cette diminution est plus marquée, de l'ordre de 25% du contrôle positif. Cela représente quand même une baisse de l'efficacité de traduction de près de 50%, par rapport aux effets conférés par une structure moins stable, comme celle permise par le mutant **JMC108**.

A priori, l'inversion de cette structure secondaire ne devrait pas produire une baisse marquée de l'efficacité de la traduction. Les valeurs d'activité luciférase très faibles observés pour **JMC109** (1,3% du contrôle positif pour les cellules COS-7 et 6% pour les cellules HTC) suggèrent qu'un mécanisme supplémentaire doit intervenir pour réduire autant les

taux de traduction. L'analyse des séquences génétiques de **JMC109** pourrait apporter une réponse intéressante: un site *Nsil* est situé juste en amont du site *NcoI* qui fut utilisé lors du sous-clonage de l'insert inversé. Ce site *Nsil* possède un codon d'initiation de la traduction, qui introduirait un *sORF* en amont de la structure secondaire, et qui diminuerait considérablement l'efficacité d'expression du gène rapporteur. Cette comparaison des résultats entre les constructions **JMC104** et **JMC109** apporte la démonstration supplémentaire que l'introduction d'un *sORF* réduit considérablement le taux de traduction d'un gène.

La construction **JMC103**, dans laquelle on retrouve une séquence d'intron de 280 paires de bases de longueur en amont de la première boucle, donne des résultats deux fois plus faibles que **JMC104** dans les cellules COS. Les résultats obtenus pour les cellules HTC ne peuvent être considérés ici, vu que l'expérience ne fut effectuée qu'une seule fois dans ce type cellulaire.

La preuve que la présence d'une structure secondaire massive située dans la région 5' non-traduite possède un effet inhibiteur sur l'efficacité de la traduction est fourni par la construction **JMC112** : ici, la présence d'un trio de boucles stables en amont du site d'initiation de la traduction empêche presque totalement l'expression du gène rapporteur, à cause de l'effet d'encombrement stérique considérable apporté par cette structure.

3.2.4 Résultats obtenus avec les mutants de délétion complète.

Les constructions **JMC 106** et **JMC111** furent effectuées dans le but de vérifier l'efficacité de l'allongement de la région 5' non-traduite dans la facilitation de la traduction. La construction **JMC106** possède une séquence provenant de l'intron situé en amont de l'exon 1B, et cette séquence possède 280 pb de longueur. La construction **JMC111** contient un fragment de 448 paires de bases de longueur excisé du vecteur bactérien *pBluescriptKS+*. Ce fragment chimérique comporte des séquences bactériennes de *pUC19*, avec les promoteurs viraux T3 et T7, ainsi qu'un site de clonage multiple et une partie du gène *lacZ* de *E.coli*.

Dans les deux cas, l'effet observé chez les deux types cellulaires étudiés consiste en une nette diminution des niveaux d'expression du gène rapporteur, et constitue la preuve du fait que l'allongement exagéré de la région 5' non-traduite n'améliore pas nécessairement l'efficacité d'un ARNm. Dans le cas de **JMC111**, la diminution de l'efficacité de traduction est probablement provoqué par l'effet de l'addition de codons AUG cryptiques dans ces séquences.

Notons ici une observation très intéressante: la séquence d'ADN provenant de l'intron situé en 5' par rapport à l'exon 1B fut auparavant testée dans le but de démontrer si elle pouvait conférer une activité promotrice, permettant d'encourager l'expression d'un gène rapporteur CAT dans des vecteurs d'expression eucaryotes dépourvus de promoteur

(Jacobson, 1991). Les résultats rapportés confirment bel et bien que cet intron possède une bonne activité promotrice, et suggère que le gène du GR de rat est contrôlé par plusieurs promoteurs, chacun étant associé à un exon distinct, lui-même correspondant à sa propre séquence 5' non-traduite, située immédiatement en aval (Jacobson, 1991). Le promoteur associé à l'exon 1B possède des îlots C_pG, et plusieurs sites de liaison à des facteurs transcriptionnels, tels Sp1, CTF, et il y a même un nGRE. Par contre, il n'y a ni GRE, ni boîte TATA. Les faibles résultats obtenus avec le gène rapporteur luciférase suite à l'insertion de ce promoteur au niveau du MCS en aval de RSV-LTR de **JMC100**, suggèrent que l'interaction qui résulterait des facteurs transcriptionnels mis en présence ici contribue à affaiblir considérablement le promoteur fort RSV.

Une autre façon d'affaiblir un promoteur fort est d'y effectuer des délétions ou des mutations ponctuelles (*point mutations*) à l'intérieur de certaines séquences-cibles reconnues par des facteurs transcriptionnels. Ces résultats suggèrent des avenues exploratoires intéressantes afin de mieux comprendre le mécanisme de fonctionnement de ces séquences promotrices en amont des exons 5' non-traduits.

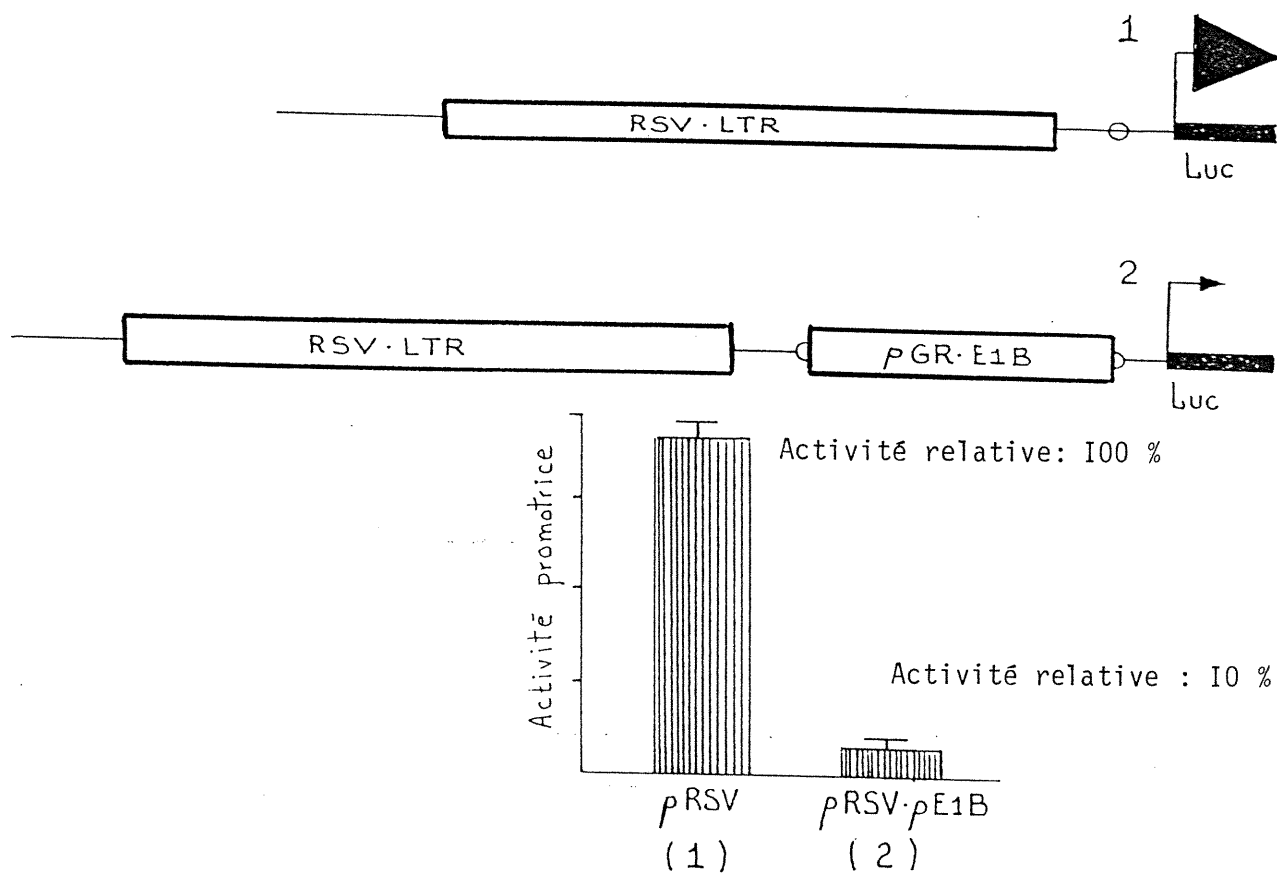


Figure 3.12 . Les séquences promotrices associées à l'exon 1B peuvent affaiblir le promoteur de RSV

3.2.5 Effet de l'exon 1A.

La construction **JMC110** fut effectuée afin de vérifier l'effet de l'exon 1A sur l'expression du gène rapporteur. Dans les cellules HTC, le mutant **JMC110** confère un niveau d'expression équivalent à celui du témoin positif **JMC100**. Dans le cas des cellules de primate, les résultats sont presque similaires (86%). Ces résultats expérimentaux semblent reproductibles, et démontrent qu'il existe une différence très nette entre les niveaux d'expression permis par l'exon 1B (**JMC101**) et l'exon 1A (**JMC110**) sur le gène rapporteur, et ce, dans les deux types cellulaires étudiés.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux observés avec la construction **JMC108**, ce qui suggère que l'allongement modéré de la séquence 5' non-traduite du messenger contribue bel et bien à améliorer le taux d'expression du gène rapporteur. L'analyse de la structure primaire de l'exon 1A ne suggère la présence d'aucun site de liaison ou codon ATG ou d'aucune séquence palindromique pouvant bloquer le mouvement d'une sous-unité 40S.

Ainsi, l'utilisation différentielle d'un choix de ces séquences 5' non-traduites constitue un mécanisme de régulation qui peut vraiment avoir une influence sur les niveaux cellulaires du GR.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

4.1. Les travaux antérieurs concernant la régulation du GR suggèrent certaines possibilités de contrôle au niveau génétique et traductionnel.

Les études de régulation post transcriptionnelle décrites et rapportées dans le cadre de ce projet furent effectuées par le biais de l'utilisation de trois lignées cellulaires. Ces dernières furent l'objet de transformations transitoires avec des chimères génétiques de 5'UTR de GR couplées à la luciférase. Ce modèle d'étude *in vitro*, quoique non exhaustif, suggère cependant l'existence putative de certains mécanismes cellulaires pouvant être utilisés dans le contexte de la régulation du GR. Cette conclusion s'impose par le simple fait que les séquences 5' non-traduites testées ici se retrouvent naturellement en amont de la région codante du GR, et que les résultats obtenus d'une construction génétique à l'autre sont très reproductibles.

En outre, les observations qui ont été rapportées antérieurement par plusieurs investigateurs, par le biais de d'autres procédures expérimentales, notamment par des expériences d'immunohistochimie et d'hybridations *in situ*, indiquent souvent un manque de corrélation directe entre les niveaux de messager et les niveaux de protéine. Ceci fut souligné à la section 1.3.5 , où

une revue de la littérature concernant la régulation du GR a été effectuée.

On peut donc suspecter l'existence d'une régulation qui s'exerce au niveau post-transcriptionnel. Ainsi, il existerait toute une panoplie d'événements cellulaires pouvant affecter les différentes composantes de la machinerie traductionnelle, et ce, à différents niveaux. Parmi ceux-ci, notons la stabilité de l'ARN m , le turnover de l'ARN m , l'efficacité de l'ARN m à promouvoir la traduction, la stabilité de la protéine, le turnover de la protéine, et finalement, l'efficacité de la protéine elle-même, par exemple, sa conversion d'une forme active à une forme inactive, ou vice-versa.

Comme point de départ, l'étude de l'exon 1B suggère fortement la présence de structures primaires et secondaires dont l'influence sur l'efficacité de la traduction furent très bien documentés, aussi bien par les travaux de Marilyn Kozak (1999) que ceux de plusieurs autres investigateurs. Cela implique également que des phénomènes de contrôle de la traduction du GR peuvent bel et bien être effectués au niveau de son ARN m .

Il faut souligner que la méthodologie utilisée lors de cette recherche n'a pas porté sur l'observation directe des différentes isoformes d'ARN m de GR pouvant être retrouvées au niveau du cytoplasme. Les conclusions apportées ici ne s'appuient que sur le simple fait de la mesure de l'activité d'un gène rapporteur. Bien que ces déterminations soient très précises, il faut souligner que la simple mesure de l'activité d'un gène rapporteur introduit dans une

culture cellulaire à la suite d'une procédure de transfection, donne souvent des résultats trop indirects et qui peuvent facilement porter à confusion.

Par exemple, la mesure d'une activité luciférase est largement tributaire à l'efficacité de la transcription du plasmide introduit dans la cellule. Il est impossible d'exercer un contrôle défini sur ce paramètre. De même, la détermination de l'activité luciférase est également tributaire à l'efficacité de l'entrée de ce même plasmide au sein du cytoplasme. Encore ici, un contrôle précis de ce phénomène est très difficile.

C'est pourquoi les résultats obtenus par le biais de la méthode de la transfection classique, utilisant un co-précipité d'ADN couplé au phosphate de calcium, auraient pu être comparés avec ceux obtenus à la suite d'une méthode alternative tout aussi reconnue, voire plus efficace, telle la lipofection ou l'utilisation du DEAE-dextran.

En outre, le plasmide utilisé comme gabarit pour l'ARN polymérase II pourrait très bien lui aussi ne pas être entièrement conforme avec ce qui est attendu, et posséder une structure primaire pouvant interférer avec les mécanismes cellulaires généralement admis de la transcription. Le même raisonnement peut très bien s'appliquer également dans le cas du messenger obtenu et ce, par surcroît, au niveau de sa structure secondaire. Il ne faut pas oublier que les constructions introduites dans les cellules en culture furent auparavant obtenues et amplifiées dans des bactéries, qui sont des organismes

vivants, donc, tout à fait en mesure de réorganiser le matériel génétique dont elles ont la tâche d'abriter, et ce, en dépit du fait qu'elles soient des mutants *rec-*, donc, supposément incapables d'exercer des phénomènes de réarrangement génétique par le biais de la recombinaison.

Les résultats observés lors de cette recherche semblent tout à fait en accord avec les prédictions basées sur le modèle de Marilyn Kozak. Il est toutefois très important de réaliser que la mesure indirecte d'une activité traductionnelle, basée uniquement sur le postulat d'une abondance toute relative et toute discutable de messenger présumément efficace, peut cacher plusieurs éléments d'erreur. Ces observations, même en étant très reproductibles, peuvent facilement diriger l'investigateur vers des conclusions hâtives et erronées, qui doivent absolument être vérifiées de façon plus exhaustive par le biais d'études plus approfondies et mieux ciblées.

4.2. L'utilisation différentielle d'un choix putatif de certaines séquences 5' non-traduites constitue une possibilité bien réelle de mécanisme de régulation post-transcriptionnelle du GR.

Plusieurs investigateurs ont remarqué une grande hétérogénéité dans les régions situées en 5', et qui flanquent la partie codante de plusieurs récepteurs stéroïdiens, tels le récepteur des estrogènes (Freyschus & Grandien, 1996), et

le récepteur de l'acide rétinoïque (Zelent et al., 1991). Si ces séquences codent pour des régions 5' non-traduites, on obtiendrait plusieurs isoformes de l'ARN m d'un même récepteur. Ces isoformes peuvent être générées :

1. par le biais d'un choix de promoteurs alternatifs, comme dans le cas du récepteur des estrogènes, ou bien,
2. par le biais d'un mécanisme d'épissage alternatif à partir d'un seul et même promoteur, comme dans le cas du récepteur des glucocorticoïdes chez l'humain.

Si certaines séquences 5' non-traduites pouvaient coder pour des régions traduites en protéine, le récepteur stéroïdien obtenu serait caractérisé par une extension de son domaine amino. Dans ce cas, il est clair que plusieurs isoformes de la même protéine pourraient être synthétisées, et chaque isoforme correspondrait à son propre 5' UTR au niveau de son ARN m respectif, à la condition que les séquences supplémentaires soient situées dans le même cadre de lecture que le reste de la protéine. En appliquant le postulat du *first AUG rule*, on déduirait que la même protéine posséderait un choix très varié de domaines de transactivation, pour la création de toute une famille d'activateurs transcriptionnels impliqués dans l'activation ou l'extinction des gènes. À l'heure actuelle, il n'existe pas de telles isoformes en ce qui concerne le GR. Seuls les mutants ntⁱ ont été caractérisés, et ces mutants sont dépourvus du premier exon codant. Ce sont donc des récepteurs tronqués dans leur domaine amino, donc,

dépourvus de tout domaine de transactivation (Miesfeld, 1989).

