

Université de Montréal

ÉTUDE DE LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA
PÉRIPHÉRINE AU COURS DE LA DIFFÉRENCIATION NEURONALE

par

Nicolay Ferrari

Département de pathologie et de biologie cellulaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en biopathologie cellulaire

juin 1998

© Nicolay Ferrari, 1998



W
4
U58
1999
V.092

Université de Montréal

ÉTUDE DE LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA
PÉRIPHÉRINE AU COURS DE LA DIFFÉRENCIATION NEURONALE

par

Nicolas Tremblay

Département de pathologie et de biologie cellulaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophie (Ph.D.)
en pathologie cellulaire

juin 1998

Nicolas Tremblay, 1998



Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Étude de la régulation de l'expression du gène de la périphérine au cours de
la différenciation neuronale**

présentée par:

Nicolay Ferrari

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Lisa McKerracher, présidente du jury.

Dr André Royal, directeur de recherche.

Dr Nicole Leclerc, membre du jury.

Dr Joséphine Nabantoglu, examinateur externe.

Dr Sylvain Meloche, représentant du doyen.

Thèse acceptée le: 18 décembre 1998

SOMMAIRE

Le bon développement du système nerveux des mammifères dépend d'évènements génétiques préprogrammés et de réponses à des signaux extracellulaires qui vont orchestrer l'activation d'une classe précise de gènes à chacune des étapes de la neurogenèse. L'expression de ces gènes histospécifiques conduit à la synthèse des protéines qui permettent aux différentes cellules neuronales d'acquérir des fonctions particulières. L'exécution parfaite de cette cascade d'activation repose sur des facteurs de transcription qui déterminent les niveaux d'expression des gènes. Nous avons étudié les mécanismes transcriptionnels responsables de l'expression du gène de la périphérine afin, d'une part, de mieux comprendre le processus qui permet au gène de s'exprimer de façon histospécifique et d'autre part, d'identifier des facteurs de transcription importants pour l'induction de l'expression du gène en réponse à des signaux extracellulaires.

La périphérine est une protéine de la famille des filaments intermédiaires (FI). Un réseau de FI distinct caractérise chaque type cellulaire. Le gène de la périphérine a un profil d'expression restreint à la majorité des neurones du système nerveux périphérique (SNP) et à quelques neurones du système nerveux central (SNC). Elle est présente dans la plupart des neurones dérivés de la crête neurale et dans certains neurones dérivés des placodes. On la trouve également exprimée dans les neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle épinière, les noyaux moteurs des nerfs crâniens de même que dans quelques autres noyaux du SNC mais elle n'est pas retrouvée dans le cerveau antérieur. La périphérine est donc un modèle intéressant pour l'étude des mécanismes moléculaires qui régissent la spécificité tissulaire ainsi que le déclenchement de l'expression génétique au cours du développement du système nerveux et, qui sont responsables du maintien de l'intégrité du système nerveux. Pour comprendre comment la transcription du gène

de la périphérine est régie, nous avons tout d'abord caractérisé un élément de régulation du promoteur du gène. Puis, dans un deuxième temps, nous sommes allés à la recherche d'éléments de régulation intragéniques susceptibles de moduler l'augmentation des niveaux d'expression du gène de la périphérine en réponse au facteur de croissance du tissu nerveux (NGF) et de l'interleukine-6 (IL-6).

Diverses techniques utilisées *in vivo*, telles que les transfections de cellules en culture et *in vitro*, telles que les changements de mobilité électrophorétiques (EMSA), nous ont permis de caractériser un élément de régulation, PER3, localisé dans la région proximale du promoteur du gène. Cet élément est un activateur transcriptionnel fort et lie le facteur de transcription Sp-1. De fait, PER3 est responsable de 80% de l'activité transcriptionnelle du promoteur. Parallèlement, l'utilisation de la DNase I *in vivo* nous a permis de cartographier trois sites hypersensibles à l'intérieur du gène dans l'intron 1 (PRi-1), l'intron 3 (PRi-3) et l'intron 6 (PRi-6). Le site PRi-1 revêt un attrait particulier pour notre étude. D'une part, parce que, de façon générale, les sites hypersensibles à la DNase I coïncident avec des séquences régulatrices capables d'interagir avec des facteurs de transcription et, d'autre part, parce que ce site pourrait intervenir dans l'induction de l'expression du gène de la périphérine en réponse au NGF et à l'IL-6. L'analyse de ce site a conduit à l'identification d'un élément de régulation liant un complexe protéique qui possède des caractéristiques intéressantes. Premièrement, la protéine associée à ce complexe, p100, a une masse moléculaire d'environ 100 kDa et, deuxièmement, n'est détectable que dans les cellules qui expriment le gène de la périphérine. Finalement, l'activité de liaison à l'ADN de p100 semble être affectée par le NGF et l'IL-6 car elle n'est pas détectée dans les cellules traitées au NGF ou à l'IL-6.

Il apparaît donc que l'expression du gène de la périphérine fait intervenir au moins deux niveaux de régulation. Le premier niveau gère l'histospecificité ainsi

que le niveau basal d'expression du gène et fait appel à des éléments de régulation localisés à proximité du site d'initiation de la transcription et, probablement, d'après les évidences présentées dans cette thèse, au moins un élément de régulation dans l'intron 1. Le second niveau semble dépendre, entre autres, d'éléments de régulation intragéniques qui, dans le cas de PRi-1, pourraient être importants pour l'induction de l'expression du gène de la périphérine en réponse au NGF et à l'IL-6.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
DEDICACE.....	xiv
REMERCIEMENTS.....	xv
CHAPITRE 1.....	1
1.1 Introduction.....	2
1.2 La périphérine: une protéine membre de la famille des filaments intermédiaires.....	3
1.2.1 La famille des filaments intermédiaires.....	3
1.2.2 Le réseau de filaments intermédiaires: structure dynamique.....	9
1.2.3 Fonctions du réseau de filaments intermédiaires....	11
1.2.4 Rôle de la phosphorylation des filaments intermédiaires.....	16
1.2.5 La périphérine: caractéristiques et propriétés structurales.....	18
1.2.6 L'aire d'expression de la périphérine.....	19
1.2.7 La fonction de la périphérine.....	23
1.3 Expression de la périphérine au cours de la différenciation neuronale.....	25
1.3.1 Le facteur de croissance du tissu nerveux.....	26
1.3.2 Les glucocorticoïdes.....	28
1.3.3 Les cytokines: l'interleukine-6.....	29
1.3.4 Les cellules PC12 comme modèle d'étude.....	31

1.4	Régulation de l'expression génétique au niveau de l'initiation de la transcription.....	33
1.4.1	Promoteur de base et facteurs de transcription généraux.....	33
1.4.2	Les facteurs de transcription spécifiques.....	37
1.4.2.1	Les domaines homéotiques.....	38
1.4.2.2	Le domaine en doigt à zinc.....	40
1.4.2.3	Le domaine basique hélicoïdal.....	41
1.4.3	Activation transcriptionnelle vs répression.....	42
1.4.3.1	Activation transcriptionnelle.....	42
1.4.3.2	Répresseurs et mécanismes de répression.....	43
1.4.4	Les co-facteurs.....	46
1.4.5	Régulation de l'activité et de la synthèse des facteurs de transcription.....	48
1.5	La régulation de l'élongation.....	49
1.5.1	Les facteurs d'élongation.....	49
1.5.2	Bloquage de l'élongation.....	51
1.6	Le gène de la périphérine, modèle d'étude pour la transcription et l'induction neurospécifique.....	52
1.6.1	Objectifs spécifiques.....	53
CHAPITRE 2	54
Résumé	55
Article :	Transcriptional activation of the neuronal peripherin-encoding gene depends on a G+C-rich element that binds Sp1 in vitro and in vivo.....	56
	Summary.....	56
	Introduction.....	56
	Results and discussion.....	57
	Acknowledgements.....	61
	References.....	61

CHAPITRE 3.....	63
3.1 Analyse de la structure de la chromatine du gène de la périphérine.....	64
3.1.1 Détection de sites hypersensibles à la DNase I à l'intérieur du gène de la périphérine.....	65
3.1.2 Relation entre la structure de la chromatine du gène de la périphérine et son expression.....	70
3.2 Rôle de la chromatine dans la régulation de l'expression du gène de la périphérine.....	71
CHAPITRE 4.....	74
Résumé.....	75
Article: NGF and IL-6-regulated binding of a tissue-specific nuclear protein at a novel DNA-binding sequence within intron 1 of the neuronal peripherin gene.....	76
Summary.....	77
Introduction.....	78
Results.....	81
Discussion.....	97
Materials and Methods.....	101
References.....	105
CHAPITRE 5.....	111
5.1 Discussion.....	112
5.2 L'expression de la périphérine dépend de la présence d'éléments de régulation dans le promoteur et à l'intérieur du gène.....	113
5.2.1 Le niveau basal d'expression et le facteur de transcription ubiquitaire Sp1.....	114
5.2.2 Modulation de l'expression de la périphérine en réponse à des signaux extracellulaires.....	116

5.3	L'élément PRi-1.2, lieu de convergence des voies de signalisation intracellulaire du NGF et de l'IL-6.....	119
5.3.1	Mécanisme d'induction de l'expression du gène de la périphérine.....	120
5.4	Conclusion.....	122
	BIBLIOGRAPHIE.....	124
	ANNEXE 1.....	xvii

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

Tableau I	Distribution des différents types de protéines des filaments intermédiaires.....	8
Tableau II	Profil d'expression de la périphérine.....	21

CHAPITRE 2

CHAPITRE 3

CHAPITRE 4

Table I	Mutational analysis of the PRi-1.2 sequence.....	94
---------	--	----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1	Structure des protéines des filaments intermédiaires.....	4
Figure 2	Assemblage du complexe d'initiation.....	36
Figure 3	Schématisation des domaines de liaison à l'ADN.....	39

CHAPITRE 2

Figure 1	Functional analysis of PER2 and PER3.....	58
Figure 2	Gel-retardation analysis of PER3 interactions.....	59
Figure 3	Characterization of the complex formed with PER3 by EMSA.....	60
Figure 4	Methylation interference (MI) analysis of PER3....	60
Figure 5	Effect of overexpression of Sp1 on a PER3-containing promoter in transfection experiments.....	61

CHAPITRE 3

Figure 1	Analyse de la structure de la chromatine du gène de la périphérine.....	68
----------	---	----

CHAPITRE 4

Figure 1	Chromatin structure analysis of the peripherin gene using a DNaseI hypersensitivity assay.....	82
Figure 2	Northern blot analysis of peripherin gene expression in NGF and IL-6-treated PC12 cells....	86
Figure 3	DNase I footprinting of intron 1 of the peripherin gene.....	88
Figure 4	Gel retardation analysis of PRi-1.2 interactions....	92
Figure 5	Southwestern analysis of the PRi-1.2 protein binding complexes.....	96

ANNEXE 1

Figure 1 Analyse fonctionnelle de l'élément PRi-1.2..... xviii

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc	:	ADN complémentaire à l'ARN messager
β -gal	:	β -galactosidase
bFGF	:	«basic <u>F</u> ibroblast <u>G</u> rowth <u>F</u> actor» : facteur de croissance fibroblastique (b)
C-terminal(e)	:	carboxy-terminal(e)
DNase I	:	endonucléase I
EGF	:	« <u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor» : facteur de croissance épidermique
EMSA	:	essais de changement de mobilité électrophorétique
FI	:	filament(s) intermédiaire(s)
GFAP	:	« <u>G</u> lial <u>F</u> ibrillary <u>A</u> cidic <u>P</u> rotein» : protéine gliale fibrillaire acide
IL-6	:	interleukine 6
kb	:	kilobase(s)
kDa	:	kilodalton(s)
LIF	:	« <u>L</u> eukemia <u>I</u> nhibitory <u>F</u> actor» : facteur d'inhibition leucémique
N-terminal(e)	:	amino-terminal(e)
NF-H	:	protéine de haut poids moléculaire des neurofilaments
NF-L	:	protéine de bas poids moléculaire des neurofilaments
NF-M	:	protéine de poids moléculaire moyen des neurofilaments
NGF	:	« <u>N</u> erve <u>G</u> rowth <u>F</u> actor» : facteur de croissance du tissu nerveux
pb	:	paire(s) de bases
Pol II	:	ARN polymérase II
SNC	:	système nerveux central
SNP	:	système nerveux périphérique
X-gal	:	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

*«Ne demande pas que ce qui arrive comme tu veux.
Mais veille que les choses arrivent comme elles
arrivent, et tu seras heureux.»*

Épictète

REMERCIEMENTS

On dit souvent que le destin fait bien les choses. Ceci a été le cas dans mon cheminement scientifique. Au tout début, la curiosité plus que l'intérêt m'a attiré à la recherche scientifique. Des circonstances particulières m'ont fait rencontrer le Dr André Royal et m'ont amené dans son laboratoire afin d'y débiter mes études graduées. Grâce à l'encadrement et au dévouement du Dr Royal, cette curiosité scientifique fut continuellement alimentée, l'intérêt pour la rigueur et pour la qualité de la recherche m'ont été inculqués et une belle passion m'a été généreusement transmise. Le Dr Royal a su me guider, m'encourager et a toujours consacré temps et patience pour me donner avis et conseils afin de mener mon projet à terme. Je tiens à remercier le Dr Royal, simplement mais avec une grande affection et une grande admiration.

Je ne peux passer sous silence mon affection particulière pour le Dr Danielle Desmarais qui me prit sous son aile et qui a contribué grandement à mon projet par sa qualité d'enseignement, sa patience, sa discipline et sa générosité. De la même façon, il me tarde de remercier le Dr Mario Fillion qui fut plus qu'un proche collaborateur, il est devenu un ami. Sa vitesse d'analyse, sa vivacité intellectuelle ainsi que sa rigueur scientifique ont éveillé mon admiration.

Je crois qu'il est impossible de s'épanouir complètement si l'environnement auquel nous appartenons ne nous est pas favorable. J'ai pu trouver dans le laboratoire tout le support moral, l'aide technique et une amitié précieuse. Pour ces raisons, je tiens à saluer et à remercier mes collègues et camarades: Line Lapointe, Carole Bélanger, le Dr Pierre Rousseau ainsi que le Dr Vahé Sarafian. La présence au département, d'amies et d'amis d'autres laboratoires ou parmi le personnel, ont fait de mes années aux études graduées un grand livre de souvenirs que je garderai précieusement. Finalement, je veux remercier affectueusement France Léveillé,

Jean-Luc Dionne, Christian Lemaire, Julie Lacaille, Philippe Pierret, Maxime Lehmann et Azra Alvi qui me sont particulièrement chers et dont la présence à permis de toujours égayer mes journées des plus beaux sourires et de discussions mémorables.

CHAPITRE 1

Introduction

1.1 INTRODUCTION

N'est-il pas fascinant de constater que le développement d'un organisme aussi complexe que l'homme se fasse à partir d'une seule cellule? Cette cellule renferme dans son génome toute l'information nécessaire à la formation des cellules spécialisées qui donnent naissance aux divers tissus qui composent un organisme. Toutefois, seule une infime partie de cette information est utilisée pour chacune des différentes étapes du développement. Ainsi, l'orchestration des processus qui convergent vers la diversification des cellules s'effectue par le biais de la transcription des gènes. De plus en plus d'évidences indiquent que l'expression génétique caractéristique d'un type cellulaire particulier dépend des facteurs de transcription présents dans la cellule en question. Le contrôle de la transcription relève de mécanismes très complexes qui découlent du fait que l'expression d'un gène peut être dictée par un grand nombre de facteurs de transcription différents. Afin de mieux comprendre les mécanismes qui régulent l'expression histospécifique des gènes, il est primordial d'identifier les facteurs de transcription qui actualisent l'information contenue dans l'ADN et les mécanismes d'action par lesquels ces facteurs conduisent à la diversité phénotypique. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés aux mécanismes qui modulent la transcription neurospécifique du gène de la périphérine. Cet attrait pour la périphérine comme modèle d'étude est sans nul doute dû à la particularité de son expression, mais aussi, au fait que l'expression du gène peut être induite en réponse à différents signaux extracellulaires. De plus, des systèmes expérimentaux bien caractérisés permettent son étude *in vitro*.

Notre étude a donc consisté à déterminer les mécanismes régissant l'expression de la périphérine, en particulier au moment de son induction en réponse à diverses molécules extracellulaires importantes pour le développement et le maintien du système nerveux. Toutefois, avant de présenter les résultats de nos

recherches, il est primordial de faire un bilan de l'état des connaissances générales concernant la périphérine et son expression tout au long du développement de même que des travaux portant sur son rôle potentiel. Finalement, l'introduction de cette thèse mettra aussi en relief le rôle des facteurs de transcription dans la régulation de l'expression des gènes, non seulement au niveau de l'initiation de la transcription mais également au niveau de l'élongation.

1.2 LA PÉRIPHÉRINE: UNE PROTÉINE MEMBRE DE LA FAMILLE DES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES

1.2.1 La famille des filaments intermédiaires

Le cytosquelette de la majorité des cellules eucaryotes est composé de trois types de filaments cytoplasmiques: les microfilaments, les microtubules et les filaments intermédiaires (FI). Les FI se distinguent des autres filaments cytoplasmiques par leur taille de même que par leur diversité. Les protéines de FI ont la caractéristique commune de s'assembler pour former un filament de 8 à 10 nm de diamètre. Contrairement à la formation de microfilaments ou de microtubules, la formation de filaments intermédiaires peut survenir *in vitro* à partir de sous-unités dénaturées sans hydrolyse de nucléotides ou d'autres co-facteurs (Steinert *et al.*, 1993). Environ une cinquantaine de protéines connues à ce jour composent cette famille. Ces protéines ont en commun un domaine central α -hélicoïdal caractéristique comportant un motif en heptade de la forme $(a-b-c-d-e-f-g)_n$ où des acides aminés apolaires occupent les positions a et d (Figure 1, page 4). Cette région, grâce à la répétition du motif en heptade, permet l'assemblage de dimères en α -hélice parallèles qui conduisent à la formation d'oligomères d'ordre supérieur.

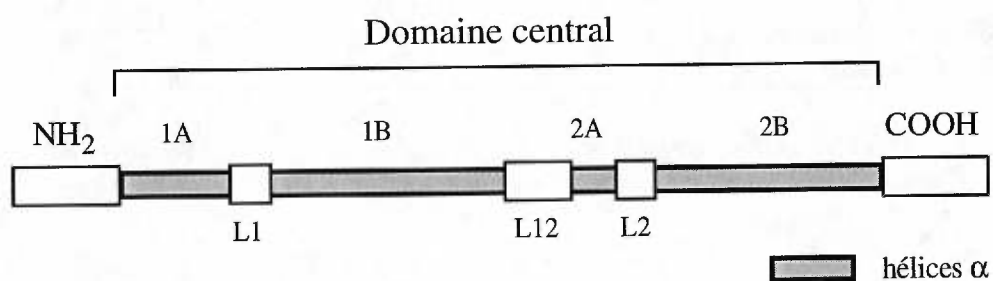


Figure 1: Structure des protéines de FI. Ces protéines contiennent un domaine central α -hélicoïdal flanqué par des domaines N- et C-terminaux. Les régions α -hélicoïdales (1A, 1B, 2A et 2B) sont séparées par de courtes séquences appelées «Linker» L1, L12 et L2.

La taille, la séquence et la structure secondaire du domaine central sont très conservées entre les différents membres. Contrairement au domaine central, les régions amino-terminale (N-terminale) et carboxy-terminale (C-terminale) varient de façon importante autant en taille qu'en structure. Le domaine N-terminal semble être essentiel pour l'assemblage et la fonction des FI (Herrmann *et al.*, 1992). Le rôle du domaine C-terminal est, quant à lui, plus énigmatique. Les progrès accomplis dans l'élucidation de la structure et de l'organisation des gènes des protéines de FI a conduit à une classification en six types principaux selon le nombre et la localisation des introns le long de leurs gènes respectifs (Tableau 1, page 8; Steinert et Roop, 1988; Robson, 1989).

À l'exception des FI de type V, groupe composé des lamines nucléaires A, B1, B2 et C, l'expression de chacun des réseaux de FI des autres types est cytoplasmique et est associée à un type cellulaire particulier: les types I et II regroupent respectivement les kératines acides et basiques qui sont exprimées dans les divers épithéliums suivant des combinaisons différentes selon la nature et le stade de différenciation cellulaire; le type III est représenté par la vimentine qui est retrouvée dans les cellules d'origine mésenchymateuses et dans la plupart des lignées cellulaires, par la desmine retrouvée dans les cellules musculaires, par la protéine gliofibrillaire acide (GFAP) dans les astrocytes et par la périphérine dans certaines populations neuronales.

Par sa complexité, le réseau de FI des neurones est particulier. Les neurofilaments forment un réseau de FI retrouvé dans la majorité des neurones et représentent le principal membre du type IV (Steinert et Roop, 1988). Chez les mammifères, les neurofilaments sont formés par l'étroite association de trois protéines, une de faible masse moléculaire (NF-L), une de masse moléculaire moyenne (NF-M) et une de masse moléculaire élevée (NF-H). La formation des neurofilaments dépend de la présence de NF-L et elle constitue l'armature du

neurofilament. L'expression de NF-L et de NF-M est un signe de différenciation neuronale; elle accompagne la croissance axonale et confère aux axones une certaine rigidité. À la fin du développement, la protéine NF-H s'ajoute au réseau de neurofilaments pour y jouer un rôle pour le maintien du calibre axonal (Portier *et al.*, 1993). Les neurofilaments seront discutées plus amplement aux sections 1.2.2 (voir page 9), 1.2.3 (voir page 11) et 1.2.4 (voir page 16).

Outre le triplet de neurofilaments, plusieurs autres protéines de la familles des FI sont aussi retrouvées selon les différentes sous-populations neuronales (Tableau I, page 8; Liem, 1993). Ainsi, on retrouve la nestine (type VI) dans les cellules souches du neuroépithélium (Lendahl, 1990), l' α -internexine (type IV) dans certains neurones du système nerveux central (SNC) (Kaplan, 1990) et la périphérine dans le système nerveux périphérique (SNP) et quelques neurones du SNC (Greene, 1989).

Récemment, un grand nombre de nouvelles protéines de FI ont été identifiées chez les mammifères, les amphibiens ainsi que chez les vertébrés inférieurs. Parmi celles-ci, on retrouve 1) la tanabine dont l'expression peut être retrouvée, entre autres, dans le cône de croissance des neurones chez le poisson rouge (Hemmati-Brivanlou, 1992); 2) la protéine XNIF exprimée dans les neurones sensoriels des ganglions périphériques chez *Xenopus* (Charnas *et al.*, 1992); 3) la xefiltine (Zhao et Szaro, 1997), la plasticine et la gefiltine (Glasgow, 1992; Glasgow, 1994; Asch *et al.*, 1998) qui sont exprimées dans les cellules ganglionnaires de la rétine et dans le nerf optique également chez *Xenopus*; 4) la transitine exprimée dans les cellules de la glie radiale (Yuan *et al.*, 1997); 5) la synemine dont l'expression est retrouvée dans les muscles lisses chez le porc et le poulet (Bilak *et al.*, 1998); 6) enfin, deux protéines ressemblant aux protéines des FI pourraient former un groupe distinct: il s'agit de la filensine (Masaki et Watanabe, 1991; Gounari *et al.*, 1993, Masaki et Quinlan, 1997) et de la phakinine (Merdes *et al.*, 1993) qui sont retrouvées

uniquement dans le cristallin. Les séquences de la filensine et de la phakinine se distinguent des autres FI par l'absence d'un domaine de 29 acides aminés. Toutefois, la position des introns du gène de la filensine, telle que fournie par la séquence des ADNc du gène du rat et de la souris, la rapproche aux protéines de FI membres du type III (Masaki et Quinlan, 1997). Par contre, la filensin et la phakinine s'assemblent pour former un réseau particulier de filaments différent de celui des autres filaments de type III et dont l'apparence est nodulaire (Georgato *et al.*, 1997). Finalement, des homologues des protéines de FI de type I, II et III ont aussi été retrouvées chez le métazoaire céphalochordé Branchiostoma (Karabinos *et al.*, 1998).

Tableau I.

Distribution des différents types de protéines des filaments intermédiaires

Type	Nom	Aire d'expression
I	Kératines acides (~20 protéines)	Épithélium
II	Kératines basiques (~20 protéines)	Épithélium
III	Desmine	Muscle
	Vimentine	Mésenchyme
	GFAP	Astrocytes, cellules gliales
	Périphérine	Neurones du SNP, quelques neurones du SNC
IV	Neurofilaments (NF-L, NF-M, NF-H)	Neurones du SNC et SNP
	α -internexine	Neurones du SNC
V	Lamines nucléaires (A, B1, B2, C)	Enveloppe nucléaire
VI	Nestine	Cellules neuroépithéliales souches
Autres protéines des filaments intermédiaires		
	Tanabine	Cône de croissance des neurones
	Plasticine	Cellules ganglionnaires de la rétine et nerf optique
	Gefiltine	Cellules ganglionnaires de la rétine et nerf optique
	filensine	crystallin
	phakinine	crystallin
	XNIF	Cellules ganglionnaires de la rétine et nerf optique
	Xefiltine	Cellules ganglionnaires de la rétine et nerf optique
	Transitine	Cellules de la glie radiale
	Synemine	muscle lisse

1.2.2 Le réseau de filaments intermédiaires: structure dynamique

Le réseau formé par les lamines est l'organisation de FI la mieux caractérisée. Les fibres de lamines sont associées à la surface interne de l'enveloppe nucléaire où elles forment, dans la plupart des cellules, un réseau plutôt diffus appelé lamina nucléaire. Il y a toutefois une exception frappante dans les oocytes de *Xenopus* où les filaments de lamine sont disposés de façon à former un réseau orthogonal (Aebi *et al.*, 1986). Dans la majorité des cellules, pendant l'interphase, le noyau et la lamina nucléaire gagnent en taille et les lamines nouvellement synthétisées entrent dans le noyau pour s'incorporer, de façon plus ou moins uniforme, à la lamina. Lorsque la cellule entre en phase M du cycle cellulaire, la lamina nucléaire subit une dépolymérisation contrôlée qui fait intervenir la phosphorylation des lamines par la kinase cycline-dépendante p34^{cdc2} (Heald et McKeon, 1990). À la sortie de la phase M, le processus de désassemblage est renversé et une nouvelle lamina nucléaire est mise en place. Dans certaines cellules, d'autres FI subissent une réorganisation durant la phase M mais rarement aussi importante que celle des lamines nucléaires. Le déclenchement de la phase M de la plupart des cellules somatiques est associé à une augmentation du niveau de phosphorylation des protéines de FI (Bravo *et al.*, 1982), phénomène potentiellement associé à plusieurs fonctions des protéines de FI (discuté à la section 1.2.4, page 16). Typiquement, les réseaux de FI se désassemblent et forment une cage qui entoure le fuseau mitotique. Ce phénomène d'écroulement du réseau de FI est particulièrement dramatique pendant la maturation de l'oocyte chez *Xenopus* (Klymkowsky *et al.*, 1991). Dans cet oocyte en prophase, on retrouve trois kératines organisées en un réseau cortical. Au cours de la maturation de l'oocyte, le réseau de kératines se désassemble complètement en oligomères solubles. La

réorganisation du réseau est initiée par l'activité du facteur de maturation (MPF) et semble mettre en cause la phosphorylation des kératines.

L'axone en croissance nécessite une réorganisation constante des microfilaments, des FI et des microtubules. Un contrôle de la synthèse et du transport axonal des protéines du cytosquelette permet de maintenir l'intégrité de l'axone. Cet aiguillage de la synthèse et du transport axonal des FI est particulièrement évident suite à une lésion d'un neurone par axotomie. Le neurone lésé répond par une augmentation de la synthèse et du transport axonal de la tubuline afin de répondre à l'exigence en microtubules de l'axone en régénérescence (Oblinger et Lasek, 1988). De façon similaire, la synthèse de la périphérine (Oblinger *et al.*, 1989; Wong et Oblinger, 1990; Troy *et al.*, 1990) ainsi que son transport axonal (Chadan *et al.*, 1994) augmentent dans l'axone en régénérescence. Contrairement à la périphérine, la synthèse et le transport axonal des neurofilaments diminue suite à l'axotomie (Oblinger *et al.*, 1989; Wong et Oblinger, 1990; Troy *et al.*, 1990; Chadan *et al.*, 1994). Dans les neurones, le réseau de FI subit donc une réorganisation continue, le réseau croît au cours du développement et peut décroître, dans le cas des neurofilaments, après axotomie, lorsque le neurone dégénère (Hoffman *et al.*, 1985).

Au cours du développement et de la différenciation cellulaire, l'échafaudage du réseau de FI semble s'effectuer via un processus dynamique par lequel certaines composantes du réseau sont échangées avec de nouvelles sous-unités (Steinert *et al.*, 1993). La réorganisation du réseau de FI apparaît donc comme un processus essentiel pour le maintien de la fonction et de l'intégrité du cytosquelette de la cellule. Par conséquent, des altérations dans l'expression des protéines de FI ou un défaut dans l'organisation du réseau de FI peuvent avoir des conséquences cruciales non seulement pour le développement et la différenciation, mais peuvent aussi mener

à des pathologies. Ces observations ont entraîné une nouvelle approche dans les stratégies expérimentales pour l'étude du rôle des FI.

1.2.3 Fonctions du réseau de filaments intermédiaires

Malgré le fait qu'ils soient d'importants constituants du cytosquelette et de la matrice nucléaire, le rôle précis des sous-unités des FI est encore mal compris. Il est maintenant admis que des indices importants des rôles physiologiques de ces protéines résideraient dans leurs profils d'expression développementale et histospécifique de même que dans leur organisation cellulaire. Ainsi, l'expression spécifique des FI serait un aspect fondamental de la différenciation cellulaire. Ceci se reflète par l'observation que durant le développement, le profil d'expression des protéines de FI varie et se complexifie selon le stade de différenciation et le type cellulaire. Par exemple, chez le jeune embryon, les premières protéines de FI à être exprimées sont les kératines (Paulin *et al.*, 1980; Santini *et al.*, 1993). Par la suite, lorsque la différenciation cellulaire progresse, certaines cellules cessent d'exprimer ces kératines et commencent à exprimer d'autres protéines de FI. Dans les cellules non-épithéliales, par exemple dans les myoblastes, l'expression de la vimentine est la première à apparaître suite à la répression des kératines. Au cours de la neurulation, les cellules précurseurs du SNC et du SNP deviennent positives pour la nestine et/ou la vimentine. Ces deux protéines sont ultérieurement remplacées par les FI typiques des cellules neuronales différenciées qui en descendront (Cochard, 1984; Lendahl, 1990). C'est ainsi que les neurones co-exprimeront le triplet de neurofilaments et l' α -internexine ou la périphérine. Dans les astrocytes et les cellules de Schwann, on verra apparaître la GFAP tandis que les oligodendrocytes n'exprimeront plus aucun FI et ce, après avoir initialement exprimé la vimentine

(van de Klundert *et al.*, 1993). Cette alternance d'inductions et d'extinctions de l'expression de ces protéines au cours de l'ontogénèse suggère que chaque type de FI aurait un rôle différent dans la cellule, qui plus est, spécifique au stade de développement.

Des études récentes de souris dans lesquelles certains gènes des FI ont été inactivés, ont permis d'augmenter nos connaissances du rôle potentiel des réseaux de FI. Par exemple, des souris déficientes en vimentine ou en GFAP ne montrent pas de phénotype apparent (Colucci-Guyon *et al.*, 1994; Gomi *et al.*, 1995; Pekny *et al.*, 1995). Toutefois, des analyses plus approfondies ont révélé que la GFAP pourrait jouer un rôle dans le processus de formation d'extensions des astrocytes (Weinstein *et al.*, 1991) confirmant une des fonctions histospécifiques de cette protéine.

De la même façon, des souris transgéniques dans lesquelles le réseau de kératines est perturbé par la surexpression d'un gène de la kératine 14 (K14) mutant dominant-négatif montrent une fragilisation du tissu épidermique (Vassar *et al.*, 1991). Ce rôle de barrière mécanique du réseau de kératines est particulièrement évident chez des patients atteints d'épidermolyse bulleuse simple (EBS) chez qui une dysfonction du réseau de kératines se traduit, suite à un stress mineur, par une lyse des kératinocytes de la couche basale de la peau. Chez les patients atteints d'EBS, plusieurs mutations dans les gènes K14 et K5 ont été décrites (pour une revue, Fuchs, 1995). De plus, des souris transgéniques possédant des mutations du gène de la K10 (Fuchs *et al.*, 1992), présentent une perturbation du réseau des kératines produisant un phénotype semblable à celui de patients atteints d'hyperkératose épidermolytique. Cette atteinte se traduit par une cytolysse des cellules de la couche suprabasale de la peau (Anton-Lamprecht, 1983). Finalement, un désordre du réseau des kératines a également été décrit lorsque les gènes de la K9 (Reis *et al.*,

1994) ou des K16 et K17 (McLean *et al.*, 1995) ont été mutés. De façon similaire aux kératines, la desmine pourrait à la fois représenter un élément de structure mécanique dans les cellules musculaires (Goebel et Bornemann, 1993) mais aussi, elle pourrait contribuer au processus de la différenciation myogénique (Li *et al.*, 1994).

Le problème de la fonction des neurofilaments a été abordé récemment en étudiant les effets de leur surexpression ou de leur délétion à l'aide de modèles animaux. L'importance des neurofilaments pour la spécification du calibre axonal a été initialement démontré par l'analyse d'un mutant récessif (*quv*) de la caille tremblante du Japon. Chez ces derniers animaux, le réseau de neurofilaments est absent par manque de la protéine NF-L et sans NF-L, les protéines NF-M et NF-H ne peuvent former de filaments. N'ayant pas de réseau de neurofilaments, les axones de ces animaux présentent un diamètre réduit (Ohara *et al.*, 1993). De façon similaire, l'absence de la protéine NF-M produit une diminution importante du nombre de neurofilaments ainsi qu'une diminution de la croissance radiale de l'axone (Elder *et al.*, 1998). Par contre, dans des souris transgéniques dans lesquelles on surexprime NF-L et NF-H ou NF-L et NF-M, on remarque une augmentation du calibre axonal (Xu *et al.*, 1996). Il semble toutefois que la détermination du calibre axonal n'est pas simplement fonction du nombre de neurofilaments présents. La surexpression de NF-L se traduit par une augmentation du nombre de neurofilaments mais avec comme conséquence une légère diminution du diamètre axonal (Xu *et al.*, 1993). De plus, la surexpression de la protéine NF-L (Xu *et al.*, 1993) ou NF-H (Côté *et al.*, 1993) a pour conséquence des symptômes semblables à ceux décrits pour la sclérose latérale amyotrophique (ALS). Chez les patients atteints de cette neuropathologie, où on observe une dégénérescence axonale,

la surexpression des protéines de neurofilaments conduit à l'accumulation de neurofilaments dans le cytoplasme périnucléaire et perturbe le transport axonal.

Plusieurs évidences suggèrent que les niveaux de phosphorylation des neurofilaments (la phosphorylation des neurofilaments sera discutée plus amplement à la section 1.2.4, page 16) ainsi que les interactions interfilaments sont des déterminants importants pour la spécification du calibre axonal. Par exemple, la dystonine, isoforme neuronal de BPAG1, est localisée principalement dans les ganglions de la racine dorsale (Brown *et al.*, 1995) et elle sert de pont entre les neurofilaments et les microfilaments d'actine (Yang *et al.*, 1996). La dystonine semble jouer un rôle essentiel pour le maintien de l'organisation structurale de l'axone. La délétion du gène semble être impliquée dans une neuropathie (Dystonia musculorum) qui affecte, entre autres, le cytosquelette des cellules de Schwann par la désorganisation du réseau de neurofilaments (Bernier et Kothary, 1998; Bernier *et al.*, 1998; Dalpe *et al.*, 1998).

En conclusion, les protéines des neurofilaments semblent également jouer un rôle structural important pour le maintien du calibre axonal et, par conséquent, de la fonction axonale. Cette fonction des neurofilaments ne reste pas moins associée de très près aux autres filaments du cytosquelette et des protéines les reliant.

Outre un rôle structural, il semble de plus en plus évident que les protéines de FI interviennent au niveau de diverses fonctions cellulaires. Suite à la découverte de récepteurs transmembranaires reliés aux réseaux de FI, en particulier les intégrines, il semble que les FI pourraient jouer un rôle comme transducteurs de signal, relayant l'information de la matrice extracellulaire au noyau (Klymkowsky et Parr, 1995). Spécifiquement, des interactions entre la fibronectine retrouvée à la membrane cellulaire et la vimentine ont été rapportées (Green et Goldman, 1986). Certaines hypothèses récentes vont même jusqu'à attribuer aux FI une fonction de

La phosphorylation des neurofilaments, particulièrement NF-M et NF-H, est impliquée dans la modulation de l'espacement interfilaments et par conséquent contribue à la régulation du calibre axonal. Deux kinases, la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique, PKA, et de la protéine kinase C (Hisanga *et al.*, 1990; Nakamura *et al.*, 1990) peuvent phosphoryler les neurofilaments dans la région C-terminale de la protéine. L'assemblage particulier de NF-M et NF-H autour de NF-L fait en sorte que les domaines C-terminaux de NF-M et NF-H forment des projections qui sortent du neurofilament. En plus de son rôle pour le maintien du calibre axonal, la phosphorylation de NF-M et NF-H détermine le taux de transport des neurofilaments dans l'axone (Nixon *et al.*, 1987). Contrairement à la phosphorylation des domaines C-terminaux de NF-M et NF-H, la phosphorylation du domaine N-terminal de NF-L induit le désassemblage des neurofilaments. De façon similaire à NF-L, la phosphorylation du domaine N-terminal de la périphérine et de l' α -internexine résulte aussi avec la fragmentation des FI (Giasson et Mushynski, 1998).

