

Université de Montréal

**Rôle fonctionnel des polymorphismes du promoteur de
l'*IGFBP3***

par

Benoit Bessette

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en biochimie

Mars 2005

© Benoit Bessette, 2005



W

4

U58

2005

v.114

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôle fonctionnel des polymorphismes du promoteur de l'*IGFBP3*

présenté par :
Benoit Bessette

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr André Tremblay, président-rapporteur
Dr Cheri Deal, directeur de recherche
Dr Richard Momparler, membre du jury

Résumé

Dans le sang, l'*Insulin Growth Factor I* (IGF-I), médiateur de l'action mitogénique de l'hormone de croissance (GH), voit son action régulée par la liaison à une protéine de transport, l'*IGF Binding Protein-3* (IGFBP-3). Cette protéine est utilisée en clinique dans le diagnostic de déficience en GH, mais il existe une variabilité interindividuelle considérable. Des études de jumeaux ont démontré que plus de 50% de cette variabilité était d'ordre génétique. Nos études antérieures sur des cohortes d'enfants et d'adultes ont montré une corrélation entre le polymorphisme A/C en position -202 dans le promoteur d'*IGFBP3* et les taux sériques d'IGFBP-3. Notre hypothèse est que l'haplotype du promoteur d'*IGFBP3* influence l'expression d'IGFBP-3. Nous avons fait des transfections transitoires dans les cellules SK-HEP-1 en utilisant des vecteurs correspondant à divers haplotypes du promoteur d'*IGFBP3* (A/C en position -202 et C/T en -185) placés en amont du gène rapporteur luciférase. Des expériences de retard sur gel avec des extraits nucléaires de cellules SK-HEP-1 en utilisant comme sonde différents fragments du promoteur d'*IGFBP3* ont aussi été effectuées. L'activité luciférase basale corrigée pour l'efficacité de transfection a révélé une transcription génotype-dépendante significative avec AC > CC, CT et AT (2.3 > 0.98, 1.00 et 1.06, CT fixé à 1.00). La stimulation à l'insuline a provoqué une augmentation de l'activité luciférase semblable pour CC et AT, mais significativement différente de AC et CT (CC=216%, AT=217%, AC=156% et CT=164%, stimulé/non stimulé). Les essais de retard sur gel ont permis d'identifier un site de liaison pour le facteur USF (Upstream stimulatory factor). Cette liaison est affectée par une méthylation du site de reconnaissance et de la région avoisinante. De plus, une mutation du site de liaison à USF a grandement diminué l'activité de transcription du promoteur suite à une stimulation à l'insuline. Le séquençage au bisulfite d'ADN génomique a révélé que la méthylation CpG dans la région de la liaison d'USF était dépendante de l'haplotype. Nous croyons que les polymorphismes, par leur impact sur la méthylation CpG locale, modulent l'activité de liaison du facteur USF.

Mots-clés : IGF, GH, insuline, régulation génique, USF, croissance, oncogénèse.

Abstract

The actions of insulin-like growth factors (IGFs) are regulated at various levels. One mechanism involves binding to IGF Binding Protein-3 (IGFBP-3) for transport, thus governing bioavailability. IGFBP-3 mRNA and protein are increased by many hormones and agents that induce apoptosis/growth. Measurement of circulating IGFBP-3 is used in the diagnosis of GH deficiency, but there is wide interindividual variability. Twin studies have determined that over 50% of the variability is explained by genetic factors. Correlations are observed between IGFBP-3 serum levels and the -202 A/C and -185 C/T promoter polymorphisms in children and adults. Functionality of these single nucleotide polymorphisms (SNPs) was explored in hepatic adenocarcinoma-derived SK-HEP-1 cells using transient transfections of luciferase constructs driven by different haplotypes of the *IGFBP3* promoter. Beta-galactosidase correction of the basal luciferase activity revealed a significant haplotype-dependent transcriptional activity (expression relative to CT: AC=2.3, CC=0.98, CT=1.00, AT=1.06; $p < 0.03$). Insulin treatment produced a similar haplotype-dependence of luciferase activity (AC>CC/CT/AT; $p < 0.04$), however induction ratios (insulin/control) for CC and AT were significantly higher compared to AC and CT (CC=216%, AT=217% versus AC=156% and CT=164%; $p < 0.03$). Gel retardation assays identified Upstream Stimulatory Factor (USF) binding to the SNP region in a methylation-dependent manner. Mutation of the USF binding site resulted in a significant loss of insulin stimulation of luciferase activity in the transfection assay. Bisulfite sequencing of genomic DNA revealed that CpG methylation in the region of USF binding was haplotype-dependent. We hypothesize that SNPs, through their impact on local CpG methylation, modulate activity of insulin-stimulated USF binding.