Dans le cas d'un épissage alternatif de séquences dans la région 3' des récepteurs stéroïdiens, on observerait alors un choix très varié de domaines de liaison au ligand. Cet événement se retrouve au niveau du récepteur des glucocorticoïdes chez l'humain. Ainsi, la forme *hGRbeta*, obtenue par épissage alternatif des régions situées en 3', permet l'obtention d'une forme tronquée du GR humain dans sa partie carboxy-terminale, et qui ne possède aucune affinité pour les glucocorticoïdes (Oakley et al., 1996).

Dans le cadre de ce projet de recherche, l'hypothèse de base propose que les séquences situées en 5' ne possèdent pas de codon AUG situé dans le même cadre de lecture que le premier exon codant, et donc, ne sont pas traduites en protéine. De plus, on suppose qu'une molécule de luciférase extentionnée dans son domaine amino ne pourrait se replier de la même façon que la protéine originelle. L'observation des faibles niveaux d'activité luciférase conférés par l'exon 1B entier, et une comparaison avec les niveaux très élevés correspondant à la présence hypothétique de l'exon 1A, suggère que l'utilisation différentielle de ces séquences par la cellule pourrait effectivement contribuer à enrichir ou à appauvrir le cytosol d'une protéine fonctionnelle. L'épissage alternatif pouvant mener à la rétention d'un exon, ou l'activation de tel ou tel promoteur pour générer une isoforme d'ARN*m*, seraient des événements dictés par les conditions de vie de la cellule, et pourrait être illustré comme suit (figure 4,1):

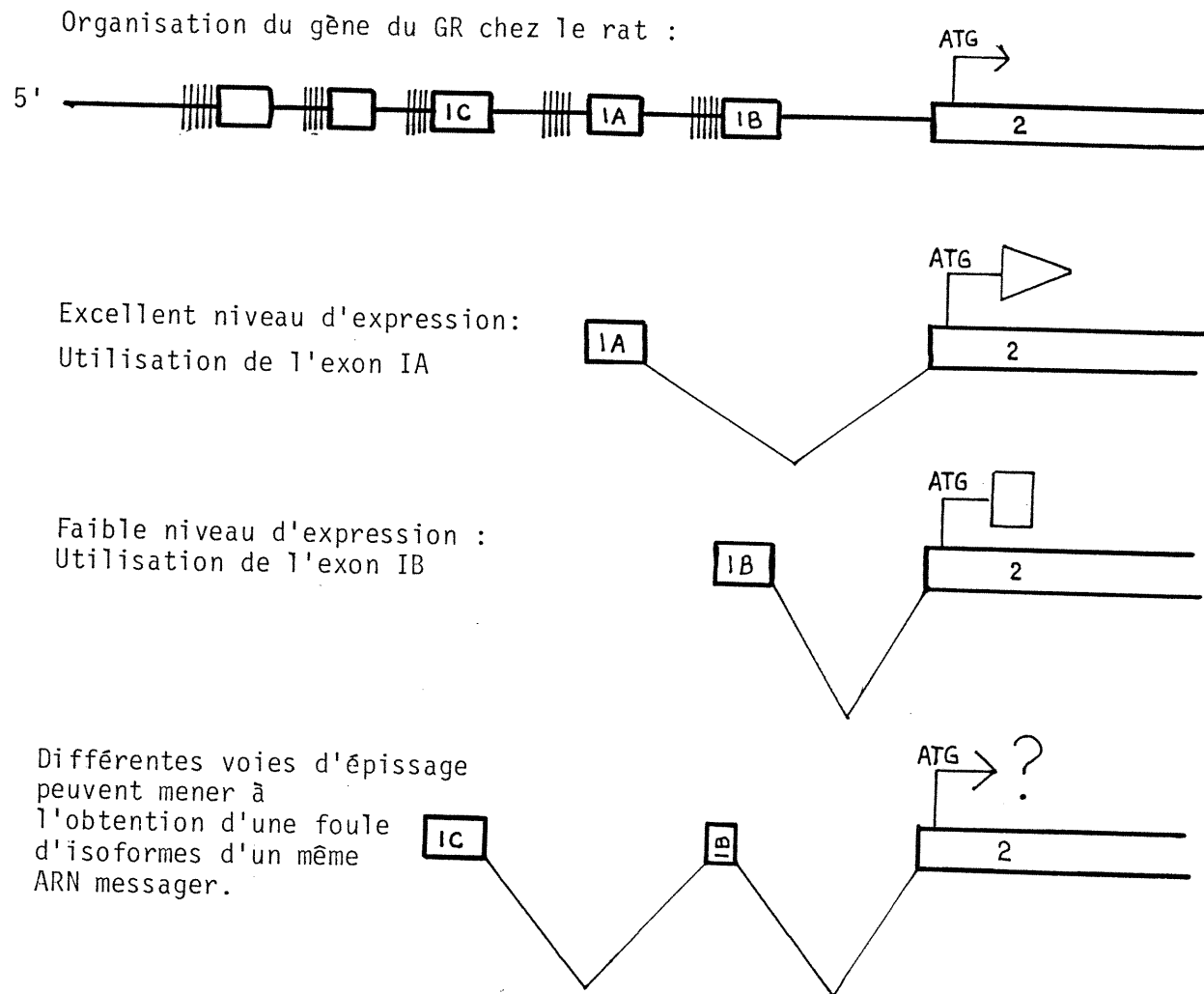


Figure 4.1.

**L'utilisation différentielle d'un choix putatif
de certaines séquences 5' non-traduites constitue
une possibilité bien réelle de mécanisme de régulation
post-transcriptionnelle du Récepteur des Glucocorticoïdes
chez le rat.**

Un choix d'au moins 8 régions 5' non-traduite se trouve en amont de l'exon codant 2. L'utilisation différentielle de telle ou telle région 5' non-traduite:

1. pourrait s'effectuer par le biais de l'activation d'un seul promoteur, ce qui résulterait en l'expression individuelle d'une seule région 5'UTR lui correspondant,
2. pourrait résulter de l'activation simultanée de deux ou trois promoteurs distincts,
3. pourrait être le résultat d'un épissage alternatif du transcrit primaire, dont l'expression serait dirigée par une ou plusieurs de ces séquences promotrices.

Le tout dépendant de la force relative de chacun de ces promoteurs, ou de l'état de la machinerie cellulaire contrôlant l'épissage du transcrit primaire, lesquels seraient dictés par les conditions physiologiques de la cellule.

Plusieurs investigateurs ont remarqué que la réponse d'auto-régulation du GR est tissu-spécifique, et varie d'un type cellulaire à l'autre (Kalinyak et al., 1987). Par surcroît, il fut également observé que les concentrations intracellulaires de l'ARN m du GR ne correspondaient pas toujours exactement à celles de la protéine (Okret et al., 1990). Les résultats de ce projet de recherche suggèrent que les exons 1A et 1B pourraient conférer une régulation au niveau de l'efficacité de la traduction du GR chez le rat. Ainsi, l'utilisation individuelle ou combinée d'une seule ou de plusieurs séquences 5' non-traduites d'ARN m à partir d'un choix putatif de séquences régulatrices se trouvant dans le génome pourrait fort bien, *a priori*, constituer un mécanisme facilement accessible afin d'exercer un contrôle précis des quantités de GR cytosolique. Ceci compte tenu de l'effet positif de l'exon 1A, et de l'effet négatif de l'exon 1B sur l'efficacité de la traduction du gène rapporteur utilisé ici, et aussi compte tenu que de telles séquences d'une telle complexité et d'une telle utilité potentielle ne pourraient se retrouver dans ce locus génique particulier sans même servir à quoi que ce soit.

Il est important de noter que plusieurs investigateurs ont proposé qu'une certaine proportion des molécules de GR cellulaire pourrait être séquestrée au niveau du noyau. La méthodologie expérimentale utilisée ici ne permet pas de vérifier si la transfection d'une construction artificielle comme RSV-GR, ou la transfection de chimères génétiques de GR pourvues des différents 5' UTR déjà

caractérisés, pourrait contribuer à enrichir le pool intranucléaire de ce récepteur. Des expériences d'hybridation *in situ* pourraient apporter une indication quant au rôle de ces différents exons 5' non-traduits dans l'éventualité d'une rétention nucléaire du récepteur. Il faut se rappeler que, d'une manière générale, la rétention nucléaire est un phénomène conféré par certaines séquences d'acides aminés. Les séquences de rétention nucléaire devraient donc être retrouvées dans la partie *codante* du messenger.

Les situations dans lesquelles la cellule se trouve dans l'obligation de réguler la concentration intracellulaire de GR sont fort variées, et procurent autant de pistes d'investigation pour détecter les différentes isoformes d'ARN m pourvues des régions 5' non-traduites qui font l'objet de cette recherche. L'isoforme majeure d'ARN m de GR dans les cellules HTC est celle qui contient les séquences caractérisant l'exon 1B (Jacobson, 1991). La forme retrouvée en plus grande quantité dans les tissus sains est l'isoforme contenant les séquences de l'exon 1A (Gearing et al., 1993), ce qui démontre bel et bien l'existence d'un mécanisme d'épissage alternatif, ou d'utilisation de promoteurs alternatifs, ou peut-être même une action combinée de ces deux mécanismes, pour mener à l'obtention de ces isoformes d'ARN m chez le rat.

Des expériences d'élongation d'amorce (*primer extension*) effectuées par PCR- RACE sur des tissus de rat à différents stages de développement et sous différentes conditions hormonales (Gearing et al., 1993), ont bel et bien permis

de détecter un transcrit majeur, qui se caractérise par la présence des séquences d'ARN*m* propres à l'exon 1A. Ce n'est pas tout : trois autres isoformes furent caractérisées en tant que transcrits mineurs dans les conditions de vie normales de cet animal. L'une de ces isoformes contient des séquences 5' UTR correspondant à celles de l'exon 1B, une autre isoforme contient des séquences d'extrémité 3' d'intron entre l'exon 1B et le premier exon codant 2, ce qui représenterait le produit d'un épissage incomplet. La troisième isoforme contient des séquences 5'UTR qui ne correspondent à aucune séquence d'exon publiée à date. Elle constitue probablement le produit final de la transcription d'un des exons 5'UTR situés plus en amont.

De toute évidence, il semble bien exister un mécanisme d'épissage alternatif, probablement combiné à un mécanisme d'utilisation de promoteurs alternatifs, pour générer toutes ces isoformes. La même chose fut découverte chez la souris (Dieken et al., 1990), mais pas encore chez l'humain.

Les séquences des différentes isoformes d'ARN*m* qui furent détectées par RACE-PCR dans les cellules HTC (Jacobson, 1991), correspondent également à celles retrouvées dans les tissus de rat, mais dans des proportions différentes. Ainsi, les transcrits d'exon 1A, majoritaires dans les tissus animaux sains (Gearing et al., 1993), étaient abondants à 16% dans les cellules HTC. Par contre, les transcrits d'exon 1B, minoritaires dans les tissus animaux, étaient abondants à 55% dans les cellules HTC. Cette surabondance de l'isoforme 1B

dans des cellules de foie immortalisées est très étrange, et suggère donc que les différentes isoformes de l'ARN m de GR pourraient être utilisées de façon différentielle durant le processus de la prolifération cellulaire, ou en une multitude d'autres occasions, dans plusieurs autres types de cellules ou de tissus sains ou transformés. On sait que les glucocorticoïdes sont impliqués dans le contrôle d'une grande variété de processus biochimiques et physiologiques dans une grande variété de cellules, de tissus et mêmes d'organes. Ainsi, les événements reliés à certains phénomènes du cycle cellulaire, de l'ontogénèse, de la senescence, de l'apoptose, ou même de l'oncogénèse, pourraient fournir autant de pistes d'investigation pour une meilleure connaissance de ces phénomènes.

Il serait intéressant de détecter et de caractériser les différentes isoformes du GR pouvant être retrouvées dans les cellules ou les tissus humains, et de comparer leur homologie avec la grande variété d'isoformes retrouvées chez le rat. L'organisation du gène de GR chez l'humain ne démontre pas un choix aussi varié de régions 5' non-traduites avec autant de promoteurs individuels. Si plusieurs isoformes de transcrit de GR pouvaient se retrouver chez l'humain, on pourrait conclure qu'elles seraient générées uniquement par des phénomènes d'épissage alternatif. La figure 4,2, retrouvée à la page suivante, permet de comparer l'organisation génomique du GR entre la souris et le rat, et de réaliser à quel point elles diffèrent de chez l'humain.

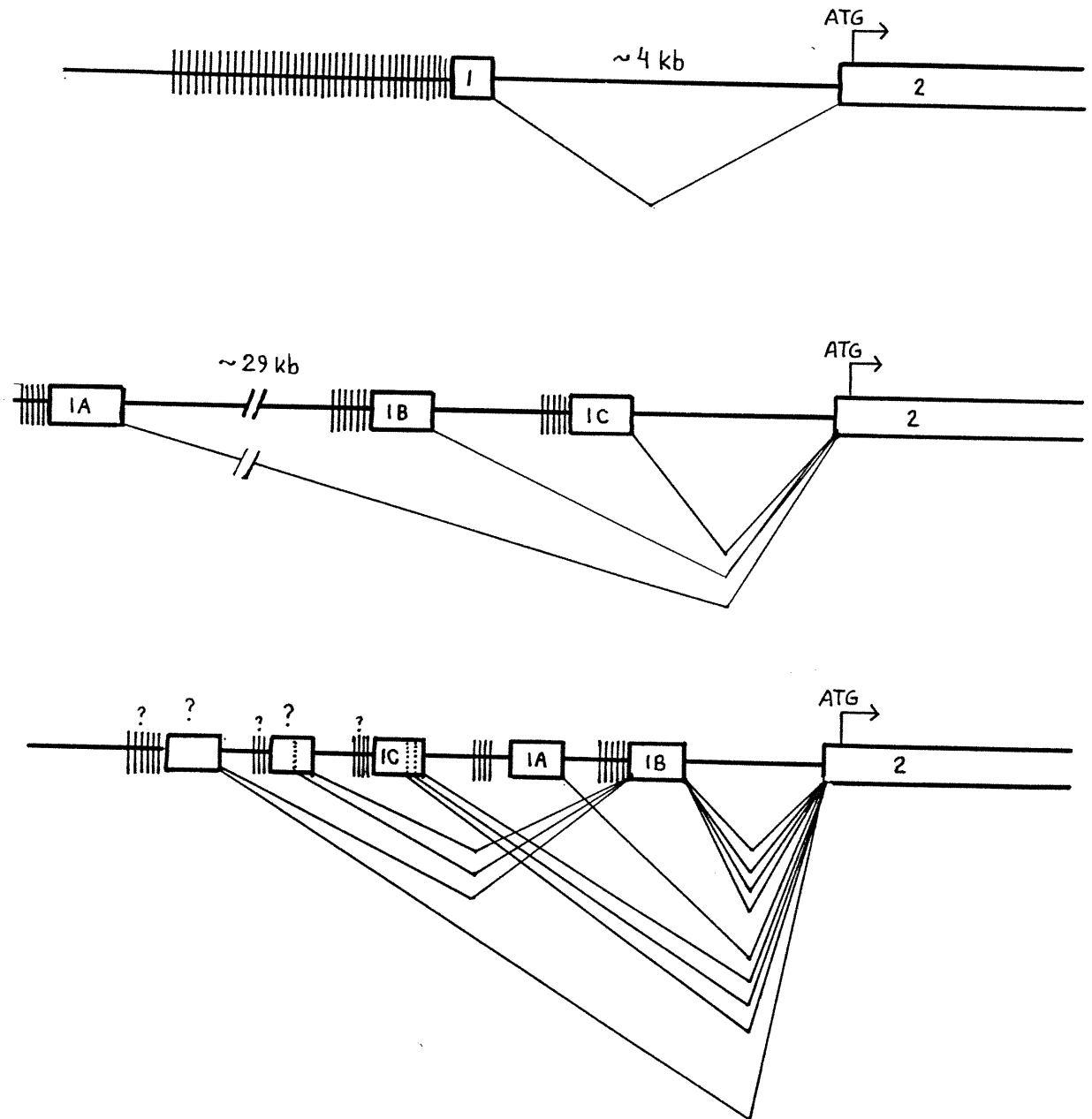


Figure 4.2. Une comparaison de l'organisation génétique du GR chez le rat, la souris et l'humain.