La phosphorylation des protéines de FI est associée à plusieurs fonctions des protéines: la réorganisation des filaments (Gonda *et al.*, 1990), la solubilité des filaments (Chou *et al.*, 1993), la localisation cellulaire des protéines de FI (Sternberger et Sternberger, 1983), la régulation de l'association avec des protéines cytoplasmiques et nucléaires (Liao et Omary, 1996), la protection contre des stress physiologiques (Liao *et al.*, 1995) et la spécification des fonctions histospécifiques (Nixon *et al.*, 1994). L'hypothèse généralement retenue est que cet éventail de fonctions semble être attribuable aux différents sites de phosphorylation à l'intérieur des domaines N-terminal et C-terminal. Ainsi, la phosphorylation à des sites uniques pour une protéine de FI particulière pourrait servir une fonction spécifique, fonction liée à l'aspect histospécifique de l'expression de cette protéine. La phosphorylation de sites conservés parmi plusieurs protéines de FI entrerait en jeu

pour une fonction commune à ces diverses protéines. L'étude des composantes des voies de transduction menant à la phosphorylation des protéines de FI est primordiale pour mieux définir le rôle de ces modifications post-traductionnelles notamment lors du développement de pathologies associées à une désorganisation du réseau de FI.

1.2.5 La périphérine: caractéristiques et propriétés structurales

Jusqu'à 1984, les seules protéines de FI décrites dans les neurones étaient les protéines des neurofilaments. La périphérine, une protéine d'environ 57 kDa a été observée pour la première fois dans une lignée de neuroblastome de souris (Portier *et al.*, 1982). Il a fallu toutefois attendre 1989 pour que les travaux de Thompson et Ziff permettent l'isolation du gène de la périphérine du rat. Plusieurs chercheurs ont par la suite cloné les ADNc spécifiques chez la souris (Landon *et al.*, 1989; Karpov *et al.*, 1992) et chez *Xenopus laevis* (Sharpe *et al.*, 1989) et ont confirmé que la périphérine appartenait à la famille des protéines de FI de type III.

La structure primaire du gène de la périphérine se compose de 9 exons séparés par 8 introns dont la structure coïncide avec celle des gènes des autres FI de type III. La périphérine est phosphorylée non seulement dans sa portion N-terminale comme les protéines de FI de type III (Huc *et al.*, 1989) mais aussi dans sa portion C-terminale (Angelastro *et al.*, 1998). Trois isoformes phosphorylées de la périphérine ont déjà été décrites (Aletta *et al.*, 1989). De plus, le clonage de l'ADNc du gène de souris a révélé l'existence de trois ARN messagers (ARNm) différents d'environ 2 kb, résultant d'un épissage alternatif du transcrit unique du gène de la périphérine (Landon *et al.*, 1989). Des formes mineures correspondant à des transcrits de 2 et de 3.2 kb ont été détectées dans le cerveau et la moelle épinière

chez le rat (Parysek, 1988). La différence de taille entre ces derniers transcrits pourrait découler de l'utilisation de deux sites de terminaison différents. Il est aussi possible que le messager de 3.2 kb corresponde à une forme précurseur ou à un ARNm homologue à celui de la périphérine détecté par la sonde utilisée dans cette étude. Ainsi, plusieurs isoformes de la périphérine proviennent à la fois de modifications post-traductionnelles et de la traduction des différents ARN messagers. Cependant, la participation des différentes isoformes au réseau de la périphérine n'est pas encore connue.

Le gène murin de la périphérine a été localisé sur le chromosome 15 dans la région [15E-15F] (Pendleton *et al.*, 1991; Moncla *et al.*, 1992) et l'homologue humain sur le chromosome 12 [12q12-12q13] (Moncla *et al.*, 1992). Les régions où ces gènes ont été localisés sont connues comme étant des segments chromosomiques homologues contenant d'autres gènes de FI (kératines).

1.2.6 L'aire d'expression de la périphérine dans le système nerveux

La périphérine, comme pour la majorité des protéines de FI, a un profil d'expression restreint. Ainsi, on retrouve l'expression de la périphérine limitée aux neurones, plus particulièrement, à la majorité des neurones du SNP et à quelques neurones du SNC. Elle est retrouvée dans la plupart des neurones dérivés de la crête neurale et dans certains neurones dérivés des placodes (Tableau II, page 21). On retrouve son expression dans les neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle épinière, dans les noyaux moteurs des nerfs crâniens de même que dans quelques autres noyaux du SNC. Toutefois, la périphérine n'est pas exprimée dans

le cerveau antérieur (Tableau II, page 21; Portier *et al.*, 1984a; Leonard, 1988; Parysek et Goldman, 1988; Brody, 1989).

Au cours du développement, l'expression de la périphérine est initialement visualisée au stade E12 (34 somites); son expression est alors co-localisée avec celle de la protéine NF-L à la fois dans les neurones moteurs et dans les ganglions de la racine dorsale (DRG) les plus antérieurs (Escurat *et al.*, 1990; Gorham *et al.*, 1990; Troy *et al.*, 1990). L'expression de la périphérine est contemporaine de la croissance des axones des neurones dans lesquels elle est présente. Dans le SNP, on retrouve l'expression à la fois de la périphérine et de la protéine NF-L. Dans le SNC, l'expression de la périphérine reste toutefois confinée aux neurones moteurs et pré-ganglionnaires, où elle est aussi co-localisée avec la protéine NF-L, alors que l'expression de la protéine NF-L envahit progressivement tout le SNC, moelle épinière et cerveau. L'expression de la périphérine, de façon similaire à celle de la protéine NF-L, apparaît selon un gradient dans les neurones moteurs, les neurones sensoriels des DRG et les neurones des ganglions sympathiques. Ce gradient débute dans le mésencéphale au niveau des noyaux les plus antérieurs des nerfs moteurs crâniens et, après quelques jours, il atteint la partie la plus postérieure du tronc (Escurat *et al.*, 1990; Troy *et al.*, 1990). Bien que chaque neurone dans les DRG embryonnaires co-expriment la périphérine et la protéine NF-L, les niveaux d'expression de ces protéines varient selon la taille des neurones autant dans les DRG post-nataux qu'adultes: on retrouve une forte expression de la périphérine dans les neurones de petite taille alors que les neurones de grande taille expriment seulement faiblement la périphérine; les niveaux d'expression de la NF-L sont inversés comparativement à la périphérine, les neurones de petite taille expriment faiblement la NF-L tandis que ceux de grande taille l'expriment fortement (Escurat *et al.*, 1990).

Tableau II

Profil d'expression de la péricérine

Origine	Type de cellules
Tube neural	<p>Neurones moteurs</p> <ul style="list-style-type: none"> • nerfs crâniens • neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle épinière <p>Neurones sensoriels</p> <ul style="list-style-type: none"> • cellules ganglionnaires de la rétine • nerfs optiques
Crête neurale	<p>Neurones sensoriels</p> <ul style="list-style-type: none"> • ganglions de la racine dorsale (ganglions spinaux) • nerfs crâniens <p>Neurones du système nerveux autonome</p> <ul style="list-style-type: none"> • ganglions sympathiques • ganglions parasympathiques • ganglions entériques
Placodes	<p>Neurones sensoriels</p> <ul style="list-style-type: none"> • neurones olfactifs • ganglions acoustiques

Une caractéristique intéressante de l'expression de la périphérine concerne son expression dans les neurones sensoriels qui ne sont pas dérivés de la crête neurale, tels que les cellules ganglionnaires de la rétine provenant du tube neural, les neurones des ganglions acoustiques et les neurones olfactifs d'origine placodale. Dans le nerf optique, les cellules ganglionnaires sont les seules dont les axones sont entourés d'un environnement glial de type central. Cependant, la mise en place de l'expression de la périphérine a lieu durant le développement lorsque les cellules gliales du SNC ne sont pas encore différenciées. De plus, le nerf optique des mammifères est le seul qui ne peut pas régénérer, sauf quand un segment du nerf périphérique est greffé à proximité du globe oculaire (So et Aguayo, 1985). Bien que les neurones des ganglions acoustiques expriment à la fois la périphérine et la protéine NF-L, les neurones olfactifs qui sont les seuls à pouvoir se renouveler constamment (Graziadei et Graziadei, 1979), expriment la périphérine (Escurat *et al.*, 1990), et probablement la vimentine (Schwob *et al.*, 1986). Ces observations suggèrent dans un premier temps que la régulation de l'expression du gène de la périphérine puisse être contrôlée par l'environnement. Dans un deuxième temps, les neurones dans lesquels on retrouve la périphérine ont en commun que leurs axones ont à circuler à l'extérieur du SNC pour la plus grande partie de leur trajet, et qu'ainsi, durant le développement, ils ont à trouver leur voie dans un environnement non neuronal, probablement en réponse à des signaux provenant de leurs cibles respectives. Finalement, au cours du développement embryonnaire, l'expression de la périphérine semble être étroitement associée à la différenciation neuronale.

1.2.7 La fonction de la périphérine

Il a été suggéré que le rôle de la périphérine soit structural, pour le maintien du calibre axonal comme pour les neurofilaments, mais aussi pour la régénération axonale. En fait, peu d'études montrent clairement le rôle de la périphérine car les approches utilisées sont indirectes. Par exemple, Djabali et collaborateurs ont démontré une interaction entre la périphérine et la lamine B via le domaine C-terminal de la périphérine (Djabali *et al.*, 1991). La même étude a montré que le domaine N-terminal de la périphérine interagit avec l'ankyrine permettant la liaison de la périphérine à la membrane plasmique (Djabali *et al.*, 1991). Le fait que la périphérine relie la membrane plasmique au noyau pourrait l'associer dans une voie de transduction de signal intracellulaire. Cette hypothèse cadre avec le rôle possible de la périphérine pour la guidance axonale lors du développement et lors de la régénération axonale. Ces deux processus dépendent, entre autres, de l'émission de molécules chémoattractantes par les cellules cibles (pour une revue, Aguayo *et al.*, 1991; Tessier-Lavigne, 1994; Colamarino et Tessier-Lavigne, 1995). Ces molécules captées par le neurone entraîneraient une cascade intracellulaire qui emmènerait le signal au noyau, cette cascade pourrait faire intervenir la périphérine.

Le rôle de la périphérine a également été étudié en regardant l'expression du gène dans les neurones de DRG et les neurones moteurs après axotomisation (Oblinger *et al.*, 1989; Troy *et al.*, 1990). On a ainsi démontré une augmentation des niveaux d'ARNm de la périphérine peu après l'axotomie, et un retour à la normale lorsque la régénération était terminée. Contrairement à la périphérine, l'expression des gènes des neurofilaments était diminuée en réponse à l'axotomie.

Finalement, des expériences ont été réalisées avec les cellules PC12 dans lesquelles des oligonucléotides antisens ont été utilisés pour inhiber la transcription de la périphérine (Troy *et al.*, 1992). Dans ces cellules, la synthèse de la périphérine

était bloquée même en présence de NGF mais sans toutefois affecter la formation des neurites. Les résultats étaient différents lorsque des oligonucléotides antisens étaient ajoutés à des cultures primaires de neurones de DRG embryonnaires. Quand les oligonucléotides antisens étaient ajoutés avant que les neurones commencent à émettre des extensions neuritiques, aucune extension n'apparaissait. Par contre, si les oligonucléotides antisens étaient ajoutés aux neurones ayant déjà émis de longues extensions, le réseau de périphérine était alors détruit mais les neurites n'étaient pas affectées. Ces observations appuyent l'hypothèse qui fait intervenir la périphérine au cours de la régénération axonale. La périphérine pourrait intervenir, au même titre que les neurofilaments, dans le maintien du calibre axonal assurant ainsi une vitesse adéquate au transport axonal et une stabilité de l'axone lors de l'axogénèse (Hoffman *et al.*, 1984; Hoffman *et al.*, 1987). L'observation de FI formés d'hétéropolymères de périphérine et de NF-L ou NF-H vient appuyer cette hypothèse (Parysek *et al.*, 1991).

Malgré ces efforts, le rôle précis de la périphérine demeure hypothétique. Plusieurs évidences font intervenir la périphérine lors de la régénération axonale. Pour clarifier le rôle de la périphérine, il est essentiel d'étudier l'effet de la déplétion du gène dans des modèles animaux. De tels modèles pourraient être générés en bloquant l'expression de la périphérine en utilisant, par exemple, le système de recombinaison homologue Cre/loxP du phage P1 (Sauer et Henderson, 1988; Tsien *et al.*, 1996). Ce système permet, par recombinaison homologue d'inhiber l'expression d'un gène et ce, de façon histospécifique et de manière inducible. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'effet de la déplétion de la périphérine à différents stades du développement à la fois pour l'axogénèse et pour la régénération axonale suite à la blessure d'un neurone.

1.3 EXPRESSION DE LA PÉRIPHÉRINE AU COURS DE LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE

En analysant des coupes d'embryon de rat, l'expression de la périphérine a aussi pu être détectée dans la médullo-surrénale et dans le pancréas (Escurat *et al.*, 1991). D'autres auteurs ont décrit une expression de la périphérine *in vivo*, dans les cellules chromaffines de l'adulte (Parysek et Goldman, 1988). Ces observations restent toutefois controversées puisque Leonard et coll.(1988) ainsi que Troy et coll. (1990) n'ont pu détecter une telle expression. Cependant, dans des cultures primaires de cellules chromaffines de jeunes souris adultes, une petite sous-population (environ 1% des cellules) représentée essentiellement par des cellules avec des extensions ressemblant à des neurites exprime la périphérine (Troy *et al.*, 1990). Quand des cellules chromaffines, isolées de souris âgées de quelques jours, sont mises en culture, 35% d'entre elles expriment la périphérine (Derer *et al.*, 1989) démontrant que ces cellules conservent la possibilité de retourner vers le phénotype neuronal (Aloe et Levi-Montalcini, 1979). La relation développementale entre les cellules chromaffines et les neurones sympathiques est suggérée par l'observation que la transplantation de tissu médullaire surrénalien post-natal dans la chambre antérieure de l'oeil provoque la croissance de prolongements neuritiques (Olson, 1970). Unsicker et coll. ont subséquemment démontré que la croissance de neurites peut être induite *in vitro* en traitant des cellules chromaffines post-natales par le NGF (Unsicker *et al.*, 1978). Cette induction pouvait être bloquée par traitement aux glucocorticoïdes qui ramenaient et maintenaient le phénotype endocrinien. Cette plasticité semble provenir du fait que les cellules chromaffines et les neurones sympathiques ont pour origine cellulaire un précurseur embryonnaire commun, le précurseur sympathosurrénalien (Doupe *et al.*, 1985). Ce précurseur a pour origine des cellules de la crête neurale qui migrent ventralement de l'apex du tube neural

vers l'aorte dorsale où elles s'agrègent et se différencient pour former les neurones sympathiques, ou vers la glande surrénale où elles se différencient pour former les cellules chromaffines (pour revue, Anderson, 1993). L'environnement que rencontrent ces cellules soit durant leur migration, soit lorsqu'elles atteignent leur destination ultime semble un déterminant important de leur devenir cellulaire. *In vitro*, ce précurseur bipotentiel peut se différencier soit en neurones sympathiques sous l'influence du NGF, soit en cellules chromaffines sous l'influence des glucocorticoïdes (Anderson et Axel, 1986; Anderson, 1991; Carnahan et Patterson, 1991; Michelsohn et Anderson, 1992).

1.3.1 Le facteur de croissance du tissu nerveux (NGF)

Dans le système nerveux embryonnaire et adulte, les neurotrophines et les facteurs de croissance régulent précisément le déclenchement et le maintien de la différenciation neuronale, de la prolifération cellulaire et de la survie des neurones. Le NGF est la première molécule neurotrophique à avoir été identifiée et c'est, par conséquent, la plus étudiée et la mieux caractérisée. Le NGF a été découvert par Hamburger et Levi-Montalcini dans les années 1940 en étudiant les effets d'un sarcome de souris sur la croissance d'axones périphériques. Le NGF est constitué de trois sous-unités, α , β et γ , et son expression est principalement retrouvée dans les neurones du SNC. Dans le cerveau, l'expression du NGF est retrouvée dans les régions innervées par les neurones cholinergiques de l'hippocampe, du bulbe olfactif et du neocortex et dans les régions contenant les corps cellulaires de ces neurones (pour une revue, Connor et Dragunow, 1998). La synthèse et la sécrétion du NGF sont aussi retrouvées au niveau des cellules post-synaptiques telles les

fibres des muscles lisses dans les tissus effecteurs (pour une revue, Rush *et al.*, 1997).

Au cours du développement, le NGF est nécessaire à la différenciation, au maintien et à la survie des neurones sympathiques et sensoriels de même que des neurones cholinergiques (Levi-Montalcini, 1987). Le NGF produit par les cellules cibles semble être également impliqué dans le contrôle du programme de croissance axonale et de mort cellulaire que subissent les neurones en développement (pour une revue, Paves et Saarma, 1997). Il semble aussi qu'un gradient de NGF soit requis pour l'établissement du patron d'innervation et de la densité des contacts synaptiques au niveau des tissus cible (pour une revue, Ebadi *et al.*, 1997). Le rôle du NGF pour la survie de plusieurs neurones sympathiques se prolonge chez l'adulte. Au stade adulte, le NGF ne joue plus un rôle pour la survie des neurones sensoriels mais est toutefois important pour la plasticité de ces neurones (pour une revue, Frade et Barde, 1998).

Les neurones ne sont pas les uniques cibles du NGF. Certaines cellules du système immunitaire semblent aussi répondre au NGF (pour une revue, Levi-Montalcini *et al.*, 1996). Le NGF influence la prolifération des lymphocytes B et T, stimule la production d'immunoglobulines, induit la croissance et la différenciation de certaines cellules hématopoïétiques et a un effet chemotactique sur les neutrophiles (Levi-Montalcini *et al.*, 1996). De plus, conjointement aux cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α et INF- γ , le NGF est produit aux sites d'injure cellulaire où il est un médiateur important pour l'équilibre homéostasique du tissu environnant (Levi-Montalcini *et al.*, 1996). Finalement, le NGF apparaît également comme un régulateur de certaines populations neuronales et non-neuronales impliquées dans certaines fonctions neuro-endocrines (Levi-Montalcini *et al.*, 1996).

Deux récepteurs membranaires pour le NGF ont été identifiés. Il s'agit de la protéine p75^{NGFR}, qui est un récepteur de basse affinité et qui lie indifféremment

plusieurs neurotrophines (Chao *et al.*, 1986; Johnson *et al.*, 1986; Radeke *et al.*, 1987), et du produit du proto-oncogène *trk*, la p140^{prototr_k} (Klein *et al.*, 1991; Kaplan *et al.*, 1991a). Contrairement à p140^{prototr_k}, le domaine cytoplasmique du récepteur p75^{NGFR} est dépourvu de séquence catalytique. La liaison du NGF au récepteur p140^{prototr_k} produit une dimérisation du récepteur qui stimule une activité tyrosine kinase intrinsèque (Kaplan, 1991b). L'autophosphorylation des Trk initie une cascade intracellulaire de phosphorylation de plusieurs protéines propageant le signal à d'autres messagers qui, ultimement, provoquent l'activation transcriptionnelle de gènes qui contrôlent la croissance, la migration, la morphologie et la survie des neurones (Kaplan et Stephens, 1994). La réponse au NGF conduit à l'activation de trois classes de gènes: les gènes dits «précoces immédiats», les gènes «précoces tardifs» et les «gènes tardifs». L'activation transcriptionnelle des «gènes précoces immédiats» est indépendante de la synthèse protéique, contrairement à celle des gènes «précoces tardifs» qui survient une à deux heures après le début du traitement au NGF. Ce n'est que plusieurs heures, voire plusieurs jours après le début du traitement au NGF, que les «gènes tardifs» seront activés, activation qui coïncide avec l'acquisition du phénotype neuronal. Contrairement aux premiers gènes cibles de la réponse au NGF, peu de «gènes tardifs» ont été identifiés et les étapes conduisant à leur activation sont encore obscures.

1.3.2 Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes régulent l'expression de plusieurs gènes en s'associant avec un récepteur nucléaire qui module leur transcription par sa liaison à une séquence d'ADN spécifique, généralement retrouvée dans les promoteurs des gènes (Evans, 1988; Beato, 1989). Le récepteur des glucocorticoïdes est un facteur de

transcription qui peut stimuler ou réprimer l'activité transcriptionnelle des gènes (Chandler *et al.*, 1983; Drouin *et al.*, 1989).

La migration du précurseur sympathosurrénalien vers la glande surrénale l'emmène vers un environnement riche en glucocorticoïdes, des hormones synthétisées par le cortex surrénalien. La voie de différenciation du précurseur vers le phénotype endocrinien est dictée par les glucocorticoïdes qui agissent à deux niveaux. Premièrement, les glucocorticoïdes ont une action négative qui réprime l'activité de facteurs qui amorcent la différenciation neuronale tels le NGF (Unsicker *et al.*, 1978) et le FGF (Stemple *et al.*, 1988). Deuxièmement, ils induisent l'expression de la phényléthanolamine-N-méthyl transférase (PNMT), une enzyme responsable de la synthèse de l'épinéphrine qui est caractéristique des cellules de la surrénale (Bohn *et al.*, 1981; Jiang *et al.*, 1989). Les mécanismes par lesquels le récepteur des glucocorticoïdes exerce deux effets différents à deux moments différents dans la même cellule ne sont pas encore compris. Toutefois, des indices obtenus d'analyses pharmacologiques semblent indiquer que ces effets dépendraient de la concentration des glucocorticoïdes (Simons *et al.*, 1989; Diamond *et al.*, 1990). Ainsi, l'induction de la transcription du gène PNMT nécessiterait une concentration de complexe récepteur-ligand plus grande que la répression des gènes neuronaux.

1.3.3 Les cytokines: l'interleukine-6

La communication intracellulaire via les cytokines joue un rôle clé dans la régulation de la survie cellulaire, dans la prolifération, dans la différenciation et dans le fonctionnement normal de la cellule, autant au cours de l'embryogénèse que chez l'adulte. En particulier, l'interleukine-6 (IL-6) affecte plusieurs types cellulaires

agissant, entre autres, comme régulateur de l'hématopoïèse et de la fonction immunitaire dans les lignées myéloïdes et lymphoïdes, comme médiateur au cours de la phase aiguë de la réponse hépatique et comme régulateur dans le métabolisme du tissu osseux (pour une revue, Akira *et al.*, 1993). Des souris déficientes en l'IL-6 se développent normalement mais présentent des réponses immunitaires et de phase-aiguë altérées (Poli *et al.*, 1994). Ces observations ont permis d'associer l'IL-6 à une fonction en tant que molécule «SOS» suite à des blessures ou des infections.

L'IL-6 appartient à une famille de cytokines qui comprend le facteur inhibiteur leucémique (LIF), l'oncostatine M (OSM), le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF), l'interleukine-11 et la cardiotrophine-1 (CT-1) (pour une revue, Hibi *et al.*, 1996). Les facteurs LIF et CNTF sont impliqués dans la régulation de fonctions neuronales telles la survie et la différenciation de neurones primaires en culture (Fann et Patterson, 1994). Plusieurs évidences permettent d'inclure les cellules neuronales parmi les cibles de l'IL-6. Premièrement, la production d'IL-6 peut être induite dans les astrocytes et dans la microglie dans le SNC (Gottschall *et al.*, 1994) et dans les cellules de Schwann du SNP (Bolin *et al.*, 1995). Deuxièmement, l'ARNm du récepteur de l'IL-6 est détecté dans certaines structures neuronales chez le rat et les niveaux en sont augmentés en réponse à une lésion (Yan *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1995; Hirota *et al.*, 1996; Kurek *et al.*, 1996). Finalement, l'IL-6 augmente la survie de certains neurones en culture primaire (Hama *et al.*, 1989) et, chez les cellules PC12, induit la formation de neurites (Satoh *et al.*, 1988). Ainsi, dans le système nerveux, l'IL-6 influence la survie des neurones et accélère la régénération axonale suite à une lésion d'un neurone (pour une revue, Gadiant et Otten, 1997).

Le récepteur de l'IL-6 est un complexe hétérodimérique formé d'une sous-unité désignée IL-6R α qui lie spécifiquement l'IL-6, et d'une sous-unité gp130 qui est aussi une composante des récepteurs des autres cytokines de la famille de l'IL-6

(Hibi *et al.*, 1996). Une caractéristique intéressante de la voie de signalisation intracellulaire de IL-6R est son activité sous forme soluble: il peut être relargué de la surface cellulaire par protéolyse (Heaney et Golde, 1996). Sous cette forme, l'IL-6R peut toujours lier son ligand et interagir avec le récepteur de surface gp130 des cellules cibles. Ainsi, la forme soluble IL-6R avec son ligand peut quand même produire son effet aux cellules qui possèdent uniquement le récepteur de surface gp130. Deux voies de signalisation intracellulaire, la voie de Ras/ERK/MAPK et la voie JAK/STAT, peuvent être activées suite à la liaison de l'IL-6 à son récepteur (Gadiant et Otten, 1997). Ces voies entrent en jeu dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes dont celui de la protéine JunB et de la protéine de la phase aiguë (Karin, 1994). Par contre, les étapes subséquentes de la réponse à l'IL-6 sont encore peu caractérisées.

1.3.4 Les cellules PC12 comme modèle d'étude

L'étude de la régulation de l'expression du gène de la périphérine peut être faite dans des cellules en culture puisque son expression est retrouvée dans plusieurs lignées à caractère neuro-endocrinien. Les cellules PC12, dérivées d'une tumeur de la médullosurrénale de rat, expriment le gène de la périphérine (Portier *et al.*, 1984a; Leonard *et al.*, 1987; Parysek et Goldman, 1987). L'expression de la périphérine est également retrouvée dans les cellules RIN5F qui dérivent d'un insulinome de rat (Baudoin *et al.*, 1993).

La lignée cellulaire PC12 possède les caractéristiques qui la font ressembler au précurseur sympathosurrénalien (Greene et Tischler, 1976; Greene et Tischler, 1982). Cette similarité avec le précurseur sympathosurrénalien fait des cellules PC12 un modèle de choix pour l'étude moléculaire des mécanismes de la

différenciation neuronale et endocrinienne. Ainsi, les cellules PC12 se caractérisent par deux voies de différenciation distinctes: la première voie est induite par le NGF et conduit les cellules PC12 à se différencier en neurones sympathiques (Greene et Tischler, 1982); la seconde est induite par les glucocorticoïdes et engage les cellules PC12 dans la voie de différenciation endocrinienne (Doupe *et al.*, 1985).

Le traitement des cellules PC12 par le NGF permet l'acquisition d'un phénotype neuronal accompagné de la croissance de neurites et de l'augmentation de l'ARNm de plusieurs gènes neuronaux dont celui de la périphérine (Leonard *et al.*, 1987). De plus, la synthèse (Portier *et al.*, 1984b; Aletta *et al.*, 1988; Gorham *et al.*, 1990) et la phosphorylation de la périphérine (Aletta *et al.*, 1989) augmentent au cours de la différenciation neuronale induite par le NGF. D'autres études avec les cellules PC12 ont identifié le facteur de croissance fibroblastique (bFGF) (Togari *et al.*, 1985; Rydel et Greene, 1987), l'IL-6 (Sato *et al.*, 1988) et la pléiotrophine (Li *et al.*, 1990) comme étant des facteurs capables de mimer l'effet du NGF sur la croissance des neurites et, dans le cas de l'IL-6 (Sterneck *et al.*, 1996) sur l'expression du gène de la périphérine.

D'autre part, l'exposition des cellules PC12 aux glucocorticoïdes réprime l'expression de gènes neuronaux tels que SCG10 (Stein *et al.*, 1988), GAP-43 (Federoff *et al.*, 1988) et la périphérine (Leonard *et al.*, 1987). La différenciation des cellules PC12 par des facteurs environnementaux reflète donc les propriétés développementales bipotentielles du précurseur sympathosurrénal. De plus, la modulation de l'expression du gène de la périphérine en réponse à ces facteurs fait de la périphérine un excellent modèle pour étudier les mécanismes moléculaires qui régulent son expression au cours du processus de différenciation cellulaire.

1.4 LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNÉTIQUE AU NIVEAU DE L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION

L'état de différenciation d'une cellule est étroitement lié à la présence d'un ensemble de protéines particulières qui confère à la cellule une morphologie caractéristique et des fonctions spécialisées. Le contenu précis en protéines est régi par une orchestration parfaite de l'expression des gènes correspondants. Pour qu'un gène soit exprimé, la région de la chromatine dans laquelle on retrouve le gène doit d'abord être dans un état favorisant sa transcription. Cette structure soutiendra l'assemblage d'un complexe transcriptionnel qui produira un ARN qui après maturation sera traduit en protéine. Ainsi, chaque étape de ce processus permet autant de points de contrôles pour assurer une expression génétique fidèle et précise. De plus, au cours du développement, la succession d'événements complexes, comme les interactions cellulaires et nucléocytoplasmiques, la division cellulaire, la mort sélective et la migration cellulaire s'ajoutent à l'expression spécifique des gènes afin d'orchestrer le programme de différenciation (Davidson, 1990; Gurdon, 1992). Cependant, uniquement les mécanismes purement transcriptionnels seront l'objet d'une revue puisqu'ils forment le thème principal de cette thèse.

1.4.1 Promoteur de base et facteurs de transcription généraux

Les gènes transcrits par l'ARN polymérase II (Pol II) contiennent typiquement un promoteur basal, qui est reconnu par les facteurs d'initiation généraux responsables de l'initiation de la transcription, et des séquences spécifiques reconnues par des facteurs de transcription qui modulent la fonction des facteurs généraux.

Le promoteur basal est défini comme l'ensemble des éléments de l'ADN nécessaires et suffisants pour permettre une initiation précise de la transcription par la Pol II *in vitro* (Roeder, 1996). La majorité des promoteurs de base contiennent soit la boîte TATA, située à environ 30 paires de bases (pb) en amont du site d'initiation de la transcription, soit l'initiateur qui enveloppe le site d'initiation de la transcription, ou les deux (pour une revue, Novina et Roy, 1996). Ces deux éléments peuvent, de façon indépendante, favoriser la formation du complexe d'initiation de la transcription (Roeder, 1991). La formation du complexe d'initiation est un processus en plusieurs étapes qui fait intervenir des interactions entre les facteurs d'initiation généraux: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF, TFIIH et TFIIJ (Figure 2, page 36). Le rôle du complexe d'initiation est de recruter la Pol II pour qu'elle initie efficacement la transcription car celle-ci ne peut lier l'ADN directement (pour une revue, Buratowski, 1994; Roeder, 1996).

La première étape de l'assemblage du complexe d'initiation requiert la reconnaissance et la liaison de la boîte TATA par la protéine TBP («TATA-binding protein», une sous-unité du complexe TFIID; les autres sous-unités sont appelées TAF, «TBP-associated factor») ou de l'initiateur par la protéine IBP («Initiator-binding protein»). Par la suite, les facteurs d'initiation TFIIB et TFIIF vont permettre le recrutement de la Pol II pour former un complexe de pré-initiation (Buratowski *et al.*, 1989; Maldonado *et al.*, 1990; Ha *et al.*, 1993). Le complexe formé par TBP, TFIIB et RAP30 (sous-unité de TFIIF, l'autre sous-unité étant RAP74) est suffisant pour le recrutement de la Pol II et sa liaison au promoteur (Killeen *et al.*, 1992). TFIIA semble intervenir afin de stabiliser l'interaction TFIID-ADN, particulièrement pour les promoteurs qui possèdent des boîtes TATA de plus faible affinité (Lee *et al.*, 1992). Chacune des étapes de la formation du complexe de pré-initiation peut être régulée par différents facteurs de transcription (activateurs ou répresseurs) via des interactions protéine-protéine (Tjian et Maniatis, 1994).

Après la formation de ce complexe, deux facteurs d'initiation supplémentaires, TFIIE et TFIIH, sont requis pour la conversion du complexe d'initiation en un complexe d'élongation qui va permettre de libérer le site d'initiation de la transcription («promoter clearance») afin de permettre l'assemblage d'un complexe de pré-initiation subséquent (Flores *et al.*, 1992). Par conséquent, en plus de réguler la formation d'un complexe de pré-initiation menant à l'initiation de la transcription, un activateur ou un répresseur peut également réguler les étapes de libération du promoteur et d'élongation (Goodrich et Tjian, 1994). Deux autres facteurs d'initiation, TFIIG et TFIIJ, ont été récemment identifiés mais leurs fonctions exactes ne sont pas claires (Sunimoto *et al.*, 1990; Cortes *et al.*, 1992; Flores *et al.*, 1992). Toutefois, TFIIG serait une combinaison de TFIIH et TFIIJ.

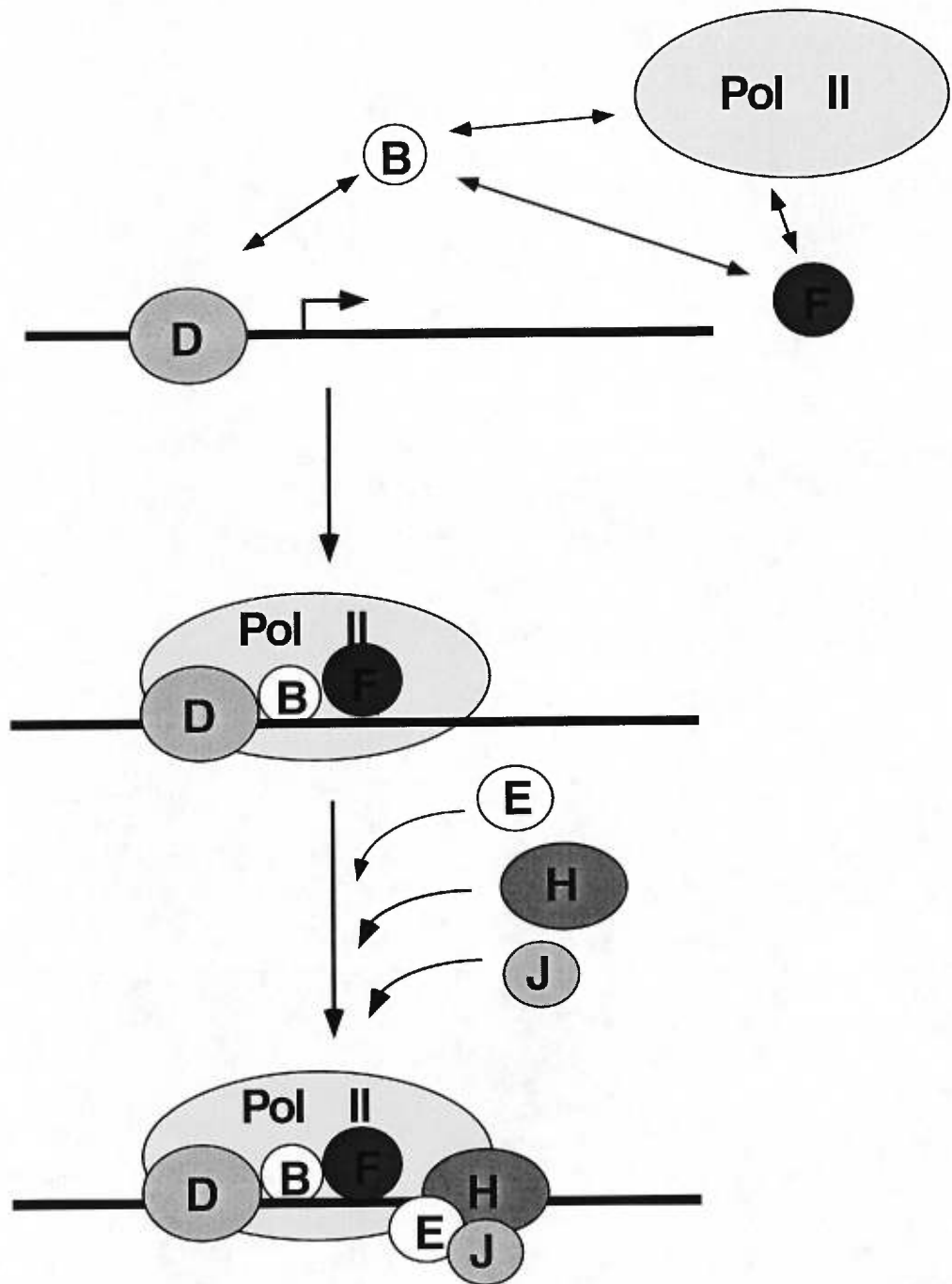


Figure 2: Assemblage du complexe de pré-initiation. Les facteurs généraux de transcription sont représentés par leurs lettres tandis que les double-flèches indiquent des interactions protéine-protéine (d'après Roeder, 1996).

1.4.2 Les facteurs de transcription spécifiques

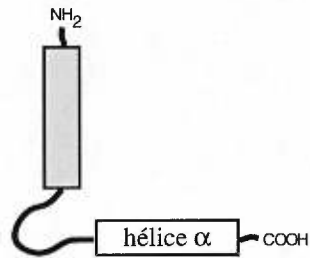
Même si les facteurs généraux peuvent stimuler la transcription *in vitro*, leur activité peut être modulée positivement ou négativement par une pléiade de facteurs de transcription. Les facteurs de transcription lient des séquences d'ADN de 6 à 20 nucléotides qui peuvent être situées en amont ou en aval du site d'initiation de la transcription. Une combinaison unique de ces sites ainsi que des facteurs de transcription qui s'y lient spécifie l'activité transcriptionnelle d'un gène et assure la fidélité de son profil d'expression spatial et temporel. Les facteurs de transcription peuvent intervenir au niveau de l'assemblage ou de la stabilité du complexe de pré-initiation et au niveau de l'élongation.

Les facteurs de transcription peuvent être répertoriés en deux classes: les facteurs ubiquitaires et les facteurs spécifiques à certains types cellulaires. L'analyse de la structure des facteurs de transcription a permis d'identifier des domaines fonctionnels distincts. La majorité des facteurs de transcription sont des protéines modulaires avec un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de transactivation. En plus de ces deux domaines, des domaines pour la dimérisation ou la liaison à un ligand peuvent également être retrouvés chez certains facteurs de transcription. Le domaine de liaison à l'ADN des différents facteurs de transcription est caractérisé par la présence d'une hélice α dite «hélice de reconnaissance» qui permet à la protéine de se lier dans le sillon majeur de l'ADN. Malgré cette similarité commune à tous les facteurs de transcription possédant un domaine de liaison à l'ADN, la structure globale de ce domaine est assez hétérogène pour permettre de les regrouper en différentes classes selon la présence de séquences d'acides aminés consensus particulières. Plusieurs centaines de facteurs de transcription ont été identifiés et il serait ardu de les décrire tous. Cependant, certaines classes regroupent des facteurs de transcription qui se distinguent par leur rôle critique au cours du développement

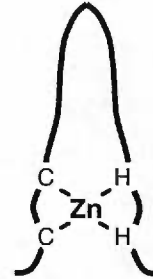
autant chez les vertébrés que chez les invertébrés. Ainsi, trois principales classes de facteurs de transcription seront présentées dans cette section.