Keywords: IGF, GH, insulin, gene regulation, USF, growth, oncogenesis.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Liste des figures.....	vii
Liste des tableau.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	x
Remerciements.....	xii
1. Introduction.....	1
Survol de l'axe GH/IGF.....	2
<i>IGF-I et IGF-II.....</i>	2
<i>Récepteurs d'IGF de type I et II.....</i>	2
<i>Insulin-like growth factor binding proteins.....</i>	3
<i>Protéases d'IGFBPs.....</i>	3
Structure des IGFBPs.....	4
<i>Domaine N-terminal.....</i>	4
<i>Domaine central.....</i>	5
<i>Domaine C-terminal.....</i>	6
<i>Interaction IGF : IGFBP.....</i>	6
Les Insulin-like Growth Factor Binding Proteins-1, -2, -4, -5 et -6 et l'ALS.....	8
<i>IGFBP-1.....</i>	9
<i>IGFBP-2.....</i>	10
<i>IGFBP-4.....</i>	11
<i>IGFBP-5.....</i>	12
<i>IGFBP-6.....</i>	13
<i>ALS.....</i>	14
L'Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3.....	15
<i>Fonctions dépendantes des IGFs.....</i>	17
<i>Fonctions indépendantes des IGFs.....</i>	18
<i>Surexpression d'IGFBP-3 chez la souris.....</i>	19
<i>Dosage d'IGFBP-3 : variation selon l'âge, le sexe et le stade pubertaire.....</i>	21
<i>Niveaux d'IGFBP-3 dans différentes conditions physiologiques et</i>	
<i>Pathologiques.....</i>	22
<i>Régulation in vitro de l'expression d'IGFBP-3.....</i>	23
<i>Structure du gène et régulation du promoteur.....</i>	27
<i>Régulation du promoteur d'IGFBP3 par la méthylation.....</i>	30
Présentation du projet de recherche.....	31
2. Matériel et méthodes.....	35
Obtention de la région promotrice du gène d'IGFBP3.....	36
Création des vecteurs d'expression de la luciférase sous contrôle du promoteur	
humain d'IGFBP3.....	36
<i>Construction contenant le fragment de promoteur d'IGFBP3 de 4.4kb.....</i>	37
<i>Construction contenant le fragment de promoteur d'IGFBP3 de 2kb.....</i>	38
<i>Construction contenant le fragment de promoteur d'IGFBP3 de 1.1kb.....</i>	38
<i>Constructions contenant les fragments de promoteur d'IGFBP3 de 848</i>	
<i>et648pb.....</i>	39
Création de vecteurs rapporteurs d'haplotypes différents pour l'analyse des	

polymorphismes -202 A/C et -185 C/T.....	39
<i>Création des vecteurs pBP3/-440 AC, CC et CT.....</i>	39
<i>Création des vecteurs pBP3/-250 AC, CC et CT.....</i>	40
Création du vecteur pBP3/-440 AT par mutagenèse dirigée.....	40
Création du vecteur mutant pour un site USF par mutagenèse dirigée.....	41
Enzyme de polymérisation et appareil utilisés pour les PCRs.....	42
Vérification des vecteurs.....	42
Culture cellulaire.....	42
Transfection de vecteurs et essai luciférase.....	43
Détermination in silico des éléments de réponse du promoteur d' <i>IGFBP3</i>	44
Expérience de retard sur gel.....	44
<i>Préparation d'extraits nucléaires.....</i>	45
<i>Préparation de compétiteurs méthylés.....</i>	45
<i>Marquage des sondes.....</i>	46
<i>Expérience de retard sur gel.....</i>	46
Expérience de traitement au bisulfite.....	47
<i>Traitement au bisulfite d'ADN génomique de leucocytes.....</i>	47
<i>Amplification par PCR du promoteur d'IGFBP3.....</i>	48
<i>Séquençage du produit de PCR de l'ADN génomique.....</i>	48
Amorces.....	49
Statistiques.....	49
3. Résultats.....	50
Optimisation des conditions expérimentales pour l'étude de l'activité du promoteur d' <i>IGFBP3</i>	51
<i>Quantité de vecteur.....</i>	51
<i>Nombre de cellules.....</i>	53
<i>Concentration d'insuline.....</i>	53
<i>Durée du traitement.....</i>	55
<i>Utilisation du sérum foetal de veau.....</i>	56
<i>Effet du rouge de phénol.....</i>	60
Le promoteur minimal d' <i>IGFBP3</i>	62
Les polymorphismes -202 A/C et -185 C/T affectent in vitro l'activité de transcription du promoteur d' <i>IGFBP3</i>	67
La région du promoteur d' <i>IGFBP3</i> comprise entre les polymorphismes -202 A/C et -185 C/T contient un site de liaison au facteur de transcription USF.....	70
Le facteur de transcription USF se lie in vitro à la région comprise entre les polymorphismes -202 et -185 et cette liaison est influencée par la méthylation CpG.....	71
L'élément de réponse au facteur de transcription USF compris entre les polymorphismes -202 et -185 semble important pour la réponse au traitement à l'insuline.....	74
Les polymorphismes -202 A/C et -185 C/T affectent les patrons de méthylation de l'ADN génomique dans les leucocytes.....	74
4. Discussion.....	78
5. Conclusion.....	88
Bibliographie.....	90