Schéma du haut : Organisation du gène du GR humain.
 Schéma du milieu : Organisation du gène du GR de souris.
 Schéma du bas : Organisation du gène du GR de rat.

Il serait approprié, à ce stade, de comparer les structures primaires des différentes isoformes du GR. Ainsi, chez l'humain, trois isoformes d'ARN m de GR furent caractérisées (Oakley & Cidlowski, 1996). Des essais de buvardage de Northern ont détecté une forme *alpha1*, de 7,0 kb, une forme *alpha2*, de 5,5 kb, et une forme *beta* de 4,3 kb. La traduction des isoformes *alpha1* et *alpha2* résulte en la synthèse d'une même protéine, qui varie au niveau de son extrémité carboxyle- i.e. le domaine de liaison au ligand. On retrouve également une forme *alpha* et *beta* de cette molécule chez le rat (Kohn et al., 1998). La forme *beta* possède un domaine de liaison au ligand tronquée. L'isoforme *beta* du GR humain serait un compétiteur des isoformes *alpha*, et exercerait son action au niveau de la chromatine (Bamberger et al., 1995, Oakley et al., 1996). Chez l'humain, comme chez le rat, la forme *alpha* est régulée négativement en présence de son ligand. On ne connaît pas encore les mécanismes de la régulation de la forme *beta* du récepteur. Ces trois formes sont obtenues à la suite d'un épissage alternatif.

Chez la souris, il existe trois promoteurs distincts du GR, et chaque promoteur correspond respectivement à un exon 5' non-traduit, i.e. l'exon 1A, 1B et 1C (figure 4.2). La grande homologie entre les gènes du GR de rat et de souris suggère l'existence passée d'un ancêtre commun (Strahle et al., 1992).

Afin de comparer le GR avec d'autres récepteurs stéroïdiens, il serait intéressant de faire un parallèle avec le Récepteur des Estrogènes (ER). Dans le

cas du ER, deux formes sont retrouvées chez le rat: la forme *alpha* (Koike et al., 1987) et la forme *beta* (Kuiper et al., 1996). Ces deux isoformes d'un même récepteur possèdent une faible homologie au niveau de leur structure primaire (moins de 50%), et proviennent de deux gènes distincts, ayant chacun leur propre promoteur. Elles sont distribuées de façon différente dans plusieurs régions de cerveau de rat. Elles font également l'objet d'une régulation séparée (Osterlund et al., 1998). La forme la mieux connue est la forme *alpha*, laquelle se retrouve en deux isoformes : la forme B et la forme C. Une troisième isoforme, A, fut caractérisée chez l'humain.

Il appert que le ER contient lui aussi plusieurs promoteurs utilisés de façon différentielle, et même tissu-spécifique. Chaque promoteur possède sa propre région 5' non-traduite immédiatement en aval, transcrite en ARNm et immédiatement annexée au premier exon codant. Le choix de tel ou tel promoteur est, encore ici, un événement dicté par les conditions physiologiques de la cellule (Freyschus & Grandien, 1996).

4.3 Les sORF, les structures secondaires de l'ARN m et la longueur excessive du 5' UTR peuvent conférer un potentiel régulateur bien réel.

Cette conclusion s'impose d'elle-même quand on compare les résultats obtenus suite à la dissection moléculaire des régions 5' non-traduites étudiées dans le cadre de ce projet. Les résultats sont schématisés à la Figure 4.3.

L'hypothèse de la présence d'activateurs traductionnels fut formulée et vérifiée par bon nombre d'investigateurs, afin d'expliquer l'activation ou l'extinction de la traduction de plusieurs protéines très importantes pour la vie cellulaire, et même chez certains virus, comme HIV. Cette hypothèse trouve son inspiration dans la compréhension des mécanismes moléculaires généralement admis de l'initiation de la transcription chez les procaryotes comme chez les eucaryotes. L'hypothèse des activateurs traductionnels propose la liaison de facteurs actifs en *trans*, comme des protéines, à des séquences-consensus retrouvées au niveau de la région 5' non-traduite de plusieurs ARN m , plus particulièrement au niveau d'éventuelles structures secondaires. L'attachement de la protéine IRE-BP à certaines séquences spécifiques de l'ARN m de la ferritine constitue un bon exemple pour illustrer ce fait (Klausner et al., 1989).

Régulation conférée par la présence de diverses structures de l'ARN*m* dans la région 5' non-traduite: Comparaison des efficacités d'extinction sur la traduction, par rapport à JMC100.

1. La baisse la plus marquée est conférée par l'effet additif d'une structure secondaire stable et d'un *sORF*.
(Suggéré par JMC101 et JMC 107)
Efficacité d'extinction : 9,5 / 10, cellules COS-7
9,0 / 10, cellules HTC.
2. L'allongement excessif ($n > 300$ nt) de la région 5'UTR réduit le taux de traduction d'une façon tout aussi considérable, dans les deux lignées cellulaires considérées.
(Suggéré par JMC111, JMC106, et les comparaisons JMC103-JMC104, et JMC103-JMC106).
Efficacité d'extinction : 9,0 / 10, cellules COS-7
8,5 / 10, cellules HTC
3. La présence d'un *sORF* provoque une baisse très nette du taux de traduction d'un ARN*m*, sans nécessiter d'allongement considérable du 5'UTR.
(Suggéré par JMC102, et la comparaison JMC104-109)
Efficacité d'extinction : 9,0 / 10, cellules COS-7
6,0 / 10, cellules HTC
4. La présence d'une structure secondaire stable, de $\Delta G = -36,2$ Kcal/mol, diminue le taux de traduction d'une façon moins efficace qu'un *sORF*. L'addition de ces structures possède un effet d'extinction cumulatif considérable.
(Suggéré par JMC104 et JMC112).
Efficacité d'extinction : 7,5 / 10, cellules COS-7
5,0 / 10, cellules HTC
5. La présence d'une structure secondaire labile, de $\Delta G = -17,7$ Kcal/mol, possède moins d'efficacité d'extinction sur la traduction.
(Suggéré par JMC108)
Efficacité d'extinction : 6,0 / 10, cellules COS-7
1,5 / 10, cellules HTC
6. Un allongement modéré de la région 5'UTR avec des séquences de nucléotides ne conférant ni structure secondaire, ni *sORF*, ne possède aucun pouvoir d'extinction, et permet un excellent taux de traduction d'un ARN*m*.
(Suggéré par JMC108 et JMC110).
Efficacité d'extinction : 0 / 10, cellules COS-7
0 / 10, cellules HTC.

Les cellules HTC semblent moins sensibles à l'effet régulateur d'une structure secondaire ou d'un *sORF* au niveau du 5' UTR que dans le cas des cellules COS-7. L'amplitude de la régulation montre des variations significatives d'un type cellulaire à l'autre.

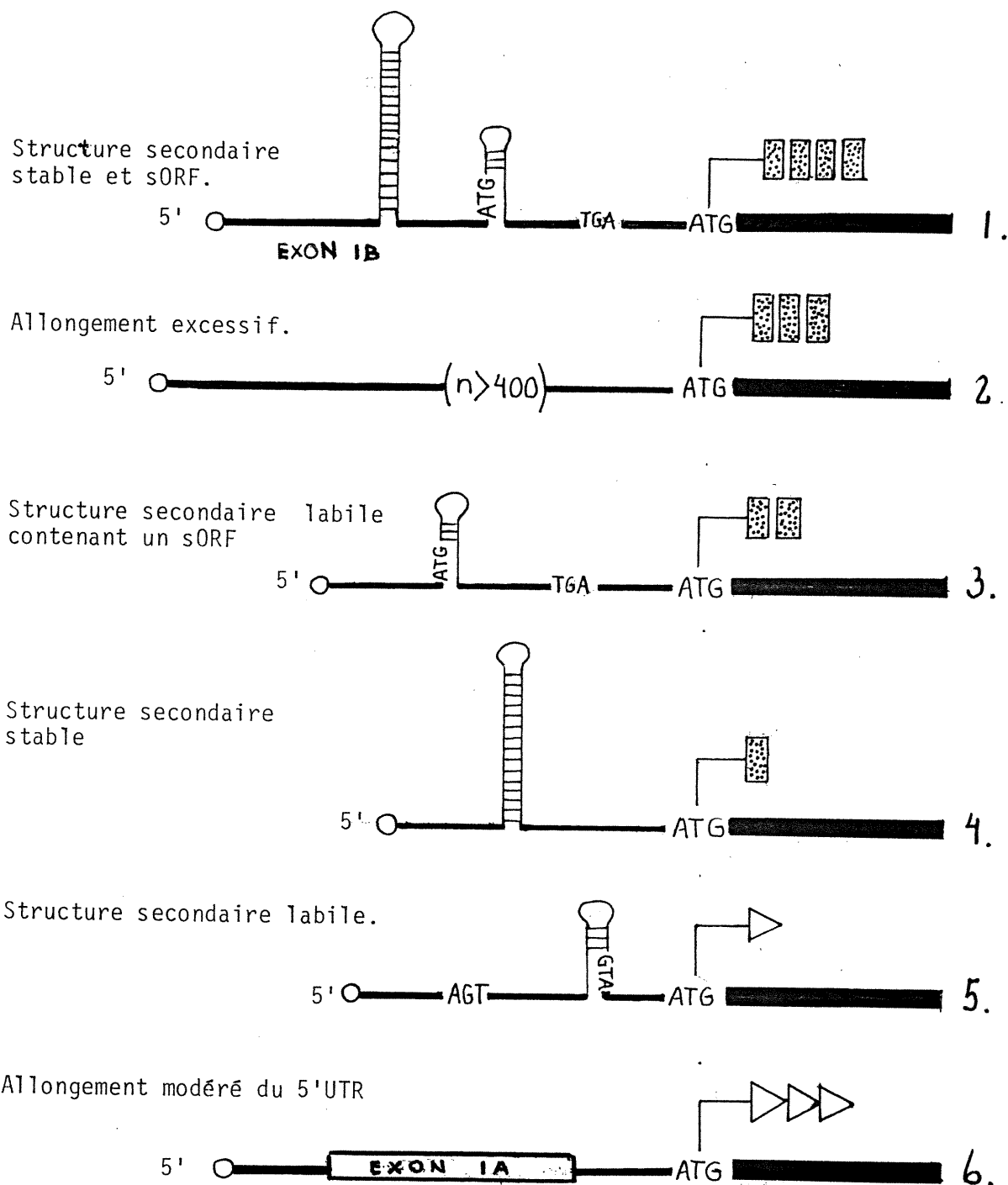


Figure 4.3. Les sORF, les structures secondaires de l'ARNm et la longueur excessive du 5'UTR peuvent conférer un pouvoir régulateur bien réel.

Une façon simple de neutraliser l'effet des sites de liaison putatifs tout en conservant les structures secondaires dans lesquels ils se trouvent consiste à inverser l'orientation naturelle 5'-3' de ces séquences. Une autre façon est offerte par les techniques de la mutagenèse dirigée. Dans ce projet, les séquences d'ADN plasmidique correspondant à celles de la structure secondaire stable de -37,7 kcal/mol retrouvée au niveau de l'exon 1B furent isolées, et inversées. Cette inversion s'accompagne d'une forte diminution de l'expression du gène rapporteur dans tous les types cellulaires testés. *A priori*, l'inversion d'un site de liaison à un éventuel facteur traductionnel entraînerait l'absence d'une liaison. Si le facteur est un inhibiteur, son absence de liaison signifierait la levée d'une inhibition, et un bien meilleur taux de traduction en résulterait. Ce qui n'est pas le cas. Les résultats rapportés ici proposeraient que cet hypothétique facteur serait plutôt un activateur de la traduction. Si un tel activateur traductionnel existait vraiment, son action serait plutôt négligeable, car la construction **JMC104** ne favorise la traduction du gène rapporteur que dans une faible mesure (figure 3.9 et 3.10). Ainsi, l'hypothèse de la présence d'un site de liaison au niveau de l'exon 1B ne serait pas valide.

Finalement, un mécanisme de régulation supplémentaire, qui fut proposé pour expliquer le phénomène de l'autorégulation de la tubuline, consiste en des événements très particuliers faisant appel aux notions rencontrées dans l'étude de la gymnastique du ribosome. Dans la plupart des cas, ces mécanismes se

produisent au niveau de certaines séquences glissantes retrouvées dans les systèmes viraux ou bactériens, qui ne sont pas retrouvées au niveau de l'ARN m du GR de rat. De plus, ces événements ne se produisent que lorsque le ribosome est déjà engagé dans la phase d'élongation de la traduction, au niveau de la région codante d'un messager, et non dans les séquences régulatrices non-traduites retrouvées en 5' ou en 3'.

4.4 Ces mécanismes de régulation post-transcriptionnels semblent ubiquitaires, et pourraient avoir été conservés au cours de l'ontogénèse et au cours de l'évolution.

En général, la comparaison des niveaux d'activité luciférase obtenus dans les différents types cellulaires utilisés lors de ce projet de recherche suggère que les cellules de rat et de primate montrent des réponses assez similaires. On remarque toutefois l'existence de quelques variations au niveau de l'activité luciférase conférée par certaines chimères génétiques particulières.

Par exemple, les niveaux d'expression des constructions **JMC102** et **JMC103** sont relativement similaires à ceux de **JMC104** dans les cellules de foie de rat, mais pas dans les fibroblastes de primate. Les niveaux d'expression conférés par l'allongement modéré du 5' UTR (**JMC108**) sont également modérés dans les cellules de primate, si on les compare aux niveaux plus

considérables observés dans les cellules de rat.

Plus concrètement, les variations observées au niveau des différents types cellulaires, comme les cellules HTC, COS-7 et L6, apportent un élément de réflexion supplémentaire au sujet des mécanismes de la régulation de l'efficacité de la traduction. D'une manière générale, un sORF ou une structure secondaire stable diminueront considérablement l'efficacité de la traduction.

Cependant, cette régulation négative semble plus marquée dans les cellules COS-7 que dans les cellules HTC. Ainsi, l'amplitude de la réponse observée semble varier d'un type cellulaire à l'autre. Une gamme très étendue d'intensités de régulation négative ou même positive pourrait exister d'un type cellulaire à l'autre, ou même d'un organe à l'autre.

En outre, les essais effectués sur des myoblastes de rat (cellules L6) suggèrent que le tissu musculaire squelettique de cet organisme réagit de la même façon que le tissu hépatique, sur la base de la comparaison des activités du gène rapporteur de quelques constructions. Ce manque de tissu-spécificité dans la réponse observée, de même que cette uniformité de réponse chez le rat et le singe, suggère que les mécanismes de régulation observés ici avec des séquences propres au GR peuvent facilement se comparer dans différents tissus et différents organismes. Cela pourrait suggérer que ces mécanismes aient été conservés au cours de l'évolution, et même au cours du processus de l'ontogénèse, dont le résultat final mène à l'obtention des différents tissus de

l'organisme.