1.4.2.1 Les domaines homéotiques

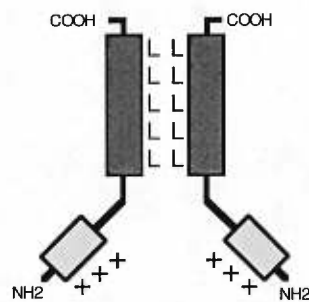
Chez les eucaryotes, les homéoprotéines forment une superfamille de protéines qui contrôlent le développement. Ces facteurs de transcription déterminent l'axe antéro-postérieur de l'organisme. De plus, chez la drosophile, certaines homéoprotéines sont importantes pour le développement du système nerveux (Doe *et al.*, 1988; Doe et Scott, 1988; Doe *et al.*, 1988). Les homéoprotéines possèdent un domaine de liaison à l'ADN composé de trois hélices α . L'hélice en position C-terminale correspond à l'hélice de reconnaissance. Elle est soutenue par les deux autres hélices qui forment un motif hélice-coude-hélice («helix-turn-helix»; Figure 3A, page 39; Harrison et Aggarwal, 1990). Le domaine avec les trois hélices correspond à une région de 60 acides aminés appelée «domaine homéo» qui est très conservée chez les homéoprotéines (Gehring, 1987). La spécificité de liaison des homéoprotéines dépend du neuvième acide aminé de l'hélice de reconnaissance qui permet de lier le consensus TAA(A)T (Treisman *et al.*, 1992). Certaines homéoprotéines possèdent un deuxième domaine de liaison à l'ADN tels les domaines POU, Paired, LIM et «cut repeats» qui entrent en jeu pour la reconnaissance de séquences d'ADN aux abords des sites reconnus par le domaine homéo (Herr *et al.*, 1988; Freyd *et al.*, 1990; Treisman *et al.*, 1991; Harada *et al.*, 1994).



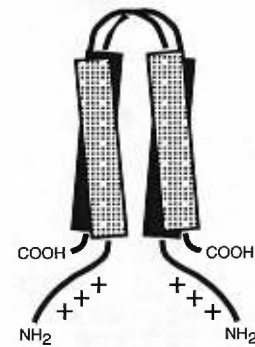
A) La structure en hélice-coude-hélice.



B) Le domaine en doigt à zinc de type C_2-H_2 .



C) La structure «leucine zipper» et son domaine basique.



D) La structure en hélice-boucle-hélice et son domaine basique.

Figure 3: Schématisation des domaines de liaison à l'ADN.

1.4.2.2 Le domaine en doigt à zinc

Le domaine de liaison de plusieurs facteurs de transcription forme une structure repliée autour d'un atome de zinc formant ainsi un domaine compact appelé doigt à zinc. Dans cette famille de facteurs de transcription, on retrouve notamment les récepteurs nucléaires qui permettent à un signal extracellulaire (hormone) d'être directement transporté dans le noyau. Les récepteurs nucléaires comprennent, entre autres, les récepteurs de l'hormone thyroïdienne, de l'acide rétinoïque et de la vitamine D. Les facteurs de transcription à motif en doigt à zinc ont été subdivisés en quatre groupes d'après la nature des doigts (Harrison et Aggarwal, 1990).

Classe I : Cette classe regroupe les facteurs avec un motif en doigt à zinc de la forme C_2-H_2 dans lequel les deux cystéines et les deux histidines stabilisent un atome de zinc (Figure 3B, page 39). Le prototype de cette classe est le facteur TFIIIA qui est important pour la transcription des gènes 5S par l'ARN polymérase III. TFIIIA contient un domaine de liaison à l'ADN avec 9 doigts à zinc (Klug et Rhodes, 1987). Par contre, le nombre de doigts peut varier, par exemple, les facteurs de transcription de la famille Sp1 ont un domaine de liaison à l'ADN formé de trois doigts à zinc (Kadonaga *et al.*, 1987). Dans cette famille, Sp4, dont l'expression est principalement retrouvée dans le système nerveux, semble jouer un rôle important pour le développement (Hagen *et al.*, 1992; Supp *et al.*, 1996).

Classe II : La classe II regroupe la famille des récepteurs nucléaires ou stéroïdiens ayant un motif doigt à zinc du type C_4 . Ce motif particulier est formé de deux groupes de quatre résidus cystéines où chaque groupe stabilise un atome de zinc. De façon générale, la différence principale entre les facteurs de la classe I et

ceux de la classe II est que ces derniers lient l'ADN comme homodimères ou hétérodimères (Ribeiro *et al.*, 1995; Trapp et Holsboer, 1996).

Classe III : Le motif doigt à zinc des facteurs de cette classe est de type C₆ dont la structure globulaire est maintenue par deux atomes de zinc stabilisés par six cystéines. Un motif doigt à zinc du type C₆ est retrouvé dans le domaine de liaison à l'ADN du facteur Gal4 de la levure (Ma et Ptashne, 1987).

Classe IV : Cette classe regroupe les facteurs qui reconnaissent et lient la séquence GATA. Ces facteurs possèdent un domaine de liaison à l'ADN avec un motif doigt à zinc différent des autres classes, il a une structure générale du type CXNCX₁₇CNXC (Evans et Felsenfeld, 1989).

1.4.2.3 Le domaine basique hélicoïdal

Cette troisième classe de facteurs de transcription regroupe des protéines importantes pour la prolifération cellulaire et dont la forme oncogénique est souvent impliquée dans la progression tumorale. Les facteurs de transcription de cette classe lient l'ADN sous forme de dimères et leurs domaines de liaison à l'ADN contiennent un domaine basique hélicoïdal qui est adjacent à la partie N-terminale du domaine de dimérisation. Cette classe de facteurs de transcription peut être subdivisée selon le type de domaine de dimérisation.

Classe «Leucine zipper» : Ce domaine de dimérisation est caractérisé par la présence d'un acide aminé hydrophobe, très souvent une leucine, à tous les sept acides aminés. Cette périodicité se répète quatre à cinq fois (Landschulz *et al.*,

1988; Vinson *et al.*, 1989). Cette structure facilite la dimérisation de chaque monomère par emboîtement des deux hélices contenant les résidus hydrophobes (Figure 3C, page 39). On retrouve dans cette classe les facteurs de la famille AP-1 et ATF/CREB.

Classe hélice-boucle-hélice : En plus du domaine basique hélicoïdal responsable de la liaison à l'ADN, les facteurs de transcription de cette classe possèdent un domaine de dimérisation formé de deux régions contenant chacune deux hélices α séparées par une boucle non-hélicoïdale (Figure 3D, page 39; Murre *et al.*, 1989; Anthony-Cahill *et al.*, 1992). Toutefois, la structure primaire du domaine basique hélicoïdal est différente de celle des «leucine-zipper» comme l'est la séquence d'ADN reconnue par ces facteurs. Les protéines de la famille Myc forment un exemple de facteurs de transcription avec un domaine de dimérisation hélice-boucle-hélice.

1.4.3 Activation transcriptionnelle vs répression

1.4.3.1 Activation transcriptionnelle

La Pol II est incapable d'elle-même d'initier la transcription d'un gène. Elle requiert la présence de facteurs généraux afin de permettre l'assemblage d'un complexe de pré-initiation et afin de débiter la transcription. Toutefois, les facteurs de transcription peuvent intervenir à l'une ou l'autre des étapes de l'initiation dans le but de moduler les niveaux de transcription. Ainsi, les différents facteurs de transcription présents dans le noyau de la cellule vont adopter diverses stratégies pour assurer une expression génétique particulière.

Certains facteurs peuvent intervenir de façon à stimuler ou à stabiliser la formation du complexe de pré-initiation et par le fait même augmenter les niveaux transcriptionnels (Horikoshi *et al.*, 1988). Ce mécanisme d'activation de la transcription dépend de la présence d'un domaine spécifique du facteur de transcription appelé domaine d'activation ou de transactivation qui permet d'interagir avec d'autres facteurs de transcription ou avec la Pol II. Les domaines d'activations varient d'un facteur de transcription à l'autre ou d'une famille à l'autre. Certains domaines d'activation possèdent une forte proportion d'acides aminés acides, par exemple, le facteur Gal4 chez la levure (Workman *et al.*, 1991). Les domaines de transactivation des facteurs de transcription de la famille Sp1 contiennent des régions riches en glutamines (Courey et Tjian, 1988; Courey *et al.*, 1989) tandis que d'autres peuvent être riches en résidus proline tels les membres de la famille CTF/NF-I (Alevizopoulos et Mermod, 1996). Par ailleurs, certains facteurs contiennent plus d'un type de domaines d'activation (Hollenberg et Evans, 1988; Tora *et al.*, 1989; Gonzalez *et al.*, 1991) et, selon le contexte du promoteur auquel ils s'associent, l'un et/ou l'autre des domaines pourrait activer la transcription. Malgré la vaste littérature concernant les activateurs transcriptionnels, les mécanismes par lesquels ils agissent restent encore énigmatiques.

1.4.3.2 Répresseurs et mécanismes de répression

L'attrait pour les mécanismes d'activation transcriptionnelle découle du répertoire considérable d'activateurs et de la complexité des interactions entre ces facteurs et la machinerie basale. Typiquement, dans une cellule eucaryote, seulement 7% environ du génome est transcrit en ARN (Alberts *et al.*, 1983). Il est facilement envisageable que la transcription du 93% restant ne soit pas

spécifiquement bloquée par des répresseurs transcriptionnels. Le nombre de répresseurs transcriptionnels serait alors astronomique ce qui du point de vue évolutif, serait très dispendieux pour la cellule. De la même façon, pour diminuer le coût énergétique de la répression transcriptionnelle, il n'est pas nécessaire d'avoir un répresseur pour chaque activateur présent dans le noyau de la cellule.

Contrairement aux mécanismes d'action des activateurs transcriptionnels, différents modes d'action des répresseurs ont été décrits, notamment grâce aux travaux chez les procaryotes (pour une revue, Johnson, 1995). L'initiation de la transcription peut se résumer simplement en quatre étapes: la liaison du complexe de pré-initiation, le passage du complexe de pré-initiation à un complexe actif, la formation du premier lien phosphodiester et le relarguage du promoteur par la machinerie transcriptionnelle (Roeder, 1996). Ainsi, différents répresseurs semblent pouvoir intervenir pour bloquer une ou l'autre de ces étapes. Chez les procaryotes, par exemple, le répresseur du phage λ bloque la liaison de la polymérase, la protéine MerR prévient l'étape d'isomérisation du complexe de pré-initiation; le répresseur Gal bloque la formation du premier lien phosphodiester; et le répresseur LacI semble interférer avec le relarguage du promoteur par la machinerie transcriptionnelle (pour MerR, Ansari *et al.*, 1995; pour une revue des autres répresseurs procaryotes, Herschbach et Johnson, 1993).

Plusieurs répresseurs transcriptionnels ont également été identifiés chez les eucaryotes et différents mécanismes de répression ont été décrits. Certains dépendent d'une liaison ADN-protéine alors que d'autres n'en dépendent pas.

Compétition :

Par ce mécanisme, un répresseur empêcherait la liaison d'un activateur qui posséderait une séquence de liaison identique ou qui chevaucherait celle du répresseur. Une variante du mécanisme de compétition a été décrite pour le facteur YB-1, un répresseur des gènes du complexe majeur

d'histocompatibilité de classe II (MacDonald *et al.*, 1995). La liaison de la protéine YB-1 produirait une distorsion de l'ADN qui préviendrait la liaison d'un activateur à un site voisin.

Interférence et co-occupation : Un répresseur peut, en même temps qu'un activateur, lier l'ADN et, néanmoins, contrecarrer la fonction de l'activateur. Par exemple, la liaison du répresseur pourrait prévenir l'interaction entre un activateur et la machinerie transcriptionnelle basale. Ce type de répression peut également se retrouver lorsque deux activateurs lient simultanément l'ADN de manière à prévenir l'activation transcriptionnelle de chacun d'eux (Diamond *et al.*, 1990). Ce type d'interférence a été décrit pour le récepteur des glucocorticoïdes et le facteur NF- κ B dont la liaison à leurs séquences spécifiques annule l'activation respective de la transcription des gènes de certaines cytokines (Scheinman *et al.*, 1995).

Séquestration : La répression par séquestration ou «squelching» s'observe lorsqu'un activateur est surexprimé, ce qui entraîne une diminution de la concentration d'un deuxième activateur par titration et, par conséquent, réprime un gène cible de ce second activateur (Gill et Ptashne, 1988).

Arrimage ou masquage : La liaison d'une protéine à un activateur déjà lié à sa séquence cible sur l'ADN pourrait bloquer l'action de l'activateur en masquant son domaine de transactivation (Lohr et Hopper, 1985; Johnston *et al.*, 1987). On désigne ce type de répression, répression par arrimage ou «tethering».

Ainsi, la répression peut être un mécanisme actif ou passif et ne dépend pas exclusivement de la présence de répresseurs proprement dits. Dans un contexte particulier, un activateur peut également jouer un rôle de répresseur si, par

interférence ou par arrimage, il interfère avec un autre activateur. Les mécanismes décrits démontrent bien l'étendue des interactions possibles entre les différents facteurs de transcription pour permettre de moduler l'expression d'un gène au cours du développement.

1.4.4 Les co-facteurs

La purification des facteurs de transcription et l'analyse de leurs modes d'action *in vitro* ont permis de dresser un portrait général de la régulation des gènes au niveau de l'initiation de la transcription. Toutefois, ce portrait semble se complexifier plutôt que de se simplifier avec l'identification d'autres molécules, appelées co-facteurs, qui entrent en jeu au cours de l'initiation de la transcription. Deux classes de co-facteurs ont ainsi été identifiées: les co-facteurs spécifiques aux activateurs et les co-facteurs généraux (pour une revue, Kaiser et Meisterernst, 1996).

Les TAFs ont été les premiers co-facteurs identifiés et font partie du premier type, ceux spécifiques aux activateurs (Dymlacht *et al.*, 1991). Ils s'associent étroitement avec les facteurs de transcription généraux et agissent comme intermédiaires entre ces derniers et les facteurs de transcription. Les TAFs semblent également entrer en jeu pour la reconnaissance du promoteur basal (pour une revue, Verrijzer et Tjian, 1996).

Les co-facteurs généraux, contrairement aux co-facteurs spécifiques, ne s'associent pas étroitement avec la machinerie basale. Parmi ces co-facteurs généraux, certains possèdent une activité positive sur la transcription, par exemple, les facteurs PC1 («positive co-factor 1»), PC2, PC3, PC4 et ACF («activating po-

factor») qui ont été fractionnés à partir du précurseur USA («upstream stimulatory activity») (Meisterernst *et al.*, 1991). Ces co-facteurs semblent intervenir dans la stabilisation des interactions entre les activateurs et la machinerie basale (Kaiser et Meisterernst, 1996). D'autres co-facteurs généraux peuvent, toutefois, agir en s'intercalant entre les facteurs généraux avec comme conséquence un blocage de l'assemblage du complexe de pré-initiation. Par exemple, le facteur NC1 («negative co-factor 1») entre en compétition avec TFIIA pour la liaison à TBP (Meisterernst *et al.*, 1991). Également, NC2, qui est un complexe dimérique structurellement similaire aux histones, affecte négativement la transcription par la compétition de TFIIA et de TFIIB pour leurs sites de liaison à l'ADN respectifs (Meisterernst et Roeder, 1991).

Finalement, un troisième groupe de co-facteurs généraux, désignés médiateurs, a été identifié chez la levure par son rôle dans l'activation transcriptionnelle dans un système reconstitué à partir de la Pol II et de facteurs de transcription purifiés (Kelleher III *et al.*, 1990; Flanagan *et al.*, 1991). Le médiateur est un complexe multi-protéique possédant trois fonctions: une fonction de support au niveau de l'activation transcriptionnelle, une fonction de stimulation des niveaux basals de la transcription et une fonction de stimulation de la phosphorylation du domaine C-terminal de la Pol II par TFIIH (pour une revue, Bjorklund et Kim, 1996).

1.4.5 Régulation de l'activité et de la synthèse des facteurs de transcription

La régulation de l'activité d'un facteur de transcription devient primordiale lorsque celui-ci régule l'expression d'un gène histospécifique. En effet, l'activité de ce facteur se doit d'être régulée de manière à aiguiller l'expression du gène vers un type cellulaire particulier ou vers un stade de différenciation précis. Par conséquent, il est également important de réguler l'activité ou la synthèse d'un facteur de transcription.

Pour qu'un facteur de transcription assure son rôle, il doit se retrouver dans le noyau et être dans une conformation favorable à son activité. L'activité d'un facteur peut donc être régulée à ces deux niveaux. Par exemple, la localisation intracellulaire d'un facteur de transcription peut dépendre d'un ligand activateur. Les récepteurs nucléaires forment une famille de facteurs de transcription dont l'activité fait intervenir des ligands tels les hormones stéroïdiennes, la vitamine D et l'acide rétinoïque (Evans, 1988; Green et Chambon, 1988; Beato, 1989). Parmi ceux-ci, le récepteur des glucocorticoïdes fait partie d'un complexe multiprotéique cytoplasmique et la liaison de l'hormone permet sa libération, son passage dans le noyau et sa liaison à l'ADN (Muller et Renkawitz, 1991). L'activation d'un facteur de transcription peut également dépendre de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation. Le facteur CREB («cAMP response element binding protein») doit être phosphorylé pour produire son effet, et cette phosphorylation survient à la suite d'une stimulation par l'AMP cyclique (Roesler *et al.*, 1988).

En s'assurant de la synthèse d'un facteur de transcription dans un type cellulaire particulier, il est ainsi possible de faire coïncider son expression avec celle de son gène cible. Il est clair toutefois qu'une telle régulation reporte le problème de la régulation des gènes histospécifiques une étape en arrière, nécessitant des

mécanismes de régulation de l'expression histospécifique des facteurs de transcription eux-mêmes.

Les quelques modes de régulation au niveau de l'initiation de la transcription décrits ici démontrent l'importance et la grande variété des mécanismes qui contrôlent l'expression des gènes.

1.5 LA RÉGULATION DE L'ÉLONGATION

Chez les eucaryotes, le contrôle de l'expression génétique dépend grandement de la modulation des niveaux d'initiation de la transcription. Comme il a été décrit dans les sections précédentes, l'efficacité de l'initiation de la transcription fait intervenir des interactions entre facteurs de transcription et des séquences spécifiques de liaison à l'ADN. Ainsi, la régulation spécifique des gènes s'appuie sur une combinaison unique de sites de liaison à l'ADN qui peuvent être reconnus par une pléiade de facteurs de transcription propre aux différents types cellulaires. Toutefois, le taux d'initiation de la transcription ne détermine pas nécessairement les niveaux d'ARNm synthétisés. Plusieurs évidences montrent que pour certains gènes, la régulation de leur expression se manifeste également au niveau de l'élongation (pour une revue, Spencer et Groudine, 1990).

1.5.1 Les facteurs d'élongation

Les travaux récents chez les eucaryotes suggèrent deux classes de facteurs d'élongation: les facteurs d'élongation généraux importants pour accélérer l'élongation de la transcription de la majorité des gènes, et les facteurs de régulation

de l'élongation dont la fonction est de contrôler l'expression spécifique de certains gènes (pour une revue, Reines *et al.*, 1996).

Les évidences de l'existence de facteurs généraux de l'élongation proviennent de certaines caractéristiques du processus d'élongation par la Pol II. Par exemple, un analogue nucléotidique, le 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosyl-enzimidazole (DRB), est un puissant inhibiteur de la synthèse d'ARNm *in vivo*. Il agit en augmentant la fréquence des arrêts de la transcription par la Pol II. Le DRB n'a aucun effet sur l'élongation dans les systèmes reconstitués à partir de Pol II et de certains facteurs d'initiation généraux purifiés. Ces expériences ont suggéré la présence de facteurs d'élongation sensibles au DRB, facteurs qui interviendraient lors des premières étapes de l'élongation (Fraser *et al.*, 1978). Une seconde évidence vient de l'évaluation de la vitesse de transcription par la Pol II *in vitro*, vitesse qui ne concorde pas avec celle observée *in vivo*.

Ainsi, plusieurs facteurs généraux d'élongation ont été identifiés par leur capacité à prévenir les pauses lors de la synthèse d'ARN et à stabiliser le complexe d'élongation. Plusieurs facteurs, TFIIF (Flores *et al.*, 1988), P-TEFb (Marshall et Price, 1995), l'élongine (SIII) (Takagi *et al.*, 1996) ELL (Shilatifard *et al.*, 1996) et SII (Reines *et al.*, 1989) semblent intervenir en protégeant la Pol II d'éventuels arrêts lors de l'élongation. Leurs rôles précis ne sont pas encore clairs mais, dans le cas de P-TEFb, il semble intervenir au niveau de la phosphorylation de la Pol II et d'autres facteurs du complexe d'élongation. Quant à SII, il semble entrer en jeu lorsque le passage de la Pol II est entravé par des complexes nucléoprotéiques liés à l'ADN ou par des sites d'arrêt intrinsèques.

1.5.2 Bloquage de l'élongation

Le bloquage de l'élongation de la transcription est un mécanisme de contrôle de la synthèse qui permet, en réponse à un stimuli qui lève ce bloquage, de retrouver rapidement des niveaux élevés de la synthèse d'ARNm. Des exemples d'un tel mécanisme de contrôle sont retrouvés pour le gène *hsp70* chez la drosophile (Rougvie et Lis, 1988; Rougvie et Lis, 1990), pour le gène de la transthyrétine chez la souris (Mirkovitch et Darnell, 1991) et pour le gène *c-myc* humain (Bentley et Groudine, 1986; Eick et Bornkamm, 1986). Toutefois, aucun facteur d'élongation spécifique capable de bloquer l'élongation n'a encore été isolé.

En conclusion, la régulation de l'expression génétique repose, entre autres, sur des facteurs de transcription qui agissent à plusieurs étapes de la transcription, depuis l'assemblage du complexe de pré-initiation jusqu'à l'élongation. Même si les étapes de la terminaison de la transcription et de la maturation des ARNm n'ont pas fait l'objet d'une revue, il n'en demeure pas moins que ce sont d'autres étapes susceptibles d'être des points de contrôle importants pour l'expression génétique. De plus, une vue d'ensemble semble émerger avec les travaux sur le rôle de la structure de la chromatine dans la régulation de l'expression génétique (Wolffe, 1995). La structure de la chromatine est sujette à des altérations telles que la méthylation et l'acétylation qui peuvent faire en sorte de faciliter ou de bloquer l'expression de certains gènes. Les niveaux de condensation de la chromatine au cours du cycle cellulaire jouent également un rôle important pour l'expression génétique. Des niveaux de condensation élevés emprisonnent l'ADN et diminuent les interactions avec les protéines impliquées dans les différents processus de transcription, de réplication et de réparation de l'ADN. La régulation de l'expression génétique est donc un processus largement dynamique qui nécessite la

coordination de l'activité d'un ensemble de facteurs environnementaux, cellulaires et protéiques. Ainsi, l'étude de chacun de ces facteurs permet d'approfondir nos connaissances sur le processus de l'expression génétique qui est le fondement de la différenciation cellulaire et du développement.

1.6 LE GÈNE DE LA PÉRIPHÉRINE, UN MODÈLE D'ÉTUDE POUR LA TRANSCRIPTION ET L'INDUCTION NEUROSPÉCIFIQUE

L'utilisation de gènes histospécifiques comme modèles d'étude comporte plusieurs avantages. L'élucidation du code d'interactions entre les facteurs de transcription et leurs séquences de liaison à l'ADN permet d'identifier les facteurs de première instance qui dictent le profil d'expression histospécifique. Le gène de la périphérine, caractérisé par un profil d'expression restreint à des populations neuronales particulières, correspond à un outil de choix afin d'identifier de tels facteurs de transcription. D'autre part, l'intérêt de la périphérine comme modèle d'étude découle du fait que son expression peut être induite en réponse à différents signaux extracellulaires. Les signaux extracellulaires peuvent conduire à la régulation de l'expression génétique. L'utilisation de gènes ciblés par ces signaux permet ainsi de remonter la cascade de signalisation intracellulaire et d'identifier les facteurs de transcription qui interviennent dans les étapes ultimes de ces voies de transduction du signal.

1.6.1 Objectifs spécifiques

Mes travaux de recherche avaient pour but la caractérisation d'éléments de régulation importants pour les niveaux basaux et pour l'induction de l'expression du gène de la périphérine. Une telle étude devrait permettre d'identifier, et éventuellement d'isoler, des facteurs de transcriptions impliqués lors des changements phénotypiques associés à la différenciation neuronale et au maintien de l'intégrité du système nerveux. Dans cet ordre d'idées, mon projet d'étude a comme objectifs spécifiques:

- a) Caractériser la nature de la liaison protéique d'un élément de régulation du promoteur du gène de la périphérine.
- b) Identifier et caractériser des éléments de régulation importants pour l'induction de l'expression du gène en réponse au NGF et à l'IL-6.
- c) Étudier les mécanismes sous-jacents à l'induction du gène.

Les travaux qui ont permis d'atteindre le premier objectif sont présentés dans le prochain chapitre. Le corps des troisième et quatrième chapitres correspond à l'ensemble des travaux de recherche qui visaient à éclairer nos connaissances sur les facteurs de transcription qui entrent en jeu au cours de l'induction du gène de la périphérine en réponse à des signaux extracellulaires.

CHAPITRE 2

Transcriptional activation of the neuronal peripherin-encoding gene depends on a G+C-rich element that binds Sp1 *in vitro* and *in vivo*

RÉSUMÉ

Les travaux récents dans notre laboratoire avaient pour but d'étudier les mécanismes de régulation de l'expression de la périphérine. Ces travaux ont ainsi permis d'identifier trois éléments de régulation appelés PER1, PER2 et PER3 localisés dans les 98 premières paires de bases (pb) du promoteur du gène de la périphérine. Cette région du promoteur est suffisante pour orienter l'activité transcriptionnelle d'un gène rapporteur de façon histospécifique (Desmarais *et al.*, 1992). L'élément PER1 s'avère être le déterminant de l'histospécificité mais ne peut activer la transcription sans la présence d'autres activateurs. Ce deuxième chapitre englobe les travaux concernant la caractérisation de l'élément PER3. Cette étude a permis de montrer que PER3 est un activateur plus fort que PER2. De plus, nous avons analysé la capacité de l'élément PER3 de lier des facteurs de transcription. Des expériences d'EMSA et d'interférence à la méthylation ont montré que le facteur de transcription Sp1 lie PER3 *in vitro*. La liaison de Sp1 à PER3 a été confirmée par l'utilisation d'un anticorps anti-Sp1. De plus, une mutation de 3 paires de bases qui empêche la liaison de Sp1 à PER3 *in vitro* bloque complètement l'expression d'un gène rapporteur placé sous le contrôle des éléments PER3 et PER1 lors d'expériences de transfections de cellules qui expriment la périphérine. Dans une construction qui contient les 256 premières paires de bases du promoteur du gène de la périphérine, la même mutation diminue l'activité transcriptionnelle du promoteur de 80%. Finalement, des expériences de co-transfection dans lesquelles Sp1 était surexprimé ont démontré que Sp1 pouvait stimuler la transcription d'un gène rapporteur placé sous le contrôle des éléments PER3 et PER1. Ainsi, ces résultats montrent que des interactions entre Sp1 et des protéines liées à l'élément PER1 interviennent dans le contrôle de l'expression du gène de la périphérine.

GENE 08858

Transcriptional activation of the neuronal peripherin-encoding gene depends on a G + C-rich element that binds Sp1 in vitro and in vivo

(Intermediate filament; transcription; gene expression; neuron; mouse)

Nicolay Ferrari, Danielle Desmarais and André Royal

Groupe de Recherche en Oncogénétique, Département de Pathologie, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

Received by C.M. Kane: 21 October 1994; Revised/Accepted: 7 January/17 January 1995; Received at publishers: 17 February 1995

SUMMARY

Peripherin (Prph) is a type-III intermediate filament (IF) protein principally synthesized in peripheral nervous system neurons. We have previously shown that three regulatory elements, *PER1*, *PER2* and *PER3*, in the first 98 bp of the *Prph* gene promoter, were sufficient to direct cell-type specific expression of a reporter gene [Desmarais et al., *EMBO J.* 11 (1992) 2971–2980]. Of these elements, *PER1* was found to be important for cell-type specificity, but required the presence of other elements for transcriptional activity. Here, we show that *PER3* is a stronger activator than *PER2* and that it can stimulate cell-type-specific transcription when combined with *PER1*. We have characterized the G + C-rich *PER3* element for its ability to bind *trans*-acting factors. Gel retardation and methylation interference (MI) assays show that *PER3* binds transcription factor Sp1. In addition, an anti-Sp1 antibody recognizes the *PER3* DNA-binding protein. A 3-bp mutation abrogating the capacity of *PER3* to bind Sp1 in vitro completely abolished expression of the reporter gene construct containing only *PER3* and *PER1*, while in a construct containing the first 256 bp of the *Prph* promoter, it led to an 80% decrease with respect to the control wild-type construct. Finally, by co-transfection of a Sp1-expressing plasmid, we show that Sp1 can stimulate transcription from a reporter gene containing the *PER3* sequence. Together, these results indicate that interactions between Sp1 and the proteins binding *PER1* are involved in the control of the *Prph* gene.

INTRODUCTION

Differentiation is based on changes in the expression of cell-type-specific genes, a process that involves a complex interplay between multiple *cis*-acting DNA elements and *trans*-acting factors. As a model to study how these changes are regulated during neuronal differentiation, we have used peripherin (Prph), a member of the intermedi-

ate filament (IF) protein family. The IF network constitutes a fundamental component of differentiated cells: most cell types synthesize one class of IF proteins. For example, in epithelial cells, the IF network is composed of keratins (for a review, see Steinert and Roop, 1988). However, in neurons the IF network is more complex. In addition to neurofilament triplet proteins which are synthesized in all neurons, other IF proteins, including

Correspondence to: Dr. A. Royal, Groupe de Recherche en Oncogénétique, Département de Pathologie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada; Tel. (1-514) 343-7062; Fax (1-514) 343-5755; e-mail: royala@ere.umontreal.ca

Abbreviations: β Gal, β -galactosidase; bp, base pair(s); BSA, bovine serum albumin; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; cDNA, DNA complementary to RNA; DMS, dimethylsulfate; ds, double strand(ed);

EtdBr, ethidium bromide; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; HSV, Herpes simplex virus; IF, intermediate filament; MI, methylation interference; nt, nucleotide(s); oligo, oligodeoxyribonucleotide; PAGE, polyacrylamide-gel electrophoresis; PBS, phosphate-buffered saline (140 mM NaCl/2.7 mM KCl/8 mM Na₂HPO₄/1.5 mM KH₂PO₄ pH 7.4); *PER*, sites on *Prph* DNA; Prph, peripherin; *Prph*, gene (DNA) encoding Prph; *TK*, thymidine kinase-encoding gene; wt, wild-type; [], denotes plasmid-carrier state.

nestin (Lendhal et al., 1990), α -internexin (Fliegner et al., 1990), plasticin (Glasgow et al., 1992), tanabin (Hemmati-Brinvalou et al., 1992) and *Prph* (Portier et al., 1982; Parysek and Goldman, 1987; Greene, 1989) are synthesized in specific groups of neurons. The *Prph* gene is expressed in all peripheral nervous system neurons, most cranial nerves, ventral horn motor neurons and a few neurons in specific nuclei in the hindbrain and midbrain (Parysek and Goldman, 1988; Brody et al., 1989).

To determine the mechanism responsible for the cell-type-specific expression of the *Prph* gene, we have analyzed its promoter (Desmarais et al., 1992). Three protein-binding sequences named *PER1*, *PER2* and *PER3* were identified in the first 98 bp of the gene promoter. *PER1* which overlaps the TATA box, is the most important for cell-type-specific activation but it is inactive in the absence of other activator sequences. By contrast, *PER2* and *PER3* are important determinants of the level of gene expression (Desmarais et al., 1992). However, when placed in another context, upstream from the minimal HSV-1 *TK* gene promoter, the two elements had little effect on gene expression. In these experiments, *PER2* was not distinguished from *PER3*. However, the later appeared potentially more important because it is conserved in the mouse, rat and human *Prph* genes.

Here we report the results of experiments designed to clarify the importance of *PER2* and *PER3* in *Prph* gene activation. Our results indicate that *PER3* is a stronger *cis*-acting activator than *PER2*, and that it plays a central role in the activation of *Prph* gene expression in neuronal cells. Also, we show that *PER3* interacts with Sp1 *in vitro* and *in vivo*.

RESULTS AND DISCUSSION

(a) The *PER3* element is a strong *cis*-acting activator which contains a Sp1-binding site

To determine the relative strengths of *PER2* and *PER3*, we inserted each element upstream from position -46 in pGAL46. The resulting plasmids, pGAL46-*PER2* and pGAL46-*PER3*, were then transfected into *Prph*-expressing N18TG2 cells. As expected from our previous experiments, pGAL46 was inactive and pGAL98, which contains *PER2* and *PER3* in their natural configuration, had a relatively high β Gal activity (Desmarais et al., 1992; see also Fig. 1). The β Gal activities of pGAL46-*PER2* and pGAL46-*PER3* were 14 and 72% of pGAL98, respectively (Fig. 1). These results indicate that the two elements act independently rather than synergistically and that *PER3* is a stronger activator than *PER2*. The constructs were also transfected in cell lines that do not express *Prph*. In all these experiments no activity above background was ever detected (data not shown).

Transfection of pGAL46-*PER3* containing only *PER3* and *PER1* elements resulted in a 25-fold increase over the level observed with *PER1* alone (pGAL46) which was essentially at background level (Fig. 1). This is to be contrasted with the results obtained when *PER3* and *PER2* were placed upstream from the promoter of the HSV-1 *TK* gene (Desmarais et al., 1992). In that context, *PER2* and *PER3* showed little activity. The experiments described here and in our previous paper (Desmarais et al., 1992) therefore suggest strongly that the activity of the *PER3*-binding protein depends on interactions with proteins binding in the 46-bp core promoter. This sequence, previously shown to determine cell-type specificity of expression, contains element *PER1* which surrounds the TATA box.

To characterize the *PER3* DNA-binding site, we used a ds oligo corresponding to nt -90 to -67 of the *Prph* promoter. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were then carried out using nuclear extract proteins from N18TG2, PC12 and NG108 cells which express *Prph* and NIH3T3 and OBL24 cells which do not express it. In all cell lines tested, one major complex as well as one minor complex were observed (Fig. 2A). This indicates that the proteins binding *PER3* are ubiquitous. The minor complex probably resulted from protein degradation since it was not present in all experiments and seemed to have the same properties as the major complex (Figs. 2A, 3 and data not shown). The complexes were specifically competed by addition of an excess of unlabeled ds *PER3* oligo (Fig. 2A, lanes 2, 5, 8, 11 and 14). As *PER3* contains a motif which resembles the consensus binding site of transcription factor Sp1 (Kadonaga et al., 1986), we tested the ability of an oligo containing a Sp1-binding site (Fig. 2B) to compete with *PER3* in EMSA. As shown in Fig. 2A (lanes 3, 6, 9, 12 and 15), the Sp1-binding sequence prevented formation of the complexes. When used as probe with N18TG2 nuclear extract proteins, the Sp1-binding site formed one major complex which comigrated with the *PER3* complex (Fig. 3A, compare lanes 1 and 6). This complex was not formed in the presence of an excess of unlabeled *PER3* or Sp1-binding oligos (Fig. 3A, lanes 7 and 8). These results suggest that *PER3* contains a Sp1-binding site. To confirm this hypothesis, we designed two other ds oligos, *PER3d5* and *PER3M-1*. *PER3d5* has a 4-bp deletion upstream and 1-bp deletion downstream from the Sp1-binding site giving an oligo of the same size as the Sp1-binding oligo (Fig. 2B). *PER3M-1* has a 3-bp mutation (Fig. 2B) at a position known to be critical for the binding of Sp1 (Letovsky et Dynan, 1989). When used as competitors in EMSA, *PER3M-1* was unable to prevent protein binding to the *PER3* probe or to the Sp1-binding sequence (Fig. 3A, lanes 2 and 9) while *PER3d5* prevented protein binding

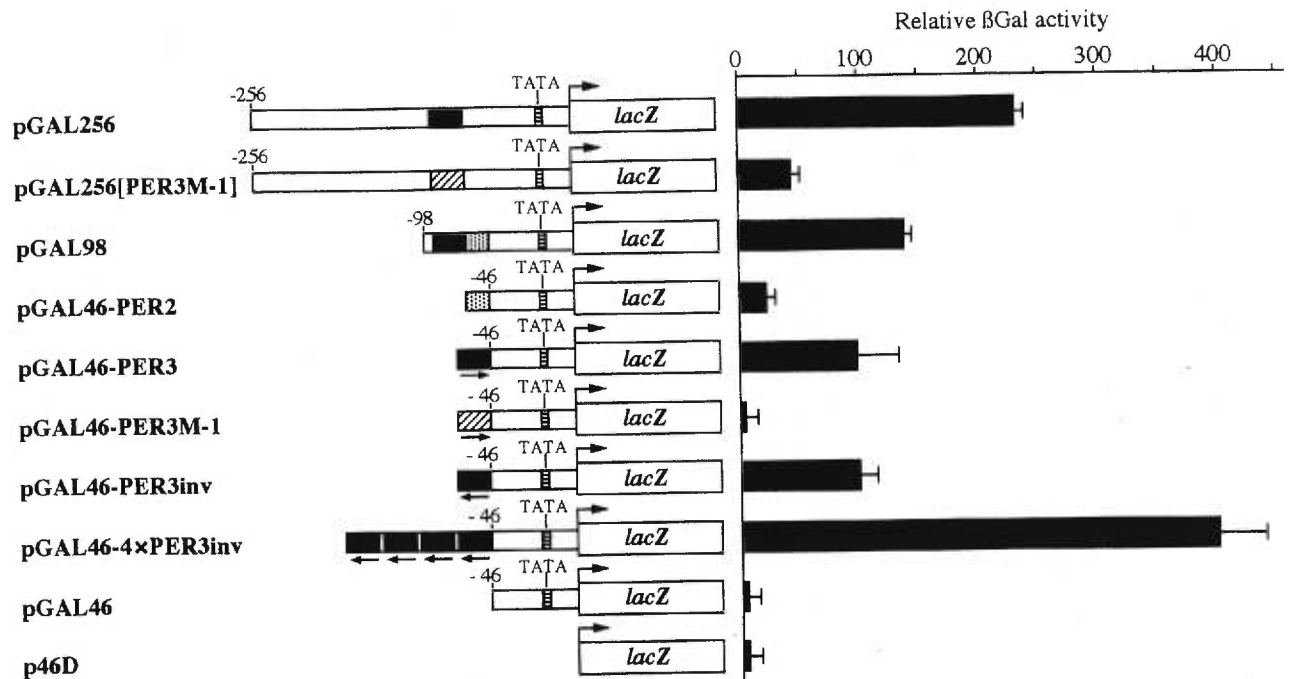


Fig. 1. Functional analysis of *PER2* and *PER3*. β Gal activities were normalized to the pSV2CAT control and expressed relative to the activity of pGAL46-*PER3* set at 100%. pGAL46 β Gal activity was similar to background level obtained with the promoterless plasmid p46D. The regulatory elements, *PER3* (black box), *PER2* (dotted box) and the TATA box are indicated. Arrows show the orientation of the regulatory elements. The hybrid constructs p46D, pGAL46, pGAL98 and pGAL256 in which expression of the bacterial *lacZ* gene was placed under the control of the *Prph* gene promoter have been described (Desmarais et al., 1992). pGAL46-*PER2* and pGAL46-*PER3* were constructed by insertion of *PER2* (5'-TGCCCCCCCCACCCCCCTCCCC) or *PER3* (5'-TCAGGCCAGTGGGAGGAGCTGTGC) at the *EcoRI* site of pGAL46, next to nt -46 of the *Prph* gene promoter, respectively. The *PER3* element, in one or four copies, was inserted in an inverted orientation at the *EcoRI* site of pGAL46 to generate pGAL46-*PER3inv* and pGAL46-4 \times *PER3inv* respectively. In pGAL46-4 \times *PER3inv*, 4 \times stands for tetramer. The *PER3M-1* mutation was inserted by site-directed mutagenesis (Ito et al., 1991) in pGAL256 to generate pGAL256[*PER3M-1*]. The plasmids used in transfection experiments were purified by alkaline lysis and one round of CsCl density gradient sedimentation in the presence of EtdBr. N18TG2 cells were cultured as described (Desmarais et al., 1992) and transfected using the Ca-phosphate precipitation method (Rosenthal, 1987). Briefly, the Ca-phosphate precipitate mixture containing 15 μ g of *Prph-lacZ* constructs and 5 μ g of pSV2CAT as control was added to the cells. After 8 h, the medium was removed and 15% glycerol in PBS was added to the cells for 1 min. β Gal and CAT activities were determined as described before (Desmarais et al., 1992). Transfection experiments were repeated at least four times and the results are expressed as the mean of β Gal activities obtained.

involving both the *PER3* and the Sp1-binding probes (Fig. 3A, lanes 3 and 10). Moreover, *PER3M-1* was unable to bind any protein in EMSA by contrast to *PER3d5* which elicited a gel-retardation pattern identical to the one involving the *PER3* and the Sp1-binding probes (data not shown). These experiments indicate that *PER3* contains a Sp1 motif implicated in the formation of a complex with proteins.