Liste des figures

Figure 1	Structure générale des IGFBPs.....	8
Figure 2	Niveaux circulants d'IGF-I (a) et d'IGFBP-3 (b) durant l'enfance et la puberté selon le sexe ainsi que les niveaux d'IGFBP-3 selon les stades de développement pubertaire (« Tanner stages »).....	22
Figure 3	Structure du gène codant pour l'IGFBP-3 et de son promoteur ainsi que de l'ARNm.....	28
Figure 4	Corrélation entre le polymorphisme -202 A/C et les niveaux circulants d'IGFBP-3.....	32
Figure 5	Vecteurs d'expression de la luciférase sous contrôle du promoteur humain d' <i>IGFBP3</i> utilisés pour les transfections.....	37
Figure 6	Détermination de la quantité optimale de plasmides à utiliser pour les transfections.....	52
Figure 7	Détermination de la quantité optimale de cellules SK-HEP-1 à utiliser pour les transfections.....	54
Figure 8	Détermination de la concentration d'insuline à utiliser pour les traitements.....	56
Figure 9	Détermination de la durée optimale de traitement avec l'insuline.....	57
Figure 10	Effet de l'utilisation de sérum fœtal de veau lors du traitement avec l'insuline.....	58
Figure 11	Effet du rouge de phénol sur les transfections.....	61
Figure 12	Étude de l'influence de la longueur du promoteur d' <i>IGFBP3</i>	63
Figure 13	Étude de la région -1,1kb à -440pb du promoteur d' <i>IGFBP3</i>	65
Figure 14	Ratios d'induction à l'insuline obtenus en fonction de la longueur du promoteur d' <i>IGFBP3</i>	66
Figure 15	Impact des polymorphismes du promoteur d' <i>IGFBP3</i>	68
Figure 16	Impact des polymorphismes du promoteur d' <i>IGFBP3</i> : ratios d'induction par l'insuline.....	69
Figure 17	Site de liaison putatif du facteur de transcription USF entre les polymorphismes du promoteur d' <i>IGFBP3</i>	70

Figure 18	Étude de la liaison <i>in vitro</i> d'USF au promoteur d' <i>IGFBP3</i>	73
Figure 19	Impact du site de liaison d'USF dans la réponse à l'insuline du promoteur d' <i>IGFBP3</i>	76
Figure 20	Impact des polymorphismes -202 et -185 sur la méthylation de l'ADN génomique.....	77

Liste des tableaux

Tableau I	Phénotypes des souris transgéniques surexprimant l'IGFBP-3 humaine..	20
Tableau II	Différentes conditions <i>in vivo</i> pouvant affecter les niveaux circulants d'IGFBP-3.....	23
Tableau III	Régulation <i>in vitro</i> de l'expression de l'IGFBP-3.....	26

Liste des sigles et abréviations

ALS	Sous-unité acide-labile
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1, -2	Activating protein-1, -2
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Bad	Bcl-XL/Bcl-2 associated death promoter
BAX	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2 alpha
Bcl-X _L	B-cell lymphoma protein-X _L
BSA	Albumine de sérum bovin
C/EBP	CCAAT/Enhancer binding protein
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
Egr-1	Early growth response factor-1
FAS	Fatty acid synthase
FSH	Follicle-stimulating hormone
FGF-2	Fibroblast growth factor-2
GH	Hormone de croissance
HDAC	Histone-déacétylase
IGF-I, -II	Insulin-like growth factor-I, -II
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IGFRI, II	Récepteur d'IGF de type I, II
IRE	Insulin response element
IRS1	Insulin receptor substrate 1
kb	Kilobase
MEM	Minimum essential medium
MBP	Methyl-cytosine-binding-protein
MMP	Matrix metalloproteinase protease
NSCLC	Non-small-cell lung cancer

mM	millimole par litre
nM	nanomole par litre
ONPG	2-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside
OP-1	Osteogenic protein-1
pb	Paire de bases
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF-BB	Platelet-derived growth factor-BB
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PI3-kinase	Phosphatidylinositol 3-kinase
pKS	Vecteur pBluescript III KS (+/-)
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
PSA	Prostate-specific antigen
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SFV	Sérum fœtal de veau
SNP	Singe nucleotide polymorphism
TGF- β 1	Transforming growth factor- β 1
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TSA	Trichostatine A
USF	Upstream stimulatory factor
UV	Ultra violet

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Cheri de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Ça été pour moi une expérience très enrichissante et j'ai appris beaucoup de choses grâce à toi. Merci.

Un merci particulier à Wagner Yotov pour m'avoir aidé à me trouver une « famille d'accueil ».

Je voudrais remercier Jean sans qui ce présent mémoire ne serait pas aussi complet. Il y a pas mal de toi là-dedans! Merci pour ton aide technique et pour les nombreuses discussions qui ont permis de faire avancer le projet. J'ai bien aimé te cotoyer durant ces deux années et demie même si tu me battais régulièrement au badminton! Merci pout tout.

Je voudrais aussi remercier Élisabeth et Catherine, ma « coloc de bureau », pour leur aide technique et surtout pour leur amitié. Merci. Un gros merci aussi aux filles de chez André (Mélanie, Catherine, Véronique, Julie et les autres) et à Martine pour leur support moral et technique. Vous avez mis de la vie à nos heures de dîner!