L'effet de l'utilisation des séquences régulatrices d'exon 1B au niveau de l'ARN m suggère un mécanisme pouvant également se retrouver au niveau du GR humain. Ainsi, plus de la moitié des ARN m du GR dans les cellules HTC contiennent les séquences d'exon 1B (Jacobson, 1991). On retrouve également ces séquences dans une moins grande proportion au niveau des tissus sains (Gearing et al., 1993). Ce transcrit d'exon 1B de rat est très homologue au cDNA de GR humain, qui correspond à l'unique exon 1 (Encio & Detera-Wadleigh, 1991). Cette séquence d'exon 1B de rat pourrait être impliquée dans l'extinction de la traduction du gène lui étant associé. Des résultats similaires furent obtenus en testant les séquences d'ARN m conférées par l'exon 1B sur des cellules HeLa, avec *X-gal* comme gène rapporteur (Jacobson, 1991). Cette baisse de l'efficacité de la traduction observée dans les cellules en culture suggère que l'exon 1 chez l'humain pourrait avoir un rôle similaire à l'exon 1B chez le rat. L'examen des séquences d'exon 1 humain (Encio & Detera-Wadleigh, 1991) démontre l'existence d'un codon AUG en position +36 par rapport au premier nucléotide de l'exon 1. Il est également situé dans un contexte favorable, avec un résidu guanine en position +4. Un épissage correc de cet exon 1 avec l'exon 2 permet de compléter un cadre de lecture avec un codon d'arrêt, situé immédiatement en amont du codon de départ du GR humain. Un tel sORF code pour une agnoprotéine d'exactlyment

50 acides aminés, pouvant être traduite à partir de ce sORF, suite à l'épissage correct de l'intron entre l'exon 1 et l'exon 2 du GR:

5'...promoteur...caatGGAGACTTTCTTAAATAGGGGCTCTCCCCCCCACCC**ATG**
GAG AAA GGG GCG GCT GTT TAC TTC CTT TTT TTA GAA AAA AAA AAT ATA
 TTT CCC TCC TGC TCC TTC TGC GTT CAC AAG CTA AGT TGT TTA TCT
 CGG CTG CGG CGG GAA CTG CGG ACG GTG GCG GGC GAG CGG CTC
 CTC TGC CAGAGgtaagaag...intron1...tttgtagT **TGA** TATTC**ACTG** **ATG** GAC
 TCC...**exon 2** ...

On voit que la distance très courte entre le codon d'arrêt du *sORF* et le codon de départ du GR proprement dit (l'exon 2), ne permet pas une grande efficacité de réinitiation (Kozak, 1986). La figure 4.2 nous indique que l'expression du GR humain se fait à partir d'un seul promoteur, lequel est situé à 4,1 kb en amont de l'exon 2.

Si l'exon 1 n'est pas retenu lors du processus d'épissage (*default RNA splicing*), la courte séquence 5' non-traduite de 13 pb générée en amont de la séquence codante du GR ne permet pas un taux de traduction efficace, en accord avec les théories de Marilyn Kozak sur l'initiation de la traduction. Un épissage *incomplet*, se soldant par l'absence de l'exon 1 et la rétention d'une certaine partie de l'intron immédiatement en amont de l'exon 2, pourrait fournir une région 5' non-traduite plus longue, donc, plus efficace à promouvoir

l'initiation de la traduction. De même, un épissage *correct* menant à l'annexion de l'exon 1 tout entier immédiatement en amont de l'exon 2, conformément à la règle de Chambon, diminuerait le niveau de traduction, à cause de la présence du sORF ainsi positionné en amont de la région codante de l'ARN*m*. Nous serions donc en présence d'un mécanisme fort simple, mais élégant, pour contrôler le taux de GR dans les cellules, et une variation plus fine serait probablement offerte par la nature des différents types cellulaires dans lesquels se produiraient ces phénomènes. La figure 4,4 retrouvée à la page suivante, illustre comment un épissage incomplet peut allonger le 5'UTR du GR humain:

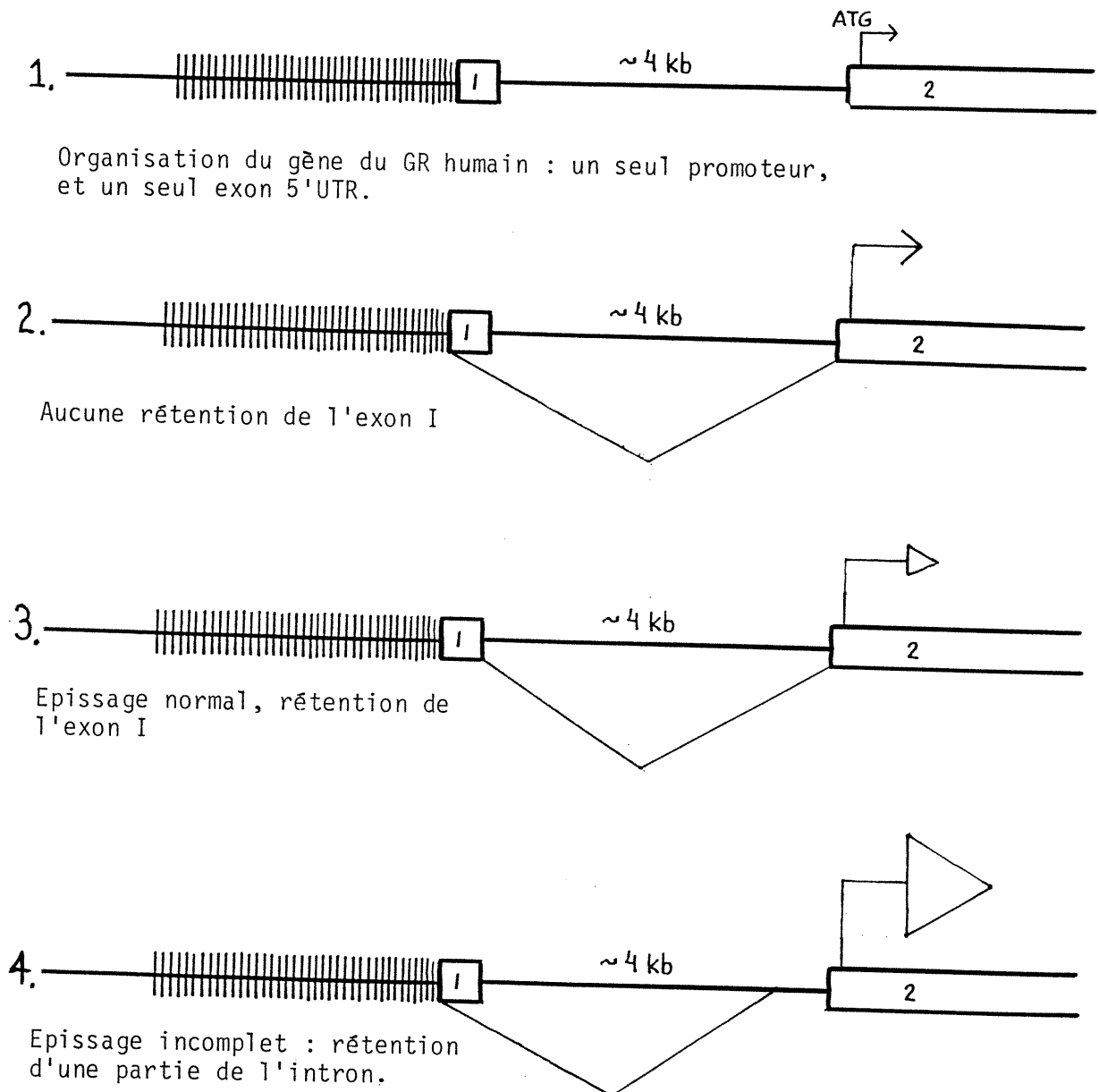


Figure 4.4. Un modèle moléculaire de régulation post-transcriptionnelle du GR chez l'humain.

Schéma 1 : Rappel de l'organisation du gène du GR humain.

Schéma 2 : Aucun épissage : 5'UTR très court et inefficace.

Schéma 3 : Epissage correct : Introduction d'un sORF et mauvais taux de traduction.

Schéma 4 : Épissage incomplet, et formation d'un 5'UTR efficace.

CHAPITRE 5 : CONCLUSION

Les résultats de cette recherche exploratoire ouvrent des perspectives très intéressantes en ce qui concerne certains éléments du contrôle post-transcriptionnel du récepteur des glucocorticoïdes, et suggèrent *a posteriori* que ces éléments de contrôle au niveau de l'initiation de la traduction pourraient se retrouver au niveau de d'autres protéines d'importance majeure dans les mécanismes gouvernant la vie cellulaire.

Un des premiers constats qui s'impose de lui-même est que l'interprétation des résultats obtenus s'appuie sur une hypothèse fondamentale qui n'a pas été vérifiée. On suppose que les ARNm nouvellement synthétisés dans les cellules transformées avec les différentes chimères génétiques constituaient bel et bien des transcrits pleine longueur et complets. Ceci sous-entend que le site de départ de la transcription se retrouve au niveau du promoteur viral RSV, et non à un locus situé plus en aval de ce promoteur. Par exemple, dans la plupart des promoteurs, le site de départ de la transcription se situe à une trentaine de nucléotides en aval de la boîte TATA. Dans le cas des promoteurs dépourvus de cette séquence-consensus, on pourrait supposer que le site de départ de la transcription se retrouve à l'intérieur du promoteur.

Il est clair que des expériences d'élongation d'amorce par PCR RACE, suivies d'expériences de séquençage, auraient dû être effectuées pour caractériser les transcrits d'ARN m cellulaires d'une manière très précise, et confirmer que les plasmides transfectés auraient fait l'objet d'une transcription complète, tel que supposé au départ. De même, les constructions transfectées auraient dû elles-même faire l'objet d'expériences de séquençage, afin de s'assurer qu'aucun dommage, délétion ou insertion n'auraient interrompu les cadres de lecture attendus, et confirmer la solidité des conclusions tirées lors de cette étude pionnière, donc, peu exhaustive.

Il est clair que des investigations encore plus poussées sont nécessaires afin de mieux caractériser les phénomènes rapportés ici, et d'en reproduire les résultats en utilisant des outils d'investigation plus variés.

Ainsi, des expériences de séquençage sont requises afin de confirmer définitivement non seulement l'existence, mais aussi l'effet des cadres de lecture ouverts retrouvés ici, soit naturellement, soit par inadvertance, sur l'expression du gène rapporteur. De même, des expériences de mutagenèse dirigée (Kunkel et al., 1986) devraient être effectuées au niveau de plusieurs constructions utilisées dans le cadre de cette recherche, notamment **JMC100**, afin de corriger l'effet d'interférence provoqués par les codons ATG artificiels propres au site de clonage multiple. Ces expériences apporteraient une confirmation supplémentaire au sujet de l'application des lois intervenant dans l'initiation de

la traduction.

Il se pourrait que les résultats obtenus au niveau cellulaire puissent, en fait, constituer des *artéfacts reproductibles*, qui se répèteraient de façon consistante, soit à cause de la présence de composantes cellulaires pouvant interférer ou fausser les données expérimentales, ou soit à cause d'une variation trop aléatoire au niveau des efficacités de transfection. Un système de traduction acellulaire aurait pu être utilisé afin de tester la traduction *in vitro* des ARNm transcrits à partir des chimères génétiques **JMC**, et de voir si les mêmes résultats se répèteraient. En effet, un système comme l'utilisation de lysats de réticulocytes devrait reproduire fidèlement les résultats expérimentaux obtenus jusqu'ici, et confirmer plus solidement les conclusions tirées quant au rôle de ces séquences 5' non-traduites de GR sur la régulation du produit du gène rapporteur.

Les cellules en culture *in vitro* peuvent également être utilisées pour effectuer des transfections stables, maintenues longtemps en culture, co-transfectées avec la construction **pRSV-néo**, et sélectionnées avec la néomycine (G-418). Ainsi, les chimères génétiques, séquencées au préalable, seraient intégrées de façon permanente dans le génome. Les résultats d'expression observées avec les clones stables ainsi obtenus donneraient des indications sur l'implication des ordres élevés de structure de la chromatine (comme la fibre de 30 nanomètres ou les boucles radiales) en tant qu'éléments

essentiels ou non à la sélectivité et à la spécificité des réponses observées jusqu'ici. Ces travaux devraient être effectués sur des lignées cellulaires immortalisées.

Il faut également souligner que les cellules immortalisées sont des cellules transformées, dont les mécanismes de régulation de la croissance n'ont rien à voir avec ceux des cellules primaires isolées à partir de tissus sains. L'absence d'inhibition de contact en apporte une démonstration, tout comme la dichotomie observée au niveau de la distribution des différentes isoformes d'ARN m de GR entre les cellules de foie et les cellules HTC.

Il existe une variante des cellules HTC qui fut auparavant sélectionnée et caractérisée (Vanderbilt et al., 1987) et qui contient jusqu'à quatre fois plus de GR que dans la souche originelle. Ce sont les cellules 19G11, qui pourraient également faire l'objet d'essais fonctionnels similaires à ceux effectués dans le cadre de ce projet. On pourrait aussi se demander si le phénomène de *phosphorylation* du récepteur ne constituerait pas lui aussi un mécanisme de régulation, qui se produirait, cette fois, au niveau post-traductionnel, donc, au niveau de la protéine.

Les cellules en culture pourraient aussi être utilisées afin de tester la présence des différentes formes d'ARN m de GR que l'on s'attendrait de rencontrer dans le cytoplasme, suite à différents traitements, ou lors de certaines étapes du cycle cellulaire. Des cellules en croissance synchronisée

pourraient être utilisées dans ce but. Ainsi, les cellules transformées de façon stable ou transitoire pourraient être traitées avec différents stimulants ou inhibiteurs, tels du dexaméthasone, du RU 486 ou de la forskoline, pour ensuite être récoltées en vue d'une extraction d'ARN total et/ou d'ARN m . Des buvardages de Northern et des hybridations avec des sondes complémentaires aux séquences propres à l'exon 1A ou à l'exon 1B pourraient démontrer de façon claire la présence ou l'absence des différentes espèces d'ARN m pouvant être suspectées selon les traitements.

En outre, les techniques de l'histologie et de la microscopie pourraient être utilisées pour détecter les événements qui se produiraient *in vivo*, dans des rats normaux et adrénalectomisés, suite à différents traitements. Ainsi, les hybridations *in situ* pourraient apporter une confirmation supplémentaire au sujet de la présence des différentes isoformes d'ARN m dans des organismes entiers, par hybridation avec les mêmes sondes d'ARN que celles utilisées lors des analyses de buvardage.

De plus, étant donnée la forte homologie qui existe au niveau des séquences génétiques 5' non-traduites du GR humain et de rat, on pourrait se demander si les séquences d'exon 1B pourraient avoir leur équivalent physiologique au niveau de différentes lignées cellulaires humaines, à la suite d'un épissage incomplet (Figure 4.4). Cette hypothèse pourrait être vérifiée en dépistant les différentes isoformes d'ARN m retrouvées chez la lignée de

cellules T leucémique CEM-C7 (Antakly et al., 1989, Eisen et al., 1988), ainsi que dans les cellules de myélome OPM-2 (Gomi et al., 1990). Ces exemples s'inscrivent comme étant des exceptions dans le vaste répertoire des observations de régulation négative du récepteur des glucocorticoïdes dans les tissus humains, car ces lignées cellulaires sont régulées de façon positive (*up-regulated*) en présence du ligand.

Ce projet constitue donc une étude *pionnière*, qui pourrait ouvrir tout un champ d'études de plus en plus détaillées. Toutes ces expériences apporteraient une compréhension plus exhaustive des mécanismes pouvant être impliqués non seulement au niveau du contrôle du récepteur des glucocorticoïdes, mais aussi au niveau du contrôle de nombre de récepteurs stéroïdiens, et de bon nombre d'autres molécules importantes pour le maintien de la vie cellulaire. On pourrait donc penser aux protéines impliquées dans l'oncogénèse, la sénescence, l'apoptose, la croissance, le développement, et bien d'autres processus.

BIBLIOGRAPHIE

- Abastado JP, Miller P, Jackson BM & A. Hinnebusch (1991). *Suppression of ribosomal reinitiation at upstream Open Reading Frames in amino acid-starved cells forms the basis for GCN4 translational control.* Mol. Cell. Biol. **11**, 486-496.
- Akerblom IW, Slater EP, Beato M, Baxter JD & PL Mellon (1988). *Negative regulation by glucocorticoids through interferences with a cAMP responsive enhancer.* Science **241**, 350-353.
- Akner G, Mossberg K, Wikström AC, Sundqvist KG & JA Gustafsson (1991). *Evidence for colocalization of Glucocorticoid Receptor with cytoplasmic microtubules in human gingival fibroblasts, using two different monoclonal anti-GR antibodies, confocal laser scanning microscopy and image analysis.* J. Ster. Biochem. Mol. Biol. **39**, 419-432.
- Akner G, Wikstrom AC, Mossberg K, Sundqvist KG & JA Gustafsson (1994). *Morphometric studies of the localization of the Glucocorticoid Receptor in mammalian cells and of glucocorticoid hormone-induced effects.* J. Histochem. Cytochem. **42**, 645-657.
- Akner G, Wikström AC & JA Gustafsson (1995). *Subcellular distribution of the Glucocorticoid Receptor and evidence for its association with microtubules.* J. Ster. Biochem. Mol. Biol. **52**, 1-16.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K & JD Watson, editors. *Molecular biology of the cell.* Garland Publishing Inc. 1989.
- Altmann M & H Trachsel (1994). *The yeast Saccharomyces cerevisiae system : a powerful tool to study the mechanism of protein synthesis initiation in eukaryotes.* Biochimie **76**, 853-861.
- Amero SA, Kretsinger RH, Moncrief ND, Yamamoto KR & WR Pearson (1992). *The origin of nuclear receptor proteins: a single precursor distinct from other transcription factors.* Mol. Endocr. **6**, 3-7.
- Annweiler A, Hipskind RA & T Wirth (1991). *A strategy for efficient in vitro translation of cDNAs using the rabbit beta-globin leader sequence.* Nucleic Acids. Res. **19**, 3750-3757.
- Antakly T & HJ Eisen (1984). *Immunocytochemical localization of glucocorticoid receptor in target cells.* Endocrinology **15**, 1984-1989.
- Antakly T, Sasaki A, Liotta AS, Palkovits M & DT Krieger (1985). *Induced expression of the Glucocorticoid Receptor in the rat intermediate pituitary lobe.* Science **229**, 277-279.