(b) Proteins that interact with *PER3* are related to Sp1

The presence of a Sp1 motif in *PER3* and the competition experiments suggest that the protein which binds at that site is related to Sp1. Since Sp1 binds DNA through a zinc-finger domain and this activity requires Zn^{2+} as cofactor (Kadonaga et al., 1987; Kuwahara et al., 1993), we first examined the effect of divalent cations chelation on the formation of a DNA-protein complex. We performed EMSA in the presence of EDTA or EGTA with *PER3* and Sp1-binding probes. Both chelating agents

interfered considerably with the formation of complexes involving *PER3* (Fig. 3A, lanes 4 and 5) or the Sp1-binding sequence (Fig. 3A, lanes 11 and 12). However, they had no effect on the formation of complexes with a probe containing a CCAAT-binding site (data not shown). These results indicate that, like Sp1, the protein binding *PER3* requires divalent cations for DNA-binding activity. Second, we investigated the capacity of purified human Sp1 to bind *PER3* in EMSA. The results indicate that Sp1 recognizes *PER3* and produces a complex that comigrates with the one formed with N18TG2 nuclear extract proteins (Fig. 3B, compare lanes 1 and 2). The interaction of Sp1 with *PER3* was prevented by addition of unlabeled *PER3* (Fig. 3B, lane 3) or Sp1-binding sequence (Fig. 3B, lane 4). As expected, when purified Sp1 and the Sp1-binding probe were used, the gel retardation pattern obtained was similar to the one observed with *PER3* (Fig. 3B, lane 7). Third, we compared the binding sequence specificity of the proteins

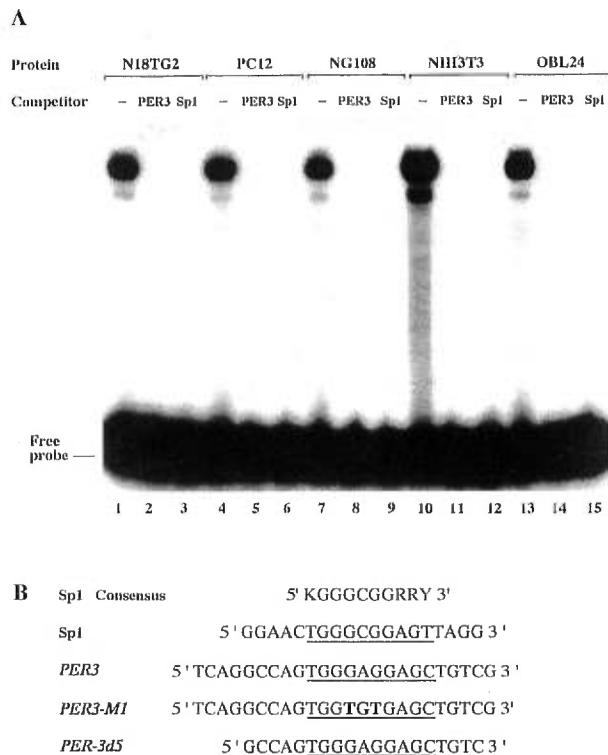


Fig. 2. Gel-retardation analysis of *PER3* interactions. (A) EMSA using 1 ng of labeled *PER3* oligo and 5 μ g of nuclear extract proteins from indicated cell lines. Competition experiments were performed by adding 100 ng of unlabeled ds *PER3* (lanes 2, 5, 8, 11 and 14) or Sp1-binding (lanes 3, 6, 9, 12 and 15) oligos to the mixture prior to probe addition. (B) Oligos used as probes or as unlabeled competitors. The Sp1-like motif in *PER3* is underlined. Purines are indicated by R and pyrimidines by Y; K signifies G or T. Mutated bases in *PER3M-1* are in bold. N18TG2, PC12, NG108, NIH3T3 and OBL24 cell lines were grown as previously described (Desmarais et al., 1992) and nuclear extracts were prepared essentially by the method of Dignam (1983). The *PER3d5* oligo was radiolabeled with [γ - 32 P]ATP and T4 polynucleotide kinase and purified by 8% PAGE. EMSA were carried out as described previously (Desmarais et al., 1992).

forming the *PER3* complex with that of Sp1 using a MI assay. As shown in Fig. 4 (lanes 1–3), the binding of nuclear proteins from N18TG2 cells to *PER3* was dependent on contacts on 6 G and 1 A residues within the Sp1 motif. Purified Sp1 made the same contacts (Fig. 4 lanes 4–6). These results suggest that N18TG2 nuclear extract proteins and Sp1 bind *PER3* in a similar manner. Finally, to confirm that Sp1 is part of the *PER3* DNA-binding complex, we used an anti-Sp1 antibody in EMSA. As shown in Fig. 3B, addition of the anti-Sp1 antibody resulted in a supershift of the DNA-protein complex involving the *PER3* probe (compare lanes 1 and 5) as well as the Sp1-binding probe (lane 6). Together, these results indicate that the *PER3* DNA-protein complex involves Sp1 or proteins immunologically and biochemically related to Sp1.

(c) The Sp1-binding site of *PER3* is essential for transcriptional activation in vivo

The experiments described in sections a and b establish that *PER3* contains a Sp1 motif and that it plays an important role in the activation of the *Prph* gene. We then examined the influence of mutations inactivating in vitro the Sp1 activity of *PER3* on reporter gene expression in transient transfection assays. We introduced a 3-bp mutation which prevents the binding of Sp1 to *PER3* into pGAL46-*PER3* and pGAL256. Plasmid pGAL256 was used because it contains the *Prph* promoter fragment with the stronger activity in transient transfections (Desmarais et al., 1992). The resulting plasmids, pGAL46-*PER3M-1* and pGAL256[*PER3M-1*], were then transfected into N18TG2 cells. The β Gal activity of pGAL256[*PER3M-1*] was only 20% of that obtained with pGAL256 (Fig. 1) and pGAL46-*PER3M-1* was almost inactive. These results confirm the importance of *PER3* and are consistent with the notion that its activity depends on the interaction with Sp1. Since the activity of Sp1 is not affected by the orientation of the sequence to which it binds (Kadonaga et al., 1986), we examined how the activity of *PER3* was affected by such a change. As shown in Fig. 1, a construct containing *PER3* in the reverse orientation, pGAL46-*PER3inv*, results in the same β Gal activity than pGAL46-*PER3*. Thus, with respect to orientation, *PER3* behaves as a Sp1-binding sequence. In addition, multimerization of the inverted sequence in pGAL46-4 \times *PER3inv* increased the activity proportionally to the number of copies of *PER3*. In this respect, *PER3* functions independently, like the Sp1-binding sites of the SV40 early promoter region (Barrera-Saldaña et al., 1985; Gidoni et al., 1985) rather than synergistically as described for other promoters (Courey et al., 1989; Pascal and Tjian, 1991).

(d) Sp1 overexpression increases transcription from a *PER3* containing promoter

Finally, to confirm that Sp1 could interact with *PER3* in vivo, we determined how the expression of reporter genes was affected by co-transfection of a plasmid expressing Sp1. To this end, we used pRSVSp1, a plasmid expressing the rat Sp1 (Imataka et al., 1992), and as control, pRSV(*Xho1*), a plasmid from which the Sp1-encoding sequence has been deleted. As expected from our previous experiments, co-transfection of each of these two plasmids with pGAL46 had no effect on the level of transcription (Fig. 5). However, co-transfection of pGAL46-*PER3* with pRSVSp1 resulted in a twofold increase in the β Gal activity, when compared to the co-transfection of pGAL46-*PER3* with pRSV(*Xho1*) (Fig. 5). Sp1 overexpression had a similar effect on pGAL46-Sp1, a construct that contains the SV40

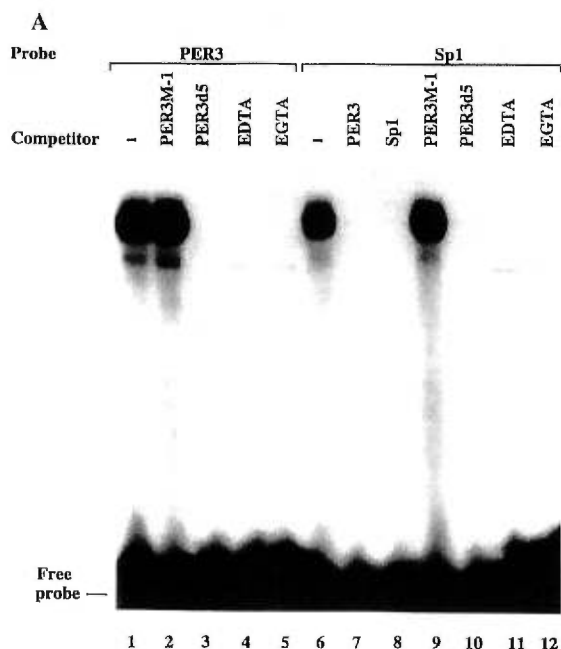


Fig. 3

Fig. 3. Characterization of the complex formed with *PER3* by EMSA. (A) 5 μ g of N18TG2 nuclear extract proteins were incubated with the *PER3* (lanes 1–5) or the Sp1-binding (lanes 6–12) probes as described in the legend to Fig. 2. 100 ng of unlabeled ds *PER3M-1* (lanes 2 and 9), *PER3d5* (lanes 3 and 10), *PER3* (lane 7) or Sp1-binding (lane 8) oligos were included as competitors. For binding inhibition assays, 40 mM EDTA (lanes 4 and 11) or 40 mM EGTA (lanes 5 and 12) was included in the DNA binding reaction. (B) 5 μ g of N18TG2 nuclear extracts (lanes 1, 5 and 6) or 15 ng of human purified Sp1 (Promega, Madison, WI, USA) (lanes 2, 3, 4 and 7) were used in DNA-binding reactions with the *PER3* (lanes 1–5) or the Sp1-binding (lanes 6 and 7) probes. For experiments using purified Sp1, the binding buffer was brought to 100 μ M ZnCl₂ and 0.25 μ g BSA. Competition experiments were performed by adding 100 ng of unlabeled ds oligo containing the *PER3* (lane 3) or the Sp1-binding elements (lane 4) to the mixture prior to probe addition. For supershift assays, binding reactions were pre-incubated 1.5 h at 4°C in the presence (+) or absence (–) of 1 μ g of polyclonal human anti-Sp1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) prior to addition of the probes.

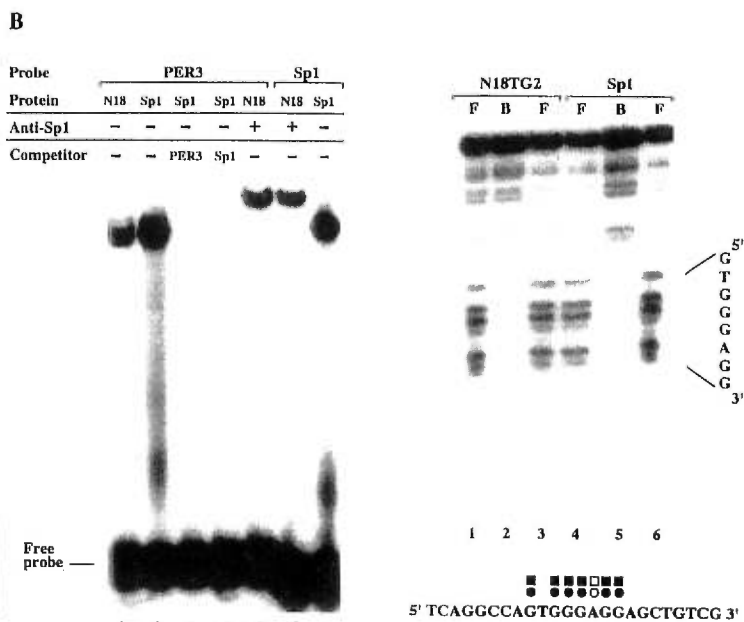


Fig. 4

Fig. 4. Methylation interference (MI) analysis of *PER3*. The *PER3* element was 3'-end labeled on the coding strand, partially methylated with DMS and added to a scaled-up binding reaction containing either 75 μ g of N18TG2 nuclear extracts (lanes 1–3) or 180 ng of purified Sp1 (lanes 4–6). The MI patterns are summarized at the bottom of the figure. Residues at which methylation interfered with protein binding are indicated. Solid symbols represent a greater degree of interference than hollow symbols. Circles, N18TG2 nuclear extract proteins; squares, purified human Sp1. The MI experiments were performed only with the 3'-end labeled coding strand of *PER3*. The *PER3* element was cloned in the *Sma*I site of pBluescriptIIISK+. For end-labeling, the plasmid was digested with *Eco*RI and incubated in the presence of DNA polymerase I Klenow fragment and [α -³²P]dATP. After digestion with *Bam*HI, a 38-bp fragment containing labeled *PER3* at the 3'-end of the coding strand was purified by 8% PAGE. The fragment was then partially methylated with 1 μ l of DMS at 22°C for 8 min (Maxam and Gilbert, 1980) and MI was performed as described before (Desmarais et al., 1992). Free (F) and bound (B) DNA were separated by native gel electrophoresis, purified and cleaved with NaOH. An equal number of radioactive counts of free and bound DNA were analyzed by denaturing gel electrophoresis.

Sp1-binding site III, upstream from the *Prph* core promoter (Fig. 5). Although the hybrid plasmids pGAL46-*PER3* and pGAL46-Sp1 can be efficiently activated by Sp1, the β Gal activity of pGAL46-Sp1 was higher than pGAL46-*PER3*, suggesting that the SV40 Sp1-binding site III has more affinity for Sp1 than *PER3*. This observation is consistent with the known decrease in affinity observed when the C residue on the consensus Sp1-binding site is replaced by an A residue (Letovsky and Dynan, 1989) as in *PER3*.

(e) Conclusions

(1) The experiments described here provide evidences that Sp1 interacts with the proximal promoter of the *Prph*

gene in vitro: first, the ubiquitous complex formed by *PER3* and nuclear proteins involves the Sp1 motif of *PER3*; second, complex formation is dependent on divalent cations; third, purified human Sp1 transcription factor binds *PER3* and causes a gel shift identical to the one produced by nuclear proteins; fourth, addition of anti-Sp1 antibody in EMSA results in a supershift. Recent works have shown that GC and GT boxes are recognized by a family of factors containing at least four members designated Sp1, Sp2, Sp3/SPR-2 and Sp4/SPR-1 (Kadonaga et al., 1986; Kingsley and Winoto, 1989; Hagen et al., 1992). All four have similar structures including a DNA binding domain, Gln-rich transactivation domains and domains for post-translational modifi-

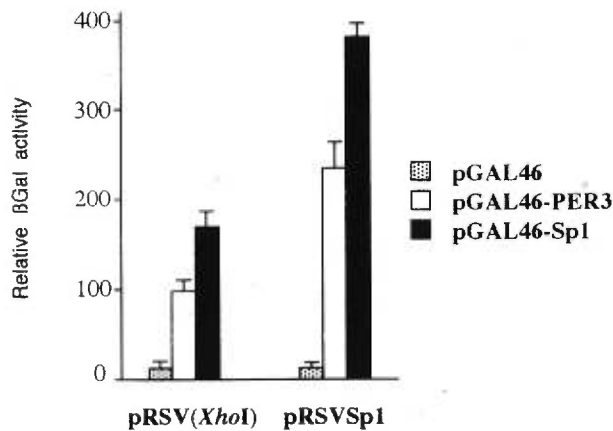


Fig. 5. Effect of overexpression of Sp1 on a *PER3* containing promoter in transfection experiments. In co-transfection experiments, 15 μ g of pGAL46, or pGAL46-PER3, or pGAL46-Sp1 were co-transfected with 5 μ g of pRSV(*XhoI*) or pRSVSp1 (as indicated) into N18TG2 cells. β Gal activities are expressed relative to the activity of pGAL46-PER3 set at 100%. Co-transfection experiments were repeated at least four times and the results are expressed as the mean of β Gal activities obtained. Plasmids pGAL46 and pGAL46-PER3 are described in Fig. 1. pGAL46-Sp1 was generated by inserting the Sp1 SV40 early promoter site III (5'-GGAAGTGGGCGGAGTTAGG; Dynan and Tjian, 1983) at the *EcoRI* site of pGAL46. pRSVSp1 plasmid contains the complete rat Sp1 cDNA and this cDNA (Imataka et al., 1992) is deleted in pRSV(*XhoI*). In these experiments, the pSV2CAT control was omitted because its expression is stimulated by Sp1.

cations (Kadonaga et al., 1987; Courey and Tjian, 1988; Jackson et al., 1990). Two other transcription factors highly homologous to Sp1 in their DNA-binding domains, were described. These two factors, BTEB (Imataka et al., 1992) and Btd (Wimmer et al., 1993), have the same binding site specificity as the members of the Sp1 family. The properties of these factors predict that they would be able to bind to *PER3*. We cannot draw any conclusions about their presence or absence in the complex observed in EMSA, because the specificity of the anti-Sp1 antibody that we have used relative to other members of the Sp1 family has not been documented. Other experimental approaches will therefore be necessary to establish which of these factors interact with *PER3* in vivo and to determine how they affect *Prph* gene expression.

(2) Mutations that abrogate the capacity of *PER3* to form a complex with nuclear proteins also abrogate transcriptional activity in transient transfection experiments. In addition, in vivo elevation of Sp1 concentration increases expression from a *PER3*-containing promoter. Thus, the binding of this factor to the Sp1 motif within *PER3* is involved in transcriptional activation of the *Prph* gene in vivo. This raises questions about the role and mechanism of action of Sp1 in cell-type-specific expression of the *Prph* gene. Recent studies have shown that Sp1 can interact with a number of transcription factors

including the TATA-binding protein (Emili et al., 1994) and some of its associated factors (Gill et al., 1994). Also cooperative interactions between Sp1 and transcription factors, such as E2, NF- κ B and Ets, can mediate synergistic activation of transcription (Li et al., 1993; Perkins et al., 1993; Gégonne et al., 1993). More relevant to the situation found in the *Prph* gene promoter, Sp1 has been shown to cooperate in the control of tissue-specific gene expression. This is the case of the cardiac α -actin and of the acetylcholine receptor α -subunit genes in muscle cells where Sp1 cooperates with myogenic factors (Bessereau et al., 1993). It was also reported in studies of the *CD11b* gene that a Sp1-binding site located at -60 bp in the promoter in combination with a *PUI-1*-binding site located at -20 bp were essential and sufficient for myeloid-specific promoter activity. Moreover, this Sp1-binding site was found to be occupied only in *CD11b*-expressing cell lines in vivo (Chen et al., 1993). On the basis of these observations, it is reasonable to postulate that interactions of Sp1 with the protein binding *PER1* are involved in the cell-type-specific control of *Prph* gene expression in a subset of neuronal cells. Experiments are now in progress to verify this hypothesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are particularly grateful to Dr Y. Fujii-Kuriyama (Kyoto University) for generously providing us with the rat Sp1 expressing plasmid pRSVSp1. We thank Dr Vahé Sarafian and Dr Mario Filion for critical reading of the manuscript. This work was supported by Bristol-Myers Squibb. D.D. was supported by a studentship from the Medical Research Council of Canada and A.R. by a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

- Barrera-Saldaña, H., Takahashi, K., Vigneron, M., Wilderman, A., Davidson, I. and Chambon, P.: All six GC-motifs of the SV40 early upstream element contribute to promoter activity in vivo and in vitro. *EMBO J.* 4 (1985) 3839-3849.
- Bessereau, J.-L., Mendelzon, D., LePoupon, C., Fiszman, M., Changeux, J.-P. and Piette, J.: Muscle-specific expression of the acetylcholine receptor alpha-subunit gene requires both positive and negative interactions between myogenic factors, Sp1 and GBF factors. *EMBO J.* 12 (1993) 443-449.
- Brody, B.A., Ley, C.A. and Parysek, L.M.: Selective distribution of the 57 kDa neural intermediate filament protein in the rat CNS. *J. Neurosci.* 9 (1989) 2391-2401.
- Chen, H.-M., Pahl, H.L., Scheibe, R.J., Zhang, D.-E. and Tenen, D.G.: The Sp1 transcription factor binds the CD11b promoter specifically in myeloid cells in vivo and is essential for myeloid-specific promoter activity. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 8230-8239.

- Courey, A.J. and Tjian, R.: Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* 55 (1988) 887–898.
- Courey, A.J., Holtzman, D.A., Jackson, S.P. and Tjian, R.: Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell* 59 (1989) 827–836.
- Desmarais, D., Filion, M., Lapointe, L. and Royal, A.: Cell-specific transcription of the peripherin gene in neuronal cell lines involves a cis-acting element surrounding the TATA box. *EMBO J.* 11 (1992) 2971–2980.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. and Roeder, R.G.: Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 1475–1489.
- Dynan, W.S. and Tjian, R.: The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in SV40 early promoter. *Cell* 35 (1983) 79–87.
- Emili, A., Greenblatt, J. and Ingles, C.J.: Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 1582–1593.
- Fliegner, K.H., Ching, G.Y. and Liem, R.K.: The predicted amino acid sequence of alpha-internexin is that of a novel neuronal intermediate filament protein. *EMBO J.* 9 (1990) 749–755.
- Gégonne, A., Bosselut, R., Bailly, R.-A. and Ghysdael, J.: Synergistic activation of the HTLV1 LTR Ets-responsive region by transcription factors Ets1 and Sp1. *EMBO J.* 12 (1993) 1169–1178.
- Gidoni, D., Kadonaga, J.T., Barrera-Saldaña, H., Takahashi, K., Chambon, P. and Tjian, R.: Bidirectional SV40 transcription mediated by tandem Sp1 binding interactions. *Science* 230 (1985) 511–517.
- Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z.H. and Tjian, R.: A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the *Drosophila* TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 192–196.
- Glasgow, E., Druger, R.K., Levine, E.M., Fuchs, C. and Schechter, N.: Plasticin, a novel type III neurofilament protein from goldfish retina: increased expression during optic nerve regeneration. *Neuron* 9 (1992) 373–381.
- Greene, L.A.: A new neuronal intermediate filament protein. *Trends Neurosci.* 12 (1989) 228–230.
- Hagen, G., Müller, S., Beato, M. and Suske, G.: Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 5519–5525.
- Hemmati-Brivanlou, A., Mann, R.W. and Harland, R.M.: A protein expressed in the growth cones of embryonic vertebrate neurons defines a new class of intermediate filament protein. *Neuron* 9 (1992) 417–428.
- Imataka, H., Sogawa, K., Yasumoto, K., Kikuchi, Y., Sasano, K., Kobayashi, A., Hayami, M. and Fujii-Kuriyama, Y.: Two regulatory proteins that bind to the basic transcription element (BTE), a GC box sequence in the promoter region of the rat P-4501A1 gene. *EMBO J.* 11 (1992) 3663–3671.
- Ito, W., Ishiguro, H. and Kurosawa, Y.: A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene* 102 (1991) 67–70.
- Jackson, S.P., MacDonald, J.J., Lees-Miller, S. and Tjian, R.: GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell* 63 (1990) 155–165.
- Kadonaga, J.T., Jones, A.K. and Tjian, R.: Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Sp1. *Trends Biochem. Sci.* 11 (1986) 20–23.
- Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R. and Tjian, R.: Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51 (1987) 1079–1090.
- Kingsley, C. and Winoto, A.: Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 12 (1992) 4251–4261.
- Kuwahara, J., Yonezawa, A., Futamura, M. and Sugiura, Y.: Binding of transcription factor Sp1 to GC box DNA revealed by footprinting analysis: different contact of three zinc fingers and sequence recognition mode. *Biochemistry* 32 (1993) 5994–6001.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B. and McKay, R.D.G.: CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60 (1990) 585–595.
- Letovsky, J. and Dynan, W.S.: Measurement of the binding of transcription factor Sp1 to a single GC box recognition sequence. *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 2639–2653.
- Li, R., Knight, J.D., Jackson, S.P., Tjian, R. and Botchan, M.R.: Direct interaction between Sp1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription. *Cell* 65 (1991) 493–505.
- Maxam, A.M. and Gilbert, W.: Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65 (1980) 499–560.
- Parysek, L.M. and Goldman, R.D.: Characterization of intermediate filaments in PC12 cells. *J. Neurosci.* 7 (1987) 781–791.
- Parysek, L.M., Chisholm, R.L., Ley, C.A. and Goldman, R.D.: A type III intermediate filament gene is expressed in mature neurons. *Neuron* (1988) 395–401.
- Pascal, E. and Tjian, R.: Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev.* 5 (1991) 1646–1656.
- Perkins, N.D., Edwards, N.L., Duckett, C.S., Agranoff, A.B., Schmid, R.M. and Nabel, G.J.: A cooperative interaction between NF- κ B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J.* 12 (1993) 3551–3558.
- Portier, M.M., Croizat, B. and Gros, F.: A sequence of changes in cytoskeletal components during neuroblastoma differentiation. *FEBS Lett.* 146 (1982) 283–288.
- Rosenthal, N.: Identification of regulatory elements of cloned genes with functional assays. *Methods Enzymol.* 152 (1987) 704–720.
- Steinert, P.M. and Roop, D.R.: Molecular and cellular biology of intermediate filament. *Annu. Rev. Biochem.* 57 (1988) 593–625.
- Wimmer, E.A., Jäckle, H., Pfeiffe, C. and Cohen, S.M.: A *Drosophila* homologue of human Sp1 is a head-specific segmentation gene. *Nature* 366 (1993) 690–694.

CHAPITRE 3

3.1 ANALYSE DE LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE DU GÈNE DE LA PÉRIPHÉRINE

Les travaux visant à déterminer le rôle du promoteur du gène de la périphérine dans la régulation de l'expression du gène (voir chapitre 2, page 54; Desmarais *et al.*, 1992; Desmarais et Royal, 1996) ont montré que le promoteur est essentiel afin de dicter l'histospécificité de l'expression et assurer un niveau minimal d'activité transcriptionnelle. Ces résultats corroborent ceux obtenus à l'aide de modèles de souris transgéniques dans lesquelles on a étudié le profil d'expression des gènes périphérine de rat (Belecky-Adams *et al.*, 1993) et de souris (Leconte *et al.*, 1996). Deux observations principales découlent de l'étude de Belecky-Adams et collaborateurs. Premièrement, il a été démontré qu'un fragment de 5,8 kb du promoteur du gène de la périphérine de rat était suffisant pour dicter la spécificité neuronale du gène *LacZ*. Toutefois, le profil d'expression du transgène ne suivait pas parfaitement le profil d'expression de la périphérine endogène. Dans certaines cellules qui expriment normalement le gène, l'expression du transgène n'était pas détectée. Au cours du développement, le profil d'expression temporel du transgène était comparable à celui de la périphérine. Le profil d'expression du transgène approchait presque parfaitement celui de la périphérine exclusivement lorsque le transgène comprenait, en plus du fragment de 5,8 kb du promoteur, le gène de la périphérine entier comprenant les séquences introniques. Deuxièmement, l'analyse des souris transgéniques après qu'elles aient subi une lésion du nerf sciatique (par écrasement du nerf) a révélé que l'induction de l'expression du transgène ne s'observait que lorsque le transgène comprenait les séquences intragéniques. Par conséquent, des séquences intragéniques semblent nécessaires pour assurer un profil d'expression histospécifique complet et pour permettre l'induction du gène en réponse à une lésion. Dans cette optique, nous sommes allés à la recherche de

séquences intragéniques susceptibles d'intervenir dans la liaison de facteurs de transcription importants pour la régulation de l'histospecificité et pour l'induction du gène de la périphérine en réponse à une lésion.

3.1.1 Détection de sites hypersensibles à la DNase I à l'intérieur du gène de la périphérine

L'analyse de la structure de la chromatine par la détection de sites hypersensibles à la DNase I («hypersensitive sites», HSS) permet de déceler des régions de l'ADN susceptibles de lier des protéines, en particulier des facteurs de transcription (Wu *et al.*, 1979; Groudine et Weintraub, 1981). Ceci découle d'observations qui indiquent qu'un gène transcriptionnellement actif présente dans son voisinage une structure de la chromatine dite «sensible» à la digestion par la DNase I et que cette sensibilité est plus grande que celle d'un gène inactif (Weintraub et Groudine, 1976; Wood et Felsenfeld, 1982). Par ailleurs, l'association de facteurs de transcription avec leurs séquences d'ADN dans le promoteur d'un gène a pour conséquence d'augmenter cette sensibilité à la DNase I dans cette région, région que l'on désigne alors «hypersensible» à la DNase I (Herrera *et al.*, 1989). Des régions hypersensibles à la DNase I reflètent donc la présence de séquences d'ADN importantes telles les promoteurs, les activateurs de type «enhancers», les éléments de contrôle d'un locus (LCR), les répresseurs transcriptionnels ou «silencers», les origines de réplication, les éléments de recombinaison et des sites structuraux aux alentours ou à l'intérieur des télomères (Gross et Garrard, 1988). Ce type d'analyse a permis, entre autres, d'identifier des HSS importants pour la régulation de l'expression des gènes du locus de la globine (McGhee *et al.*, 1981; Weisbrod, 1982; Tuan *et al.*, 1985).

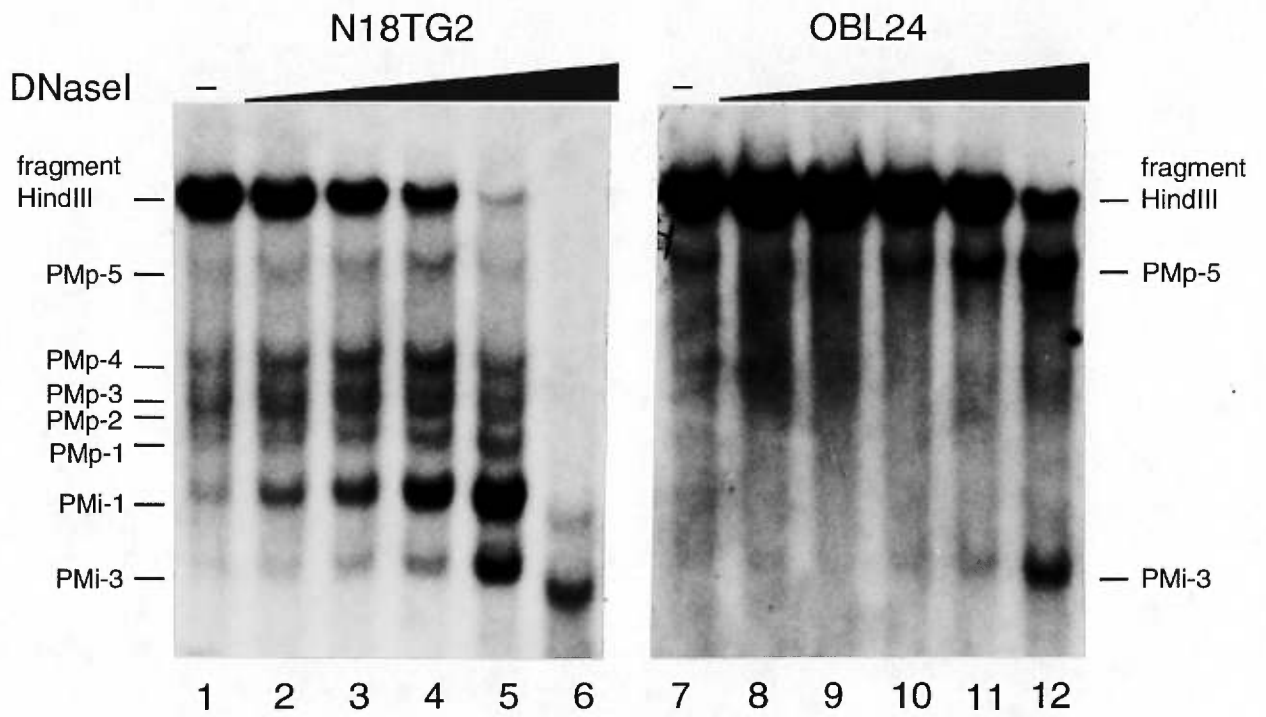
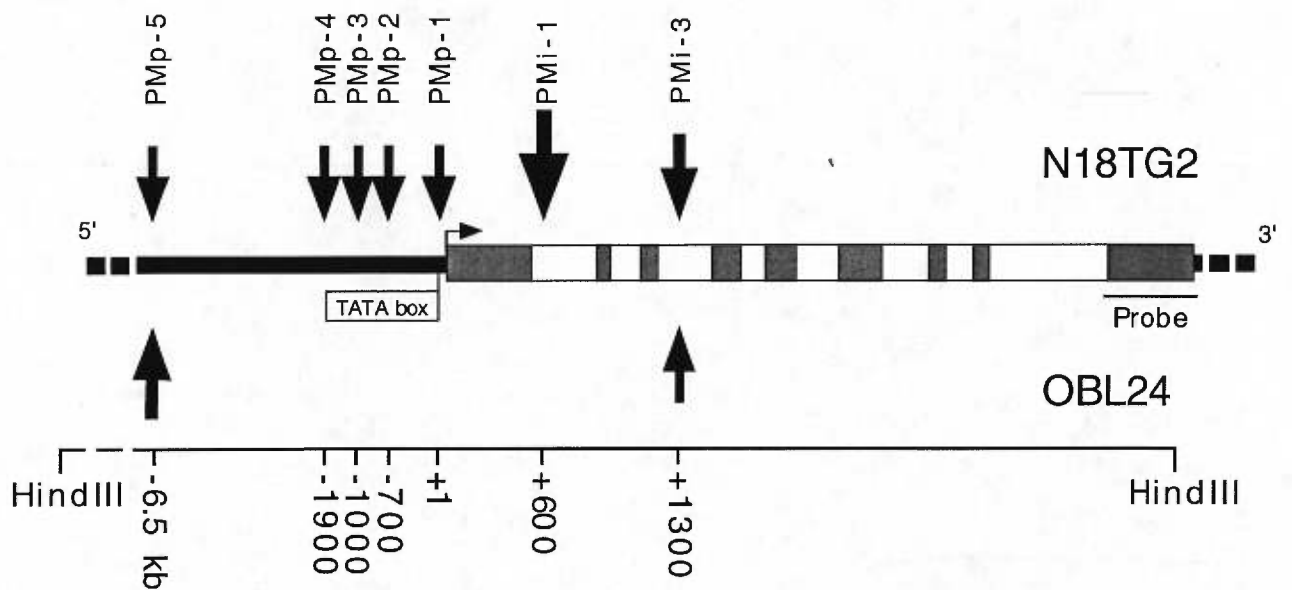
Nous avons analysé la structure de la chromatine dans le voisinage du gène de la périphérine en soumettant des noyaux de cellules N18TG2 à un traitement à la DNase I. Les cellules N18TG2 dérivent d'un neuroblastome de souris et expriment le gène de la périphérine. Les noyaux de ces cellules ont été isolés et traités avec des concentrations croissantes de DNase I. L'ADN a ensuite été purifié et digéré avec une enzyme de restriction puis fractionné par électrophorèse sur gel d'agarose. Après transfert de l'ADN sur membrane, celui-ci a été hybridé avec une sonde marquée spécifique à la périphérine de souris (pour un protocole détaillé, voir chapitre 4 section «Materials and Methods», page 101). Le domaine analysé correspond à un fragment de restriction HindIII de 18 kb comprenant le gène entier et 14,5 kb de la région 5' flanquant le gène. Les résultats de cette analyse montrent la présence de plusieurs HSS d'intensité variable (Figure 1A, pistes 1 à 6, page 69).