Je tiens à remercier spécialement Pierre-André, mon vieil ami, franc copain et vieux camarade, que j'ai connu au secondaire. Ce fut un réel plaisir d'être ton « partner » de lab au CÉGEP, à l'Université ainsi que ton voisin de lab à Sainte-Justine. Mais par-dessus tout, c'est d'être ton ami depuis tout ce temps qui est franchement plaisant!

Je veux remercier mes parents, Diane et Mario, pour tout ce qu'ils ont fait pour moi depuis ces 25 dernières années et pour tout ce qu'ils continuent à m'apporter. Merci pour votre support et votre intérêt même si vous ne comprenez plus vraiment ce que je fais depuis quelques années! Je vous aime. Merci à mes deux frères préférés, Phil et Norm. C'est fou comme j'ai du plaisir à vous côtoyer et à faire des niaiseries avec vous! Je vous aime.

Finalement, je tiens à remercier Véro, mon cœur, mon soleil, mon amour. Merci pour ta compréhension durant ma rédaction (la barbe pas faite, les sautes d'humeur, le chaos dans le bureau et j'en passe), merci pour ta bonne humeur contagieuse, pour ton support moral. Merci aussi d'avoir lu au complet ce mémoire sans rien comprendre pour corriger mes fautes! Je t'aime vraiment, vraiment beaucoup.

1. Introduction

Survol de l'axe GH/IGF

L'insulin-like growth factor binding protein-3, le sujet de ce présent mémoire, fait partie d'un système appelé communément l'axe GH/IGF-I. Cet axe est composé de ligands, les IGF-I et -II, de récepteurs, les récepteurs d'IGF de type I et II, de protéines de transport, les IGFBP-1 à -6 et de protéases, les protéases d'IGFBPs. Voici donc dans un premier temps un rapide survol des différentes composantes de cet axe.

IGF-I et IGF-II

L'IGF-I et -II sont des polypeptides de 70 et 67 acides aminés respectivement qui possèdent une grande homologie de structure avec la proinsuline [1]. Ces deux facteurs sont retrouvés à de fortes concentrations dans le sérum de pratiquement tous les mammifères et tous les types de cellules mammifères peuvent les synthétiser et les exporter [2]. Lors de la vie fœtale, contrairement à la vie postnatale, l'action mitogénique de l'IGF-II est supérieure à celle de l'IGF-I et ces actions sont indépendantes de l'hormone de croissance (GH) [2;3]. Après la naissance, l'IGF-I devient le principal médiateur de l'action mitogénique de l'hormone de croissance et le principal régulateur de la croissance linéaire [2;4]. Le rôle de l'IGF-II après la naissance n'est pas encore bien défini, mais une surexpression de l'IGF-II observée dans plusieurs tumeurs humaines lui suggère une fonction dans le contrôle de la croissance cellulaire [5-9].

Récepteurs d'IGF de type I et II

L'action mitogénique des IGFs se fait via le récepteur d'IGF de type I (IGFRI). Ce récepteur à tyrosine kinase possède une grande homologie avec le récepteur à l'insuline [10]. L'IGFRI possède une affinité pour l'IGF-I plus grande que pour l'IGF-II. Il possède aussi une affinité pour l'insuline, mais celle-ci est 100 fois inférieure à celle de l'IGF-I [10]. L'IGF-II possède son propre récepteur spécifique, appelé récepteur d'IGF de type II (IGFRII). Ce récepteur est identique au récepteur mannose-6-phosphate et n'est pas un récepteur de type tyrosine kinase.

L'IGFR II agirait comme un facteur de clairance pour l'IGF-II en l'internalisant. L'IGF-II serait ensuite ciblé vers les lysosomes pour être dégradé [11].

Insulin-like growth factor binding proteins

Comme les IGFs possèdent une grande homologie avec l'insuline, ils peuvent eux aussi se lier au récepteur à l'insuline, mais avec une affinité beaucoup plus faible. Cependant, à cause de leur abondance dans la circulation, les IGFs pourraient en théorie exercer un pouvoir hypoglycémiant 50 fois plus important que l'insuline [12]. En pratique ce pouvoir hypoglycémiant est contrôlé par la liaison des IGFs dans la circulation à des protéines de transport, les « insulin-like growth factor binding proteins » (IGFBPs). Il existe 6 IGFBPs et l'IGFBP-3 est la plus abondante dans la circulation. Les IGFBPs feront l'objet d'une description plus complète dans les prochaines sections.

Protéases d'IGFBPs

Les protéases d'IGFBPs sont des enzymes qui peuvent cliver les IGFBPs en des fragments plus petits qui possèdent une affinité pour les IGFs diminuée [13]. Dans le cas de l'IGFBP-3, une multitude de protéases spécifiques ont été identifiées [14]. Parmi celles-ci, il y a le groupe des protéases à sérine qui comprend le PSA (prostate-specific antigen) et la plasmine [15]. Il existe aussi le groupe des cathepsines qui sont des protéinases intracellulaires agissant dans un milieu acide [16]. Finalement, la famille des « matrix metalloproteinases proteases » (MMPs), qui est responsable de la dégradation de composantes de la matrice extracellulaire telles que le collagène et les protéoglycans, peut aussi cliver l'IGFBP-3 [17-19].