- Antakly T, Zhang C, Sarrieau A & D Raquidan (1991). *Cell specific expression of the Glucocorticoid Receptor within granular convoluted tubules of the rat submaxillary gland*. *Endocrinology* **128**, 617-622.
- Argentin S, Sun YL, Lihmann I, Schmidt TJ, Drouin J & M. Nemer (1991). *Distal cis acting promoter sequences mediate glucocorticoid stimulation of cardiac ANF gene transcription*. *J. Biol. Chem.* **266**, 23315-23322.
- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE & RM Evans (1987). *Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the Glucocorticoid Receptor*. *Science* **237**, 268.
- Atkins JF, Weiss RB & RF Gesteland (1990). *Ribosome Gymnastics: degree of difficulty 9.5, style 10.0*. *Cell* **62**, 413-423.
- Bacchetti S & FL Graham (1977). *Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 1590-1594.
- Ballantine JEM & HR Woodland (1985). *Polyadenylation of histone mRNA in Xenopus oocytes and embryos*. *FEBS letters* **180**, 224-228.
- Ballard PL, Baxter JD, Higgins SD, Rousseau GG & GM Tomkins (1974). *General presence of the Glucocorticoid Receptor within granular convoluted tubules of the rat submaxillary gland*. *Endocrinology* **128**, 617-622.
- Barbosa MS & FO Wettstein (1988). *The two proteins encoded by CRPV-E6 open reading frame differ with respect to localization and phosphorylation*. *J. Virol.* **62**, 1088-1092.
- Barsony J & W Mc Coy (1992). *Molybdate increases intracellular 3' 5'- guanosine cyclic monophosphate, and stabilizes vitamin D receptor association with tubulin-containing filaments*. *J. Biol. Chem.* **267**, 24457-24465.
- Barton HA, Eisenstein RS, Bomford A & HN Munro (1990). *Determinants of the interaction between the IRE-BP and its binding site in rat L-ferritin mRNA*. *J. Biol. Chem.* **265**, 7000-7008.
- Basilion J, Rouault T, Massinpole M, Klausner R & W. Burgess (1994). *The Iron Responsive Element- Binding Protein: Localization of the RNA-binding site to the aconitase active site cleft*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **91**, 574-578.
- Beato M. (1989). *Gene regulation by steroid hormones*. *Cell* **56**, 335-344.
- Beltzer JS, Morris S & GB Kohlhaw (1988). *Yeast Leu4 encodes mitochondrial and non-mitochondrial forms of alpha-isopropylmalate synthase*. *J. Biol. Chem.* **263**, 368-374.

- Bentley DL & PJ Groudine (1986). *Novel promoter upstream of the human c-myc gene and regulation of c-myc expression in B cell lymphomas*. Mol. Cell. Biol. **6** , 3481-3489.
- Bernstein P, Peltz SW & J Ross (1989). *The poly (A) - Poly (A) binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro*. Mol. Cell. Biol. **23** , 9659-9670.
- Birnberg NC, Lissitzky JC, Hinman M & E Herbert (1983). *Glucocorticoids regulate POMC gene expression in vivo at the levels of transcription and secretion*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **80**, 6982-6986.
- Bloom E, Metulich DT, Lan NC, Higgins SJ, Simons SS & JD Baxter (1980). *Nuclear binding of the Glucocorticoid Receptor : Correlation between cytosol binding, activation, and biological response*. J. Ster. Biochem. **12** , 175-184.
- Bloomfield CD, Smith KA, Peterson BA & A Munck (1981). *Glucocorticoid Receptors in adult lymphoblastic leukemia*. Cancer Res. **41** , 4857-4860.
- Boal TR, Chiorini JA, Cohen RB, Miyamoto S, Frederickson RM, Sonenberg N & B Safer (1993). *Regulation of eukaryotic translation initiation factor expression during T cell activation*. Bioch. Biophys. Acta **1176** , 257-264.
- Boggs R, Gregor P, Idriss S, Belote J & M. McKeown (1987). *Regulation of sexual differentiation in Drosophila melanogaster via alternate splicing of RNA from the transformer gene*. Cell **50**, 739-747.
- Bourgeois S & RF Newby (1979). *Correlation between Glucocorticoid Receptor and cytosolic response of murine lymphoid cell lines*. Cancer Res. **39**, 4749-4751.
- Bram RJ, Young RA & JA Steitz (1980). *The Ribonuclease III site flanking 235 sequences in the 30S ribosomal precursor RNA of E. coli*. Cell **19**, 393-401.
- Brawermann G (1987) review. *Determinants of messenger RNA stability*. Cell **48**, 5-6.
- Breatnach PL & P Chambon (1981) review. *Splicing of eukaryotic mRNA*. Ann. Rev. Biochem. **50**, 349-383.
- Breitbart RE, Andreadis A & B Nadal-Ginard (1987). *Alternative splicing : a ubiquitous mechanism for the generation of multiple proteins from single genes*. Annu. Rev. Biochem. **56** 467-56495.
- Briehl M, Flomerfelt FA, Wu XP & RL Miesfeld (1990). *Transcriptional analyses of steroid-regulated gene networks*. Mol. Endocr. **4** , 287-294.
- Brönnegard M & S Okret (1988). *Characterization of the glucocorticoid receptor in fetal rat lung during development : influence of proteolytic activity*. J. Ster. Biochem. **31**, 809-817.

- Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S & A Cerami (1986). *Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-UTR of mRNA molecules specifying inflammatory mediators*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **83**, 1670-1674.
- Carey M (1991). *Mechanistic advances in eukaryotic gene activation*. Curr. Op. Cell Biol. **3**, 452-460.
- Carter-Muenchau P & RE Wolf Jr (1989). *Growth-rate dependent regulation of 6-phosphogluconate dehydrogenase level is mediated by an anti-Shine-Dalgarno sequence located within the E.coli gnd structural gene*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **86**, 1138-1142.
- Chakraborti PK, Garabedian MJ, Yamamoto KR & SS Simons Jr (1991). *Creation of "super" glucocorticoid receptors by point mutations in the steroid binding domain*. J. Biol. Chem. **266**, 22075-22078.
- Chalepakis G, Schauer M, Cao X & M Beato (1990). *Efficient binding of GR to its responsive element requires a dimer and DNA flanking sequences*. DNA & Cell Biol. **9**, 5355-5368.
- Chan GCK, Hess P, Meenakshi T, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA & F Payvar (1991). *Delayed Secondary Glucocorticoid Response Elements: unusual nucleotide motifs specify glucocorticoid receptor binding to transcribed regions of alpha-2u globulin DNA*. J. Biol. Chem. **266**, 22634-22644.
- Chandler VL, Maler BA & KR Yamamoto (1983). *DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro render a heterologous promoter hormone responsive in vivo*. Cell **33**, 489 - 499.
- Charron J & J Drouin (1986). *Glucocorticoid inhibition of transcription from episomal POMC gene promoter*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **83**, 8903-8907.
- Chrétien S, Dubart A, Beaupain D, Raich N, Grandchamp B, Rosa J, Goossens M & PH Romeo (1988). *Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **85**, 6-10.
- Chu E, Voeller D, Koeller DM, Drake JC, Takimoto CH, Maley GF & CJ Allegra (1993). *Identification of an RNA binding site for human thymidilate synthase*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **90**, 517-521.
- Cidlowski JA & GA Michaels (1977). *Alteration in glucocorticoid binding site number during the cell cycle in HeLa cells*. Nature **266**, 643-645.
- Cidlowski JA & Cidlowski NB (1981). *Regulation of Glucocorticoid Receptors by glucocorticoids in HeLa S3 cells*. Endocrinology **109**, 1975-1982.

- Clark AJL, Ishii S, Richert N, Merlino GT & I Pastan (1985). *Epidermal growth factor regulates the expression of its own receptor*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **82**, 8374-8378.
- Cleveland P (1988) review. *Autoregulated instability of tubulin mRNAs: a novel eucaryotic regulatory mechanism*. Tr. Biochem. Sci. **13**, 339-343.
- Constable A, Quick S, Gray NK & MW Hentze (1992). *Modulation of the RNA-binding activity of a regulatory protein by iron in vitro: switching between an enzymatic and genetic function ?* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **89**.
- Cordingley MG, Riegel AT & GL Hagen (1987). *Steroid dependent interaction of transcription factors with the inducible promoter of MMTV in vivo*. Cell **48**, 261-270.
- Crum C, Johnson JD, Nelson A & D Roth (1988). *Complementary oligodeoxynucleotide mediated inhibition of tobacco mosaic virus RNA translation in vitro*. Nuc. Ac. Res. **16**, 4569-4581.
- Crabtree GR, Munck A & Smith KA (1980). *Glucocorticoids and lymphocytes II : Cell cycle dependent changes in GR content*. J. Immunol. **125**, 13-17.
- Cullen BR & WC Greene (1989) review. *Regulatory pathways governing HIV-1 replication*. Cell **58**, 423-426.
- Cullen BR (1990) minireview. *The HIV-1 tat Protein : An RNA sequence-specific processivity factor?* Cell **63**, 655-657.
- Dahlmann-Wright K, Siltala-Roos H, Carlstedt-Duke J & JA Gustafsson (1990). *Protein-protein interactions facilitates DNA binding by the DNA binding domain of the Glucocorticoid Receptor*. J. Biol. Chem. **265**, 14030-14035.
- Dahlman-Wright K, Wright A, Gustafsson JA & J Carlstedt-Duke (1991). *Interaction of the Glucocorticoid Receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids*. J. Biol. Chem. **266**, 3107-3112.
- Dahlman-Wright K, Wright A, Carlstedt-Duke J & JA Gustafsson (1992). *DNA-binding by the Glucocorticoid Receptor: a structural and functional analysis*. J. Ster. Biochem. Mol. Biol. **41**, 249-272.
- Danielsen M, Northrop JP & G Ringold (1986). *The mouse Glucocorticoid Receptor: mapping of functional domains by cloning, sequencing and expression of wild-type and mutant receptor proteins*. EMBO J. **5**, 2513-2522.
- de Franco D & KR Yamamoto (1986). *Two different factors act separately or together to specify functionally distinct activities at a single transcriptional enhancer*. Mol. Cell. Biol. **6**, 993-1001.

- Denis M, Gustafsson JA & AC Wikström (1988). *Interaction of the Mr=90000 hsp with the steroid binding domain of the Glucocorticoid Receptor*. J. Biol. Chem. **263**, 18520-18523.
- de Robertis EM (1983) review. *Nucleoplasmic segregation of proteins and RNAs*. Cell **32**, 1021-1025.
- de Thé H, Marchio A, Tiollais P & A Dejean (1988). *A novel steroid thyroid hormone receptor related gene inappropriately expressed in human hepatocellular carcinoma*. Nature **330**, 667-670.
- Dever TE, Feng L, Wek RC, Cigan AM, Donahue TF & AG Hinnebusch (1992). *Phosphorylation of initiation factor 2a by protein kinase GCN4 in yeast*. Cell **68**, 585-592
- deWet JR, Wood KW, deLuca M, Helinski DR & S Subramani (1987). *Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells*. Mol. Cell. Biol. **7**, 725-737.
- Dieken ES, Meese EU & RL Miesfeld (1990). *nt¹ Glucocorticoid Receptor transcripts lack sequences encoding the amino-terminal transcriptional modulatory domain*. Mol. Cell. Biol. **10**, 4574-4581.
- Dieken ES & RL Miesfeld (1992). *Transcriptional transactivation functions localized to the Glucocorticoid Receptor N-terminus are necessary for steroid induction of lymphocyte apoptosis*. Mol. Cell. Biol. **2**, 589-597.
- Dingwall C, Ernberg T, Gait MJ, Green SM, Heaphy S, Karn J, Lowe AD, Singh M, Skinner MA & R Valerio (1989). *Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation responsive region (tar) RNA in vitro*. Proc. Nat. Acad. Sci USA. **86**, 6925-6929.
- Dingwall C & R Laskey (1986) review. *Protein import into the cell nucleus*. Ann. Rev. Cell Biol. **2**, 367-390.
- Dingwall C & R Laskey (1992) review. *The nuclear membrane*. Science **258**, 942-947.
- Dix DJ, Lin PN, Kimata Y & EC Thiel (1992). *The iron regulatory region of ferritin mRNA is also a positive control element for iron independent translation*. Biochem. **31**, 2818-2822.
- Dolph PJ, Huang J & RJ Schneider (1990). *Translation by the adenovirus tripartite leader elements which determine independence from cap-binding complex*. J. Virol. **64**, 2669-2677.
- Dong Y, Poellinger L, Gustafsson JA & S Okret (1988). *Regulation of Glucocorticoid Receptor expression: Evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms*. Mol. Endocr. **2**, 1256-1264.

- Drouin J, Trifiro MA, Plante RK, Nemer M, Ericksson P & O Wrange (1989). *Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent inhibition of proopiomelanocortin gene transcription*. Mol. Cell Biol **9**, 5305-5314.
- Drouin J, Sun YL, Tremblay S, Lavender P, Schmidt TJ, deLéan A & M Nemer (1992). *Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by Glucocorticoid Receptor*. Mol. Endocr. **6**, 1299-1309.
- Drouin J, Sun YL, Chamberland M, Gauthier Y, deLéan A, Nemer M & TJ Schmidt (1993). *Novel Glucocorticoid Receptor complex with DNA element of the hormone repressed proopiomelanocortin gene*. EMBO J. **12**, 145-156.
- Duncan R, Nagy E, Krell PJ & Dobos (1987). *Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions*. J. Virol. **61**, 3655-3664.
- Ederly I, Petryshyn R & N Sonnenberg (1989). *Activation of double-stranded RNA-dependent kinase (dsl) by the TAR region of HIV-1 mRNA : a novel translational control mechanism*. Cell **56**, 303-312.
- Eisen LP, Elasser MS & JHM Harmon (1988). *Positive regulation of the Glucocorticoid Receptor in human T-cells sensitive to the cytolytic effects of glucocorticoids*. J. Biol. Chem. **263**, 12044-12048.
- Ellis RJ & SM van der Vies (1991). *Molecular chaperones*. Ann. Rev. Biochem. **60**, 321-329.
- Encio IJ & SD Detera-Wadleigh (1991). *The genomic structure of the Human Glucocorticoid Receptor*. J. Biol. Chem. **266**, 7182-7188.
- Eriksson P & O Wrange (1990). *Protein-protein contacts in the Glucocorticoid Receptor homodimer influence its DNA binding properties*. J. Biol. Chem. **265**, 3535-3542.
- Evans RM. (1988) review. *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily*. Science **240**, 889-894.
- Falcone D & DW Andrews (1991). *Both the 5' untranslated regions and the sequences surrounding the start site contribute to efficient initiation of translation in vitro*. Mol. Cell. Biol. **11**, 2656-2664.
- Farman N, Oblin ME, Lombes M Delahaye F Westphal HM Bonvalet JP & JM Gasc (1991). *Immunolocalization of gluco-mineralocorticoid receptors in rabbit kidney*. Am. J. Physiol. **260**, 226-233.
- Feng Y, Gunter LE, Organ EL & DR Cavener (1991). *Translation initiation in Drosophila melanogaster is reduced by mutations upstream of the AUG initiator codon*. Mol. Cell. Biol. **11**, 2149-53.