Parmi les sites HSS cartographiés, cinq sites désignés PMp-1 (PMp, Peripherin Mouse promoter 1), PMp-2, PMp-3, PMp-4 et PMp-5 ont été retrouvés en amont du gène et deux sites, PMi-1 (Peripherin Mouse intron 1) et PMi-3 ont été localisés à l'intérieur du gène dans les introns 1 et 3 respectivement (Figure 1A, piste 5, page 69). De plus, les sites PMi-1 et PMi-3 présentent une sensibilité plus grande pour la DNase I que les autres sites. L'emplacement du site PMp-1 coïncide avec la région du promoteur basal avec les éléments PER1, PER2, PER3, la boîte TATA et le site d'initiation de la transcription (Figure 1B, page 69). Ces résultats semblent bien démontrer que, dans les cellules N18TG2, la chromatine située en amont du gène de la périphérine présente une structure plus relâchée qui la rend plus sensible à la digestion par la DNase I suggérant par le fait même que cette propriété de la chromatine favorise la liaison de facteurs de transcription dans cette région. Ainsi, cette structure dite «ouverte» de la chromatine pourrait favoriser l'expression de la périphérine. Par ailleurs, la présence de sites HSS à l'intérieur des séquences introniques suggère la présence d'autant de sites pouvant lier des protéines telles que

des facteurs de transcription (Figure 1B, page 69). Ces résultats vont dans le même sens que ceux qui ont été obtenus par l'étude des souris transgéniques qui suggèraient l'implication de séquences intragéniques au niveau de l'histospécificité et de l'induction du gène (Belecky-Adams *et al.*, 1993; Leconte *et al.*, 1996).

Figure 1: Analyse de la structure de la chromatine du gène de la périphérine.

A) Les noyaux des cellules N18TG2 et OBL24 ont été traités avec des concentrations croissantes de DNase I (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1 et 2 µg/ml). L'ADN a ensuite été purifié et digéré par l'enzyme HindIII, séparé sur gel d'agarose, transféré sur membrane de nylon. L'ADN a été hybridé avec une sonde localisée dans l'exon 9 du gène. **B)** Localisation des sites HSS du gène de la périphérine. L'intensité des flèches est proportionnelle au niveau de sensibilité à la DNase I. La position approximative des sites HSS relativement au site d'initiation (flèche pliée) est indiquée en pb.

A**B**

3.1.2 Relation entre la structure de la chromatine du gène de la périphérine et son expression

Afin de déterminer la corrélation entre la structure de la chromatine et le profil d'expression de la périphérine, nous avons comparé le patron des sites HSS obtenu avec la lignée N18TG2 avec celui produit par l'analyse de la chromatine dans les cellules OBL24 qui n'expriment pas le gène de la périphérine. Une diminution frappante du nombre des sites HSS est observée dans les cellules OBL24 (Figure 1A, pistes 7 à 12, page 69). Seuls les sites PMp-5 et PMi-3 sont détectés dans ces cellules (Figure 1A, comparez les pistes 5 et 12, page 69). Ces résultats suggèrent que la structure de la chromatine du promoteur du gène de la périphérine est dans un état «fermé» dans les cellules qui n'expriment pas le gène comparativement à l'état «ouvert» dans celles qui l'expriment. Le patron histospécifique des sites concorde avec les résultats obtenus par transfections transitoires qui ont démontré que le promoteur de la périphérine était actif dans les cellules N18TG2 et non dans les cellules OBL24 (Desmarais *et al.*, 1992). De plus, la présence du site PMi-1, uniquement dans les cellules N18TG2, suggère qu'il puisse jouer un rôle au niveau de l'histospécificité de l'expression grâce à l'interaction avec des facteurs de transcription particuliers. Ceci vient renforcer l'hypothèse que des séquences intragéniques jouent un rôle particulier dans la régulation de l'histospécificité d'expression du gène tel que suggéré par le modèle de souris transgénique (Belecky-Adams *et al.*, 1993; Leconte *et al.*, 1996). La localisation particulière du site PMp-5 en amont du gène, à environ 6,5 kb du site d'initiation (Figure 1B, page 69), ne permet pas de statuer sur son rôle éventuel pour la régulation de l'expression de la périphérine. Ni les études par transgénèse ni les études par transfections transitoires n'incluaient de fragment du promoteur du gène d'une taille assez grande pour que le

site y soit inclus (Desmarais *et al.*, 1992; Belecky-Adams *et al.*, 1993; Leconte *et al.*, 1996).

3.2 RÔLE DE LA CHROMATINE DANS LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA PÉRIPHÉRINE

Dans les cellules N18TG2, est-ce la structure de la chromatine qui favorise la liaison de facteurs de transcription ou est-ce la présence de facteurs particuliers qui, en se liant à l'ADN, provoquent une modification de la structure de la chromatine permettant ainsi l'assemblage d'un complexe transcriptionnel? La capacité d'un facteur de transcription de reconnaître sa séquence de liaison dans l'ADN dépend des propriétés intrinsèques de la chromatine telles l'association intime avec les histones. Dans un tel cas, une structure ubiquitaire, le nucléosome, peut agir comme un répresseur spécifique en camouflant les sites de liaison des facteurs de transcription. L'acétylation des histones permet toutefois une réorganisation du nucléosome rendant l'ADN nucléosomal plus accessible aux facteurs de transcription (pour une revue, Wolffe et Pruss, 1996). D'ailleurs, il y a une corrélation entre le niveau d'acétylation des histones et l'activité transcriptionnelle d'un domaine chromosomique (Jeppesen et Turner, 1993).

D'autre part, certains facteurs de transcription possèdent la capacité d'outrepasser cette contrainte nucléosomiale. Par exemple, le récepteur des glucocorticoïdes et GAL4 peuvent lier l'ADN d'un nucléosome avec, comme conséquence, une réorganisation de la chromatine, ce qui potentialise la liaison d'autres facteurs de transcription ou de TFIID même en présence de nucléosomes (Perlmann et Wrangé, 1988; Piña *et al.*, 1990; Workman *et al.*, 1991; Workman et Kingston, 1992).

La présence conjointe de sites HSS dans les cellules qui expriment la périphérine et dans celles qui ne l'expriment pas soulève trois possibilités. Premièrement, ces sites communs pourraient intervenir dans la liaison de facteurs de transcription présents dans les deux lignées mais dont l'activité nécessite la présence d'autres facteurs à d'autres sites, par exemple, au niveau du promoteur ou de l'intron 1. Les facteurs se liant au promoteur ou à des séquences spécifiques de l'intron 1, seraient particuliers à une lignée qui exprime le gène de la périphérine. Deuxièmement, un site HSS pourrait contenir plus d'un site de liaison de protéines. Par exemple, la liaison d'une seule protéine aurait comme conséquence de maintenir la sensibilité de cette région à la DNase I. Toutefois, la propriété fonctionnelle de ce site pourrait dépendre de la liaison d'une autre protéine à un site contigu, protéine qui serait présente exclusivement dans la lignée qui exprime le gène. Finalement, ces sites pourraient correspondre à des sites de liaison de protéines importantes pour d'autres fonctions indépendantes de l'expression du gène, telles la réplication ou l'attachement de la chromatine à la matrice nucléaire. Plusieurs évidences permettent d'associer les régions d'attachement à la matrice nucléaire (MAR) à une fonction au niveau de la transcription des gènes (Cockerill et Garrard, 1986; Gasser et Laemmli, 1986; Forrester *et al.*, 1994; Aronow *et al.*, 1995). Les MAR permettraient de maintenir un état «fermé» de la chromatine au niveau du promoteur empêchant ainsi la progression de la transcription ou même l'assemblage d'un complexe transcriptionnel. Dans les cellules N18TG2, par exemple, un tel effet des MAR pourrait être contrecarré par l'activité de facteurs de transcription particuliers à cette lignée.

En résumé, l'état de la structure de la chromatine semble corrélérer avec l'activité transcriptionnelle du gène de la périphérine. En effet, le patron histospécifique des HSS dans le promoteur correspond au profil histospécifique de l'expression du gène de la périphérine. La présence de sites HSS à l'intérieur du

gène de la périphérine suggère que ces sites sont également impliqués dans la régulation de l'expression du gène. Comme l'ont suggéré les résultats obtenus à l'aide de l'étude par transgénèse (Belecky-Adams *et al.*, 1993; Leconte *et al.*, 1996), ces sites pourraient avoir une fonction au niveau de l'histospecificité de l'expression mais aussi lors de l'induction du gène tel qu'observé après une lésion à un nerf. Le rôle de ces sites lors de l'induction de l'expression de la périphérine sera étudié à l'aide des cellules PC12 dans lesquelles il est possible d'induire l'expression de la périphérine en traitant les cellules avec le NGF ou l'IL-6 (voir chapitre 4, page 74).

Ainsi, la présence de sites HSS pourrait être un prérequis important pour la transcription du gène de la périphérine et leur formation semble dépendre de la présence de facteurs de transcription particuliers aux cellules qui expriment le gène. Ces facteurs de transcription pourraient intervenir pour remodeler l'ADN pour faciliter la fonction d'autres activateurs ou pour favoriser directement l'assemblage d'un complexe de pré-initiation.

CHAPITRE 4

**NGF and IL-6-regulated binding of a tissue-specific nuclear protein
at a novel DNA-binding sequence within intron 1 of the neuronal
peripherin gene**

RÉSUMÉ

L'observation de sites hypersensibles (HSS) à la DNase I à l'intérieur du gène de la périphérine uniquement dans les cellules qui expriment le gène suggère que ces sites représentent autant d'éléments de régulation importants pour l'histospécificité d'expression du gène (voir chapitre 3, page 59). Afin d'identifier des éléments importants pour la réponse au NGF et à l'IL-6, nous avons étudié la structure de la chromatine à l'intérieur et aux abords du gène de la périphérine avant et après la différenciation des cellules PC12 en réponse à des traitements au NGF, à l'IL-6 ou à la dexaméthasone. Cette analyse nous a permis d'identifier plusieurs HSS dont trois en amont (5') du gène et trois à l'intérieur du gène, dans les introns 1, 3 et 6 respectivement. Parmi ces sites, le site détecté dans l'intron 1 comprend une séquence d'ADN importante pour la liaison d'une protéine nucléaire d'une taille moléculaire apparente d'environ 100 kDa, p100. De plus, p100 est uniquement détectée dans les cellules qui expriment le gène de la périphérine. Finalement, suite au traitement des cellules PC12 au NGF ou à l'IL-6, la liaison de p100 n'est plus détectée. Ces résultats suggèrent, d'une part, que p100 puisse être impliquée dans le contrôle de l'histospécificité d'expression du gène de la périphérine et, d'autre part, puisse être un médiateur autant de la réponse au NGF que celle à l'IL-6. Ce chapitre présente l'ensemble des travaux résumés ici et suggère certains mécanismes permettant à cette protéine d'assumer une double fonction, une pour l'histospécificité et une en tant que répresseur des réponses au NGF et à l'IL-6.

**NGF and IL-6-regulated binding of a tissue-specific nuclear protein
at a novel DNA-binding sequence within intron 1 of the neuronal
peripherin gene**

(Intermediate filament; transcription; gene expression; neuron; nerve growth factor; interleukin)

Nicolay Ferrari^{1,3}, Mario Filion² and André Royal¹

¹Département de Pathologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada,
H3C 3J7.

²Société Algène Biotechnologies Inc., 8475 avenue Christophe-Colomb, bureau
1000
Montréal, Québec, Canada, H2M 2N9.

³Present address: Dana-Farber Cancer Institute, Department of Adult Oncology,
Center for Neuro-Oncology, 44 Binney Street, Boston, MA, 02115.

Correspondence to: Dr. A. Royal, Département de Pathologie, Université de
Montréal, C.P. 6128, succursale centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada;
Tel. (514) 343-7062; Fax (514) 343-5755; e-mail: royala@ere.umontreal.ca

SUMMARY

Regulation of gene expression involves a combinatorial interaction of a plethora of trans-acting and cis-acting DNA elements that in turn can trigger or modulate transcription initiation. We have studied the regulation of the peripherin gene during neuronal differentiation. Peripherin is a type-III intermediate filament protein principally synthesized in peripheral nervous system neurons. Regulation of tissue-specific transcription of the neuronal peripherin gene depends on three regulatory elements found in the first 98 bp of the promoter. Moreover, NGF-induced neuronal differentiation of PC12 cells is accompanied by increased peripherin gene expression that presumably involves at least two 5' cis-acting elements, one of which is the TATA motif. Here we describe the mapping of DNaseI hypersensitive sites (HSS) along the peripherin gene and the changes in chromatin structure during NGF- and IL-6-induced neuronal differentiation and during dexamethasone-induced chromaffin-like differentiation of PC12 cells. Three HSS were mapped within the gene in intron 1, intron 3 and intron 6. In intron 1, two protein binding DNA sequences were revealed, one of which was important for the binding of a 100 kDa tissue specific nuclear protein. Furthermore, NGF- and IL-6-induced neuronal differentiation of PC12 cells reduced the binding activity of this protein to its DNA target sequence. Dexamethasone, in contrast, had no influence on its binding. Together, these results suggest that NGF- and IL-6-induction of peripherin expression rely upon interaction of at least one nuclear protein and its DNA target sequence within intron 1 of the peripherin gene.

INTRODUCTION

In mammals, neuronal system development depends on accurate genetically preprogrammed events and on responses to extracellular cues that occur in a defined sequential order and which prompt the cell to proliferate, migrate or differentiate. During cell differentiation, control of gene expression is crucial to provide the cell with its identity. Changes in the expression of cell-type-specific genes rely on the execution of highly regulated transcriptional events that in turn depend on a unique combination of interactions between specific nuclear factors and their DNA sequence targets. As a model to study the regulation of such transcriptional events during neuronal differentiation, we have chosen peripherin, a type III intermediate filament (IF) protein (Thompson and Ziff, 1989).

Peripherin expression, as most other IF proteins, is tissue-specific and developmentally regulated (for a review of IF gene expression see van de Klundert *et al.*, 1993). Most cell types express a single type of cytoplasmic IF proteins. However, the IF network in neurons is more complex. The neurofilament triplet proteins are distributed throughout the nervous system. In addition to neurofilaments, the peripherin gene is also expressed in neurons of the peripheral nervous system, most cranial nerves, ventral horn motor neurons and a few other nuclei in the central nervous system (Portier *et al.*, 1984; Leonard, 1988; Parysek and Goldman, 1988; Brody *et al.*, 1989). Peripherin expression coincides with terminal neuronal differentiation and the protein is presumably involved in axonal growth and regeneration (Troy *et al.*, 1990). Moreover, peripherin is significantly up-regulated in response to nerve injury (Oblinger *et al.*, 1989; Wong and Oblinger, 1990). Peripherin expression is also found in a few neuronal cell lines as well as in PC12 cells (Portier *et al.*, 1984; Parysek and Goldman, 1987). PC12 cells are extensively used to investigate signaling pathways involved in the accomplishment of the transcriptional changes necessary for differentiation, particularly nerve

growth factor (NGF) induced neuronal differentiation. Exposure of PC12 cells to NGF promotes growth arrest, extension of neurites and expression of several markers specific for sympathetic neurons. Among these markers is peripherin which expression is induced during the ultimate steps of the NGF response. Similarly, interleukin-6 (IL-6) treatment of PC12 cells elicits neurite outgrowth (Satoh *et al.*, 1988) and induces transcription of the peripherin gene (Sterneck *et al.*, 1996).

Most of the work done to clarify the mechanisms underlying the tissue-specific expression of the peripherin gene and its induction during neuronal differentiation was focused on the study of its promoter. Recently, we have identified, in the proximal promoter, three regulatory elements, PER1, PER2 and PER3, important for peripherin gene expression (Desmarais *et al.*, 1992; Ferrari *et al.*, 1995). Of these, PER1, which overlaps the TATA box, is a determinant of cell-type specificity. Furthermore, the TATA motif present in the peripherin gene promoter was shown to be important for the NGF response (Desmarais and Royal, 1996). A negative response element on which protein binding activity is modulated by NGF was also identified in the peripherin promoter (Adams *et al.*, 1995). Interestingly, the study of peripherin expression by transgenesis suggested that, besides the 5' flanking region, intragenic sequences were important for high level of gene expression, complete cell-type-specific gene expression (Belecky-Adams *et al.*, 1993; Leconte *et al.*, 1996), and peripherin induction following neuronal injury (Belecky-Adams *et al.*, 1993). However, despite these studies, the mechanisms by which peripherin gene expression is regulated during the ultimate steps of neuronal differentiation are still unclear.

To better understand these mechanisms, we have begun a search for intragenic regulatory elements that could play a role in the control of peripherin gene expression in response to NGF and IL-6. Here, we describe the analysis of the

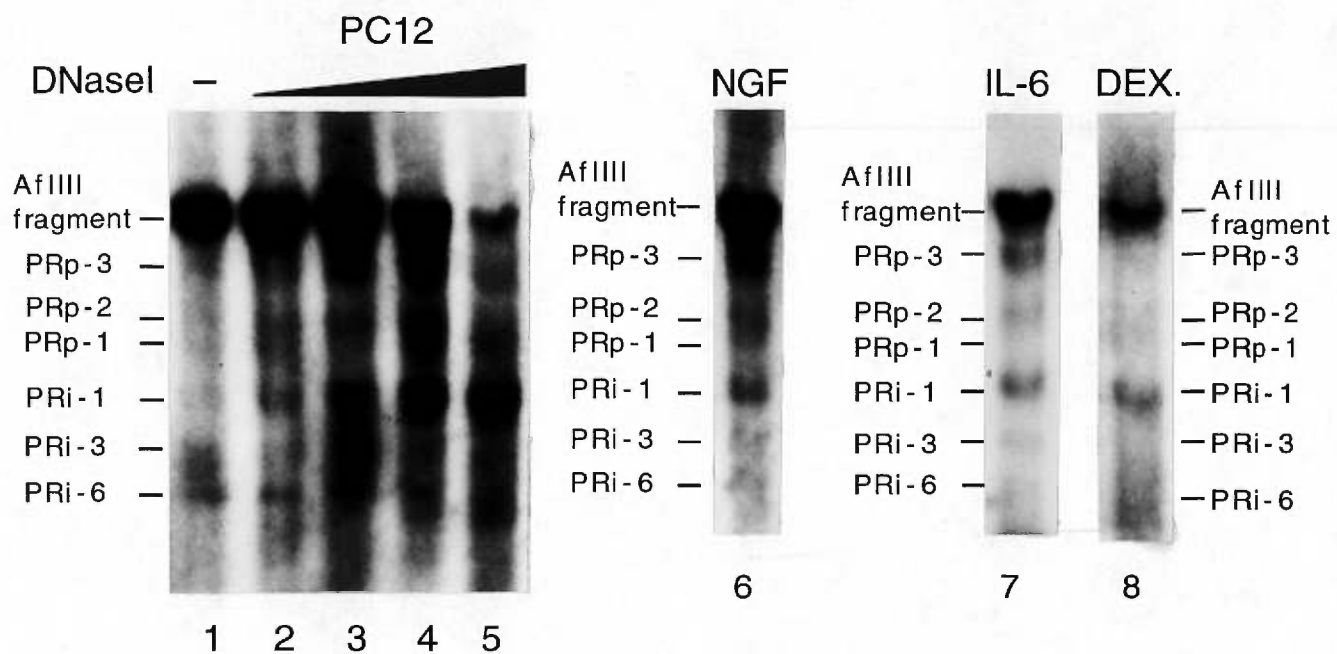
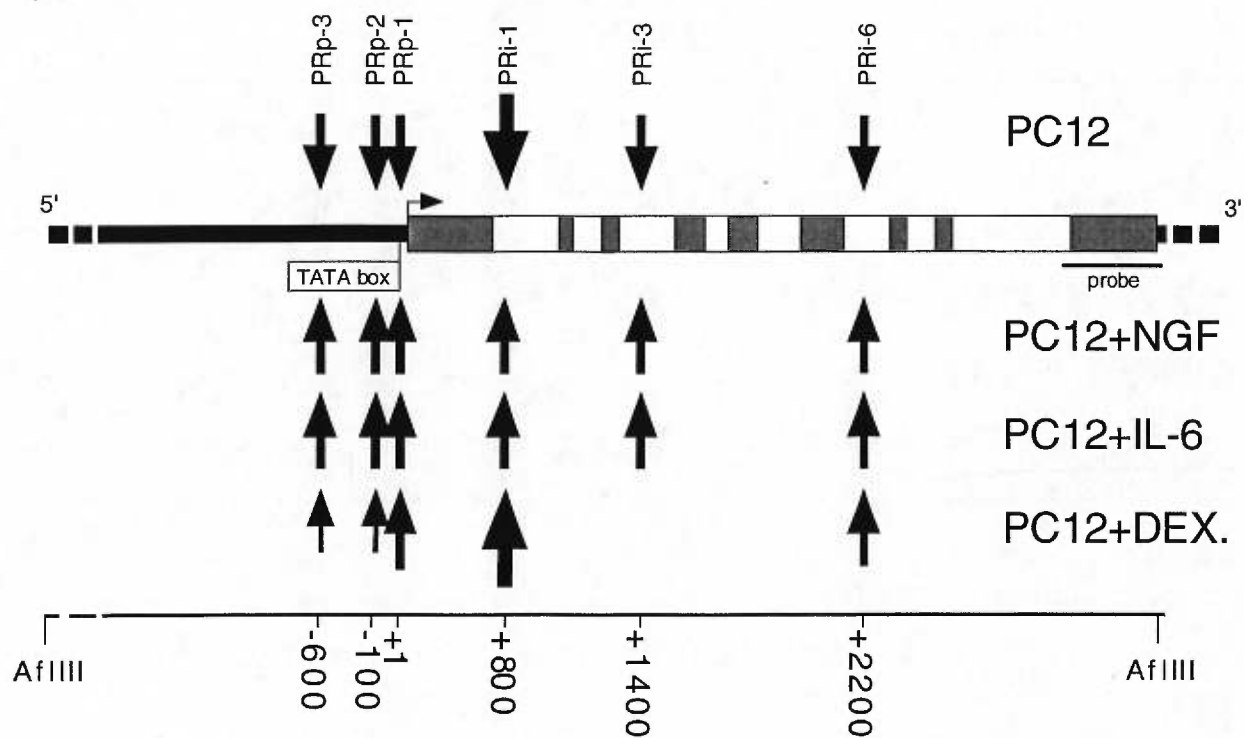
chromatin structure of the peripherin gene and show that chromatin structure differs between peripherin-expressing and non-expressing cells and that chromatin undergoes remodeling during PC12 neuronal and chromaffin-like cellular differentiation. Moreover, we present evidence that a tissue-specific 100 kDa protein binds a novel DNA sequence element in the first intron of the peripherin gene and that this interaction is regulated by both NGF and IL-6.

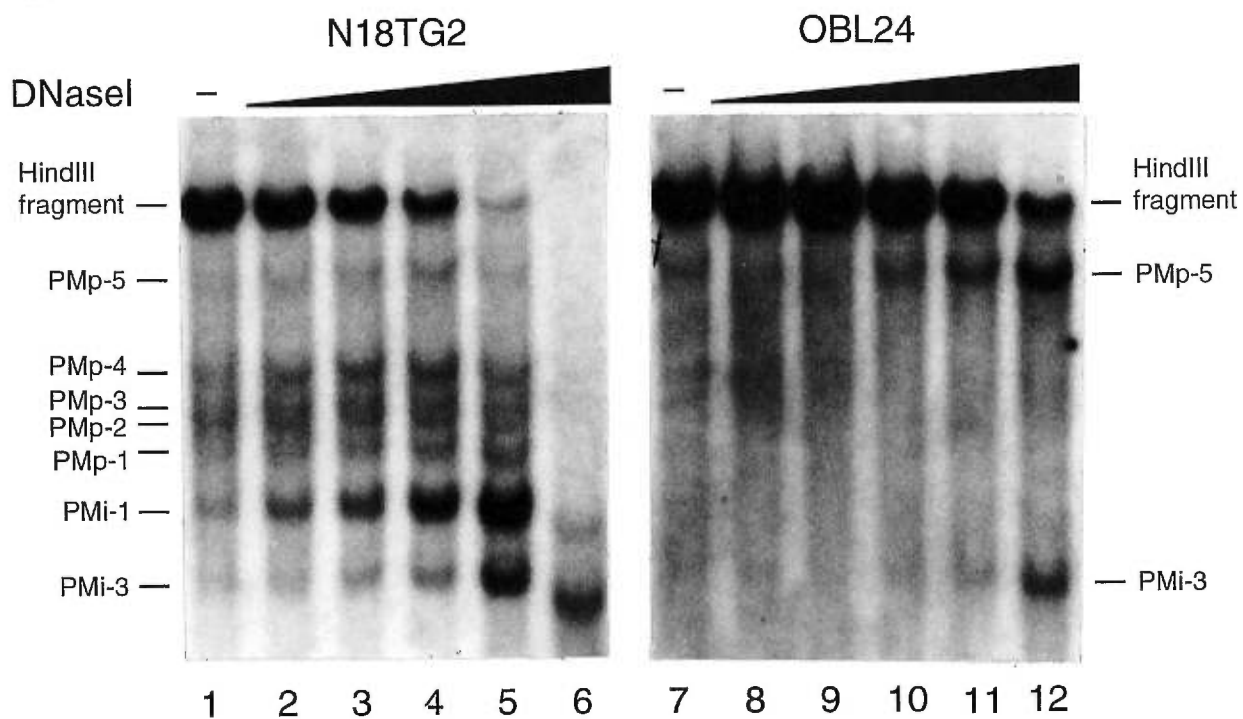
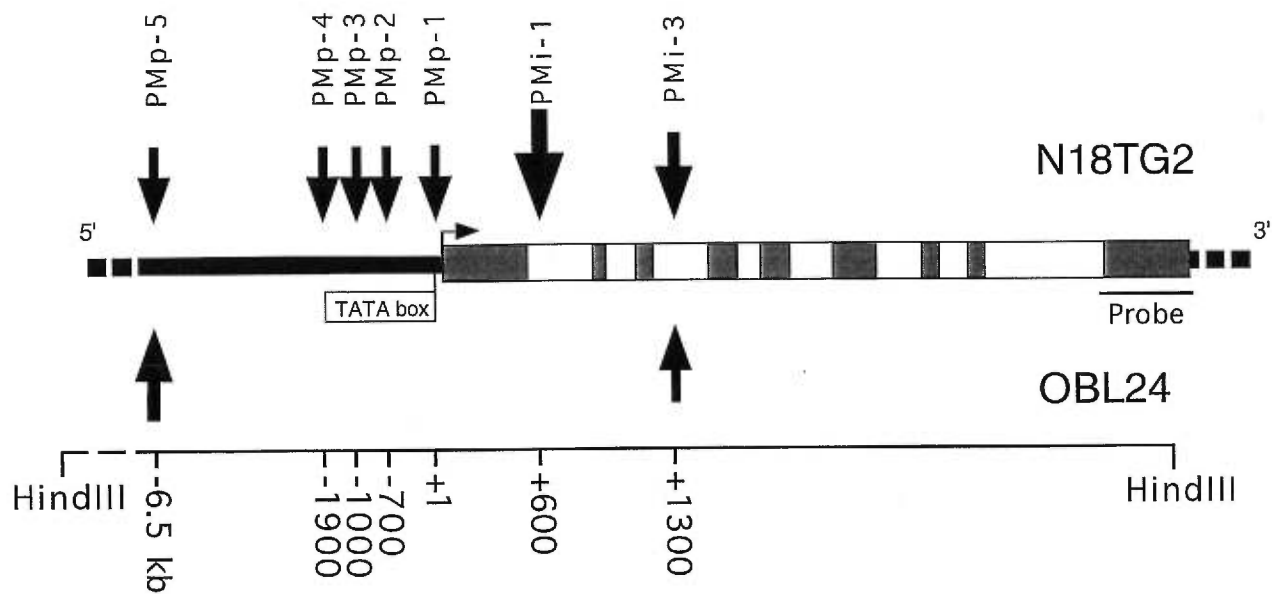
RESULTS

Changes in intragenic DNaseI hypersensitivity occur during induction of neuronal differentiation in PC12 cells.

To identify potential intragenic regulatory elements to explain the apparent role of this region during neuronal differentiation, we have looked at chromatin structure by DNaseI hypersensitivity analysis. To map DNaseI hypersensitive sites (HSS), nuclei from PC12 cells were isolated and treated with DNaseI. The DNA was then extracted, Southern-blotted and analyzed by indirect end-labelling. A 5 kb *Afl*III DNA fragment comprising the rat peripherin gene and the first 1.5 kb of its promoter was scanned (see map in Fig. 1B). In untreated PC12 cells, DNaseI digestion revealed six HSS within the analysed region (Fig. 1A, lanes 1-5). In the 5' flanking region, three HSS, designated PRp-1, PRp-2 and PRp-3, were mapped. Of these, PRp-1 overlapped the proximal promoter containing the TATA motif while the PRp-2 and PRp-3 sites were mapped, respectively, approximately 100 bp and 800 bp upstream from the transcription start site (Fig. 1B). Three additional HSS, PRi-1, PRi-3 and PRi-6, were mapped within the peripherin gene, in introns 1, 3 and 6 respectively (Fig. 1B). In N18TG2 cells, a mouse cell line which expresses the peripherin gene, a 18 kb *Hind*III DNA fragment was scanned for HSS (Fig. 1C and D). In these cells, the HSS pattern was slightly different: in the 5' flanking region, at 1.9 kb and 6.5 kb upstream from the transcription start site, two additional HSS were mapped and there were only two HSS in the gene itself (Fig. 1D). In OBL24 cells, a mouse cell line which does not express peripherin, only two HSS were observed, the most upstream HSS and the site localized within intron 3. These results illustrate the tissue-specific nature of the HSS pattern along the peripherin gene (Fig. 1D).

Figure 1: Chromatin structure analysis of the peripherin gene using a DNaseI hypersensitivity assay. **A)** Southern blot of DNA isolated from PC12 nuclei, DNaseI-digested and AflIII digested. Lane 1, DNA from untreated nuclei; lanes 2-5 correspond to DNA from nuclei which were incubated with increasing DNaseI concentrations; lanes 6-8 correspond to DNA from cells previously treated with 100 ng/ml of NGF for 72 h, 10 μ M of dexamethasone for 7 days and 100 ng/ml of IL-6 for 48 h respectively. **B)** Schematic map of the rat peripherin gene. Coding exons are represented by gray boxes, and introns by white boxes. HSS are represented by arrows and are localized according to the transcription start site. Arrows thickness are proportional to intensities of DNaseI digestion sensitivity. **C)** Southern blot of the 18 kb HindIII DNA fragment isolated from DNaseI-digested nuclei from N18TG2 (lane 9) and OBL24 (lane 10). **D)** Schematic map of the mouse peripherin gene.

A**B**

C**D**

To further characterize the HSS detected, we sought to determine the relationship between the chromatin structure and the induction of the peripherin gene during PC12 neuronal differentiation obtained by treating the cells with NGF or IL-6. NGF-induced neuronal differentiation of PC12 cells resulted in increased peripherin mRNA levels as revealed by Northern analysis (Fig. 2, compare lanes 1 and 2). IL-6 treatment of PC12 cells also lead to a similar increase in peripherin mRNA levels (Fig. 2, lane 3), as previously shown by Sterneck *et al.* (1996). To determine the effect of NGF and IL-6 on peripherin gene chromatin structure, we performed a DNaseI hypersensitivity analysis following the treatment of PC12 cells with NGF or IL-6 (Fig. 1A, lanes 6 and 7). No significant changes in the HSS profile of the peripherin gene, except for a slight decrease in DNaseI sensitivity of the PRp-2 and PRi-1 sites, were observed following treatment with IL-6 (Fig. 1B).

By contrast to NGF and IL-6, dexamethasone leads PC12 cells to adopt an adrenal chromaffin-like phenotype with the down-regulation of the neuronal genes including peripherin (Leonard *et al.*, 1987; Federoff *et al.*, 1988; Stein *et al.*, 1988; Machida *et al.*, 1989). Dexamethasone induced changes in chromatin structure as revealed by the loss of the PRi-3 HSS and a decrease in DNaseI sensitivity of the PRp-2 HSS (Fig. 1A, lane 8). Together, these results indicate that, in PC12 cells, chromatin remodeling occurring during cellular differentiation coincides with changes in peripherin gene expression levels. In addition, these results suggest that PRi-1 contains DNA sequences potentially important for tissue-specific expression and response to IL-6 while the PRp-2 and PRi-3 DNA sequences could be involved in the dexamethasone response in agreement with previous observations of Desmarais and Royal (1996).

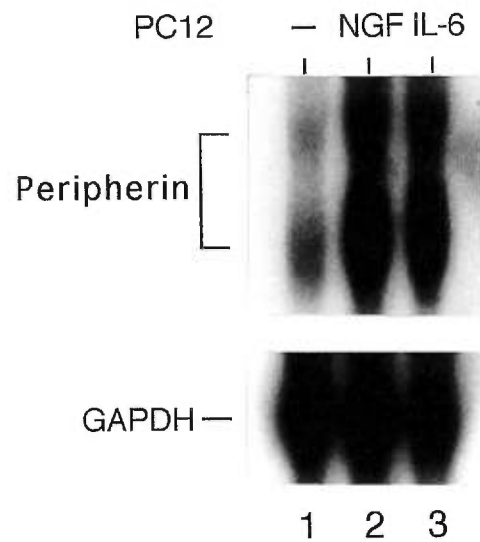


Figure 2. Northern blot analysis of peripherin gene expression in NGF and IL-6-treated PC12 cells. 20 μ g total RNA isolated from either untreated PC12 cells, PC12 cells treated with 100 ng/ml NGF for 72 h or PC12 cells treated with 100 ng/ml IL-6 for 48 h were size fractionated, transferred onto a membrane and hybridized to a radiolabeled 1 kb peripherin cDNA probe. Total RNA quantification was obtained by hybridization of the same membrane with a radiolabeled GAPDH probe.

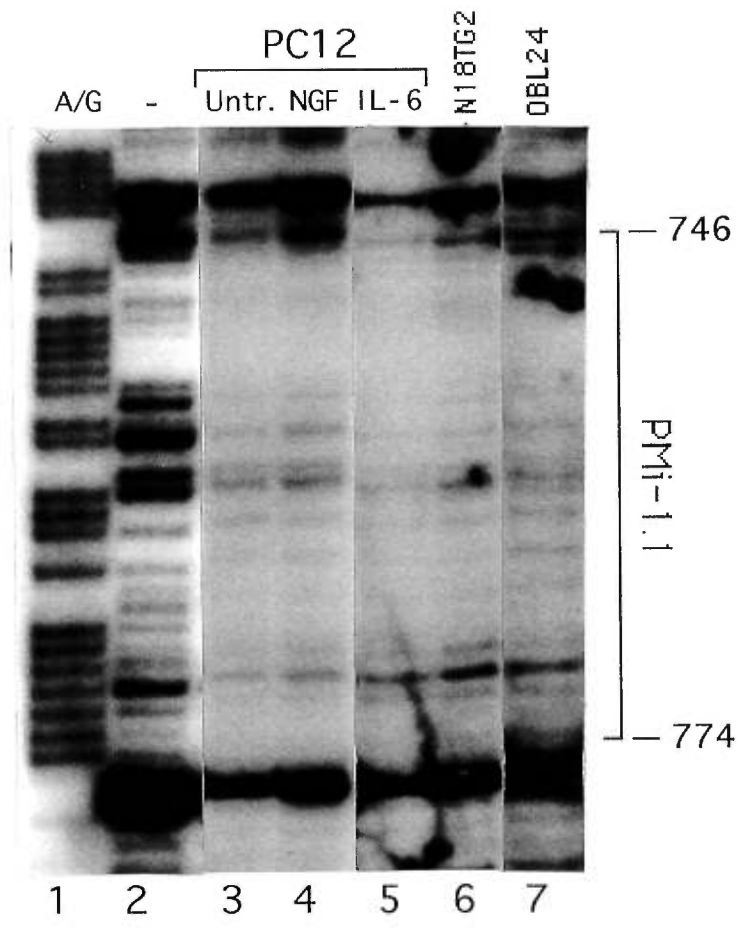
The intragenic PRi-1 DNaseI hypersensitive site contains a tissue-specific protein binding sequence

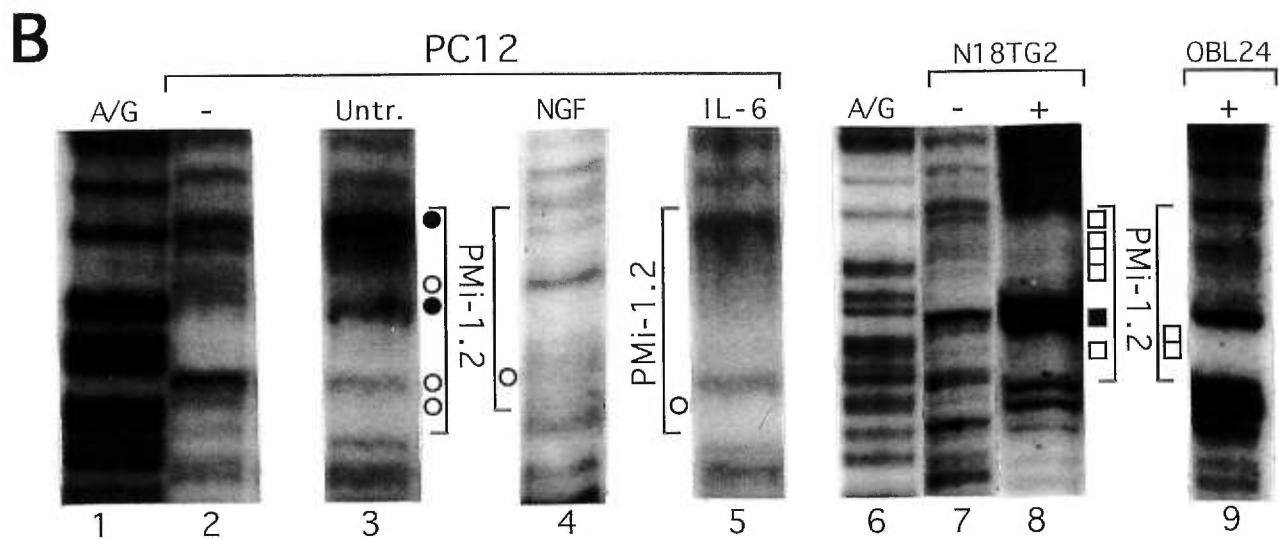
To define more precisely the PRi-1 sequence, we performed *in vitro* DNaseI footprint experiments using a 479 bp DNA probe and nuclear extract proteins from PC12, N18TG2 or OBL24 cells. Two DNaseI protection patterns, PRi-1.1 and PRi-1.2, corresponding to positions 746-774 (Fig. 3A, lane 3) and 637-670 (Fig. 3B, lane 3) respectively, were observed on the non-coding strand when nuclear extract proteins from PC12 cells were used for DNase I footprint analysis. The PRi-1.1 footprint was also observed when DNaseI footprint analysis was performed using nuclear extract proteins from N18TG2 cells, which express the peripherin gene, as well as when nuclear extract proteins from a non-expressing cell lines (OBL24) were used (Fig. 3A, lanes 6 and 7).