Plusieurs résultats indiquent que la protéolyse produit des fragments d'IGFBP-3 avec une affinité réduite pour les IGFs, ce qui permet une disponibilité des IGFs pour les cellules [20-22]. Par contre, d'autres résultats décrivent une inhibition des actions des l'IGFs par des fragments d'IGFBP-3 conservant une faible ou bien indétectable affinité pour les IGFs [21;23-25]. Il n'est pas encore clair que les effets produits par les fragments protéolytiques d'IGFBP-3 soient

entièrement reliés à la séquestration des IGFs. Il se pourrait que les fragments aient des effets IGF-indépendants.

Structure des IGFBPs

La structure primaire des 6 IGFBPs peut être séparée en 3 domaines distincts : le domaine N-terminal, le domaine central et le domaine C-terminal. Les domaines N- et C-terminal possèdent une grande similarité entre les IGFBPs et permettent la liaison avec les IGFs, tandis que le domaine central est plus variable. Un schéma de la structure générale des IGFBPs est présenté à la figure 1. Voici donc un survol de ces trois domaines suivi d'une description de l'interaction IGF : IGFBP.

Domaine N-terminal

Tous les précurseurs des IGFBPs possèdent une séquence-signal de 20 à 39 acides aminés en N-terminal permettant la sécrétion de la protéine et donc, toutes les IGFBPs matures sont retrouvées de façon extracellulaire [26]. Le domaine N-terminal regroupe de 80 à 93 acides aminés et partage une similarité d'environ 58% parmi les IGFBPs [26]. Cette région est riche en résidus cystéine et les IGFBP-1 à -5 possèdent 6 ponts disulfures tandis qu'IGFBP-6 en forme 5.

Des études ont démontré que les ponts disulfures étaient bien formés à l'intérieur du domaine N-terminal et non avec le domaine C-terminal, supportant l'hypothèse que les 2 domaines ne sont pas liés entre eux [27;28]. De plus, des données suggèrent que les résidus cystéine qui sont près entre eux dans la séquence primaire forment préférentiellement des ponts disulfures. Par exemple, l'analyse de fragments de digestion de la protéine IGFBP-6 a mené à l'hypothèse de l'existence de 2 sous-domaines à l'intérieur du domaine N-terminal [28;29]. Les six premiers résidus cystéine produiraient des ponts disulfures entre eux et les quatre résidus suivants en produiraient d'autres, créant ainsi deux sous-domaines. Des études avec l'IGFBP-3 de rat [30] ont démontré que les quatre derniers résidus cystéine

formaient entre eux des ponts disulfures qui se chevauchaient (Cys⁵⁶-Cys⁶⁹ et Cys⁶³-Cys⁸⁹), ce qui est en accord avec la théorie des deux sous-domaines de Neuman *et al.* [28]. Aussi, une image par résonance magnétique nucléaire de ce sous-domaine chez l'IGFBP-5 humaine montrant les 2 ponts disulfures est venue appuyer ces résultats [31].

Dans le domaine N-terminal, on retrouve un motif (GCGCCxxC) qui est très bien conservé parmi les IGFBPs [26] à l'exception de l'IGFBP-6 qui présente une séquence GCAEAEGC, d'où les 2 résidus cystéine en moins. Cependant, aucun rôle spécifique n'a encore été accordé à ce motif. Certains pensent qu'il serait impliqué dans la liaison avec les IGFs, mais cette hypothèse est contredite par le fait que l'IGFBP-6 conserve son affinité pour les IGFs malgré l'absence de ce motif.

Domaine central

Chez les IGFBPs humaines, le domaine central consiste en une région allant de 55 à 95 acides aminés située entre les domaines N- et C-terminal. La séquence primaire de cette région semble propre à chaque IGFBP puisqu'il existe moins de 15% de similitude entre les IGFBPs [26]. Ce domaine agirait structurellement comme une charnière entre les domaines N- et C-terminal. Le domaine central ne contient aucun pont disulfure sauf pour l'IGFBP-4 qui présente un pont intra-domaine [32].

Il est intéressant de remarquer que les données recueillies jusqu'à ce jour montrent que le domaine central subit des modifications post-traductionnelles, mais non les domaines N- et C-terminal. Trois sites de N-glycosylation chez l'IGFBP-3 [33] et un site chez l'IGFBP-4 [34] sont retrouvés dans cette région. Il y a aussi des sites d'O-glycosylation chez l'IGFBP-5 [35] et l'IGFBP-6 [28]. De plus, les IGFBP-1, -3 et -5 sont phosphorylées dans ce domaine [36]. Des sites de clivage de la protéine ont aussi été identifiés dans le domaine central des IGFBP-3, -4, et -5 [37-39]. Des sites secondaires de liaison avec la sous-unité acide labile (ALS, discuté plus bas) [40] et l'héparine [41] ont été retrouvés chez l'IGFBP-5. Finalement, un domaine potentiel d'association cellulaire a été identifié chez l'IGFBP-3 [42].