- Freneau RT Jr, Lundbald JR, Pritchett DB, Wilcox JN & JL Roberts (1986). *Regulation of proopiomelanocortin gene transcription in individual cell nuclei*. Science **234**, 1265-1269.
- Freedman LP, Yoshinaga SK, Vanderbilt JN & KR Yamamoto (1989). *in vitro transcription enhancement by purified derivatives of the Glucocorticoid Receptor*. Science **245**, 289-301.
- Freshney RI (1983). *Culture of Animal Cells : Manual of Basic Techniques*. Alan Liss Inc, New-York.
- Freyschuss B & K Grandien (1996). *The 5' flank of the rat estrogen receptor gene: structural characterization and evidence for tissue-and species- specific promoter organization*. J. Mol. Endocr. **17**, 197-206.
- Frisch SM & EH Ruley (1987). *Transcription from the stromyelin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone*. J. Biol. Chem. **262**, 16300-16304.
- Furuichi Y, LaFiandra A & A. Shatkin (1977). *5'-terminal structure and mRNA stability*. Nature **266**, 235-239.
- Fuxe K, Wikstrom AC, Okret S, Agnati LF, Harfstrand A, Yu ZY, Granholm L, Zoli M, Vale W & JA Gustafsson (1985). *Mapping of the GR immunoreactive neurons in the rat tel-and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver*. Endocrinology **117**, 1803-1812.
- Gadson P, McCoy J, Wilkstrom AC & JA Gustafsson (1990). *Suppression of protein kinase C and the stimulation of glucocorticoid receptor synthesis by dexamethasone in human fibroblasts derived from tumor tissue*. J. Cell Biochem. **43**, 185-189.
- Galili G, Kawata E, Smith LD & BA Larkins (1988). *Role of the 3' poly(A) sequence in translational regulation of mRNAs in Xenopus laevis oocytes*. J. Biol. Chem. **263**, 5764-5770.
- Gallie DR & V Walbot (1992). *Identification of the motifs within the tobacco mosaic virus 5' leader responsible for enhancing translation*. Nucleic Acids Res. **20**, 4631-4638.
- Gametchu B (1987). *Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membrane : correlation to cell lysis*. Science **236**, 456-461.
- Gaul U, Seifert E, Schuh R & H Jackle (1987). *Analysis of Krüppel protein distribution during early Drosophila development reveals posttranscriptional regulation*. Cell **50**, 639-647.
- Gay DA, Sisodia S & DW Cleveland (1989). *Autoregulatory control of beta-tubulin messenger RNA stability is linked to translation elongation*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **86**, 5763-5765.

- Gearing K, Cairns W, Okret S & JA Gustafsson (1993). *Heterogeneity in the 5' UTR region of the rat glucocorticoid receptor mRNA*. J. Ster. Biochem. Mol. Biol. **46**, 635-639.
- Georgopoulos C & WJ Welch (1993) review. *Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones*. Trends Biochem. Sci. **17**, 295-302.
- Gething MJ & J Sambrook (1992) review. *Protein folding in the cell*. Nature **355**, 33-39.
- Giguère V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG & RM Evans (1986). *Functional domains of the human Glucocorticoid Receptor*. Cell **46**, 645.
- Gluzman Y (1981). *SV40-transformed simian cells support the replication of Early SV40 mutants*. Cell **23**, 175-182.
- Godowski PJ, Picard D & KR Yamamoto (1988). *Signal transduction and transcriptional regulation by Glucocorticoid Receptor-LexA fusion proteins*. Science **241**, 812-816.
- Gomi L, Moriwaki K, Katagiri S, Kurata T & EB Thompson (1990). *Glucocorticoid effects on myeloma cells in culture: inhibition with induction of glucocorticoid receptor mRNA*. Cancer Res **50**, 1873-1878.
- Gorman CM, Merlino GT, Willingham MC, Pastan I & BH Howard (1982). *The Rous Sarcoma Virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection*. P. Nat. Acad. Sci. USA. **79**, 6777-6781.
- Gorman CM, Moffat LF & BH Howard (1982). *Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells*. Mol. Cell. Biol. **2**, 1044-1051.
- Graham FL & AJ Van Der Eb (1973). *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA*. Virology **52**, 456-467.
- Grandien KFH, Berkenstam A, Nilsson S & JA Gustafsson (1993). *Localization of DNase I hypersensitive sites in the human estrogen receptor gene correlates with the transcript I activity of two differentially used promoters*. J. Mol. Endocr. **10**, 269-277.
- Green S & P Chambon (1988) review. *Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation*. Tr. Genet. **4**, 309-314.
- Gruol DJ, Campbell NF & S Bourgeois (1986). *Cyclic AMP-dependent protein kinase promotes glucocorticoid receptor function*. J. Biol. Chem. **261**, 4909-4914.
- Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J, Poellinger L, Okret S, Wikström AC, Bronnegard M, Gillner M, Dong Y, Fuxe K, Cintra A, Harfstrand A & L. Agnati (1987). *Biochemistry, molecular biology and Physiology of the Glucocorticoid Receptor*. Endocr. Rev. **8**, 185-234.

- Guertin M, Beril P, Bartowiak J, Anderson A & L Belanger (1983). *Rapid suppression of alpha-1 fetoprotein gene transcription by dexamethasone in developing rat liver*. *Biochemistry* **22**, 4296-4302.
- Hackett PB, Petersen RB, Hensel CH, Albericio F, Gunderson SI, Palmenberg AC & G Barany (1986). *Synthesis in vitro of a seven amino acid peptide encoded in the leader RNA of Rous Sarcoma Virus*. *J. Mol. Biol.* **190**, 45-57.
- Han S, Navarro J, Greve RA & TH Adams (1993). *Translational repression of brl A expression prevents premature development in Aspergillus*. *EMBO J.* **12**, 2449-2457.
- Hard T, Kellenbach E, Boelens R, Maler B, Dahlman K, Freedman LP, Carlstedt-Duke J, Yamamoto KR, Gustafsson JA & R Kaptein (1990). *Solution structure of the Glucocorticoid DNA binding domain*. *Science* **249**, 157-160.
- Hard T, Dahlman K, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA & R Rigler (1990). *Cooperativity and specificity in the interaction between DNA and the DNA binding domain of the Glucocorticoid Receptor*. *Biochemistry* **29**, 5358-5364.
- Harr L, Marsden HS, Preston CM, Smiley JR, Summers WC & WP Summers (1985). *J. Virol* **56**, 512-519.
- Harrison RW, Fairfield S & DN Orth (1974). *Evidence for glucocorticoid transport through the target cell membrane*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**, 1262-1267.
- Heaphy S, Dingwall C, Ernberg I, Gait M, Green M, Karn J, Lowe A, Singh M & MA Skinner (1990). *HIV-1 regulator of Virion Expression (Rev) Protein binds to an RNA stem loop structure located within the rev response element region*. *Cell* **60**, 685-693.
- Hershey JWB (1991) review. *Translational control in mammalian cells*. *Ann. Rev. Biochem.* **60**, 717-755.
- Hershey JWB (1989) review. *Protein phosphorylation controls translation rates*. *J. Biol. Chem.* **264**, 20823-20826.
- Hoffmann EK, Trusko FP, Freeman N & DL George (1987). *Structural and functional characterization of the promoter region of the mouse c-k-ras gene*. *Mol. Cell Biol.* **7**, 2592-2596.
- Hofmann MA, Senanayake SD & DA Brian (1993). *A translation-attenuating intraleader Open Reading Frame is selected on coronavirus mRNA during persistent infection*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **90**, 11733-11737.
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG & R Evans (1985). *Primary structure and expression of a functional human Glucocorticoid Receptor cDNA*. *Nature* **318**, 635-641.

- Hollenberg SM & RM Evans (1988). *Multiple and cooperative transactivation domains of the human glucocorticoid receptor*. *Cell* **55**, 899-906.
- Horiuchi T, Macon K, Kidd VJ & JE Volanakis (1990). *Translational regulation of complement protein C2 expression by differential utilization of the 5'-Untranslated Region of mRNA*. *J. Biol. Chem.* **265**, 6521-6524.
- Huckaby CS, Conneely DM, Beattie WG, Dobson AD, Tsai MJ & BW O'Malley (1987). *Structure of the chromosomal chicken progesterone receptor gene*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **84**, 8380-8384.
- Ishikawa M, Meshi T, Motoyoshi F, Takamatsu N & Y Okada (1986). *in vitro mutagenesis of the putative replicase genes of tobacco mosaic virus*. *Nucleic Acids Res.* **14**, 8291-8305.
- Israel A & SN Cohen (1985). *Hormonally mediated negative regulation of human proopiomelanocortin gene expression after transfection into mouse L cells*. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 2443-2453.
- Jackson R J & N Standart (1990). *Do the poly(A) tail and 3' Untranslated Region control mRNA translation ?* *Cell* **62**, 15-24.
- Jacobson, MD. *The structure and Regulation of the rat Glucocorticoid Receptor gene*. Thèse de doctorat, UCSF, 1991.
- Johansen H, Schumperli D & M Rosenberg (1984). *Affecting gene expression by altering the length and sequence of the 5' leader*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **81**, 7698-7702.
- Jones JDG, Dean C, Gidoni D, Gilbert D, Bond-Nutter D, Lee R, Bedbrook J & P Dunsmuir (1988). *Expression of bacterial chitinase protein in tobacco leaves using two photosynthetic gene promoters*. *Mol. Gen. Genetics* **212**, 536-542.
- Kalinyak JE, Dorin RI, Hoffmann AR & AJ Perlman (1987). *Tissue specific regulation of glucocorticoid receptor mRNA by dexamethasone*. *J. Biol. Chem* **262**, 10441-10444
- Kalinyak JE, Griffin CA, Hamilton RW, Bradshaw JG, Perlman AJ & AR Hoffman (1989). *Developmental and hormonal regulation of the Glucocorticoid Receptor messenger RNA in the rat*. *J. Clin. Invest.* **84**, 1843-1848.
- Karin M (1990). *Transcriptional control and integration of cell-autonomous and environmental cues during development*. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**, 996-1002.
- Kaspar RL, Kakegawa T, Cranston H, Morris D & M White (1992). *A regulatory cis element and a specific binding factor involved in the mitogenic control of murine rpL32 translation*. *J. Biol. Chem.* **267**, 508-514.

- Keaveney M, Klug J, Dawson MT, Nestor PI, Neilan JG, Forde RC & F Gannon (1991). *Evidence for a previously unidentified upstream exon in the human estrogen receptor gene*. J. Mol. Endocr. **6**, 111-115.
- Klausner RD & JB Harford (1989). *Cis-trans models for post-transcriptional gene regulation*. Science **246**, 870-872.
- Klausner RD, Rouault TA & Harford JB (1993). *Regulating the fate of mRNA : the control of cellular iron metabolism*. Cell **72**, 19-28.
- Koike S, Sakai M & M Muramatsu (1987). *Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA*. Nucleic Acids Res. **15**, 2499-2512.
- Koleske AJ, Buratowski S, Nonet M & RA Young (1992). *A novel transcription factor reveals a functional link between the RNA polymerase II CTD and TFIID*. Cell **69**, 883-894.
- Korn S, Koerts de Lang E, Engel G, Arends JW, Wouters EF & F Thunnissen (1998). *alpha and beta glucocorticoid receptor mRNA expression in rat skeletal muscle*. J. Muscle Res. Cell Mot. **19**, 757-765.
- Kozak M. & AJ Shatkin (1976). *Characterization of Ribosome-protected fragments from reovirus messenger RNA*. J. Biol. Chem. **251**, 4259-4266.
- Kozak M. & AJ Shatkin (1977). *Sequences of two 5'-terminal ribosome-protected fragments from reovirus messenger RNAs*. J. Mol. Biol. **112**, 75-96.
- Kozak M. & AJ Shatkin (1977). *Sequences and properties of two ribosome binding sites from the small size class of reovirus messenger RNA*. J. Biol. Chem. **252**, 6895-6908.
- Kozak M. & AJ Shatkin (1978). *Migration of 40 S ribosomal subunits on messenger RNA in the presence of edeine*. J. Biol. Chem. **253**, 6568-6577.
- Kozak M. (1978). *How do eukaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA ?* Cell **15**, 1109-1123.
- Kozak M. (1979). *Inability of circular mRNA to attach to eukaryotic ribosomes*. Nature **280**, 82-85.
- Kozak M. (1979). *Migration of 40S ribosomal subunits on messenger RNA when initiation is perturbed by lowering magnesium or adding drugs*. J. Biol. Chem. **254**, 4731-4738.
- Kozak M. (1980). *Binding of wheat germ ribosomes to fragmented viral mRNA*. J. Virology **35**, 748-756.
- Kozak M. (1980). *Influence of mRNA secondary structure on binding and migration of 40S ribosomal subunits*. Cell **19**, 79-90.

- Kozak M. (1980). *Evaluation of the "Scanning model" for initiation of protein synthesis in eukaryotes*. *Cell* **22**, 7-8.
- Kozak M. (1980). *Role of ATP in binding and migration of 40S ribosomal subunits*. *Cell* **22**, 459-467.
- Kozak M. (1981). *Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes*. *Nucleic Acids Res.* **9**, 5233-5252.
- Kozak M. (1981). *Mechanism of mRNA recognition by eukaryotic ribosomes during initiation of protein synthesis*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **93**, 81-123.
- Kozak M. (1982). *Analysis of ribosome binding sites from the s1 message of reovirus*. *J. Mol. Biol.* **156**, 807-820.
- Kozak M. (1983). *Translation of insulin-related polypeptides from messenger RNAs with tandemly reiterated copies of the ribosome binding site*. *Cell* **34**, 971-978.
- Kozak M. (1983). *Comparison of initiation of Protein Synthesis in Prokaryotes, Eukaryotes, and Organelles*. *Microbiol. Reviews* **47**, 1-45.
- Kozak M. (1984). *Selection of initiation sites by eukaryotic ribosomes: effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin*. *Nucleic Acids Res.* **12**, 3873-3893.
- Kozak M. (1984). *Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs*. *Nucleic Acids Res.* **12**, 857-872.
- Kozak M. (1984). *Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo*. *Nature* **308**, 241-246.
- Kozak M. (1986). *Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes*. *Cell* **47**, 481-483.
- Kozak M. (1986). *Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes*. *Cell* **44**, 283-292.
- Kozak M. (1986). *Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **83**, 2850-2854.
- Kozak M. (1986). *Regulation of protein synthesis in virus-infected animal cells*. *Adv. Virus Res.* **31**, 229-292.
- Kozak M. (1987). *Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eukaryotic ribosomes*. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3438-3445.

- Kozak M. (1987). *At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells.* J. Biol. Chem. **190**, 947-950.
- Kozak M. (1987). *An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger mRNAs.* Nucleic Acids Res. **15**, 8125-8148.
- Kozak M. (1988). *Leader length and secondary structure modulate mRNA function under conditions of stress.* Mol. Cell. Biol. **8**, 2737-2744.
- Kozak M. (1988). *A profusion of controls.* J. Cell Biol. **107**, 1-7.
- Kozak M. (1989). *Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structures in eukaryotic mRNAs.* Mol. Cell. Biol. **9**, 5134-5142.
- Kozak M. (1989). *Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eukaryotic cell-free translation systems.* Mol. Cell. Biol. **9**, 5073-5080.
- Kozak M. (1989). *The scanning model for translation: An update.* J. Cell Biol. **108**, 229-241.
- Kozak M. (1990). *Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes.* P. Nat. Acad. Sci. USA. **87**, 8301-8305.
- Kozak M. (1990). *Evaluation of the fidelity of initiation of translation in reticulocyte lysates from commercial sources.* Nucleic Acids Res. **8**, 2828.
- Kozak M. (1991). *Effects of long 5' leader sequences on initiation by eukaryotic ribosomes in vitro.* Gene expression **1**, 117-125.
- Kozak M. (1991). *A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes.* Gene expression **1**, 111-115.
- Kozak M. (1991). *Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation.* J. Biol. Chem. **266**, 19867-19870.
- Kozak M. (1991). *An analysis of vertebrate mRNA sequences: Intimations of translational control.* J. Cell Biol. **115**, 887-903.
- Kozak M. (1992). *Regulation of translation in eukaryotic systems.* Ann. Rev. Cell Biol. **8**, 197-225.
- Kozak M. (1992). *A consideration of alternative models for the initiation of translation in eukaryotes.* Critical Rev. Biochem. Mol. Biol. **27**, 385-402.
- Kozak M. (1994). *Determinants of translational fidelity and efficiency in vertebrate mRNAs.* Biochimie **76**, 815-821.