The second footprint, PRi-1.2, encompassing position 637-670 of the peripherin gene, was determined as the DNA sequence encompassing two DNase I HSS (Fig. 3B, lane 3, indicated by close circles) and the bands that showed protection to DNase I digestion when nuclear extracts from PC12 cells were used (Fig. 3B, lane 3, indicated by open circles). The PRi-1.2 footprint exhibited particular features. First, in contrast to the PRi-1.1 footprint, the PRi-1.2 protection pattern was observed only in peripherin-expressing cell lines (Fig. 3B, compare lanes 3 and 8 to lane 9). Second, since IL-6 affected chromatin structure in the vicinity of intron 1 (Fig. 1A, lane 6), we sought to determine if this structural change was due to a decrease in protein binding activity to sequences within this region. Nuclear extracts from PC12 cells treated with NGF or IL-6 bound the PRi-1.1 sequence and produced the characteristic footprint (Fig. 3A, lanes 4 and 5) but failed to produced the PRi-1.2 footprint (Fig. 3B, lanes 4 and 5) as shown by the loss of the DNase I HSS and by a different profile of the protected bands.

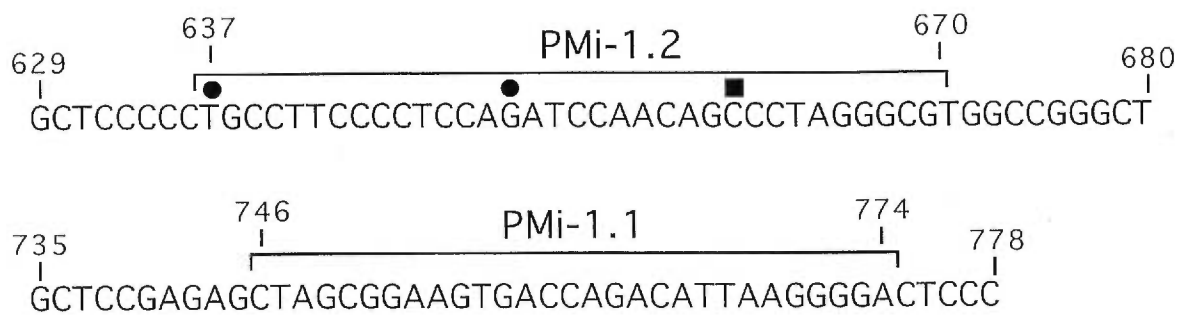
Figure 3: DNaseI footprinting of intron 1 of the peripherin gene with PC12, N18TG2 and OBL24 nuclear extracts. **A)** DNaseI protections were analyzed in parallel on the non-coding strand of the 479 pb DNA fragment (position 352-821) of the peripherin gene 5' end-labeled, as described in Materials and methods. Binding reactions were carried out without (-) or with 100 µg of untreated (Untr.) and treated (with NGF or IL-6) PC12, N18TG2 or OBL24 nuclear extracts as indicated. The probe was treated with two different DNaseI concentrations: lane 2, 15 ng; lanes 3-7, 100 ng. Lane 1, Maxam and Gilbert A/G nucleotide sequencing ladders. **B)** Same as (A). The probe was treated with two different DNaseI concentrations: lanes 2 and 7, 15 ng; lanes 3-5, 8 and 9, 100 ng. Lanes 1 and 6, Maxam and Gilbert A/G nucleotide sequencing ladders. The position of protein binding sites are indicated by brackets. DNaseI hypersensitive sites (PC12 cells, close circles; N18TG2 cells, close squares) and protected bands (PC12 cells, open circles; N18TG2 and OBL24 cells, open squares) are indicated. **C)** Summary of the results of the footprinting analysis. Protected regions are indicated by brackets with corresponding position relative to the transcriptional start site. HSS position is also shown.

A





C



Finally, both PRi-1.1 and PRi-1.2 protection patterns were observed when the DNaseI protection experiment was performed using nuclear extract from PC12 cells treated with dexamethasone. This later confirmed what we obtained with the HSS analysis of the peripherin gene, accordingly, that dexamethasone had no influence on protein binding at these sites (data not shown).

These results suggest that at least two protein binding sequences within the PRi-1 HSS are likely to be responsible for DNaseI sensitivity in this region. In addition, in the first intron of the peripherin gene, the observation that no significant differences in DNaseI sensitivity in PC12 cells after NGF or IL-6 treatment in spite of the disruption of PRi-1.2 protein DNA complex is explained by persistent PRi-1 sensitivity.

The PRi-1.2 DNA sequence binds a tissue-specific nuclear protein *in vitro* of an apparent molecular weight of 100 kDa

To confirm that nuclear factors interacted with the PRi-1.2 element *in vitro* and to start their characterization, we designed a double-stranded oligonucleotide probe corresponding to the PRi-1.2 sequence (this sequence is conserved between the mouse and the rat gene) and used it in electromobility shift assays (EMSA). Five protein complexes designated C1, C2, C3, C4 and C5 were detected when EMSA was carried out with nuclear extracts from PC12 cells (Fig. 4, lane 1). The complexes C1 and C2 were specifically competed by addition of a 100-fold molar excess of unlabeled PRi-1.2 oligo while complexes C3, C4 and C5 were not as significantly competed by addition of specific competitor (Fig. 4, lane 2). To determine whether treatment of PC12 cells with NGF or IL-6 affected the binding activity of the protein complexes to the PRi-1.2 sequence, EMSA were performed with nuclear proteins extracted from treated PC12 cells.

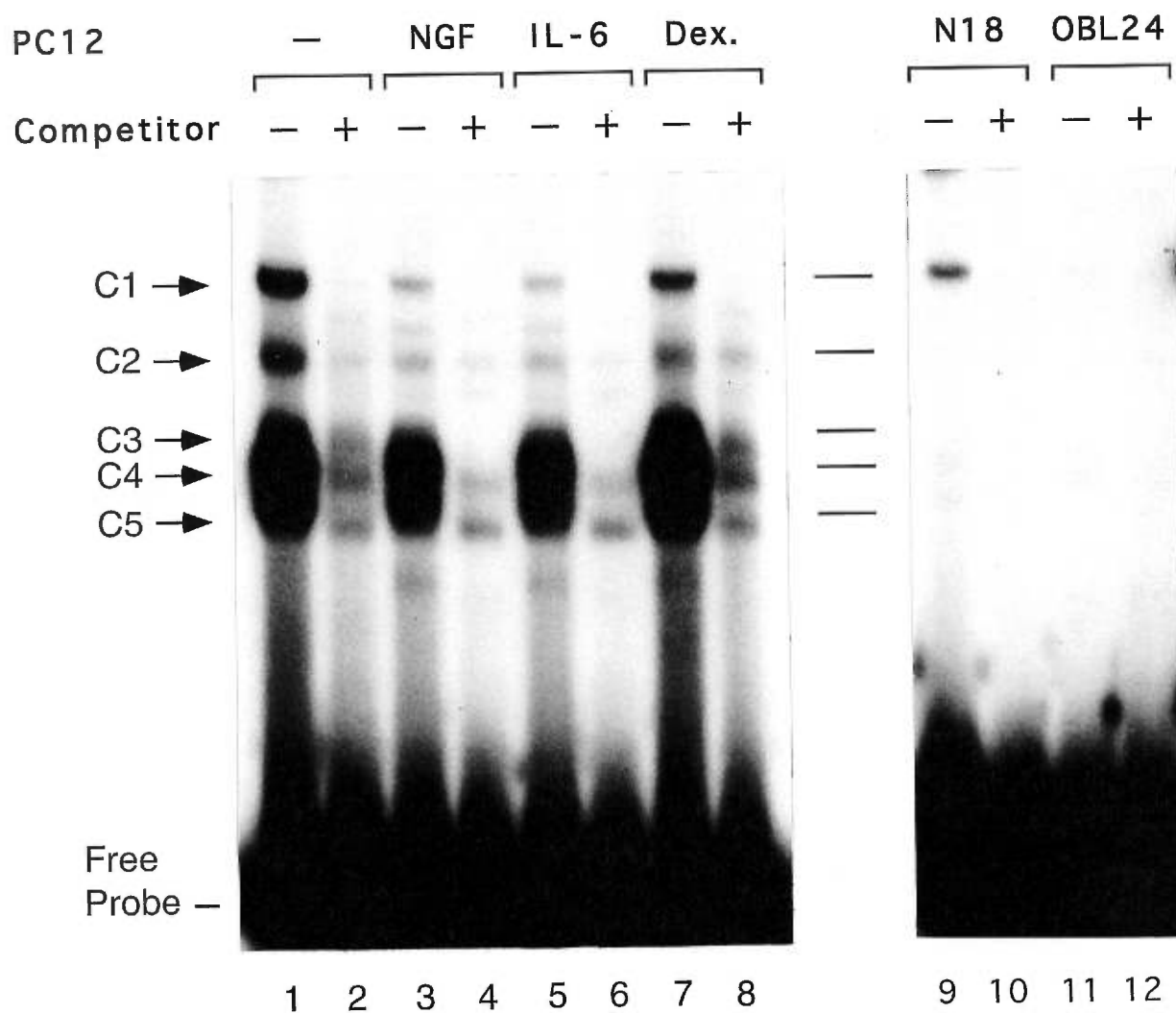


Figure 4: Gel retardation analysis of PRi-1.2 interactions. EMSA were performed using 1 ng of labeled PRi-1.2 oligo and 5 μ g of nuclear extract proteins per reaction as indicated. Competition experiments were performed by adding 100 ng of unlabeled ds PRi-1.2 (lanes 2, 4, 6, 8, 10 and 12) oligo to the mixture prior to probe addition. Probe bound protein complexes and free probe are indicated.

Nuclear extracts from PC12 cells treated with NGF or IL-6 produced very weak DNA-protein complexes C1 and C2 which were also competed by an excess of specific competitor (Fig. 4, lanes 3-6). The formation of complexes C3, C4 and C5 was not affected by NGF or IL-6. The binding of proteins to the PRi-1.2 probe was restored when EMSA were performed with nuclear extracts from PC12 cells treated with dexamethasone (Fig. 4, lanes 7 and 8). Finally, nuclear extracts from N18TG2 cells produced a protein complex that comigrated with complex C1 formed with PC12 nuclear protein extracts but failed to produce the other complexes (Fig. 4, lanes 9 and 10). Moreover, no protein complex was produced with the PRi-1.2 probe using OBL24 nuclear extracts (Fig. 4, lanes 11 and 12). These gel shift experiments show that nuclear proteins present in PC12 cells are able to form at least five protein complexes with the PRi-1.2 sequence and that the binding activity of one of these, complex C1, is affected by NGF and IL-6, but not by dexamethasone. These experiments answered one question raised by the *in vitro* DNase I footprint experiments. The gel shift experiment showed that after NGF or IL-6 treatment of the PC12 cells, the nuclear protein complex were still detected, at a lesser degree, at the PRi-1.2 site. This result explains why distinct but apparent footprints were detected when PC12 cells were treated with NGF or IL-6.

As a first step to identify the nuclear factor(s) forming the PRi-1.2 binding complex C1, we determined which nucleotides were important for its binding. Mutations, in groups of 3 bp, were inserted along the PRi-1.2 probe to produce 11 mutants that were tested for their ability to bind and compete for PC12 nuclear factors in EMSA. Table 1 presents the results of the mutational analysis. It shows that two 6 bp stretches, CCAGAT and ACAGCC, separated by 3 nucleotides are essential for the formation of complex C1 with the PRi-1.2 sequence. None of these mutations prevented the formation of complexes C3, C4 and C5 (data not shown).

TABLE I: Mutational analysis of the PMI-1.2 sequence

Name	Sequence (mutated bases are boxed)	Binding activity*
PMI-1.2	5'-GCCTTCCCCTCCAGATCCAACAGCCCTAGGCCGT-3'	+
PMI-1.2 M1	5'-GCCTTCCCCTCCAGATCCAACAGCCCTAGGGTAA-3'	+
PMI-1.2 M2	5'-GCCTTCCCCTCCAGATCCAACAGCCCTA GCAT CGT-3'	+
PMI-1.2 M3	5'-GCCTTCCCCTCCAGATCCAACAGCC ACT GGCGT-3'	+
PMI-1.2 M4	5'-GCCTTCCCCTCCAGATCCAAC CACT CTAGGGCGT-3'	-
PMI-1.2 M5	5'-GCCTTCCCCTCCAGATCCA GTG CCCTAGGGCGT-3'	-
PMI-1.2 M6	5'-GCCTTCCCCTCCAGAT TAAG CAGCCCTAGGGCGT-3'	+
PMI-1.2 M7	5'-GCCTTCCCCTCCA CTG CCAACAGCCCTAGGGCGT-3'	-
PMI-1.2 M8	5'-GCCTTCCCCT TAAG GATCCAACAGCCCTAGGGCGT-3'	-
PMI-1.2 M9	5'-GCCTTCC TGTA BCAAGATCCAACAGCCCTAGGGCGT-3'	+
PMI-1.2 M10	5'-GCCT GAA BCCTCCAGATCCAACAGCCCTAGGGCGT-3'	+
PMI-1.2 M11	5'- CAGA TCCCCTCCAGATCCAACAGCCCTAGGGCGT-3'	+

*Probe ability to bind (+) or not (-) protein complex C1 in EMSA.

To verify that the PRi-1.2-protein complex C1 involved one or more proteins, a Southwestern experiment was performed. Nuclear proteins from PC12 cells were separated by denaturing SDS-gel electrophoresis, electrotransferred onto a nitrocellulose membrane after which DNA-binding proteins were revealed using a labeled PRi-1.2 probe. A single band, corresponding to a protein of apparent molecular size of 100 kDa, was detected when PC12 nuclear proteins were used (Fig. 5, lane 1). The PRi-1.2 probe failed to detect any DNA-binding proteins when the experiment was performed with nuclear proteins extracted from PC12 cells treated with NGF or IL-6 (Fig. 5, lanes 2 and 3) while the same 100 kDa band was observed when nuclear proteins of dexamethasone treated PC12 cells were used (Fig. 5, lane 4). These results suggest strongly that the protein binding PRi-1.2 has an approximate molecular size of 100 kDa, that it is present only in peripherin expressing cell lines and that its interaction with DNA involves a DNA sequence not previously associated with a known DNA-binding protein. Moreover, the protein detected by Southwestern likely corresponds to complex C1 observed in EMSA since: 1) both respond in the same way to NGF or IL-6 and 2) dexamethasone did not prevent the formation of this complex in both EMSA and Southwestern experiments.

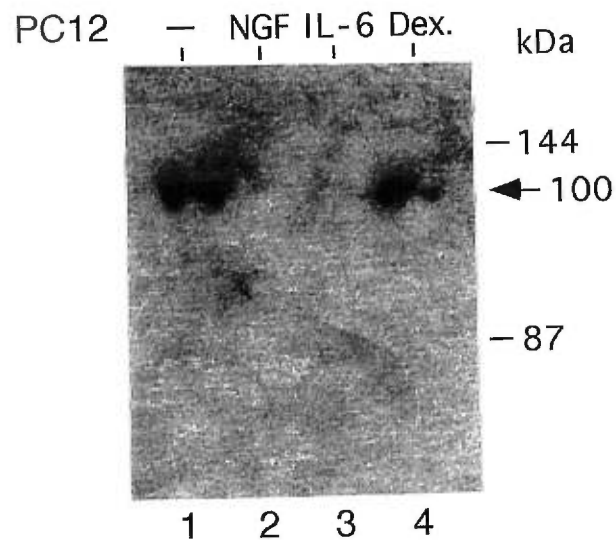


Figure 5: Southwestern analysis of the PRi-1.2 protein binding complexes. 100 μ g of nuclear protein extracts from untreated (lane 1), NGF- (lane 2), IL-6- (lane 3) or dexamethasone-treated (lane 4) PC12 cells were size fractionated in a 8% denaturing SDS-polyacrylamide gel. DNA-binding proteins were revealed using a labeled PRi-1.2 probe. The arrow indicates a band of an approximate size of 100 kDa. Size markers in kilodaltons are shown at the right.

DISCUSSION

There is a growing body of evidence suggesting that regulation of peripherin gene expression involves, beside 5' flanking regulatory elements, intragenic cis-acting DNA sequences (Belecky-Adams *et al.*, 1993; Karpov *et al.*, 1996; Leconte *et al.*, 1996). Although previous work showed that the first 98 pb of the promoter were sufficient to direct tissue-specific expression of reporter gene constructs in peripherin-expressing cells (Desmarais *et al.*, 1992), a more complex picture about the mechanisms underlying tissue-specific control of peripherin expression is now emerging. The requirement of the peripherin gene itself for complete tissue-specific expression of a transgene (Belecky-Adams *et al.*, 1993; Leconte *et al.*, 1996) and the presence of tissue-specific HSS detected within the gene (this study and Karpov *et al.*, 1996) suggested that intragenic sequences could also be important for tissue-specificity. Here, we show that the chromatin encompassing the peripherin gene undergoes structural remodeling during cellular differentiation which results in altered levels of peripherin gene expression. Such chromatin remodeling was seen in intron 1 where we showed that a tissue-specific 100 kDa nuclear protein, p100, binds to a novel DNA target sequence. Moreover, both NGF and IL-6 affected p100 binding to its DNA sequence.

What are the mechanisms by which p100 mediates its effects? The results presented here suggest that this protein may play a dual role in the control of peripherin gene expression. First, in conjunction with PER1 that has been described as the main element responsible for tissue-specific expression of the peripherin gene (Desmarais *et al.*, 1992), it may intervene to restrict peripherin gene expression in a tissue-specific manner. Following the results of the chromatin structure analysis described here, one could speculate that the accessibility of the PRi-1.2 DNA sequence may play an important role in the control of peripherin gene

expression. This "open" conformation of the chromatin structure could be induced by p100 binding to its target sequence within intron 1 of the peripherin gene. Thus, p100 binding could facilitate the assembly of the transcription initiation complex by disrupting the nucleosomal structure near the transcription start point.

On the other hand, a body of evidences described here have linked p100 to both NGF and IL-6 signalling pathways. Thus, in addition to a tissue-specific chromatin remodeling protein, p100 is likely to correspond to a transcriptional repressor. However, p100 seems to be involved in a partial repression of the peripherin expression which could correspond to the basal level of peripherin transcription as seen in some peripherin expressing cells. In addition, our results suggest that p100 binding activity can be modulated by NGF or IL-6 treatment. Thus, by a mechanism that has to be determined, NGF and IL-6 signalling pathways converge to p100, affect its binding activity to relieve repression and to allow higher levels of peripherin transcription as seen in induced PC12 cells. Transcriptional repression can be obtained at both initiation (for a review on transcriptional repression, Johnson, 1995) and elongation levels (Spencer and Groudine, 1990). Transient transfection experiments showed that addition of the PRi-1.2 DNA sequence upstream of the 98 pb peripherin promoter resulted in no detectable change in reporter gene activity, suggesting that p100 was not interfering with the transcription initiation rate as expected of a silencer (data not shown). However, these experiments were performed without other regulatory elements important for the NGF response, such as the negative response element (NRE) identified by Thompson et al. (1992) or the recently described peripherin cytokine-responsive element (Pe-CyRE) (Lecomte *et al.*, 1998). A second possibility is that p100 acts by affecting transcription elongation as described for the *Drosophila* hsp70 gene (Rougvie and Lis, 1988; Rougvie and Lis, 1990), in the mouse hepatocyte specific gene transthyretin (Mirkovitch and Darnell, 1992) and in the c-

myc gene (Bentley and Groudine, 1986; Eick and Bornkamm, 1986). In addition, our results suggest that treatment with NGF or IL-6, which affect p100 binding, would allow release of the elongation block.

How can the NGF and IL-6 signalling pathways modulate the activity of p100? To activate or to repress transcription, transcription factors must be located in the nucleus, bind DNA and/or interact with the basal transcription apparatus (Binetruy *et al.*, 1991; Gonzalez *et al.*, 1991; Beg and Baldwin, 1993). Accordingly, extracellular signals that regulate transcription factor activity may affect one or more of these processes. Most commonly, regulation is achieved by reversible phosphorylation. Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors has been amply demonstrated. Phosphorylation of a transcription factor by several different kinases (or by a kinase linked to more than one pathway) is a mechanism that allows different signals to converge at the same factor. Therefore, NGF and IL-6 responses in PC12 cells, possibly through ERK and JAK kinases respectively, may result with p100 phosphorylation which may in turn alter p100 activity. Similarly, both NGF and IL-6 may affect p100 synthesis by affecting the activity of one or more transcription factors important for the regulation of p100 gene expression.

These results raise questions concerning the importance of p100 for the expression of the peripherin gene. What is the role of p100 in peripherin expressing cells? Moreover, in these cells, what is the role of p100 in the NGF and the IL-6 signalling pathways? During development, peripherin expression coincides with terminal neuronal differentiation (Troy *et al.*, 1990). The identification of a tissue-specific nuclear factor that may be important for the regulation of peripherin gene expression suggests that this protein is a marker of an

earlier step of neuronal differentiation. Furthermore, the identification of p100 in a cell line, PC12, which resemble a bipontential sympathoadrenal precursor supports this hypothesis. Accordingly, the cells that express p100 would be those that proceed further in the neuronal differentiation where other markers such as peripherin are later expressed. In the adult, p100 may be important during, for exemple, axonal regeneration after neuronal injury. Therefore, p100, a common target of different signalling pathways such as those triggered by NGF and IL-6 after neuronal injury, could allow increased peripherin expression.

In conclusion, in addition to the core promoter, cell-specific expression of the peripherin gene may also involve binding of a 100 kDa nuclear protein to a DNA target sequence located in intron 1. In the context of the peripherin gene, p100 binding may be necessary to trigger a process bringing the chromatin structure from a non-permissive state to an “open” state. Once bound to its target sequence within intron 1, p100 could act as a repressor by reducing transcription rate resulting in a basal level of peripherin expression. Moreover, NGF or IL-6 treatment would affect p100 binding resulting in an increased rate of peripherin transcription. However, the mechanism that underlies this repression will require further investigation to evaluate the possible role of p100 in the regulation of transcriptional elongation.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture, nuclear extracts and DNaseI footprinting assays

N18TG2, OBL24 and PC12 cell lines were cultured and seeded as previously described (Desmarais *et al.*, 1992). N18TG2 is a cell line derived from a mouse neuroblastoma (Minna *et al.*, 1972). OBL24 is a cell line derived from mouse olfactory bulb cells immortalized by the avian myc oncogene (Ryder *et al.*, 1990). PC12 cells (ATCC CRL 1721) are derived from a rat pheochromocytoma. N18TG2 and PC12 are peripherin-expressing cell lines while OBL24 does not express peripherin. Nuclear extracts were prepared essentially by the method of Dignam *et al.* (1983) and protein concentrations were measured according to Bradford (1976). For DNaseI footprinting assays, a DNA fragment corresponding to nucleotides 1080-1843 of the mouse peripherin gene was amplified by PCR and cloned using the TA Cloning Kit (Invitrogen, USA) to produce plasmid pMi-1. The pMi-1 construct was EcoRI or SacI digested and [³²P]αdATP end-labeled on the non-coding strand using polymerase I Klenow fragment and on the coding strand using T4 DNA polymerase. The plasmid was then digested with SacI or EcoRI respectively to produce a 479 pb probe that was purified by electrophoresis on a 5% polyacrylamide gel (PAGE). DNaseI footprinting assays were performed according to Sierra (1990). The DNA-protein mixture contained 0.3-0.5 ng (12,000 c.p.m.) of probe, 2 μg of poly(dI-dC) and 100 μg of nuclear extract proteins. DNA digests were analysed on 8% sequencing gels together with G+A size markers (Maxam and Gilbert, 1980).

Mapping of DNase I hypersensitivity sites

Mapping of DNaseI hypersensitivity sites was performed with the following cell lines: N18TG2, OBL24 and PC12. Nuclei were obtained by lysing cells in 20

volumes of isolation buffer (0.25 M Sucrose, 10 mM Tris pH 6.85, 1 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂ and 0.5% Triton). The nuclei were washed twice and resuspended in isolation buffer without Triton. DNaseI (Grade II, Boehringer Mannheim, Germany) digestions were performed by addition of 1 mM CaCl₂ (final concentration), 1 mM MgCl₂ (final concentration) and DNaseI at 0, 0.1, 0.2, 0.5 and 1.0 µg/ml (final concentrations) directly to nuclei. All the samples were incubated at 22°C for 10 min. DNaseI digestion was stopped by addition of EDTA at a final concentration of 25 mM. Samples were then treated with 20 µg of RNase A for 15 min at 37°C. One ml of 2% SDS, 100 mM Tris pH 7.5, and 400 µg proteinase K was added and the samples were incubated at 55°C overnight. Genomic DNA was extracted with phenol-chloroform and chloroform and precipitated with NaCl at a final concentration of 100 mM and with two volumes of ethanol. DNA was resolubilized in TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA). After proper restriction digestion, DNA was transferred for 4 hours on Gene Screen Plus membranes (Dupont, USA) after acid depurination in 0.25 N HCl and denaturation in 0.4 N NaOH. Membranes were washed in 2X SSC (0.3M NaCl, 0.33M NaHCO₃, pH 7.0) and nucleic acids were covalently bound to membranes by UV crosslinking with a Stratalinker (Stratagene). A specific DNA probe corresponding to exon 9 (position 3179-3448 of the rat peripherin gene or position 3321-3521 of the mouse gene) was [³²P]αdCTP random labeled and hybridization was performed for 18 hours at 60°C in Church hybridization buffer (Church and Gilbert, 1984). Blots were washed first in 2X SSC at room temperature followed by 0.2X SSC and 0.1% SDS at 60°C and were exposed on Kodak films with Kodak intensifying screens.

Northern analysis

Total RNA was isolated from untreated PC12 cells, NGF-treated or IL-6-treated PC12 cells with TRIZOL (Gibco). RNA fractionation, transfer and hybridization were performed as previously described (Desmarais and Royal, 1996). Blots were exposed on Kodak film with intensifying screens.

Electrophoretic mobility shift assays

Oligonucleotide PMi-1.2 corresponding to nucleotides 638-671 of the mouse peripherin gene was labeled with [γ - 32 P]ATP and T4 polynucleotide kinase and purified from unincorporated radioactivity by 8% PAGE electrophoresis. EMSA was performed as described (Desmarais *et al.*, 1992) except that samples were incubated on ice for 5 min before probe addition. The samples were left on ice for another 5 min and electrophoresed onto a 5% PAGE. Competition experiments were performed by adding 100 ng (100 fold molar excess) of unlabeled double-stranded oligonucleotides to reaction mixture prior to probe.

Southwestern

100 μ g of nuclear protein extracts in 1 volume SDS sample buffer (7% v/v SDS, 28% v/v glycerol, 0.01% v/v Bromphenol blue and 6% v/v β -mercaptoethanol) were heated at 95°C for 5 min and loaded onto a 8% SDS-PAGE. After the gel was electrotransferred onto a nitrocellulose membrane (Mandel), the membrane was blocked for 60 min at 22°C in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT and 5% w/v milk powder. The proteins were then denatured by treating the membrane twice with 6M guanidin-HCl in 25 mM NaCl; 25 mM Hepes, pH 7.9; 5 mM MgCl₂ and 0.5 mM DTT for 10 min at 4°C. Proteins renaturation was obtained by replacing 1/2 volume of the guanidin solution with the same solution without guanidin for 10 min at 4°C, this step was repeated 5 times reducing

the guanidin concentration to 3M, 1.5M, 0.75M, 0.37M and 0.18M. The membrane was washed twice with 25 mM NaCl; 25 mM Hepes, pH 7.9; 5 mM MgCl₂ and 0.5 mM DTT for 5 min at 4°C. The membrane was incubated for 20 min at 4°C in a protein-DNA binding reaction containing end-labeled double-stranded PRi-1.2 oligo at 1X10⁵ cpm/ml, 1X TBS (250 mM Hepes, pH 7.9; 400 mM NaCl; 10 mM EDTA; 1% triton X-100 and 50% glycerol), 1mM DTT, 10 µg/ml polydI-dC as a competitor and 0.25% w/v milk powder. The membrane was washed twice in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA and 1 mM DTT for 10 min at 4°C and exposed to Kodak film using intensifying screens.

REFERENCES

Adams, A.D., Choate, D.M. and Thompson, M.A. 1995. NF1-L is the DNA-binding component of the protein complex at the peripherin negative regulatory element. *J. Biol. Chem.* **270**: 6975-6983.

Beg, A.A. and Baldwin, A.J. 1993. The IkappaB proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Genes and Development.* **7**: 2064-2070.

Belecky-Adams, T., Wight, D.C., Kopchick, J.J. and Parysek, L.M. 1993. Intragenic sequences are required for cell type-specific and injury-induced expression of the rat peripherin gene. *J. Neurosci.* **13**: 5056-5065.

Bentley, D.L. and Groudine, M. 1986. A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells. *Nature.* **321**: 702-706.

Binetruy, B., Smeal, T. and Karin, M. 1991. Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature.* **351**: 122-127.

Brody, B.A., Ley, C.A. and Parysek, L.M. 1989. Selective distribution of the 57 kDa neural intermediate filament protein in the rat CNS. *J. Neurosci.* **9**: 2391-2401.

Church, G.M. and Gilbert, W. 1984. Genomic sequencing. *PNAS*. **81**: 1991-1995.

Desmarais, D., Filion, M., Lapointe, L. and Royal, A. 1992. Cell-specific transcription of the peripherin gene in neuronal cell lines involves a cis-acting element surrounding the TATA box. *EMBO J.* **11**: 297102980.

Desmarais, D. and Royal, A. 1996. The TATA motif is a target for efficient transcriptional activation and nerve growth factor induction of the peripherin gene. *J. Biol. Chem.* **271**: 24975-24981.

Eick, D. and Bornkamm, G.W. 1986. Transcriptional arrest within the first exon is a fast control mechanism in c-myc gene expression. *Nucl. Acids Res.* **14**: 8331-8346.

Federoff, H.J., Grabczyk, E. and Fishman, M.C. 1988. Dual regulation of GAP-43 gene expression by nerve growth factor and glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* **263**: 19290-19295.

Ferrari, N., Desmarais, D. and Royal, A. 1995. Transcriptional activation of the neuronal peripherin-encoding gene depends on a G+C-rich element that binds Sp1 in vitro and in vivo. *Gene*. **159**: 159-165.

Gonzalez, G.A., Menzel, P., Leonard, J., Fisher, W.H. and Montminy, M.R. 1991. Characterization of motifs which are critical for activity of the cyclic AMP-responsive transcription factor CREB. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 1306-1312.

Karpov, V., Fauquet, M., Lecomte, M.-J. and Portier, M.-M. 1996. Three different states of the chromatin structure of the mouse peripherin gene. *J. Neurosci. Res.* **44**: 115-123.

Lecomte, M.-J., Basseville, M., Landon, F., Karpov, V. and Fauquet, M. 1998. Transcriptional activation of the mouse peripherin gene by Leukemia Inhibitory Factor: Involvement of STAT proteins. *J. Neurochem.* **70**: 971-982.

Leconte, L., Santha, M., Fort, C., Poujeol, C., Portier, M.-M. and Simonneau, M. 1996. Cell type-specific expression of the mouse peripherin gene requires both upstream and intragenic sequences in transgenic mouse embryos. *Dev. Brain Res.* **92**: 1-9.

Leonard, D.G.B., Gorham, J.D., Cole, P., Greene, L.A. and Ziff, E.B. 1988. A nerve growth factor-regulated messenger RNA encodes a new intermediate filament protein. *J. Cell Biol.* **106**: 181-193.

Leonard, D.G.B., Ziff, E.B. and Greene, L.A. 1987. Identification and characterization of mRNAs regulated by nerve growth factor in PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3156-3167.

Machida, C.M., Rodland, K.D., Matrisian, L., Magun, B.E. and Ciment, G. 1989. NGF induction of the gene encoding the protease transin accompanies neuronal differentiation in PC12 cells. *Neuron.* **2**: 1587-1596.

Maxam, A.M. and Gilbert, W. 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* **65**: 499-560.

Minna, J., Glazer, D. and Nirenberg, M. 1972. Genetic dissection of neuronal properties using somatic cell hybrids. *Nature New Biol.* **235**: 225-231.

Mirkovitch, J. and Darnell, J.E. 1992. Mapping of RNA polymerase on mammalian genes in cells and nuclei. *Mol. Biol. Cell.* **3**: 1085-1094.

Oblinger, M.M., Wong, J. and Parysek, L.M. 1989. Axotomy-induced changes in the expression of a type III neuronal intermediate filament gene. *J. Neurosci.* **9**: 3766-75.

Parysek, L.M. and Goldman, R.D. 1987. Characterization of intermediate filaments in PC12 cells. *J. Neurosci.* **7**: 781-791.

Parysek, L.M. and Goldman, R.D. 1988. Distribution of a novel 57 kDa intermediate filament (IF) protein in the nervous system. *J. Neurosci.* **8**: 555-563.

Portier, M.-M., de Néchaud, B. and Gros, F. 1984. Peripherin, a new member of the intermediate filament protein family. *Dev. Neurosci.* **6**: 335-344.

Rougvie, A.E. and Lis, J.T. 1988. The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged. *Cell.* **54**: 795-804.

Rougvie, A.E. and Lis, J.T. 1990. Postinitiation transcriptional control in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6041-5.

Ryder, E.F., Snyder, E.Y. and Cepko, C.L. 1990. Establishment and characterization of multipotent neuronal cell lines using retrovirus vector-mediated oncogene transfer. *J. Neurobiol.* **21**: 356-375.

Satoh, T., Nakamura, S., Taga, T., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T. and Kaziro, Y. 1988. Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 3546-9.

Spencer, C.A. and Groudine, M. 1990. Transcription elongation and eukaryotic gene regulation. *Oncogene.* **5**: 777-785.

Stein, R., Orit, S. and Anderson, D.J. 1988. The induction of a neural-specific gene, SCG10, by nerve growth factor in PC12 cells is transcriptional, protein synthesis dependent, and glucocorticoid inhibitable. *Develop. Biol.* **127**: 316-325.

Sterneck, E., Kaplan, D.R. and Johnson, P.F. 1996. Interleukin-6 induces expression of peripherin and cooperates with Trk receptor signaling to promote neuronal differentiation in PC12 cells. *J. Neurochem.* **67**: 1365-1374.

Thompson, M.A. and Ziff, E.B. 1989. Structure of the gene encoding peripherin, an NGF-regulated neuronal-specific type III intermediate filament protein. *Neuron.* **2**: 1043-1053.

Troy, C.M., Brown, K., Greene, L.A. and Shelanski, M.L. 1990. Ontogeny of the neuronal intermediate filament protein, peripherin, in the mouse embryo. *Neuroscience*. **36**: 217-37.

Wong, J. and Oblinger, M.M. 1990. Differential regulation of peripherin and neurofilament gene expression in regenerating rat DRG neurons. *J. Neurosci. Res.* **27**: 332-41.

CHAPITRE 5

Discussion

5.1 DISCUSSION

Les travaux de recherche qui forment le coeur de cette thèse avaient pour but la caractérisation d'éléments de régulation importants, d'une part, pour le niveau basal d'expression histospécifique du gène et, d'autre part, pour l'induction de l'expression du gène de la périphérine en réponse à des signaux extracellulaires. De façon générale, le promoteur d'un gène est étroitement associé à un rôle de commutateur responsable de la modulation de l'activité transcriptionnelle. L'étude des mécanismes moléculaires qui régissent le profil d'expression histospécifique de la périphérine a donc débuté avec le clonage et l'analyse de son promoteur (Desmarais *et al.*, 1992). Grâce à ces travaux, les séquences régulatrices suffisantes pour diriger l'expression histospécifique d'un gène rapporteur lors d'expériences de transfections transitoires ont été identifiées. Trois séquences appelées PER1, PER2 et PER3, localisées dans les 98 premières pb du promoteur du gène, ont été identifiées par leur capacité à lier des protéines nucléaires *in vitro* et *in vivo*. Parmi celles-ci, la séquence PER1 dicte l'histospécificité de l'activation mais est toutefois incapable d'activer la transcription seule (Desmarais *et al.*, 1992). Nous avons poursuivi l'étude de la régulation de l'expression de la périphérine dans le but d'ajouter à notre compréhension des mécanismes qui définissent 1) le profil d'expression histospécifique de la périphérine, 2) qui assurent un niveau basal d'expression du gène et 3) qui modulent les niveaux d'expression en réponse à des signaux extracellulaires.