Domaine C-terminal

Le domaine C-terminal est très conservé et possède une similarité d'environ 34% parmi les 6 IGFBPs [26]. Il contient 6 cystéines qui forment des ponts disulfures à l'intérieur même du domaine [29;43] entre des résidus adjacents [27;29]. Ces 6 cystéines sont conservées parmi les 6 IGFBPs. La grande similitude dans la séquence primaire de la région englobant les 5 derniers résidus cystéine (environ 40%) laisse supposer que la structure tertiaire de ce domaine est conservée parmi les IGFBPs [26].

Différents sites d'interaction ont été identifiés dans le domaine C-terminal jusqu'à maintenant. Par exemple, l'IGFBP-1 [44] et -2 [45] possèdent un motif RGD (Arg-Gly-Asp) qui peut interagir avec l'intégrine. Un motif de 18 résidus basiques fonctionnellement importants et qui présente une activité de liaison pour l'héparine a été identifié pour l'IGFBP-3 et -5. Ce motif est impliqué dans l'interaction de ces IGFBPs avec la sous-unité acide-labile [46-48] permettant la formation de complexes ternaires dans le sérum avec les IGFs, dans les liaisons avec les cellules et la matrice extracellulaire [46;49] ainsi que dans le transport nucléaire [50]. Ce motif permet aussi la liaison avec la transferrine chez l'IGFBP-3 [51] et la liaison avec le « plasminogen activator inhibitor-1 » chez l'IGFBP-5 [52]. Les interactions concernant l'IGFBP-3 seront discutées plus en détail dans une section entièrement consacrée à notre protéine d'intérêt.

Interaction IGF : IGFBP

La très grande similitude entre les IGFBPs remarquée lors de l'analyse de la structure primaire a mené à la présomption que les IGFBPs possédaient la même structure tertiaire, et par conséquent le même domaine de liaison aux IGFs. Cependant, l'identification précise du domaine de liaison aux IGFs pour chaque IGFBP fait encore l'objet de recherches et de discussions. Il semble de plus en plus évident que les séquences et les résidus importants pour la liaison avec les IGFs varient d'une IGFBP à l'autre. Certains groupes croient que c'est le domaine N-

terminal qui est important pour la liaison avec les IGFs tandis que d'autres pensent que c'est le domaine C-terminal qui permet cette interaction.

D'un côté, des études utilisant des fragments d'IGFBP comprenant le domaine N-terminal ainsi que l'observation d'une perte d'activité de liaison aux IGFs lorsque ce domaine est supprimé viennent souligner l'importance du domaine N-terminal. De plus, des études de cristallographie, de résonance magnétique nucléaire et d'interaction hydrophobe/hydrophile chez l'IGFBP-3 et -5 viennent appuyer cette hypothèse [31;53-56].

De l'autre côté, des études avec des fragments C-terminaux de différentes longueurs ont montré des affinités variantes pour les IGFs [57]. Aussi, une perte d'activité de liaison avec les IGFs a été observée pour des mutants de délétion dans le domaine C-terminal [27;58].

En considérant toutes ces données, il devient évident que les deux domaines contribuent à l'activité de liaison aux IGFs en agissant comme deux structures distinctes qui créent une région permettant la liaison aux IGFs en se coordonnant dans l'espace avec l'aide entre autre du domaine central [59-62].

Cependant, il n'est pas possible de généraliser parmi les IGFBPs quant à la structure de la cavité permettant l'interaction avec les IGFs. Par exemple, plusieurs travaux indiquent que le site de liaison avec les IGFs se trouve principalement dans le domaine C-terminal chez l'IGFBP-2 [27;57;63;64] tandis que pour l'IGFBP-3, il semble que les domaines N-terminal [31;53-56] et C-terminal [65;66] soient importants pour la liaison aux IGFs.

Pour terminer, soulignons que dans toutes les études sur les interactions IGF : IGFBP, le domaine central n'a jamais été cité comme faisant partie du site de liaison des IGFs pour aucune IGFBP. La figure 1 nous montre la structure générale des IGFBPs ainsi que les interactions avec l'IGF-I.