- Kozak M. (1994). *Features in the 5' non-coding sequences of rabbit a and b-globin mRNAs that affect translational efficiency*. J. Mol. Biol. **235**, 95-110.
- Kozak M. (1995). *Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first*. P. Nat. Acad. Sci. USA. **92**, 2662-2666.
- Kozak M. (1996). *Interpreting cDNA sequences : Some insights from studies on translation*. Mamm. Genome **7**, 563-574.
- Kozak M (1997). *Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4, but is not generally affected by nucleotides in positions +5 and +6*. EMBO J. **16** , 2482-2492.
- Kozak M (1998). *Primer extension analysis of eukaryotic ribosome-mRNA complexes*. Nucleic Acids Res. **26** , 4853-4859.
- Kozak M. (1999) review. *Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes*. Gene **234**, 187-208.
- Krieg PA & DA Melton (1984). *Functional messenger RNAs sre produced by SP-6 in vitro transcription of cloned cDNAs*. Nucleic Acids Res. **12** , 7057-7070.
- Kruys V, Marinx O, Shaw G, Deschamps J & G Huez (1989). *Translational blockade imposed by cytokine-derived AU-rich sequences*. Science **245**, 852-855.
- Kuiper G, Enmark E, Peltto-Huikko M, Nilsson S & JA Gustafsson (1996). *Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **93**. 5925-5930.
- Kunkel TA (1985). *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*. Proc Nat. Acad. Sci. USA. **82**, 488-492.
- Kwiatowski DJ & GAP Burns. *Human profilin : molecular cloning, sequence comparison, and chromosomal analysis*. J. Biol. Chem. **263**, 5910-5915.
- La Baer J & KR Yamamoto (1994). *Analysis of the DNA-binding affinity, sequence specificity and context dependence of the Glucocorticoid Receptor zinc finger region*. J. Mol. Biol. **239**, 664-688.
- Laski FA, Rio DC & GM Rubin (1986). *Tissue specificity of Drosophila P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing*. Cell **44**, 7-19
- Laughton A, Boulet AM, Bermingham J, Laymon A & MP Scott (1986). *Structure of transcripts from the homeotic Antennapedia gene of Drosophila melanogaster : two promoters control the protein-coding region*. Mol. Cell. Biol. **6**, 4676-4689.

- Lee SJ (1991). *Expression of growth-differentiation factor 1 in the nervous system: conservation of a bicistronic structure*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **88**, 4250-4254.
- Lefere V, Vincent A & F Amalric (1990). *Drosophila melanogaster poly (A) binding protein : cDNA cloning reveals an unusually long 3' UTR of the mRNA also present in other eukaryotic species*. Gene **96**, 219-225.
- Levine J, Chodchoy N, Marzluff W & A Skoultchi (1987). *Coupling of replication type histone mRNA levels to DNA synthesis requires the stem-loop sequence at the 3' end of the mRNA*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **84**, 6189-6193.
- Levy S, Avni D, Hariharan N, Perry RR & O Meyuhas (1991). *Oligopyrimidine tract at the 5' end of mammalian ribosomal protein mRNAs is required for their translational control*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **88**, 3319-3323.
- Lewin B. *Genes IV*. Oxford University Press, Cambridge, Mass. USA. 1989.
- Liao SM, Taylor ICA, Kingston RE & RA Young (1991). *RNA polymerase II carboxy-terminal domain contributes to the response to multiple acidic activators in vitro*. Genes & Devel. **5**, 2431-2440.
- Lin YS, Carey MF, Ptashne M & MR Green (1988). *Gal-4 derivatives function alone and synergistically with mammalian activators in vitro*. Cell **54**, 659-664.
- Lin YS, Carey M, Ptashne M & M Green (1990). *How different eukaryotic transcriptional activators can cooperate promiscuously*. Nature **345**, pp 359-361.
- Looman AC & JA Kuivenhoven (1993). *Influence of the three nucleotides upstream of the initiation codon on expression of the E coli lacZ gene in S. cerevisiae*. Nuc. Ac. Res. **21**, 4268-4271.
- Loreni F, Francesconi A & F Amaldi (1993). *Coordinate translational regulation in the synthesis of elongation factor 1-alpha, and ribosomal proteins in Xenopus laevis*. Nuc. Ac. Res. **21**, 4721-4725.
- Macejak D & Sarnow P. (1991). *Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA*. Nature **353**, 90-94.
- Makrides SC (1999) *Components of Vectors for Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*. Protein Expression and Purification **17**, 183-202.
- Marchal G et al. (1980) *Connaissance du Corps Humain*. Éditions Études Vivantes, Paris.
- Martin KJ, Lillie JW & MR Green (1990). *Evidence for interaction of different eukaryotic transcriptional activators with distinct cellular targets*. Nature **346**, 147-152.

- Martinez E, Dusserre Y, Wahli W & N Mermod (1991). *Synergistic transcriptional activation by CTF/NF1 and the estrogen receptor involves stabilized interactions with a limiting target factor*. Mol. Cell Biol. **11**, 2937-2945.
- McEwan IJ, Almlöf T, Wikström AC, Dahlman-Wright K, Wright APH & JA Gustafsson (1994). *The Glucocorticoid Receptor functions at multiple steps during transcription initiation by RNA polymerase II*. J. Biol Chem. **269**, 25629-25636.
- McGarry TJ & S Lindquist (1985). *The preferential translation of Drosophila hsp70 mRNA requires sequences in the untranslated leader*. Cell **42**, 903-911.
- McGinnis JF & J. DeVellis (1981). *Cell surface modulation of gene expression in brain cells by down-regulation*. Proc. Nat. Acad. Sci USA **78**, 1288-98.
- McIntyre WR & HH Samuels (1985). *Triamcinolone acetate regulates glucocorticoid receptors levels by decreasing the half life of the activated nuclear receptor form*. J. Biol. Chem. **260**, 418-427.
- Mendel DB, Bodwell JE, Gametchu B, Harrison RW & A Munck (1986). *Molybdate-stabilized nonactivated glucocorticoid receptor complexes contain a 90 KDa non-steroid binding phosphoprotein that is lost on activation*. J. Biol. Chem **261**, 3758-3763.
- Mendel DB & E Orti (1988). *Isoform composition and stoichiometry of the 90 KDa heat shock protein associated with glucocorticoid receptors*. J. Biol. Chem. **263**, 6695-6702.
- Merrick WC (1992) review. *Mechanism and Regulation of Eukaryotic protein synthesis*. Microbiol. Reviews **56**, 291-315.
- Merrick WC (1994) review. *Eukaryotic protein synthesis-an in vitro analysis*. Biochimie **76**, 822-830.
- Miesfeld R, Okret S, Wikström AC, Wrangé O, Gustafsson JA & KR Yamamoto (1984). *Characterization of a steroid hormone receptor gene and mRNA in wild-type and mutant cells*- Nature **312**, 779-781.
- Miesfeld R, Rusconi S, Godowski P, Maler B, Okret S, Wikström AC, Gustafsson JA & KR Yamamoto (1986). *Genetic complementation of a Glucocorticoid Receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA*. Cell **46**, 389-399.
- Miesfeld R, Godowski P, Maler B & KR Yamamoto (1987). *Glucocorticoid Receptor mutants that define a small region sufficient for enhancer activation*. Science **236**, 423-427.
- Miesfeld, R. (1989). *The structure and function of steroid receptor proteins*. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. **24**, 101-117.

- Miesfeld R. (1990). *Molecular genetics of corticosteroid action*. Amer. Rev. Resp. Dis. **141**, S11-S17.
- Miksicek R, Heber A, Schmid W, Danesch U, Posseckert G, Beato M & G Schütz (1986). *Glucocorticoid responsiveness of the transcriptional enhancer of moloney murine sarcoma virus*. Cell **46**, 283-290.
- Milburn SC, Hershey JWB, Davies MV, Kelleher K. & Kaufman RJ (1990). *Cloning and expression of eukaryotic initiation factor 4B cDNA: sequence determination identifies a common RNA recognition motif*. EMBO J. **9**, 2783-2790.
- Miller PF & AG Hinnebusch (1989). *Sequences that surround the stop codons of upstream open reading frames in GCN-4 mRNA determine their distinct functions in translational control*. Genes Devel. **3**, 1217-1225.
- Miner JN & KR Yamamoto (1992). *The basic region of AP-1 specifies glucocorticoid receptor activity at a composite response element*. Genes Devel. **6**, 2491-2501.
- Moldave, K. (1985) review. *Eukaryotic protein synthesis*. Ann. Rev. Biochem. **54**, 1109-1149.
- Morley SJ, Dever TE, Etchison DE & JA Traugh (1991). *Phosphorylation of eIF-4F by protein kinase C or multipotential S6 kinase stimulates protein synthesis at initiation*. J. Biol. Chem **266**, 4669-4672.
- Moustakas A, Sonstegard TS & PB Hackett (1993). *Effects of the open reading frames in the Rous Sarcoma Virus leader mRNA on translation*. J. Virol **67**, 4350-4357
- Munck A, Mendel DB, Smith LI & Orti E (1990). *Glucocorticoid Receptors and Actions*. Am. Rev. Resp. Dis. **141**, S2-S10.
- Nakai Y, Usui T, Tsukada T, Takahashi H, Fukata J, Fukushima M, Senoo K & I Imura (1991). *Molecular mechanisms of glucocorticoid inhibition of human pro-opiomelanocortin gene transcription*. J. Ster. Biochem. Mol. Biol. **401-3**, 301-306.
- Naveh-Many T & H Cedar (1981). *Active gene sequences are undermethylated*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **78**, 4246-4250.
- Needham M, Gooding C, Hudson K, Antoniou M Grosveld F & M Hollis (1992). *LCR/MEL : a versatile system for high level expression of heterologous proteins in erythroid cells*. Nuc. Acids Res. **20**, 997-1003.
- Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Denis M & JA Gustafsson (1990). *The transformed glucocorticoid receptor has a lower steroid-binding affinity than the non transformed receptor*. Biochemistry **29**, 1880-1886.
- Nigg EA (1991). *Nuclear import-export : in search of signals and mechanisms*. Cell **66** 15-22.

- Oakley RH, Sar M & JA Cidlowski (1996). *The human Glucocorticoid receptor B-isoform*. J. Biol. Chem. **271**, 9550-9559.
- Oikarinen J, Hamalainen L & A Oikarinen (1984). *Modulation of glucocorticoid receptor by cyclic nucleotides and its implications on the regulation of human skin fibroblasts growth and protein synthesis*. Biochim. Biophys. Acta **779**, 158-165.
- Okret S, Dong Y, Brönnegard M and JA Gustafsson (1991). *Regulation of Glucocorticoid Receptor expression*. Biochimie **73**, 51-59.
- Okret S, Poellinger L, Dong Y & Gustafsson JA. (1986). *Down-regulation of Glucocorticoid Receptor mRNA by glucocorticoid hormones and recognition by the receptor of a specific binding sequence within a receptor cDNA clone*. Proc. Nat. Acad.Sci. USA. **83**, 5899-5903
- Osterlund M, Kuiper G, Gustafsson JA & Y Hurd (1998). *Differential distribution and regulation of estrogen receptor alpha-and beta- mRNA within the female rat brain*. Mol. Brain Res. **54**, 175-180.
- Ozawa K, Ayub J & N Young (1988). *Translational regulation of B19 parvovirus capsid protein production by multiple upstream AUG triplets*. J. Biol. Chem **263**, 10922-10926.
- Pain VM & MJ Clemens (1983). *Assembly and breakdown of mammalian protein synthesis initiation complexes : regulation by guanine nucleotides and by phosphorylation of initiation factor eIF-2*. Biochemistry **22**, 726-733.
- Pain VM (1986). *Initiation of protein synthesis in mammalian cells*. Biochem J. **235** , 625-637.
- Pandey N & W Marzluff (1987). *The stem loop structure at the 3' end of histone mRNA is necessary and sufficient for regulation of histone mRNA stability*. Mol. Cell. Biol. **7**, 4557-4559.
- Pascal E & RT Tjian (1991). *Different activation domains of SP1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism*. Genes & Devel. **5** , 1646-1656.
- Pearce D & KR Yamamoto (1993). *Mineralocorticoid and Glucocorticoid Receptor activities distinguished by nonreceptor factors at a Composite Response Element*. Science **259**, 1161-1165.
- Pelletier J., Flynn ME, Kaplan G, Racaniello V & N Sonenberg (1988). *Mutational analysis of upstream AUG codons of poliovirus RNA*. J. Virol. **62**, 4486-4492.
- Peltz S & J Ross (1987). *Autogenous regulation of histone mRNA decay by histone proteins in a cell free system*. Mol. Cell. Biol. **7** , 4345-4356.

- Perlino E, Cortese R & G Ciliberto (1987). *The human alpha-1 antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes*. EMBO J. **6**, 2767-2771.
- Petersen C (1989). *Long range translational coupling in the rplJL-rpoBC operon of Escherichia coli*. J. Mol. Biol. **206**, 323-332.
- Petty ITD & AO Jackson (1990). *Two forms of the major barley stripe mosaic virus nonstructural protein are synthesized in vivo from alternative initiation codons*. Virology **177**, 829-832.
- Picard D & KR Yamamoto (1987). *Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor*. EMBO J. **6**, 3333-3340.
- Ponglikitmongkol M, Green S & P Chambon (1988). *Genomic organization of the human estrogen receptor gene*. EMBO J. **7**, 3385-3388.
- Ponta H, Kennedy N, Skroch P, Hynes NE & B Groner (1985). *Hormonal response region in the MMTV LTR can be dissociated from the proviral promoter and has enhancer properties*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **82**, 1020-29
- Poste G & ST Crooke (1985). *Mechanisms of Receptor Regulation*. McGraw-Hill, New-York.
- Pratt WB, Jolly DJ, Pratt DV, Hollenberg SM, Giguère V, Cadepon FM, Schweizer-Groyer G, Cartelli MG, Evans RM & EE Beaulieu (1988). *A region in the steroid binding domain determines formation of the non-DNA binding as glucocorticoid receptor complex*. J. Biol. Chem. **263**, 267-273.
- Propst F, Rosenberg MP, Iyer A, Kaul K & GF van der Woude (1987). *cmos proto-oncogen RNA transcripts in mouse tissues : structural features, developmental regulation, and localization in different cell types*. Mol. Cell. Biol. **7**, 1629-1637.
- Ptashne M. (1988). *How eukaryotic transcriptional activators work*. Nature **335**, 683-689.
- Rabbits PH, Forster A, Stinson MA & TH Rabbits (1985). *Truncation of exon 1 from the cmyc gene results in prolonged cmyc mRNA stability*. EMBO J. **4**, 3727-3733.
- Rajpert EJ, Lemaigre FP, Eliard PH, Place M, Lafontaine DA, Economidis IV, Belayew A, Martial JA & G Rousseau (1987). *Glucocorticoid receptors bound to the antagonist RU-486 are not down-regulated despite their capacity to interact in vitro with defined gene regions*. J. Steroid Biochem. **26**, 513-520.
- Rao CD, Pech M, Robbins K & SA Aaronson (1988). *The 5' untranslated sequence of the c-sis/Platelet-derived Growth Factor 2 transcript is a potent translational inhibitor*. Mol. Cell. Biol. **8**, 284-292.