5.2 L'EXPRESSION DE LA PÉRIPHÉRINE DÉPEND DE LA PRÉSENCE D'ÉLÉMENTS DE RÉGULATION DANS LE PROMOTEUR ET À L'INTERIEUR DU GÈNE

Une caractéristique intéressante de la périphérine, à part son profil d'expression histospécifique, est sans nul doute les différents niveaux d'expression du gène retrouvés en réponse à des signaux extracellulaires. Nos travaux et ceux d'autres groupes ont permis de mettre à jour trois types d'éléments de régulation: les déterminants de l'histospécificité d'expression (Desmarais *et al.*, 1992), les activateurs (Ferrari *et al.*, 1995) et les modulateurs des réponses aux différents signaux extracellulaires qui gèrent les niveaux d'expression du gène de la périphérine en culture cellulaire (voir chapitre 4, page 74; Thompson *et al.*, 1992; Adams *et al.*, 1995; Desmarais et Royal, 1996; Lecomte *et al.*, 1998). Par contre, il apparaît que certains de ces éléments puissent entrer en jeu à plus d'un niveau. Par exemple, des évidences probantes attribuent à PER1 un rôle essentiel pour dicter l'histospécificité d'expression (Desmarais *et al.*, 1992) mais des travaux récents suggèrent que PER1 entre également en jeu pour la réponse au NGF (Desmarais et Royal, 1996). L'élément PRi-1.2 semble partager cette caractéristique avec PER1. Premièrement, il entre en jeu pour la liaison d'une protéine, p100, présente uniquement dans les cellules qui expriment le gène de la périphérine d'où un rôle potentiel pour l'histospécificité d'expression. Deuxièmement, l'activité de liaison de p100 sur PRi-1.2 peut être modulée non seulement par le NGF, mais aussi par l'IL-6 (voir chapitre 4, page 74). Ce double rôle de certains éléments de régulation vient donc ajouter à la complexité des mécanismes de contrôle qui gèrent, d'une part, l'expression histospécifique du gène de la périphérine et, d'autre part, les niveaux élevés d'expression en réponse à des signaux extracellulaires tels le NGF et l'IL-6.

5.2.1 Le niveau basal d'expression et le facteur de transcription ubiquitaire Sp1

L'importance du promoteur pour l'expression du gène de la périphérine relève, entre autres, de la présence d'éléments de régulation localisés dans les 98 premières pb du promoteur. Qui plus est, cette portion de promoteur est suffisante pour diriger une expression histospécifique du gène (Desmarais *et al.*, 1992). Malgré que les constituants protéiques dictant l'histospécificité n'ont pas été mis à jour, le facteur de transcription Sp1 semble toutefois être aux avant postes afin d'instituer un niveau basal d'expression du gène de la périphérine (Ferrari *et al.*, 1995). Le facteur de transcription Sp1, non seulement lie l'élément PER3, mais fait aussi partie des complexes protéiques formés au niveau des éléments PER2 et PER1 (résultats non publiés). L'association de Sp1 à plusieurs éléments de régulation contigus dans le promoteur d'un gène n'est pas unique à la périphérine, étant même une caractéristique associée à un grand nombre de gènes dont l'expression est sous son contrôle (Gidoni *et al.*, 1984; Barrera-Saldana *et al.*, 1985; Anderson et Freytag, 1991; Freemantle et Moran, 1997).

En plus de son domaine de liaison à l'ADN, le facteur de transcription Sp1 possède deux domaines de transactivation qui permettent la formation de multimères Sp1 (Pascal et Tjian, 1991) ainsi que l'association protéine-protéine avec un vaste répertoire d'autres facteurs de transcription tels p53 (Borellini et Glazer, 1993), dTAF_{II}110 (Gill *et al.*, 1994), Rb (Udvardia *et al.*, 1995) ou NF- κ B (Perkins *et al.*, 1993). Ainsi, dans le contexte du promoteur du gène de la périphérine, la présence de plusieurs sites de liaison au facteur de transcription Sp1 pourrait servir, en plus d'activer la transcription en stimulant la formation du complexe de pré-initiation, de lien entre la machinerie basale et les autres éléments de régulation en amont ou en aval du site d'initiation de la transcription.

En plus d'intervenir dans l'activation de la transcription de gènes communs à plusieurs types cellulaires, Sp1 a aussi été caractérisé pour son implication pour la régulation de l'expression histospécifique de certains gènes. Par exemple, l'expression histospécifique du gène CD11b de l'intégrine dans les lignées myéloïdes repose sur l'activation transcriptionnelle par Sp1 sur la liaison d'un facteur de transcription histospécifique, PU.1 (Chen *et al.*, 1993). Similairement, la régulation histospécifique de l'expression du gène MUC1 dans les cellules épithéliales dépend de la liaison de deux facteurs de transcription dans la région proximale du promoteur et un de ces facteurs est Sp1 (Kovarik *et al.*, 1996). Sp1 semble aussi intervenir dans la régulation de gènes neuronaux. Par exemple, la régulation du gène codant pour le récepteur des neutrophines de faible affinité, p75, est sous le contrôle de Sp1 (Poukka *et al.*, 1996). De même, l'expression du récepteur acétylcholine nicotinique impliqué pour la transduction du signal intracellulaire dans le système nerveux, dépend de Sp1 et de Sp3 (Bigger *et al.*, 1997). La régulation transcriptionnelle des gènes des neurofilaments NF-L et NF-M exercée par PKA semble aussi dépendre de la liaison de Sp1 dans le promoteur des gènes (White *et al.*, 1997). Finalement, en plus de réguler l'expression de plusieurs gènes neuronaux, Sp1 semble être directement impliquée lors du processus de différenciation neuronale des cellules PC12. Dans ces cellules, l'activité de Sp1 est affectée par le traitement par le NGF (Yan et Ziff, 1997). L'induction de l'activité de Sp1 par le NGF semble être impliquée pour la régulation des gènes p21, Cdk et cyclin D1 qui a pour effet de contribuer à l'arrêt de croissance des cellules PC12 lors de leur différenciation (Yan et Ziff, 1997). Ainsi, un facteur de transcription ubiquitaire tel que Sp1, par son interaction avec d'autres facteurs de transcription, contribue grandement à la régulation de l'expression de gènes impliqués lors de la différenciation neuronale.

Par contre, la liaison de Sp1 dépend-t-elle de la liaison préalable du facteur de transcription histospécifique, ou est-ce l'inverse? Notre analyse de la structure de la chromatine dans la région du gène de la périphérine suggère que la liaison d'un facteur de transcription histospécifique au voisinage de la boîte TATA pourrait être essentielle pour la liaison subséquente de Sp1. Cette hypothèse découle de notre analyse des sites hypersensibles à la DNase I dans les cellules qui n'expriment pas le gène de la périphérine. Dans ces cellules, aucun site hypersensible n'a été détecté dans la région proximale du promoteur du gène. Ceci suggère que le facteur de transcription Sp1, même s'il est présent dans les cellules qui n'expriment pas le gène de la périphérine, ne semble pas lier PER3 ou les sites contigus. D'après cette observation, la liaison d'un facteur de transcription histospécifique au voisinage du site d'initiation de la transcription semble être importante afin de rendre, par un mécanisme encore inconnu, l'ADN accessible à la liaison de Sp1 et/ou d'autres facteurs de transcription. Ainsi, dans un contexte chromatinien permissif, l'association de Sp1, un facteur de transcription ubiquitaire liant PER3 et un facteur de transcription histospécifique présent au niveau de l'élément PER1 pourrait permettre d'assurer un niveau basal d'expression de la périphérine dans les sous-populations neuronales cibles.

5.2.2 Modulation de l'expression de la périphérine en réponse à des signaux extracellulaires

Plusieurs travaux décrivent l'effet de différentes molécules sur l'induction ou la répression de l'expression du gène de la périphérine dans les cellules PC12. Récemment, plusieurs éléments de régulation impliqués dans la réponse au NGF (Thompson *et al.*, 1992; Adams *et al.*, 1995; Desmarais et Royal, 1996), au LIF

(Lecomte *et al.*, 1998) et à la dexaméthasone (Desmarais et Royal, 1996) ont été identifiés dans le promoteur du gène de la périphérine. Nos travaux ont finalement permis d'identifier un élément de régulation dans l'intron 1 du gène qui vient s'ajouter aux éléments potentiellement impliqués pour la réponse au NGF. Par contre, contrairement aux autres éléments retrouvés dans le promoteur du gène, l'élément PRi-1.2 semble être impliqué dans une deuxième voie de signalisation intracellulaire, celle de l'IL-6 (voir chapitre 4, page 74).

Au cours du développement, quel est le rôle de la dexaméthasone sur l'expression du gène de la périphérine? Tel que décrit à la section 1.3.2 (page 25), la migration du précurseur bipotentiel sympathosurrénalien vers la glande surrénale l'emmène vers un environnement riche en glucocorticoïdes, des hormones synthétisées par le cortex surrénalien. La voie de différenciation du précurseur vers le phénotype endocrinien est donc dicté par les glucocorticoïdes qui ont une action négative dont le but est de réprimer l'activité des facteurs qui amorcent la différenciation neuronale. En réprimant l'expression de la périphérine dans les cellules PC12 qui possèdent aussi ce caractère bipotentiel, les glucocorticoïdes interfèrent avec une des étapes du programme de différenciation neuronale des PC12 et représente le phénomène observé pour le précurseur sympathosurrénalien.

L'importance de l'induction de l'expression de la périphérine en réponse au NGF et à l'IL-6 n'est toutefois pas aussi claire. Au cours du développement, même si le NGF est vital pour la croissance, pour la différenciation et pour la survie des neurones sympathiques et sensoriels dérivés de la crête neurale (voir chapitre 1, section 1.3.1, page 26), l'induction de son expression dans le tissu cible n'apparaît qu'à l'arrivée de la fibre nerveuse, au moment de l'innervation. De plus, l'expression du récepteur du NGF n'est détectée que lorsque les axones atteignent

leur tissu cible. Il est proposé que le NGF permet la survie neuronale au moment de l'innervation (Ebadi *et al.*, 1997). Comme l'expression de la périphérine est initialement détectée au moment où les axones commencent à être formées, il semble peu probable que l'induction de son expression au cours du développement dépende du NGF puisque son expression précède la réponse au NGF.

L'importance du NGF sur l'expression de la périphérine pourrait être toutefois plus grande lors de la régénération axonale suite à une lésion d'un neurone. Le NGF (Ebadi *et al.*, 1997) ainsi que les cytokines LIF (Sun *et al.*, 1996) et IL-6 (Kurek *et al.*, 1996; Gadiant et Otten, 1997) ont été décrites comme étant des molécules impliquées lors de la réponse à une lésion d'un neurone. Par exemple, suite à une lésion d'un axone, il y aura transport rétrograde du NGF dans l'axone puis induction du bourgeonnement d'un nouvel axone (Fang et Luo, 1996; Ramer *et al.*, 1997). La réponse d'un neurone lésé au NGF pourrait alors se traduire, entre autres, par l'induction de l'expression du gène de la périphérine et par conséquent, l'augmentation de la protéine présente dans l'axone qui se régénère. Une augmentation de la synthèse de la protéine pourrait servir à former un réseau de filaments intermédiaires essentiel au maintien du calibre et de la plasticité axonale potentiellement requis lors de la régénération.

En plus de son rôle pour la survie neuronale, l'IL-6 joue également un rôle important lors de la réponse à une lésion d'un neurone (voir chapitre 1, section 1.3.3, page 26). Dans le système nerveux, les neurones et les cellules gliales correspondent à des sites majeurs de synthèse d'IL-6 (Gadiant et Otten, 1997). Suite à une lésion, il y a augmentation de la synthèse d'IL-6 au niveau du neurone lésé ainsi qu'au niveau du tissu cible (Kurek *et al.*, 1996). De plus, l'augmentation des niveaux d'IL-6 semble être associée à une régénération accélérée de l'axone lésé (Hirota *et al.*, 1996). Donc, lors du processus de régénération axonale et de façon

similaire au NGF, l'IL-6 pourrait jouer un rôle important afin d'augmenter l'expression du gène de la périphérine et ainsi répondre à un besoin accru en protéine.

Finalement, le programme d'expression tardif de la périphérine dans la réponse au NGF et à l'IL-6 (24-48 heures après le début du traitement) semble correspondre au déroulement des étapes du processus de régénération axonale. On peut supposer que lors d'une lésion d'un neurone, une série de gènes doivent être activés avant la périphérine, notamment, les gènes impliqués dans la réponse à un stress, ceux qui sont importants pour la survie cellulaire ainsi que les facteurs de transcription associés à l'expression de ces gènes. L'apparition de la périphérine est probablement nécessaire uniquement aux étapes ultimes de la régénération axonale, soit au moment de la croissance d'un nouvel axone afin de maintenir un calibre axonal et une certaine plasticité nécessaire à l'axone en croissance.

5.3 L'ÉLÉMENT PRI-1.2, LIEU DE CONVERGENCE DES VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DU NGF ET DE L'IL-6

Au cours de la régénération axonale, la périphérine semble suivre un programme d'expression particulier qui se reflète par l'induction de son expression d'un niveau basal à un niveau trois à cinq fois plus élevé. Le rôle de l'augmentation de l'expression de la périphérine au cours de ce processus reste encore énigmatique. Des évidences associent maintenant plusieurs molécules extracellulaires, connues pour jouer un rôle lors de la régénération axonale, au contrôle de l'expression du gène de la périphérine. Ainsi, trois voies de transduction du signal différentes, celle

qui est induite par le NGF, celle qui est induite par l'IL-6 et celle qui est déclenchée par le LIF peuvent induire l'expression de la périphérine (voir chapitre 1, section 1.3, page 25).

La liaison du NGF à son récepteur de surface induit une première cascade intracellulaire médiée par la voie Ras/ERK/MAPK. Le NGF peut également amorcer une autre voie de signalisation intracellulaire en stimulant l'activité de la phospholipase C- γ 1 et de la kinase PI-3 (Kaplan et Stephens, 1994). Similairement au NGF, l'IL-6 peut déclencher plus d'une voie de signalisation intracellulaire, la voie médiée par l'activation des tyrosines kinases JAK et celle qui fait intervenir Ras/ERK/MAPK (Gadiant et Otten, 1997). Finalement, la liaison du facteur LIF à son récepteur de surface conduit à la transduction du signal de la surface cellulaire au noyau via l'activation de la voie JAK/STAT (Symes *et al.*, 1995a; Symes *et al.*, 1995b).

L'identification de p100 (voir chapitre 4, page 74) a permis de mettre au jour un nouveau maillon de la chaîne des événements qui mènent à l'induction de l'expression du gène de la périphérine. De plus, deux voies de transduction du signal semblent converger vers un facteur nucléaire unique. Ainsi, p100 a été identifié comme étant un facteur nucléaire commun aux voies du NGF et de l'IL-6 et qui est retrouvé uniquement dans les cellules qui expriment le gène de la périphérine.

5.3.1 Mécanisme d'induction de l'expression du gène de la périphérine

Le contrôle du niveau d'expression d'un gène dépend notamment de l'action directe de certains facteurs de transcription dont le rôle est de faciliter l'assemblage d'un complexe transcriptionnel actif. Contrairement à ces activateurs, certains

facteurs de transcription peuvent intervenir de façon à réprimer l'expression d'un gène. Dans certaines circonstances, la répression de l'expression d'un gène est temporaire et peut être levée lorsque la synthèse d'une protéine particulière est exigée, par exemple, suite à la stimulation d'une cellule par une neurotrophine. Les évidences présentées au chapitre 4 semblent suggérer que dans les cellules PC12 non différenciées, l'expression de la périphérine est réprimée à un niveau qui correspond au niveau basal d'expression. Dans ce modèle, en réponse au NGF ou à l'IL-6, cette répression est levée et permet d'atteindre un niveau d'expression trois à quatre fois plus élevé que le niveau de base.

Plusieurs mécanismes répressionnels ont été décrits (voir section 1.4.3.2, page 43). Le modèle de répression tel que proposé pour le gène de la périphérine présente toutefois un aspect unique. Ici, le mécanisme de répression est partiel car il doit permettre un niveau basal d'expression du gène de la périphérine. Un mécanisme de répression particulier, le blocage de l'élongation, pourrait permettre de passer d'un niveau basal d'expression à un niveau induit en levant le blocage en réponse à un stimulus. Dans le contexte de la périphérine, ce blocage de l'élongation serait partiel et permettrait ainsi de maintenir un niveau basal d'expression du gène. Des exemples d'un tel mécanisme de contrôle sont retrouvés pour le gène *hsp70* chez la drosophile, pour le gène de la transthyréline chez la souris et pour le gène *c-myc* humain (voir chapitre 1, section 1.5.2, page 51). Dans le cas du gène *c-myc*, en réponse à un stimuli, par exemple un mitogène, le blocage de l'élongation est relevé et des niveaux élevés de *c-myc* nécessaires à la prolifération cellulaire sont alors détectés. Des expériences de transfections transitoires dans des cellules en culture semblent appuyer l'idée qu'un tel mécanisme de régulation permettrait les réponses au NGF et à l'IL-6. Lorsque l'élément PRI-1.2 est placé en amont d'un promoteur comprenant les 98 premières pb du

promoteur de la périphérine pour diriger l'expression d'un gène rapporteur, aucune répression de l'expression du gène rapporteur n'est détectée (voir annexe 1, page xvii). Ces résultats suggèrent que l'élément PRi-1.2 n'agit pas comme un répresseur ou «silencer» ayant une action sur le complexe d'initiation. Cependant, le contexte de l'élément PRi-1.2 dans ces constructions plasmidiques n'était pas celui retrouvé dans l'intron 1 du gène périphérine endogène. Si le blocage de l'élongation est bien un mécanisme de régulation de l'expression du gène de la périphérine, des expériences de détection de transcrits partiels («transcriptional nuclear run on») pourraient être réalisées afin de détecter la présence de transcrits partiels qui correspondraient à un arrêt de la transcription au niveau de l'intron 1 de la périphérine.

5.4 Conclusion

Nos travaux démontrent que l'expression du gène de la périphérine dépend non seulement de séquences localisées dans le promoteur mais également de séquences à l'intérieur du gène tel que proposé initialement par Belecki-Adams et collaborateurs (1993). Le profil d'expression du gène de la périphérine et son programme d'induction lors d'une lésion à un neurone suggèrent que la périphérine puisse jouer un rôle important lors de la régénération axonale. Cette hypothèse est appuyée par l'étude des bases moléculaires régissant l'induction de l'expression du gène de la périphérine en réponse au NGF et à l'IL-6 qui nous ont permis d'identifier une séquence d'ADN, PRi-1.2, et un facteur nucléaire histospécifique, p100, potentiellement importants pour ces réponses.

En plus d'ajouter à notre compréhension de l'expression du gène de la périphérine, l'identification d'un élément de régulation impliqué dans la répression

des réponses au NGF et à l'IL-6 permet d'envisager son utilisation thérapeutique. L'insertion d'un tel élément dans un gène d'intérêt pourrait permettre de moduler son expression et permettrait d'obtenir des niveaux d'expression plus élevés en traitant au NGF ou à l'IL-6.

BIBLIOGRAPHIE

Adams, A.D., Choate, D.M. et Thompson, M.A. 1995. NF1-L is the DNA-binding component of the protein complex at the peripherin negative regulatory element. *J. Biol. Chem.* **270**: 6975-6983.

Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L. et Gerace, L. 1986. The nuclear lamina is a network of intermediate-type filaments. *Nature.* **323**: 560-564.

Aguayo, A.J., Rasminsky, M., Bray, G.M., Carbonetto, S., McKerracher, L., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M. et Carter, D.A. 1991. Degenerative and regenerative responses of injured neurons in the central nervous system of adult mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences.* **331**: 337-343.

Akira, S., Taga, T. et Kishimoto, T. 1993. Interleukin-6 in biology and medicine. *Advances in Immunology.* **54**: 1-78.

Aletta, J.M., Angeletti, R., Liem, R.K., Purcell, C., Shelanski, M.L. et Greene, L.A. 1988. Relationship between the nerve growth factor-regulated clone 73 gene product and the 58-kilodalton neuronal intermediate filament protein (peripherin). *J. Neurochem.* **51**: 1317-1320.

Aletta, J.M., Shelanski, M.L. et Greene, L.A. 1989. Phosphorylation of the peripherin 58-kDa neuronal intermediate filament protein. Regulation by nerve growth factor and other agents. *J. Biol. Chem.* **264**: 4619-4627.

Alevizopoulos, A. et Mermoud, N. 1996. Antagonistic regulation of a proline-rich transcription factor by transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *J. Biol. Chem.* **271**: 29672-29681.

Aloe, L. et Levi-Montalcini, R. 1979. Nerve growth factor-induced transformation of immature chromaffin cells in vivo into sympathetic neurons: effect for antiserum to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 1246-1250.

Anderson, D.J., Carnahan, J.F., Michelsohn, A. et Patterson, P.H. 1991. Antibody markers identify a common progenitor to sympathetic neurons and chromaffin cells *in vivo* and reveal the timing of commitment to neuronal differentiation in the sympathoadrenal lineage. *J. Neurosci.* **11**: 3507-3519.

Anderson, D.J. 1993. Cell fate determination in the peripheral nervous system: the sympathoadrenal progenitor. [Review] [65 refs]. *J. Neurobiol.* **24**: 185-98.

Anderson, D.J. et Axel, R. 1986. A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. *Cell.* **47**: 1079-1090.

Anderson, G.M. et Freytag, S.O. 1991. Synergistic activation of a human promoter in vivo by transcription factor Sp1. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 1935-1943.

Angelastro, J.M., Ho, C.-L., Frappier, T., Liem, R.K.H. et Greene, L.A. 1998. Peripherin is tyrosine-phosphorylated at its carboxy-terminal tyrosine. *J. Neurochem.* **70**: 540-549.

Ansari, A.Z., Bradner, J.E. et O'Halloran, T.V. 1995. DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism. *Nature*. **374**: 371-375.

Anthony-Cahill, S.J., Benfield, P.A., Fairman, R., Wasserman, Z.R., Brenner, S.L., Stafford III, W.F., Altenbach, C., Hubbell, W.L. et DeGrado, W.F. 1992. Molecular characterization of helix-loop-helix peptides. *Science*. **255**: 979-983.

Anton-Lamprecht, I. 1983. Genetically induced abnormalities of epidermal differentiation and ultrastructure in ichthyoses and epidermolysis, pathogenesis, heterogeneity, fetal manifestation, and prenatal diagnosis. *J. Invest. Dermatol.* **81**: 149-156.

Aronow, B.J., Ebert, C.A., Valerius, M.T., Potter, S.S., Wiginton, D.A., Witte, D.P. et Hutton, J.J. 1995. Dissecting a locus control region: facilitation of enhancer function by extended enhancer-flanking sequences. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 1123-1135.

Barrera-Saldana, H., Takahashi, K., Vigneron, M., Wildeman, A., Davidson, I. et Chambon, P. 1985. All six GC-motifs of the SV40 early upstream element contribute to promoter activity in vivo and in vitro. *EMBO J.* **4**: 3839-3849.

Baudoin, C., Meneguzzi, G., Portier, M.M., Demarchez, M., Bernerd, F., Pisani, A. et Ortonne, J.P. 1993. Peripherin, a neuronal intermediate protein, is stably expressed by neuroendocrine carcinomas of the skin, their xenograft on nude mice, and the corresponding primary cultures. *Cancer Res.* **53**: 1175-1181.

Beato, M. 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* **56**: 335-344.

Belecky-Adams, T., Wight, D.C., Kopchick, J.J. et Parysek, L.M. 1993. Intragenic sequences are required for cell type-specific and injury-induced expression of the rat peripherin gene. *J. Neurosci.* **13**: 5056-5065.

Bentley, D.L. et Groudine, M. 1986. A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells. *Nature.* **321**: 702-706.

Bernier, G., De Repentigny, Y., Mathieu, M., David, S. et Kothary, R. 1998. Dystonin is an essential component of the Schwann cell cytoskeleton at the time of myelination. *Development* **125**: 2135-2148.

Bernier, G. et Kothary, R. 1998. Prenatal onset of axonopathy in Dystonin musculorum mice. *Dev Genet.* **22**: 160-168.

Bigger, C.B., Melnikova, I.N. et Gardner P.D. 1997. Sp1 and Sp3 regulate expression of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor beta4 subunit gene. *J. Biol. Chem.* **272**: 25976-25982.

Bilak, S.R., Sernett, S.W., Bilak, M.M., Stromer, M.H., Huiatt, T.W. et Robson, R.M. 1998. Properties of the novel intermediate filament protein synemin and its identification in mammalian muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **355**: 63-76.

Bjorklund, S. et Kim, Y.J. 1996. Mediator of transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 335-337.

Bohn, M.C., Goldstein, M. et Black, I.B. 1981. Role of glucocorticoids in expression of the adrenergic phenotype in rat embryonic adrenal gland. *Develop. Biol.* **82**: 1-10.

Bolin, L.M., Verity, A.N., Silver, J.E., Shooter, E.M. et Abrams, J.S. 1995. Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. *J. Neurochem.* **64**: 850-858.

Borellini, F. et Glazer, R.I. 1993. Induction of Sp1-p53 DNA-binding heterocomplexes during granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation in human erythroleukemia cell line TF-1. *J. Biol. Chem.* **268**: 7923-7928.

Bravo, R., Small, J.V., Fey, S.J., Larsen, P.M. et Colis, J.E. 1982. Architecture and polypeptide composition of HeLa cytoskeletons. Modifications of cytoarchitectural polypeptide during mitosis. *J. Mol. Biol.* **154**: 121-143.

Brody, B.A., Ley, C.A. et Parysek, L.M. 1989. Selective distribution of the 57 kDa neural intermediate filament protein in the rat CNS. *J. Neurosci.* **9**: 2391-2401.

Brown, A., Bernier, G., Mathieu, M., Rossant, J., et Kothary, R. 1995. The mouse dystonia musculorum gene is a neuronal isoform of bullous pemphigoid antigen 1. *Nature Genet.* **10**: 301-306.

Buratowski, S. 1994. The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell.* **77**: 1-3.

Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L. et Sharp, P.A. 1989. Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell.* **56**: 549-561.

Carnahan, J.F. et Patterson, P.H. 1991. Isolation of the progenitor cells of the sympathoadrenal lineage from embryonic sympathetic ganglia with monoclonal antibodies. *J. Neurosci.* **11**: 3520-3530.

Chadan, S., Le Gall, J.-Y., Di Giamberardino, L. et Filliatreau, G. 1994. Axonal transport of type III intermediate filament protein peripherin in intact and regenerating motor axons of the rat sciatic nerve. *J. Neurosci. Res.* **39**: 127-139.

Chandler, V.L., Maler, B.A. et Yamamoto, K.R. 1983. DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor *in vitro* render a heterologous promoter hormone responsive *in vivo*. *Cell.* **33**: 489-499.

Chao, M.V., Bothwell, M.A., Ross, A.H., Koprowski, H., Lanahan, A.A., Buck, C.R. et Sehgal, A. 1986. Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science*. **232**: 518-521.

Charnas, L.R., Szaro, B.G. et Gainer, H. 1992. Identification and developmental expression of a novel low molecular weight neuronal intermediate filament protein expressed in *Xenopus laevis*. *J. Neurosci.* **12**: 3010-3024.

Chen, H.-M., Pahl, H.L., Scheibe, R.J., Zhang, D.-E. et Tenen, D.G. 1993. The Sp1 transcription factor binds the CD11b promoter specifically in myeloid cells in vivo and is essential for myeloid-specific promoter activity. *J. Biol. Chem.* **268**: 8230-8239.

Chou, C.F., Riopel, C.L., Rott, L.S. et Omary, M.B. 1993. A significant soluble keratin fraction in 'simple' epithelial cells. Lack of an apparent phosphorylation and glycosylation role in keratin solubility. *Journal of Cell Science*.

Cochard, P., et Paulin, D. 1984. Initial expression of neurofilaments and vimentine in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo *in vivo*. *J. Neurosci.* **4**: 2080-2094.

Cockerill, P.N. et Garrard, W.T. 1986. Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell.* **44**: 273-282.

Colamarino, S.A. et Tessier-Lavigne, M. 1995. The role of the floor plate in axon guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* **18**: 497-529.

Colucci-Guyon, E., Portier, M.-M., Dunia, I., Paulin, D., Pournin, S. et Babinet, C. 1994. Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell*. **79**: 679-694.

Connor, B. et Dragunow, M. 1998. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res. Rev.* **27**: 1-39.

Cortes, P., Flores, O. et Reinberg, D. 1992. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification and analysis of transcription factor IIA and identification of transcription factor IIJ. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 413-421.

Côté, F., Collard, J.F. et Julien, J.P. 1993. Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell*. **73**: 35-46.

Courey, A.J., Holtzman, D.A., Jackson, S.P. et Tjian, R. 1989. Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell*. **59**: 827-836.

Courey, A.J. et Tjian, R. 1988. Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell*. **55**: 887-898.

Dalpe, G., Leclerc, N., Vallee, A., Messer, A., Mathieu, M., De Repentigny, Y. et Kothary, R. 1998. Dystonin is essential for maintaining neuronal cytoskeleton organization. *Mol. Cell Neurosci.* **10**: 243-257.

Davidson, E.H. 1990. How embryos work: a comparative view of diverse modes of cell specification. *Development*. **108**: 365-389.

Derer, M., Grynszpan, W.O. et Portier, M.M. 1989. Immunocytochemical localization of the intermediate filament protein peripherin in adult mouse adrenal chromaffin cells in culture. *Neuroscience*. **31**: 471-477.

Desmarais, D., Filion, M., Lapointe, L. et Royal, A. 1992. Cell-specific transcription of the peripherin gene in neuronal cell lines involves a cis-acting element surrounding the TATA box. *EMBO J.* **11**: 2971-2980.

Desmarais, D. et Royal, A. 1996. The TATA motif is a target for efficient transcriptional activation and nerve growth factor induction of the peripherin gene. *J. Biol. Chem.* **271**: 24976-24981.

Diamond, M.I., Miner, J.N., Yoshinaga, S.K. et Yamamoto, K.R. 1990. Transcription factor interactions: selectors of positive and negative regulation from a single DNA element. *Science*. **249**: 1266-1272.

Djabali, K., Portier, M.M., Gros, F., Blobel, G. et Georgatos, S.D. 1991. Network antibodies identify nuclear lamin B as a physiological attachment site for peripherin intermediate filaments. *Cell*. **64**: 109-121.

Doe, C.Q., Hiromi, Y., Gehring, W.J. et Goodman, C.S. 1988. Expression and function of the segmentation gene fushi tarazu during *Drosophila* neurogenesis. *Science*. **239**: 170-175.

Doe, C.Q. et Scott, M.P. 1988. Segmentation and homeotic gene function in the developing nervous system of *Drosophila*. *Trends Neurosci.* **11**: 101-106.

Doe, C.Q., Smouse, D. et Goodman, C.S. 1988. Control of neuronal fate by the *Drosophila* segmentation gene even-skipped. *Nature.* **333**: 376-378.

Doupe, A.J., Landis, S.C. et Patterson, P.H. 1985. Environmental influences in the development of neuronal crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity. *J. Neurosci.* **5**: 2119-2142.

Doupe, A.J., Patterson, P.H. et Landis, S.C. 1985. Small intensely fluorescent cells in culture: role of glucocorticoids and growth factors in their development and interconversions with other neuronal crest derivatives. *J. Neurosci.* **5**: 2143-2160.

Drouin, J., Trifiro, M.A., Plante, R.K., Nemer, M., Ericksson, P. et Wrangle, O. 1989. Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 5305-5314.

Dynlacht, D.B., Hoey, T. et Tjian, R. 1991. Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell.* **66**: 563-576.

Ebadi, M., Bashir, R.M., Heidrick, M.L., Hamada, F.M., El Refaey, H., Hamed, A., Helal, G., Baxi, M.D., Cerutis, D.R. et Lassi, N.K. 1997. Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem. Intl.* **30**: 347-374.

Eick, D. et Bornkamm, G.W. 1986. Transcriptional arrest within the first exon is a fast control mechanism in c-myc gene expression. *Nucl. Acids Res.* **14**: 8331-8346.

Elder, G.A., Friedrich, V.L., Bosco, P., Kang, C., Goourov, A., Tu, P.-H., Lee, V.M.Y. et Lazzarini, R.A. 1998. Absence of the mid-size neurofilament sub-unit decreases axonal calibers, levels of light neurofilament (NF-L) and neurofilament content. *J. Cell. Biol.* **141**: 727-739.

Escurat, M., Djabali, K., Gumpel, M., Gros, F. et Portier, M.M. 1990. Differential expression of two neuronal intermediate-filament proteins, peripherin and the low-molecular-mass neurofilament protein (NF-L), during the development of the rat. *J. Neurosci.* **10**: 764-784.

Escurat, M., Djabali, K., Huc, C., Landon, F., Becourt, C., Boitard, C., Gros, F. et Portier, M.M. 1991. Origin of the beta cells of the islets of Langerhans is further questioned by the expression of neuronal intermediate filament proteins, peripherin and NF-L, in the rat insulinoma RIN5F cell line. *Dev. Neurosci.* **13**: 424-432.

Evans, R.M. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* **240**: 889-895.

Evans, T. et Felsenfeld, G. 1989. The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell*. **58**: 877-885.

Fang, H. et Luo, Y. 1996. Effects of nerve growth factor on axonal retrograde transport after axonal injury of motoneurons. *Journal of Tongji Medical University*. **16**: 27-31.

Fann, M.J. et Patterson, P.H. 1994. Neurotrophic cytokines and activin A differentially regulate the phenotype of cultured sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**: 43-47.

Federoff, H.J., Grabczyk, E. et Fishman, M.C. 1988. Dual regulation of GAP-43 gene expression by nerve growth factor and glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* **263**: 19290-19295.

Ferrari, N., Desmarais, D. et Royal, A. 1995. Transcriptional activation of the neuronal peripherin-encoding gene depends on a G+C-rich element that binds Sp1 in vitro and in vivo. *Gene*. **159**: 159-165.

Flanagan, P.M., Kelleher III, R.J., Sayre, M.H., Tschochner, H. et Kornberg, R.D. 1991. A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription *in vitro*. *Nature*. **350**: 436-438.

Flores, O., Lu, H. et Reinberg, D. 1992. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **267**: 2786-2793.

Flores, O., Maldonado, E., Burton, Z., Greenblatt, J. et Reinberg, D. 1988. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. RNA polymerase II-association protein 30 is an essential component of transcription factor IIF. *J. Biol. Chem.* **263**: 10812-10816.

Forrester, W.C., van Genderen, C., Jenuwein, T. et Grosschedl, R. 1994. Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin mu gene on nuclear matrix attachment regions. *Science.* **265**: 1221-1225.

Frade, J.M. et Barde, Y.-A. 1998. Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *BioEssays* **20**. 137-145.

Fraser, N.W., Seghal, P.B. et Darnell, J.E. 1978. DRB-induced premature termination of the late adenovirus transcription. *Nature.* **272**: 590-593.

Freemantle, S.J. et Moran, R.G. 1997. Transcription of human folylpoly-gamma-glutamate synthetase gene. *J. Biol. Chem.* **272**: 25373-25379.

Freyd, G., Kim, S.K. et Horvitz, H.R. 1990. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-II*. *Nature.* **344**: 876-879.

Fuchs, E. 1995. Keratins and the skin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**: 123-153.

Fuchs, E., Esteves, R.A. et Coulombe, P.A. 1992. Transgenic mice expressing a mutant keratin 10 gene reveal the likely genetic basis for epidermolytic hyperkeratosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 6906-6910.

Gadient, R.A. et Otten, U.H. 1997. Interleukin-6 (IL-6)- a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Progress in Neurobiology*. **52**: 379-390.

Gasser, S.M. et Laemmli, U.K. 1986. Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell*. **46**: 521-530.

Gehring, W.J. 1987. Homeo boxes in the study of development. *Science*. **236**: 1245-1252.

Georgatos, S.D., Gounari, F., Goulielmos, G. et Aebi, U. 1997. To bead or not to bead? Lens-specific intermediate filaments revised. *J. Cell. Sci.* **110**: 2629-2634.

Giasson, B.I. et Mushynski, W.E. 1998. Intermediate filament disassembly in cultured dorsal root ganglion neurons is associated with amino-terminal head domain phosphorylation of specific subunits. *J. Neurochem.* **70**: 1869-1875.

Gidoni, D., Dynan, W.S. et Tjian, R. 1984. Multiple specific contacts between a mammalian transcription factor and its cognate promoters. *Nature*. **312**: 409-413.

Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z.H. et Tjian, R. 1994. A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the *Drosophila* TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA*. **91**: 192-196.

Gill, G. et Ptashne, M. 1988. Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature*. **344**: 721-724.

Glasgow, E., Druger, R.K., Levine, E.M., Fuchs, C. et Schechter, N. 1992. Plasticine, a novel type III neurofilament protein from goldfish retina: increased expression during optic nerve regeneration. *Neuron*. **9**: 373-381.

Glasgow, E., Druger, R.K., Fuchs, C., Lane, W.S. et Schechter, N. 1994. Molecular cloning of gefiltin (ON1): serial expression of two new neurofilament mRNAs during optic nerve regeneration. *EMBO J.* **13**: 297-305.

Goebel, H.H. et Bornemann, A. 1993. Desmin pathology in neuromuscular diseases. *Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology*. **64**: 127-135.

Gomi, H., Yokoyama, T., Fujimoto, K., Ikeda, T., Katoh, A., Itoh, T. et Itohara, S. 1995. Mice devoid of the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to scrapie prions. *Neuron*. **14**: 29-41.

Gonda, Y., Nishizawa, K., Ando, S., Kitamura, S., Minoura, Y., Nishi, Y. et Inagaki, M. 1990. Involvement of protein kinase C in the regulation of assembly-disassembly of neurofilaments in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **167**: 1316-1325.

Gonzalez, G.A., Menzel, P., Leonard, J., Fischer, W.H. et Montminy, M.R. 1991. Characterization of motifs which are critical for activity of the cyclic AMP-responsive transcription factor CREB. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 1306-1312.

Goodrich, J.A. et Tjian, R. 1994. Transcription factors IIE and IIH and ATP hydrolysis direct promoter clearance by RNA polymerase II. *Cell.* **77**: 145-156.

Gorham, J.D., Baker, H., Kegler, D. et Ziff, E.B. 1990. The expression of the neuronal intermediate filament protein peripherin in the rat embryo. *Dev. Brain Res.* **57**: 235-248.

Gottschall, P.E., Tatsuno, I. et Arimura, A. 1994. Regulation of interleukin-6 (IL-6) secretion in primary cultured rat astrocytes: synergism of interleukin-1 (IL-1) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Brain Res.* **637**: 197-203.