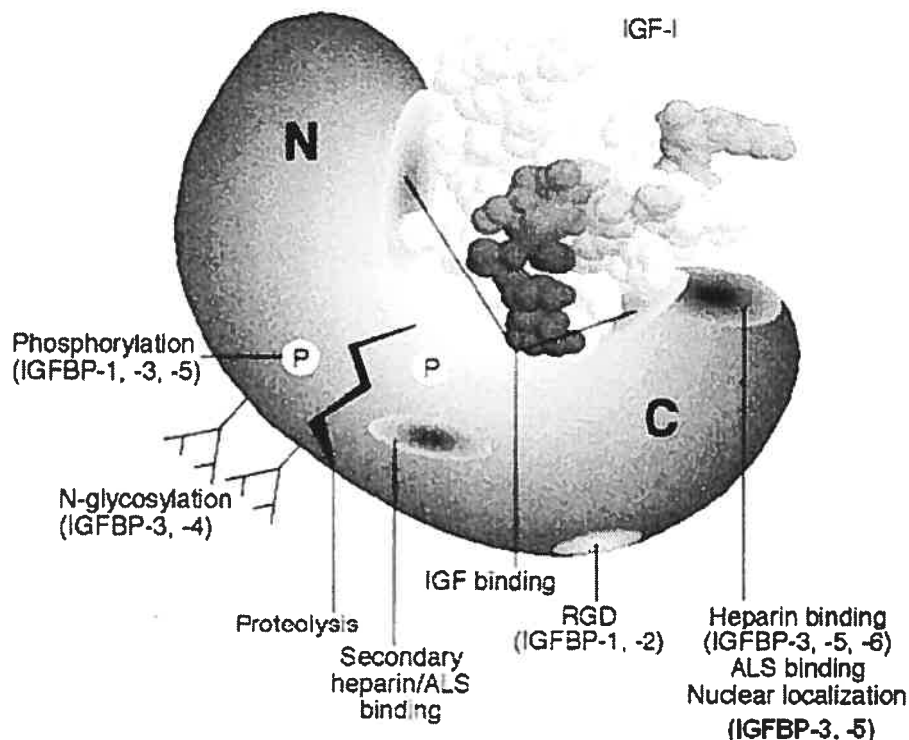


Figure 1. **Structure générale des IGFBPs.** Les extrémités N- et C-terminales forment une cavité permettant l'interaction avec les IGFs. Les sites de liaison pour plusieurs protéines sont indiqués. (Figure tirée de Firth *et al.* [67])

Les Insulin-like Growth Factor Binding Proteins-1, -2, -4, -5 et -6 et l'ALS

Chez l'adulte, de 80 à 85% des IGFs circulent sous la forme d'un complexe ternaire de 150kDa [68]. Ce complexe est composé d'IGF-I ou II, de l'Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3, l'IGFBP la plus abondante dans la circulation [69], ainsi que d'une sous-unité acide-labile (ALS). Les IGFs circulants se retrouvent aussi complexés à d'autres protéines de liaison (IGFBP-1, -2, -4, -5 et -6), mais à des niveaux plus faibles. Ces 6 IGFBPs ont des structures semblables et lient les IGF-I et -II avec une haute affinité [70;71]. Cette présente section est un résumé de ce qui est connu au sujet des IGFBP-1, -2, -4, -5 et -6. L'IGFBP-3 fera l'objet d'une étude plus exhaustive dans la prochaine section.

IGFBP-1

L'IGFBP-1 est présente à de faibles concentrations dans le sérum humain chez l'adulte et elle est la protéine de liaison retrouvée en plus grande quantité dans le liquide amniotique humain [72]. L'IGFBP-1 possède une affinité égale pour IGF-I et IGF-II. Les niveaux d'IGFBP-1 varient tout au long du développement. Ces derniers sont élevés dans le sérum fœtal, mais sont 10 fois moindres dans le cordon placentaire à terme. Ces niveaux diminuent après la naissance pour atteindre ceux bas et stables observés durant la puberté [73;74].

Chez l'adulte, la majeure partie de l'expression d'IGFBP-1 est observée dans le foie et cette expression est hautement régulée par le statut métabolique, qui est un reflet de la variation des niveaux d'insuline dans le sang [75;76]. Le jeûne [77], le diabète [78] et l'exercice prolongé [79], des conditions associées à des niveaux d'insuline diminués, augmentent les niveaux sériques d'IGFBP-1. Les niveaux élevés observés pour le jeûne peuvent rapidement être renversés par une réalimentation [77;80] tandis que ceux observés pour le diabète peuvent être rétablis par un traitement avec l'insuline [75;78].

En plus de l'insuline, l'hormone de croissance semble réguler les niveaux sériques d'IGFBP-1 puisque des niveaux élevés d'IGFBP-3 sont observés chez les enfants et les adultes avec des déficiences en hormone de croissance [77;81].

Par des expériences *in vitro*, il a été montré avec les cellules d'hépatomes de rat H4-II que la transcription du gène codant pour IGFBP-1 était activée par le dexaméthasone [82;83], l'AMP cyclique [84] ainsi que les esters phorbol [85]. Par contre, l'insuline inhibait l'IGFBP-1 ainsi que l'ARNm de 90% dans les cellules H4-II [83]. Cette inhibition a été observée aussi chez des hépatocytes de rat [86], des explants de foies fœtaux humains [87;88] et des cellules d'hépatocarcinomes humains HepG2 [89-91].

Le gène codant pour IGFBP-1 se trouve dans la région 7p14-12 du chromosome 7, à environ 20kb du gène codant pour IGFBP-3 avec une orientation queue à queue [92;93]. Le gène s'étend sur 5,2kb et contient 4 exons [93;94].