- Rao GS, Schultze-Hagen K, Rao ML & H Breuer (1976). *Kinetics of steroid transport through the cell membrane : comparison of the uptake of cortisol by isolated rat liver cells with binding of cortisol to rat liver cytosol*. J. Ster. Biochem. **7** , 1123
- Rao ML, Rao GS, Eckel J & H Breuer (1977). *Factors involved in the uptake of corticosterone by rat liver cells*. Biochim. Biophys. Acta **500**, 322-332.
- Ree AH, Landmark BF, Eskild W, Levy FO, Lahooti H, Jahensen T, Aakvaag A & V Hansson (1989). *Autologous down regulation of mRNA and protein levels for estrogen receptors in MCF-7 cells : an inverse correlation to progesterone receptors levels*. Endocrinology **124**, 2577-2583.
- Rosewicz S, McDonald AR, Maddux BA, Goldfine ID, Miesfeld RL & CD Logsdon (1988). *Mechanism of Glucocorticoid Receptor down-regulation by glucocorticoids*. The J. Biol. Chem. **263**, 2581-2584.
- Ross J & G Kobs (1987). *H4 Histone messenger RNA decay in cell free extracts initiates at or near the 3' terminus and proceeds 3' to 5'*. J. Mol. Biol. **188**, 579-593
- Rossini GP & C Malaguti (1994). *The subcellular distribution of Glucocorticoid Receptor Complexes as studied by chemical crosslinking of intact HTC cells*. J. Ster. Biochem. Mol. Biol. **48**, 517-521.
- Rouault T, Hentze M, Haile D, Harford J & R Klausner (1989). *The Iron Responsive Element Binding Protein : A method for the affinity purification of a regulatory RNA binding protein*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **86**, 5768-5772.
- Rouault TA, Stout CD, Kaptein S, Harford J & RD Klausner (1993). *Structural relationship between an iron regulated RNA binding protein (IRE-BP) and aconitase : functional implications*. Cell **64**, 881-883.
- Roy S, Katze M, Parkin N, Ederly I, Hovanessian A & N Sonenberg (1990). *Control of the Interferon-induced 68 KD protein kinase by the HIV-1 tat gene product*. Science **247** 1216-1219.
- Ruzdijic S & T Pederson (1987). *Evidence for an association between U1 RNA and interspersed repeat single copy RNAs in the cytoplasm of sea urchin eggs*. Development (Camb) **101**, 107-116.
- Saceda M, Lippmann ME, Chambon P, Lindsay RL, Ponglikitmongkol M, Puente M & MP Martin (1988). *Regulation of the estrogen receptor in MCF-7 cells by estradiol*. Mol. Endocr. **2** , 1157-1162.
- Sachs AB (1993) . *Messenger RNA degradation in eukaryotes*. Cell **74** , 413-421

- Sakai DD, Helms S, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, Rottman FM, and KR Yamamoto (1988). *Hormone-mediated repression: a Negative Glucocorticoid Response Element from the bovine prolactin gene*. *Genes and Development* **2**, 1144-1154.
- Sambrook J, Fritsch EF & T. Maniatis (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2e édition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sapolski RM, Krey LC & BS McEwan (1984). *Stress down regulates corticosterone receptors in a site specific manner in the brain*. *Endocr.* **114**, 287-292.
- Sarnow, P (1989). *Translation of glucose-regulated protein 78/immunoglobulin heavy-chain binding protein mRNA is increased in poliovirus-infected cells at a time when cap-dependent translation of cellular mRNAs is inhibited-* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **86**, 5795-5799.
- Schafer M, Kuhn R, Bosse F & U Schafer (1990). *A conserved element in the leader mediates post-meiotic translation as well as cytoplasmic polyadenylation of a Drosophila spermatocyte mRNA*. *EMBO J.* **21**, 4519-4525.
- Schäfer M, Börsch O, Hülster A & U Schäfer (1993). *Expression of a gene duplication encoding conserved sperm tail proteins is translationally regulated in Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1708-1718.
- Schatt MD, Rusconi S & W Schaffner (1990). *A single DNA-binding transcription factor is sufficient for activation from a distant enhancer and/or from a promoter position*. *EMBO J.* **9**, 481-487.
- Schneuwly S, Kuroiwa A, Baumgartner P & SW Gehring (1986). *Structural organization and sequence of the homeotic gene Antennapedia of Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **5**, 5733-5739.
- Schöffl F, Rieping M, Baumann G, Bevan M & S Angermüller (1989). *The function of plant heat shock promoter elements in the regulated expression of chimeric genes in transgenic tobacco*. *Mol. Gen. Genetics* **217**, 246-253.
- Schüle R, Muller M, Kaltschmidt C & R Renkawitz (1988). *Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors*. *Science* **242**, 1418-1420.
- Sedman SA & JE Mertz. (1988). *Mechanisms of synthesis of virion proteins from the functionally bigenic late mRNAs of SV40*. *J. Virol* **62**, 954-961.
- Sedman SA, Gelembiuk GW & JE Mertz (1990). *J. Virol* **64**, 453-457.
- Selden RF, Howie KB, Rowe ME, Goodman HM & DD Moore (1986). *Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression*. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3173-3179.

- Selye, Hans. *Stress of life /Le stress de la vie, le problème de l'adaptation (traduction)*. Paris, editions Gallimard 1975. 422 pages.
- Sergeev P, Yenikolopov GN, Peunova N, Kuzin BA, Khechumian RA, Korochkin LI & GP Georgiev (1993). *Regulation of a tissue specific expression of the esterase S gene in Drosophila viridis*. Nuc Ac. Res. **21**, 3545-3551.
- Seto M, Jaeger RD, Hockett W, Graninger W, Bennett S, Goldman P & SJ Korsmeyer (1988). *Alternative promoters and exons, somatic mutations of deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma*. EMBO J. **7**, 123-131.
- Shatkin AJ. (1976). *Capping of eukaryotic mRNAs*. Cell **9**, 645-653.
- Shatkin AJ. (1985). *mRNA Cap Binding Proteins: Essential factors for initiating translation*- Cell. **40**, 223-224.
- Shaw G & R Kamen (1986). *A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation*. Cell **46**, 659-667.
- Shine J & L Dalgarno (1974). Biochemistry J. **141** , 609-615.
- Sleat DE, Hull R, Turner PC & TM Wilson (1988). *Studies on the mechanism of translational enhancement by the 5' leader sequence of tobacco mosaic virus RNA*. Eur. J. Biochem. **175**, 75-86.
- Slusher LB, Gillmann EC, Martin NC & AK Hopper (1991). *mRNA leader length and initiation codon context determine alternative AUG selection for yeast gene MOD 5*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **88**, 9789-9793.
- Spena A, Krause E & B Dobberstein (1985). *Translation efficiency of zein mRNA is reduced by hybrid formation between the 5'- and 3'- untranslated region*. The EMBO J. **9** , 2153-2158.
- Spiropoulou CF & ST Nichol (1993). *A small highly basic protein is encoded in overlapping frame within the P gene of vesicular stomatitis virus*. J. Virol **67** , 3103-3110.
- Standart N & RJ Jackson (1994). *Regulation of translation by specific protein/mRNA interactions*. Biochimie **76**, 867-879.
- Stanley I, Metcalf P, Sobieszczuk N, Gough M & RA Dunn (1985). *The structure and expression of the murine gene encoding granulocyte-macrophage CSF : evidence for utilization of alternative promoters*. EMBO J. **4** , 2569-2573.
- Stein, I., Itin, A., Einat, P., Skaliter, R., Grossman, Z. & Keshet, E. (1998) . *Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry : Implications for translation under hypoxia*. Mol. Cell. Biol. **18**, 3112-3119.

- Strähle U, Schmidt W & G Schutz (1988) *Synergistic action of the Glucocorticoid receptor with transcription factors*. EMBO J. **7** , 3389-3395.
- Stromstedt PE, Poellinger L, Gustafsson JA & J Carlstedt-Duke (1991). *The Glucocorticoid Receptor binds to a sequence overlapping the TATA box of the human osteocalcin promoter: a potential mechanism for negative regulation*- Mol. Cell. Biol. **11**, 3379-3383.
- Su W, Jackson S, Tjian R & H Echols (1991a) *DNA looping between sites for transcriptional activation : self association of DN-bound SP1*. Genes & Devel. **5**, 820-826.
- Su, Middleton T, Sugden B & H Echols (1991b). *DNA looping between the origin of replication of the Epstein-Barr Virus and its enhancer site : stabilization of an origin complex with Epstein-Barr Virus nuclear antigen 1*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **88**, 10870-10874.
- Svec F & M Rudis (1981). *Glucocorticoids regulate the glucocorticoid receptor in the AtT-20 cells*. J. Biol. Chem. **256**, 5984-5987.
- Svec F (1985) *minireview. Glucocorticoid receptor regulation*. Life sciences **36**, 2359-2366.
- Tasset D, Tora L, Fromental C, Scheer E & P Chambon (1990). *Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms*. Cell **62**, 1177-1187.
- Takahashi K, Vigneron M, Matthes H, Wildeman A, Zenke M & P Chambon (1986). *Requirement of stereotypic alignment for initiation from the simian virus 40 early promoter*. Nature **319**, 121-126.
- Taylor JL, Jones J, Sandler S, Mueller GM, Bedbrook J & P. Dunsmuir (1987). Mol. Gen. Genetics **210**, 572-577.
- Teasdale J, Lewis FA, Barrett ID, Abbott AC, Wharton J & CC Bird (1986). *Immunocytochemical application of monoclonal antibodies to rat liver glucocorticoid receptors*. J. Pathol. **150** , 227-237.
- Theodorakis N & R Morimoto (1987). *Post-transcriptional regulation of hsp-70 expression in human cells: effects of heat shock, inhibition of protein synthesis and adenovirus infection on translation and mRNA stability*. Mol. Cell. Biol. **7** , 4357-4368.
- Theodorakis NG & DW Cleveland (1992). *Physical evidence for cotranslational regulation of beta-tubulin messenger RNA degradation*. Mol. Cell. Biol. **12** , 791-799.
- Therrien M & J Drouin (1991). *Pituitary proopiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements*. Mol. Cell. Biol. **11**, 3492-3503.
- Therrien M & J Drouin (1993). *Cell specific Helix-Loop-Helix factor required for pituitary expression of the proopiomelanocortin gene*. Mol. Cell. Biol. **13**, 2342-2353.

- Thompson EB, Tomkins GM & JF Curran (1966). *Induction of tyrosine a-ketoglutarate transaminase by steroid hormones in a newly established tissue culture cell line.* Biochemistry **56**, 296-303.
- Tora L, Gaub MP, Mader S, Dierich A, Bellard M & P Chambon (1988a). *Cell specific activity of a GGTC A half-palindromic estrogen responsive element in the chicken ovalbumin gene promoter.* EMBO J. **7** , 3771-3778.
- Tora L, Gronmeyer H, Turcotte B, Gaul MP & P Chambon (1988b). *The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation.* Nature **333** , 185-188.
- Tortora GJ, Evans RL & NP Anagnostakos. *Principles of Human Physiology.* Harper & Row Publishers, New-York, 1982. 674 pp.
- Tsai SY, Carlstedt-Duke J, Weigel NL, Dahlman K, Gustafsson JA, Tsai MJ & BW O'Malley (1988). *Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: Evidence for receptor dimer formation.* Cell **55** , 361-369.
- Tsai SY, Tsai MJ & BW O'Malley (1989) . *Cooperative binding of steroid hormone receptors contributes to transcriptional synergism at target enhancer elements.* Cell **57** , 443-448.
- Tsai SY, Srinivasan G, Allan GF Thompson EB, O'Malley BW & MG Tsai (1990). *Recombinant human Glucocorticoid Receptor induces transcription of hormone response genes in vitro.* J. Biol. Chem. **263**, 17055-17061.
- Turner BB (1986). *Tissue differences in the up-regulation of glucocorticoid binding proteins in the rat.* Endocrinology **118**, 1211-1216.
- Umesono K & RM Evans (1989) . *Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors.* Cell **57** , 1139-1146.
- Vander AJ, Sherman JH & DS Luciano. *Physiologie humaine.* McGraw-Hill editeurs, Montréal, 1977. 608 pp.
- Vanderbilt JN, Miesfeld R, Maler BA & KR Yamamoto (1987). *Intracellular receptor concentration limits glucocorticoid-dependent enhancer activity.* Mol. Endocr. **1** , 68-74.
- van der Heuvel LL, Bergkamp R, Planta J & HA Raué (1989). Gene **79**. 83-95.
- Vassalli JD, Huarte J, Belin D, Gubler P, Vassali A, O'Connell ML, Parton LA, Rickles RR & S Strickland (1989). *Regulated polyadenylation controls mRNA translation during meiotic maturation of mouse oocytes.* Genes & Devel. **3**, 2163-2171.

- Vogt PK & TJ Bos (1990). *jun : oncogene and transcription factor-review-*. Adv. Cancer Res. **55** , 1-35.
- Walsh MJ, Leleiko NS & KM Sterling Jr (1988). *Regulation of type I, III and IV procollagen nRNA synthesis in glucocorticoid-mediated intestinal development*. J. Biol. Chem. **262**, 10814-10818.
- Wang Y & RJ Miksicek (1991). *Identification of a dominant negative form of the human estrogen receptor*. Mol. Endocr. **5** , 1707-1715.
- Wasylyk B (1988)-review- *Enhancers and Transcription factors in the control of gene expression*. Bioch. Biophys. Acta **951**, 17-35.
- Waterhouse P, Khokha R & D Denhardt (1990). *Modulation of translation by the 5' Leader sequence of the mRNA encoding murine tissue inhibitor of metalloproteinases*. J. Biol. Chem. **265**, 5585-5589.
- Watson JD & FCH Crick (1953). *A structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature **171**, 737-743.
- Webster NJG, Green S, Jin JR & P Chambon (1988). *The hormone-binding domains of the Estrogen and Glucocorticoid Receptors contain an inducible transcription activation function*. Cell **54**, 199-207.
- Welte T, Philipp S, Cairns C, Gustafsson JA & W Doppler (1993). *Glucocorticoid Receptor binding sites in the promoter region of milk protein genes-* J. Ster. Biochem. Mol. Biol. **47**, 75-81.
- Werner M, Feller A, Messenguy F & A Piérard (1987). *The leader peptide of yeast gene CPA 1 is essential for the translational repression of its expression*. Cell **49**, 805-813.
- Wilson DJ & DW Foster .*Williams textbook of Endocrinology. Seventh edition*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 1985. 1413 pp.
- Wilson T & R Treisman (1988). *Removal of poly(A) and consequent degradation of cfos mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences*. Nature **336**, 396-399.
- Wolin SL & P Walter (1988)- *Ribosome pausing and stacking during translation of a eukaryotic mRNA*. EMBO J. **7**, 3559-3569.
- Wrange O, Carlstedt-Duke J & JA Gustafsson (1979). *Purification of the Glucocorticoid Receptor from rat liver cytosol-* J. Biol. Chem. **254**, 9284-9290.
- Wrange O, Erickson P & T Perlmann (1988). *The purified activated glucocorticoid receptor is a homodimer*. J. Biol. Chem. **264** , 5253-5259.

- Wright APH & JR Gustafsson (1991). *Mechanism of synergistic transcriptional transactivation by the human Glucocorticoid Receptor*. Proc Nat Acad Sci USA. **88**, 8283-8287.
- Wright APH, Zilliacus J, McEwan IJ, Dahlman-Wright K, Almlöf T, Carlstedt-Duke J & JA Gustafsson (1993). *Structure and Function of the Glucocorticoid Receptor*. J. Ster. Biochem. Mol. Biol. **47**, 11-19.
- Yaffe D. (1968). *Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **61**, 477-483.
- Yamamoto KR (1985). *Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks*. Annu. Rev. Genet **19**, 209-252.
- Yamamoto T, Jay G & I Pastan (1980). *Unusual features in the nucleotide sequence of a cDNA clone derived from the common region of avian sarcoma virus messenger RNA*-Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **77**, 176-180.
- Yamamoto T, Sivaswami J, Fagan JB, Jay G, deCrombrugge B & I Pastan (1980). *Molecular mechanism for the capture and excision of the transforming gene of avian sarcoma virus as suggested by analysis of recombinant clones*. J. Virol. **35**, 436-443.
- Yang, Q., and Samow, P. (1997). *Location of the internal ribosome entry site in the 5' noncoding region of the immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP) mRNA : Evidence for specific RNA-protein interactions*. Nucleic Acids Res. **27**, 562-572.
- Yen T, Machlin P & D Cleveland (1988). *Autoregulated instability of beta-tubulin mRNAs by recognition of the nascent amino terminus of beta-tubulin*. Nature **334**, 580-585.
- Yoshinaga SK, Peterson CL, Herskowitz I & KR Yamamoto (1992). *Roles of SWI 1, SWI 2 and SWI 3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors*. Science **258**, 1598-1604.
- Zelent A, Mendelsohn C, Kastner P, Krust A, Garnier JM, Ruffenach F, Leroy P & P Chambon (1991). *Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor B are generated by usage of two promoters and alternative splicing*. EMBO J. **10**, 71-81.