Gounari, F., Merdes, A., Quinlan, R., Hess, J., Fitzgerald, P.G., Ouzounis, C.A. et Georgatos, S.D. 1993. Bovine filensin possesses primary and secondary structure similarity to intermediate filament proteins. *J. Cell Biol.* **121**: 847-853.

Graziadei, G.A. et Graziadei, P.P. 1979. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J. Neurocytol.* **8**: 197-213.

Green, K.J. et Goldman, R.D. 1986. Evidence for an interaction between the cell surface and intermediate filaments in cultured fibroblasts. *Cell Motil. Cytoskel.* **6**: 389-405.

Green, S. et Chambon, P. 1988. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.* **4**: 309-314.

Greene, L.A. 1989. A new neuronal intermediate filament protein. *Trends Neurosci.* **12**: 228-230.

Greene, L.A. et Tischler, A.S. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 2424-2428.

Greene, L.A. et Tischler, A.S. 1982. PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research. *Adv. Cell. Neurobiol.* **3**: 373-414.

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

Groudine, M. et Weintraub, H. 1981. Activation of globin genes during chicken development. *Cell.* **24**: 393-401.

Gurdon, J.B. 1992. The generation of diversity and pattern in animal development. *Cell.* **68**: 185-199.

Ha, I., Roberts, S., Maldonado, E., Sun, X., Kim, L.U., Green, M.R. et Reinberg, D. 1993. Multiple functional domains of human transcription factor IIB. Distinct interactions with two general transcription factors and RNA polymerase II. *Genes and Development*. **7**: 1021-1032.

Hagen, G., Muller, S., Beato, M. et Suske, G. 1992. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucl. Acids Res.* **20**: 5519-5525.

Hama, T., Miyamoto, M., Tsukui, H., Nishio, C. et Hatanaka, H. 1989. Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forbrain cholinergic neurons from postnatal rats. *Neuroscience Letters*. **104**: 340-344.

Harada, R., Dufort, D., Denis-Larose, C. et Nepveu, A. 1994. Conserved Cut Repeats in the human Cut homeodomain protein function as DNA binding domains. *J. Biol. Chem.* **269**: 2062-2067.

Harrison, S.C. et Aggarwal, A.K. 1990. DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 933-969.

Heald, R. et McKeon, F. 1990. Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell*. **61**: 579-589.

Heaney, M.L. et Golde, D.W. 1996. Soluble cytokine receptors. *Blood*. **87**: 847-857.

Hemmati-Brivanlou, A., Mann, R.W. et Harland, R.M. 1992. A protein expressed in the growth cones of embryonic vertebrate neurons defines a new class of intermediate filament protein. *Neuron*. **9**: 417-428.

Herr, W., Sturm, R.A., Clerc, R.G., Corcoran, L.M., Baltimore, D., Sharp, P.A., Ingraham, J.A., Rosenfeld, M.G., Finney, M., Ruvkun, G. et Horvitz, H.R. 1988. The POU domain: a large conserved region in the mammalian *pit-1*, *oct-1*, *oct-2*, and *Caenorhabditis elegans unc-86* gene products. *Genes and Development*. **2**: 1513-1516.

Herrera, R.E., Shaw, P.E. et Nordheim, A. 1989. Occupation of the c-fos serum response element in vivo by a multi-protein complex is unaltered by growth factor induction. *Nature*. **340**: 68-70.

Herrmann, H., Hofmann, I. et Franke, W.W. 1992. Identification of a nonapeptide motif in the vimentin head domain involved in intermediate filament assembly. *J. Mol. Biol.* **223**: 637-650.

Herschbach, B.M. et Johnson, A.D. 1993. Transcriptional repression in eukaryotes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**: 479-509.

Hibi, M., Nakajima, K. et Hirano, T. 1996. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J. Molec. Med.* **74**: 1-12.

Hirota, H., Kiyama, H., Kischimoto, T. et Taga, T. 1996. Accelerated nerve regeneration in mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *J. Exp. Med.* **183**: 2627-2634.

Hisanaga, S., Gonda, Y., Inagaki, M., Ikai, A. et Hirokawa, N. 1990. *Cell Regul.* **1**: 237-248.

Hoffman, P.N., Cleveland, D.W., Griffin, J.W., Landes, P.W., Cowan, N.J. et Price, D.L. 1987. Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA.* **84**: 3472-3476.

Hoffman, P.N., Griffin, J.W., Gold, B.G. et Price, D.L. 1985. Slowing of neurofilament transport and the radial growth of developing nerve fibers. *J. Neurosci.* **5**: 2920-2929.

Hoffman, P.N., Griffin, J.W. et Price, D.L. 1984. Control of axonal caliber by neurofilament transport. *J. Cell. Biol.* **99**: 705-714.

Hollenberg, S.M. et Evans, R.M. 1988. Multiple and cooperative *trans*-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell.* **55**: 899-906.

Horikoshi, M., Hai, T., Lin, Y.-S., Green, M.R. et Roeder, R.G. 1988. Transcription factor ATF interacts with the TATA factor to facilitate establishment of a preinitiation complex. *Cell.* **54**: 1033-1042.

Houseweart, M.K. et Cleveland, D.W. 1998. Intermediate filaments and their associated proteins: multiple dynamic personalities. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 93-101.

Huc, C., Escurat, M., Djabali, K., Derer, M., Landon, F., Gros, F. et Portier, M.M. 1989. Phosphorylation of peripherin, an intermediate filament protein, in mouse neuroblastoma NIE 115 cell line and in sympathetic neurons. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **160**: 772-779.

Jeppesen, P. et Turner, B.M. 1993. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell.* **74**: 281-289.

Jiang, W., Uht, R. et Bohn, M.C. 1989. Regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) mRNA in the rat adrenal medulla by corticosterone. *Intl. J. Dev. Neurosci.* **7**: 513-520.

Johnson, A.D. 1995. The price of repression. *Cell.* **81**: 655-658.

Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M. et Chao, M.V. 1986. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell.* **47**: 545-554.

Johnston, S.A., Salmeron Jr., J.M. et Dincher, S.S. 1987. Interaction of positive and negative regulatory proteins in the galactose regulon of yeast. *Cell.* **50**: 143-146.

Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R. et Tjian, R. 1987. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell.* **51**: 1079-1090.

Kaiser, K. et Meisterernst, M. 1996. The human general co-factors. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 342-345.

Kaplan, D.R., Martin-Zanca, D. et Parada, L.F. 1991b. Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the *trk* proto-oncogene product induced by NGF. *Nature.* **350**: 158-160.

Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V. et Parada, L.F. 1991a. The *trk* proto-oncogene product: a signal transducing receptor for the nerve growth factor. *Science.* **252**: 554-558.

Kaplan, D.R. et Stephens, R.M. 1994. Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J. Neurobiol.* **25**: 1404-1417.

Kaplan, M.P., Chin, S.S.M., Fliegner, K.H. et Liem, R.K.H. 1990. α -internexin, a novel neuronal intermediate filament protein, precedes the low molecular weight neurofilament protein (NF-L) in the developing rat brain. *J. Neurosci.* **10**: 2735-2748.

Karabinos, A., Riemer, D., Erber, A. et Weber, K. 1998. Homologues of vertebrates type I, II and III intermediate filament (IF) proteins in an invertebrate: the IF multigene family of the cephalochordate Branchiostoma. *FEBS Letters.* **437**: 15-18.

Karin, M. 1994. Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 415-424.

Karpov, V., Landon, F., Djabali, K., Gros, F. et Portier, M.M. 1992. Structure of the mouse gene encoding peripherin: a neuronal intermediate filament protein. *Biol. Cell.* **76**: 43-48.

Kelleher III, R.J., Flanagan, P.M. et Kornberg, R.D. 1990. A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell.* **61**: 1209-1215.

Killeen, M., Coulombe, B. et Greenblatt, J. 1992. Recombinant TBP, transcription factor IIB, and RAP30 are sufficient for promoter recognition by mammalian RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **267**: 9463-9466.

Klein, R., Jing, S., Nanduri, V., O'Rourke, E. et Barbacid, M. 1991. The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell.* **65**: 189-197.

Klug, A. et Rhodes, D. 1987. "Zinc fingers": a novel protein motif for nucleic acid recognition. *Trends Biochem. Sci.* **12**: 464-469.

Klymkowsky, M.W., Maynell, L.A. et Nislow, C. 1991. Cytokeratin phosphorylation, cytokeatin filament severing and the solubilization of the maternal mRNA Vg1. *J. Cell Biol.* **114**: 787-797.

Klymkowsky, M.W. et Parr, B. 1995. The body language of cells: the intimate connection between cell adhesion and behavior. *Cell.* **83**: 5-8.

Kovarik, A., Lu, P.J., Peat, N., Morris, J. et Taylor-Papadimitriou, J. 1996. Two GC boxes (Sp1 sites) are involved in regulation of the activity of the epithelium-specific MUC1 promoter. *J. Biol. Chem.* **271**: 18140-18147.

Kowalczyk, A.P., Bornslaeger, E.A. et Norvell, S.M. 1998. Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. *Int. Rev. Cytol.* **185**: 237-302.

Krebs, E.G. 1994. The growth of research on protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* **19**:

Kurek, J.B., Austin, L., Cheema, S.S., Bartlett, P.F. et Murphy, M. 1996. Up-regulation of leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 in transected sciatic nerve and muscle following denervation. *Neuromuscular Disorders.* **6**: 105-114.

Landon, F., Lemonnier, M., Benarous, R., Huc, C., Fiszman, M., Gros, F. et Portier, M.M. 1989. Multiple mRNAs encode peripherin, a neuronal intermediate filament protein. *EMBO J.* **8**: 1719-1726.

Landschulz, W.H., Johnson, P.F. et McKnight, S.L. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science.* **240**: 1759-1764.

Lecomte, M.-J., Basseville, M., Landon, F., Karpov, V. et Fauquet, M. 1998. Transcriptional activation of the mouse peripherin gene by Leukemia Inhibitory Factor: Involvement of STAT proteins. *J. Neurochem.* **70**: 971-982.

Leconte, L., Santha, M., Fort, C., Poujeol, C., Portier, M.-M. et Simonneau, M. 1996. Cell type-specific expression of the mouse peripherin gene requires both upstream and intragenic sequences in transgenic mouse embryos. *Dev. Brain Res.* **92**: 1-9.

Lee, D.K., Dejong, J., Hashimoto, S., Horikoshi, M. et Roeder, R.G. 1992. TFIIA induces conformational changes in TFIID via interactions with the basic repeat. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 5189-5196.

Lendahl, U., Zimmerman, L.B. et McKay, R.D.G. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* **60**: 585-595.

Leonard, D.G.B., Gorham, J.D., Cole, P., Greene, L.A. et Ziff, E.B. 1988. A nerve growth factor-regulated messenger RNA encodes a new intermediate filament protein. *J. Cell Biol.* **106**: 181-193.

Leonard, D.G.B., Ziff, E.B. et Greene, L.A. 1987. Identification and characterization of mRNAs regulated by nerve growth factor in PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3156-3167.

Levi-Montalcini, R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science.* **237**: 1154-1161.

Levi-Montalcini, R., Skaper, S.D., Dal Toso, R., Petrelli, L. et Leon, A. 1996. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokinin. *Trends Neurosci.* **19**: 514-520

Li, H., Choudhary, S.K., Milner, D.J., Munir, M.I., Kuisk, I.R. et Capetanaki, Y. 1994. Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators MyoD and myogenin. *J. Cell Biol.* **124**: 827-841.

Li, Y.S., Milner, P.G., Chauhan, A.K., Watson, M.A., Hoffman, R.M., Kodner, C.M., Milbrandt, J. et Deuel, T.F. 1990. Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science.* **250**: 1690-1694.

Liao, G. et Gundersen, G.G. 1998. Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. *J. Biol. Chem.* **273**: 9797-9803.

Liao, J., Lowthert, L.A. et Omary, M.B. 1995. Heat stress or rotavirus infection of human epithelial cells generates a distinct hyperphosphorylated form of keratin 8. *Exp. Cell Res.* **219**: 348-357.

Liao, J. et Omary, M.B. 1996. 14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor. *J. Cell Biol.* **133**: 345-357.

Liem, R.K.H. 1993. Molecular biology of neuronal intermediate filaments. *Curr.Opin. Cell Biol.* **5**: 12-16.

Lohr, D. et Hopper, J.E. 1985. The relationship of regulatory proteins and DNase I hypersensitive sites in the yeast GAL1-10 genes. *Nucl. Acids Res.* **13**: 8409-8423.

Ma, J. et Ptashne, M. 1987. Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell*. **48**: 847-853.

MacDonald, G.H., Itoh, L.Y. et Ting, J.P. 1995. The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter. *J. Biol. Chem.* **270**: 3527-3533.

Maldonado, E., Ha, I., Cortes, P., Weis, L. et Reinberg, D. 1990. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: role of transcription factors IIA, IID, and IIB during formation of a transcription-competent complex. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6335-6347.

Marshall, N.F. et Price, D.H. 1995. Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *J. Biol. Chem.* **270**: 12335-12338.

Masaki, S. et Quinlan, R.A. 1997. Gene structure and sequence comparisons of the eye lens specific protein, filensin, from rat and mouse: implications for protein classification and assembly. *Gene* **201**. 11-20.

Masaki, S. et Watanabe, T. 1991. cDNA sequence analysis of CP94: rat lens fiber cell beaded-filament structural protein shows homology to cytokeratins. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **186**: 190-198.

Matsuoka, Y., Nishizawa, K., Yano, T., Shibata, M., Ando, S., Takahashi, T. et Inagaki, M. 1992. Two different protein kinases act on a different time schedule as glial filament kinases during mitosis. *EMBO J.* **11**: 2895-2902.

McGhee, J.D., Wood, W.I., Dolan, M., Engel, J.D. et Felsenfeld, G. 1981. A 200 base pair region at the 5' end of the chicken adult beta-globin gene is accessible to nuclease digestion. *Cell.* **27**: 45-55.

McLean, W.H., Rugg, E.L., Lunny, D.P., Morely, S.M., Lane, E.B., Swensson, O., Dopping-Hepenstal, P.J., Griffiths, W.A., Eady, R.A. et Higgins, C. 1995. Keratin 16 and keratin 17 mutations cause pachyonychia congenita. *Nature Genet.* **9**: 273-278.

Meisterernst, M. et Roeder, R.G. 1991. Family of proteins that interact with TFIID and regulate promoter activity. *Cell.* **67**: 557-567.

Meisterernst, M., Roy, A.L., Lieu, H.M. et Roeder, R.G. 1991. Activation of class II gene transcription by regulatory factors is potentiated by a novel activity. *Cell.* **66**: 981-993.

Merdes, A., Gounari, F. et Georgatos, S.D. 1993. The 47-kD lens-specific protein phakinin is a tailless intermediate filament protein and an assembly partner of filensin. *J. Cell Biol.* **123**: 1507-1516.

Michelsohn, A.M. et Anderson, D.J. 1992. Changes in competence determine the timing of two sequential glucocorticoid effects on sympathoadrenal progenitors. *Neuron*. **8**: 589-604.

Mirkovitch, J. et Darnell, J.J. 1991. Rapid in vivo footprinting technique identifies proteins bound to the TTR gene in the mouse liver. *Genes & Development*. **5**: 83-93.

Moir, R.D., Spann, T.P. et Goldman, R.D. 1995. The dynamic properties and possible functions of nuclear lamins. *Intl.Rev. Cytol.*

Moncla, A., Landon, F., Mattei, M.G. et Portier, M.M. 1992. Chromosomal localisation of the mouse and human peripherin genes. *Genetical Research*. **59**: 125-129.

Muller, M. et Renkawitz, R. 1991. The glucocorticoid receptor. *Biochim. Biophys.Acta*. **1088**: 171-182.

Murphy, P.G., Grondin, J., Altares, M. et Richardson, P.M. 1995. Induction of interleukin-6 in axotomized sensory neurons. *J. Neurosci*. **15**: 5130-5138.

Murre, C., McCaw, P.S. et Baltimore, D. 1989. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, *daughterless*, *MyoD* and *myc* proteins. *Cell*. **56**: 777-783.

Nakamura, Y., Takeda, M., Angelides, M., Tanaka, K.J., Tada, T. et Nishimura, T. 1990. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **169**: 744-750.

Nixon, R.A., Paskevich, P.A., Sihag, R.K. et Thayer, C.Y. 1994. Phosphorylation on carboxyl terminus domains of neurofilament proteins in retinal ganglion cell neurons in vivo: influences on regional neurofilament accumulation, interneurofilament spacing, and axon caliber. *J. Cell Biol.* **126**: 1031-1046.

Nixon, R.A., Lewis, S.E. et Marotta, C.A. 1987. *J. Neurosci.* **7**: 1145-1158.

Novina, C.D. et Roy, A.L. 1996. Core promoters and transcriptional control. *Trends Genet.* **12**: 351-355.

Oblinger, M.M. et Lasek, R.J. 1988. Axotomy-induced alterations in the synthesis and transport of neurofilaments and microtubules in dorsal root ganglion cells. *J. Neurosci.* **8**: 1747-1758.

Oblinger, M.M., Wong, J. et Parysek, L.M. 1989. Axotomy-induced changes in the expression of a type III neuronal intermediate filament gene. *J. Neurosci.* **9**: 3766-3775.

Ohara, O., Gahara, Y., Miyake, T., Teraoka, H. et Kitamura, T. 1993. Neurofilament deficiency in quail caused by nonsense mutation in neurofilament-L gene. *J. Cell Biol.* **121**: 387-395.

Olson, L. 1970. Fluorescence histochemical evidence for axonal growth and secretion from transplanted adrenal medullary tissue. *Histochemie*. **22**: 1-7.

Omary, M.B., Baxter, G.T., Chou, C.F., Riopel, C.L., Lin, W.Y. et Strulovici, B. 1992. PKC epsilon-related kinase associates with and phosphorylates cytokeratin 8 and 18. *J. Cell Biol.* **117**: 583-593.

Parysek, L.M., Chisholm, R.L., Ley, C.A. et Goldman, R.D. 1988. A type III intermediate filament gene is expressed in mature neurons. *Neuron*. **1**: 395-401.

Parysek, L.M. et Goldman, R.D. 1987. Characterization of intermediate filaments in PC12 cells. *J. Neurosci.* **7**: 781-791.

Parysek, L.M. et Goldman, R.D. 1988. Distribution of a novel 57 kDa intermediate filament (IF) protein in the nervous system. *J. Neurosci.* **8**: 555-563.

Parysek, L.M., McReynolds, M.A., Goldman, R.D. et Ley, C.A. 1991. Some neuronal intermediate filaments contain both peripherin and the neurofilament proteins. *J. Neurosci. Res.* **30**: 80-91.

Pascal, E. et Tjian, R. 1991. Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes and Development*. **5**: 1646-1656.

Paulin, D., Babinet, C., Weber, K. et Osborn, M. 1980. Antibodies as probes of cellular differentiation and cytoskeletal organization in the mouse blastocyst. *Exp. Cell. Res.* **130**: 297-304.

Pekny, M., Leveen, P., Pekna, M., Eliasson, C., Berthold, C.H., Westermark, B. et Betsholtz, C. 1995. Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. *EMBO J.* **14**: 1590-1598.

Paves, H. et Saarma, M. 1997. Neurotrophins as in vitro growth cone guidance molecules for embryonic sensory neurons. *Cell Tissue Res.* **290**. 285-297.

Pendleton, J.W., Violette, S.M., Hunihan, L.W., Greene, L.A. et Ruddle, F.H. 1991. The peripherin gene maps to mouse chromosome 15. *Genomics.* **9**: 369-372.

Perkins, N.D., Edwards, N.L., Duckett, C.S., Agranoff, A.B., Schmid, R.M. et Nabel, G.J. 1993. A cooperative interaction between NF-kappaB and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J.* **12**: 3551-3558.

Perlmann, T. et Wrangé, O. 1988. Specific glucocorticoid receptor binding to DNA reconstituted in a nucleosome. *EMBO J.* **7**: 3073-3079.

Piña, B., Brüggemeier, U. et Beato, M. 1990. Nucleosome positioning modulates accessibility of regulatory proteins to the mouse mammary tumor virus promoter. *Cell*. **60**: 719-731.

Poli, V., Balena, R., Fattori, E., Markatos, A., Yamamoto, M., Tanaka, H., Ciliberto, G., Rodan, G.A. et Costantini, F. 1994. Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *EMBO J*. **13**: 1189-1196.

Portier, M.-M., Brachet, P., Croizat, B. et Gros, F. 1984b. Regulation of peripherin in mouse neuroblastoma and rat PC12 pheochromocytoma cell lines. *Dev. Neurosci*. **6**: 215-226.

Portier, M.-M., Croizat, B. et Gros, F. 1982. A sequence of changes in cytoskeletal components during neuroblastoma differentiation.. *FEBS Lett*. **146**: 283-288.

Portier, M.-M., de Néchaud, B. et Gros, F. 1984a. Peripherin, a new member of the intermediate filament protein family. *Dev. Neurosci*. **6**: 335-344.

Poukka, H., Kallio, P.J., Janne, O.A. et Palvimo, J.J. 1996. Regulation of the rat p75 neurotrophin receptor promoter by GC element binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **229**: 565-570.

Prahlad, V., Yoon, M., Moir, R.D., Vale, R.D. et Goldman, R.D. 1998. Rapid movements of vimentin on microtubules tracks: kinesin-dependent assembly of intermediate filament networks. *J. Cell Biol.* **143**: 159-170.

Radeke, M.J., Misko, T.P., Hsu, C., Herzenberg, L.A. et Shooter, E.M. 1987. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature*. **325**: 593-597.

Ramer, M.S., French, G.D. et Bisby, M.A. 1997. Wallerian degeneration is required for both neuropathic pain and sympathetic sprouting into the DRG. *Pain*. **72**: 71-78.

Reines, D., Chamberlain, M.J. et Kane, C.M. 1989. Transcription elongation factor SII (TFIIS) enables RNA polymerase II to elongate through a block to transcription in a human gene in vitro. *J. Biol. Chem.* **264**: 10799-10809.

Reines, D., Conaway, J.W. et Conaway, R.C. 1996. The RNA polymerase II general elongation factors. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 351-355.

Reis, A., Hennies, H.C., Langbein, L., Disweed, M., Mischke, D., Drechsler, M., Schrock, E., Royer-Pokora, B., Franke, W.W. et Sperling, K. 1994. Keratin 9 gene mutations in epidermolytic palmoplantar keratoderma (EPPK). *Nature Genet.* **6**: 174-179.

Ribeiro, R.C., Kushner, P.J. et Baxter, J.D. 1995. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu. Rev. Med.* **46**: 443-453.

Robson, R.M. 1989. Intermediate filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1**: 36-43.

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

Roeder, R.G. 1996. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 327-335.

Roesler, W.J., Vandenbark, G.R. et Hanson, R.W. 1988. Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J. Biol. Chem.* **263**: 9063-9066.

Rougvie, A.E. et Lis, J.T. 1988. The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged. *Cell.* **54**: 795-804.

Rougvie, A.E. et Lis, J.T. 1990. Postinitiation transcriptional control in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6041-6045.

Ruhrberg, C. et Watt, F.M. 1997. The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**: 392-397.

Rush, R.A., Chie, E., Liu, D., Tafreschi, A., Zettler, C. et Zhou, X.-F. 1997. Neurotrophic factors are required by mature sympathetic neurons for survival, transmission and connectivity. *Clin. Experim. Pharmacol. Physiol.* **24**: 549-555

Rydel, R.E. et Greene, L.A. 1987. Acidic and basic fibroblast growth factors promote stable neurite outgrowth and neuronal differentiation in cultures of PC12 cells. *J. Neurosci.* **7**: 3639-3653.

Santini, D., Ceccarelli, C., Mazzoleni, G., Pasquinelli, G., Jasonni, V.M. et Martinelli, G.N. 1993. Demonstration of cytokeratin intermediate filaments in oocytes of the developing and adult human ovary. *Histochemistry*. **99**: 311-319.

Satoh, T., Nakamura, S., Taga, T., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T. et Kaziro, Y. 1988. Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 3546-3549.

Sauer, B. et Henderson, N. 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase bacteriophage P1. *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA*. **85**: 5166-5170.

Scheinman, R.I., Gualberto, A., Jewell, C.M., Cidlowski, J.A. et Baldwin, A.J. 1995. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 943-953.

Schwob, J.E., Farber, N.B. et Gottlieb, D.I. 1986. Neurons of the olfactory epithelium in adult rats contain vimentin. *J. Neurosci.* **6**: 209-217.

Sharpe, C.R., Pluck, A. et Gurdon, J.B. 1989. XIF3, a *Xenopus* peripherin gene, requires an inductive signal for enhanced expression in anterior neural tissue. *Development*. **107**: 701-714.

Shilatifard, A., Lane, W.S., Jackson, K.W., Conaway, R.C. et Conaway, J.W. 1996. An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene. *Science*. **271**: 1873-1876.

Simons, S.J., Mercier, L., Miller, N.R., Miller, P.A., Oshima, H., Sistare, F.D., Thompson, E.B., Wasner, G. et Yen, P.M. 1989. Differential modulation of gene induction by glucocorticoids and antiglucocorticoids in rat hepatoma tissue culture cells. *Cancer Res*.

Smith, E.A. et Fuchs, E. 1998. Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J. Cell Biol.* **141**: 1229-1241.

So, K.F. et Aguayo, A.J. 1985. Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. *Brain Res.* **328**: 349-354.

Spencer, C.A. et Groudine, M. 1990. Transcription elongation and eukaryotic gene regulation. *Oncogene*. **5**: 777-785.

Stein, R., Orit, S. et Anderson, D.J. 1988. The induction of a neural-specific gene, SCG10, by nerve growth factor in PC12 cells is transcriptional, protein synthesis dependent, and glucocorticoid inhibitable. *Develop. Biol.* **127**: 316-325.

Steinert, P.M., Marekov, L.N. et Parry, D.A. 1993. Conservation of the structure of keratin intermediate filaments: molecular mechanism by which different keratin molecules integrate into preexisting keratin intermediate filaments during differentiation. *Biochemistry*. **32**: 10046-10056.

Steinert, P.M. et Roop, D.R. 1988. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 593-625.

Stemple, D.L., Mahanthappa, N.K. et Anderson, D.J. 1988. Basic FGF induces neuronal differentiation, cell division, and NGF dependence in chromaffin cells: a sequence of events in sympathetic development. *Neuron*. **1**: 517-525.

Sternberger, L.A. et Sternberger, N.H. 1983. Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**: 6126-6130.

Sterneck, E., Kaplan, D.R. et Johnson, P.F. 1996. Interleukin-6 induces expression of peripherin and cooperates with Trk receptor signaling to promote neuronal differentiation in PC12 cells. *J. Neurochem.* **67**: 1365-1374.

Sumimoto, H., Ohkuma, Y., Yamamoto, T., Horikoshi, M. et Roeder, R.G. 1990. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: identification of general transcription factor TFIIG. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 9158-9162.

Sun, Y., Landis, S.C. et Zigmond, R.E. 1996. Signals triggering the induction of leukemia inhibitory factor in sympathetic superior cervical ganglia and their nerve trunks after axonal injury. *Mol. Cell. Neurosci.* **7**: 152-163.

Supp, D.M., Witte, D.P., Brandford, W.W., Smith, E.P. et Potter, S.S. 1996. Sp4, a member of the Sp1-family of zinc finger transcription factors, is required for normal murine growth, viability, and male fertility. *Develop. Biol.* **176**: 284-299.

Svitkina, T.M., Verkhovsky, A.B. et Borisy, G.B. 1998. Plectin sidearms mediate interactions of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *Biol. Bull.* **194**: 409-410.

Symes, A.J., Corpus, L. et Fink, J.S. 1995a. Differences in nuclear signaling by leukemia inhibitory factor and interferon- γ : the role of STAT proteins in regulating vasoactive intestinal peptide gene expression. *J. Neurochem.* **65**: 1926-1933.

Symes, A.J., Rajan, P., Corpus, L. et Fink, J.S. 1995b. C/EBP-related sites in addition to a stat site are necessary for ciliary neurotrophic factor-leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation by the vasoactive intestinal peptide cytokine response element. *J. Biol. Chem.* **270**: 8068-8075.

Takagi, Y., Conaway, R.C. et Conaway, J.W. 1996. Characterization of elongin C functional domains required for interaction with elongin B and activation of elongin A. *J. Biol. Chem.* **271**: 25562-25568.

Takai, Y., Ogawara, M., Tomono, Y., Moritoh, C., Imajoh, O.S., Tsutsumi, O., Taketani, Y. et Inagaki, M. 1996. Mitosis-specific phosphorylation of vimentin by protein kinase C coupled with reorganization of intracellular membranes. *J. Cell Biol.* **133**: 141-149.

Tessier-Lavigne, M. 1994. Axon guidance by diffusible repellants and attractants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**: 596-601.

Thompson, M.A., Lee, E., Lawe, D., Gizang-Ginsberg, E. et Ziff, E.B. 1992. Nerve growth factor-induced derepression of peripherin gene expression is associated with alterations in protein binding to a negative regulatory element. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2501-2513.

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

Togari, A., Dickens, G., Kuzuya, H. et Guroff, G. 1985. The effect of fibroblast growth factor on PC12 cells. *J. Neurosci.* **5**: 307-316.

Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E. et Chambon, P. 1989. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell.* **59**: 477-487.

Trapp, T. et Holsboer, F. 1996. Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**: 145-149.

Traub, P. et Shoeman, R.L. 1994. Intermediate filament and related proteins: potential activators of nucleosomes during transcription initiation and elongation? *Bioessays*. **16**: 349-355.

Treisman, J., Harris, E. et Desplan, C. 1991. The paired box encodes a second DNA-binding domain in the Paired homeo domain protein. *Genes and Development*. **5**: 594-604.

Treisman, J., Harris, E., Wilson, D. et Desplan, C. 1992. The homeodomain: a new face for the helix-turn-helix? *Bioessays*. **14**: 145-150.

Troy, C.M., Brown, K., Greene, L.A. et Shelanski, M.L. 1990. Ontogeny of the neuronal intermediate filament protein, peripherin, in the mouse embryo. *Neuroscience*. **36**: 217-237.

Troy, C.M., Greene, L.A. et Shelanski, M.L. 1992. Neurite outgrowth in peripherin-depleted PC12 cells. *J. Cell Biol.* **117**: 1085-1092.

Tsien, J.Z., Chen, D.F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E.H., Anderson, D.J., Mayford, M., Kandel, E.R. et Tonegawa, S. 1996. Subregion- and cell type-specific gene knockout in mouse brain. *Cell*. **87**: 1317-1326.

Tsujimura, K., Ogawara, M., Takeuchi, Y., Imajoh, O.S., Ha, M.H. et Inagaki, M. 1994. Visualization and function of vimentin phosphorylation by cdc2 kinase during mitosis. *J. Biol. Chem.* **269**: 31097-31106.

- Tuan, D., Solomon, W., Qiliang, L.S. et Irving, M.L.** 1985. The " β -like-globin" gene domain in human erythroid cells. *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA*. **82**: 6384-6388.
- Udvardia, A.J., Templeton, D.J. et Horowitz, J.M.** 1995. Functional interactions between the retinoblastoma (Rb) protein and Sp-family members: superactivation by Rb requires amino acids necessary for growth suppression. *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA*. **92**: 3953-3957.
- Unsicker, K., Krisch, B., Otten, U. et Thoenen, H.** 1978. Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids. *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA*. **75**: 3498-3502.
- van de Klundert, F.A.J.M., Raats, J.M.H. et Bloemendal, H.** 1993. Intermediate filaments: regulation of gene expression and assembly. *Eur. J. Biochem.* **214**: 351-366.
- Vassar, R., Coulombe, P.A., Degenstein, L., Albers, K. et Fuchs, E.** 1991. Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell*. **64**: 365-380.
- Verrijzer, C.P. et Tjian, R.** 1996. TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 338-342.
- Vinson, C.R., Sigler, P.B. et McKnight, S.L.** 1989. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*. **246**: 911-916.

Weinstein, D.E., Shelanski, M.L. et Liem, R.K. 1991. Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J. Cell Biol.* **112**: 1205-1213.

Weintraub, H. et Groudine, M. 1976. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science.* **193**: 848-856.

Weisbrod, S. 1982. Active chromatin. *Nature.* **297**: 289-295.

White, L.A., Reeben, M., Saarma, M. et Whittemore, S.R. 1997. Transcriptional regulation of neurofilament expression by protein kinase A. *J. Neurosci. Res.* **47**: 242-252.

Wiche, G. 1998. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J. Cell. Sci.* **111**: 2477-2486.

Wolffe, A.P. et Pruss, D. 1996. Targeting chromatin disruption: transcription regulators that acetylate histones. *Cell.* **84**: 817-819.

Workman, J.L. et Kingston, R.E. 1992. Nucleosome core displacement in vitro via a metastable transcription factor-nucleosome complex. *Science.* **258**: 1780-1784.

Workman, J.L., Taylor, I.C.A. et Kingston, R.E. 1991. Activation domains of stably bound GAL4 derivatives alleviate repression of promoters by nucleosomes. *Cell.* **64**: 533-544.

Wu, C., Wong, Y.C. et Elgin, S.C. 1979. The chromatin structure of specific genes: II. Disruption of chromatin structure during gene activity. *Cell*. **16**: 807-814.

Xu, Z., Cork, L.C., Griffin, J.W. et Cleveland, D.W. 1993. Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell*. **73**: 23-33.

Xu, Z., Marzalek, J.R., Lee, M.K., Wong, P.C., Folmer, J., Crawford, T.O., Hsieh, S.T., Griffin, J.W. et Cleveland, D.W. 1996. Subunit composition of neurofilaments specifies axonal diameter. *J. Cell. Biol.* **133**: 1061-1069.

Yan, G.Z. et Ziff, E.B. 1997. Nerve growth factor induces transcription of the p21 WAF1/CIP1 and cyclin D1 genes in PC12 cells by activating the Sp1 transcription factor. *J. Neurosci.* **17**: 6122-6132.

Yan, H.Q., Banos, M.A., Herregodts, P., Hooghe, R. et Hooghe-Peters, E.L. 1992. Expression of interleukin (IL-1) beta, IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury. *Eur. J. Immunol.* **22**: 2963-2971.

Yang, Y., Dowling, J., Yu, Q.C., Kouklis, P., Cleveland, D.W. et Fuchs, E. 1996. An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell* **86**: 655-665.

Yuan, Y., Lee, J.A., Napier, A. et Cole, G.J. 1997. Molecular cloning of a new intermediate filament protein expressed by radial glia and demonstration of alternative splicing in a novel heptade repeat region located in the carboxy-terminal tail domain. *Mol. Cell. Neurosci.* **10**: 71-86.

Zhao, Y. et Szaro, B.G. 1997. Xefiltin, a *Xenopus laevis* neuronal intermediate filament protein, is expressed in actively growing axons during development and regeneration. *J. Neurobiol.* **33**: 811-824.

ANNEXE 1

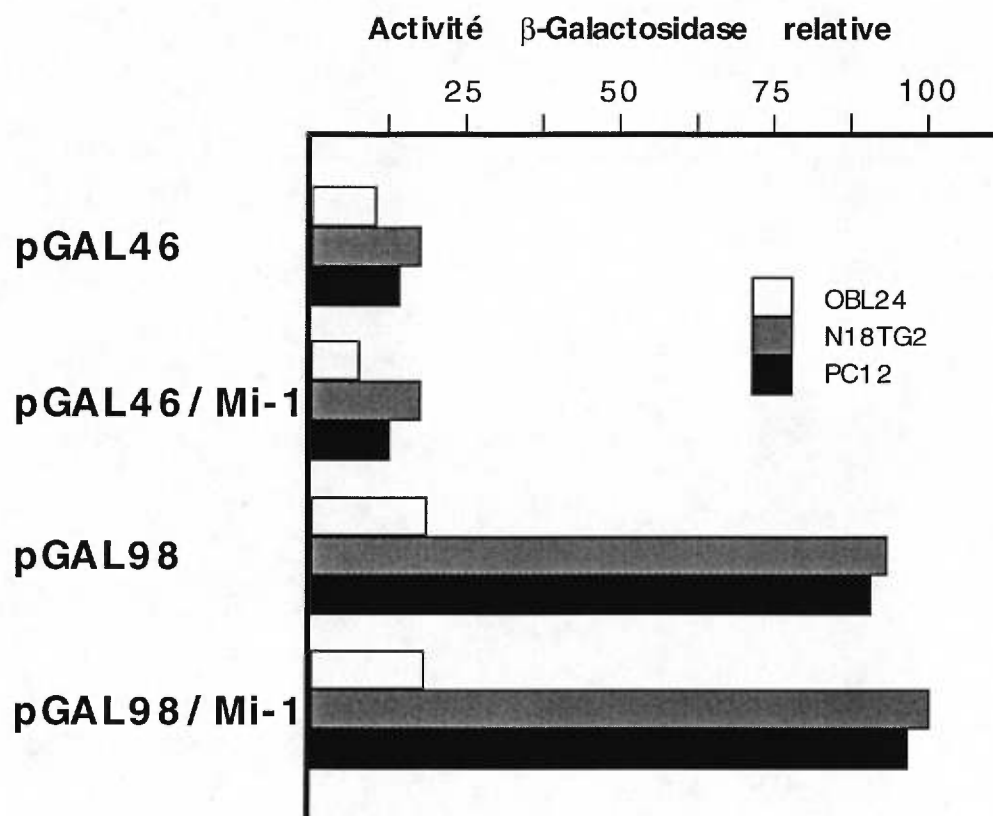


Figure 1: Analyse fonctionnelle de l'élément PRi-1.2. Les valeurs d'activité β -Galactosidase ont été normalisées selon pSV2CAT. Les constructions pGAL46/Mi-1 et pGAL98/Mi-1 ont été obtenues par insertion du fragment Mi-1 (voir chapitre 4, «Materials and Methods», page 101) au site BamHI des pGAL46 et pGAL98 respectivement (Desmarais *et al.*, 1992). Les constructions plasmidiques ont été transfectées dans les cellules N18TG2, OBL24 et PC12 par la méthode du précipité au calcium-phosphate (voir chapitre 2, Fig. 1, page 58).