Plusieurs éléments de régulation sont retrouvés dans la région promotrice de la transcription. On retrouve une boîte TATA située à 28 nucléotides en amont du

site d'initiation de la traduction [95]. Cependant, il a été démontré que le site d'initiation de la transcription se trouve au nucléotide -155 en amont de l'ATG initiateur [94]. Parmi les autres éléments-*cis* de régulation, notons une séquence CCAAT pouvant lier le facteur de transcription C/EBP en position -72 par rapport au site d'initiation de la transcription [95]. L'activité promotrice basale semble régulée par un élément-*cis* pouvant lier le facteur nucléaire hépatique 1 (HNF-1) [95;96]. Notons de plus un motif CGTA, entre les nucléotides -263 et -259, qui régule les effets de l'AMP cyclique [97], deux éléments de réponse aux glucocorticoïdes situés dans les 200 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription [98] ainsi qu'un élément de réponse à l'insuline (IRE) entre les nucléotides -416 et -407 [99;100]. Cette séquence, qui correspond à un palindrome, a d'abord été identifiée dans le promoteur du gène de la PEPCK [101;102] (phosphoenolpyruvate carboxykinase), une enzyme importante dans la gluconéogenèse [103]. Les gènes codant pour l'IGFBP-1 et la PEPCK possèdent une régulation hormonale très semblable, ce qui est consistant avec le rôle prétendu d'IGFBP-1 dans l'homéostasie du glucose [104].

IGFBP-2

Dans le sérum fœtal humain, l'IGFBP-2 est la plus abondante des IGFBPs à mi-gestation [105]. À la naissance, les niveaux circulants d'IGFBP-2 sont 4 fois plus élevés que durant la vie adulte, mais demeurent inférieurs aux niveaux circulants d'IGFBP-3 [105;106].

Chez l'adulte, les niveaux circulants d'IGFBP-2 sont augmentés par le jeûne, une déficience en hormone de croissance, l'infusion d'IGF-I et par l'hypoglycémie induite par tumeur [106-108].

In vitro, peu de modèles cellulaires ont démontré une expression régulée d'IGFBP-2. Les myoblastes de souris C2C12 et les cellules myogéniques satellites de dinde ont montré une diminution de l'expression d'IGFBP-2 durant la différenciation [109;110]. Dans les hépatocytes primaires de rat, une inhibition de l'expression par l'insuline et une stimulation de l'expression par l'acide rétinoïque ont été observées [111;112].

Le gène codant pour l'IGFBP-2 se trouve dans la région 2q33-34 du chromosome 2 et possède 4 exons [113;114]. Le gène couvre une région d'environ 32kb et le premier intron en couvre à lui seul 27kb [114;115]. Le promoteur minimal consisterait en la région comprise entre les nucléotides -521 et +112 par rapport au site d'initiation de la transcription et ne comporterait pas de boîte TATA [115].

Peu d'éléments-*cis* de régulation ont été identifiés jusqu'à ce jour sur le promoteur d'*IGFBP2*. Les principaux éléments sont trois boîtes GC indépendantes situées entre les nucléotides -89 et -41. La liaison du facteur de transcription Sp1 à ces éléments est essentielle pour l'activation du promoteur dans les cellules de foie de rat BRL-3A et les cellules humaines embryonnaires de rein 293 [116;117]. Une quatrième boîte GC, entre les nucléotides -139 et -130, semble aussi importante dans les cellules BRL-3A [116]. Deux autres régions, entre les nucléotides -493 et -423 et entre les nucléotides -291 et -188, semblent importantes dans la régulation du promoteur d'*IGFBP-2* chez le rat [116], mais les éléments-*cis* de régulation n'ont pas encore été identifiés.

IGFBP-4

L'IGFBP-4 se retrouve à de faibles concentrations dans le sang et est aussi synthétisée localement par les cellules osseuses humaines [118;119]. L'IGFBP-4 semble impliquée dans le métabolisme osseux puisqu'elle est un puissant inhibiteur de l'action des IGFs dans l'os [119].

Peu de choses sont connues quant à la régulation *in vivo* de l'expression de l'IGFBP-4 chez l'humain. Cependant, chez le rat, l'IGFBP-4 est principalement synthétisée par le foie [120], mais est retrouvée dans une multitude de tissus comme le cortex cérébral, l'hypothalamus, l'estomac, le rein, le poumon, le cœur, le testicule et la glande surrénale [121].

In vitro, l'IGFBP-4 est une des IGFBPs les plus synthétisées par les ostéoblastes et est un puissant inhibiteur de leur prolifération [119]. Dans ce modèle cellulaire, l'expression d'IGFBP-4 est régulée par plusieurs agents ostéotropiques tels que l'hormone parathyroïdienne, la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ et la « bone

morphogenetic protein-7 » [122;123]. Dans les chondrocytes humains, la prostaglandine E₂ et la ionomycine, un ionophore de calcium, ont stimulé de 3 à 4 fois la synthèse d'IGFBP-4 et de son ARNm [124]. Dans les cellules humaines SaOS-2, l'hormone parathyroïdienne, mais non le 17β-estradiol, a augmenté l'ARNm d'IGFBP-4 [125]. Dans les cellules ostéoblastiques de souris, l'hormone thyroïdienne ainsi que l'acide rétinoïque ont induit la synthèse d'IGFBP-4 [126].

Le gène codant pour IGFBP-4 se retrouve dans la région 17q1-21 du chromosome 17 [127;128]. La région proximale de 1,3kb du promoteur, l'exon 1 ainsi qu'une partie de l'intron 1 ont un contenu riche en résidus CG, formant ainsi des îlots CpG [129]. Le promoteur contient une boîte TATA située à -229 nucléotides en amont du site d'initiation de la traduction [130]. Des éléments de réponse putatifs pour les facteurs de transcription AP-1 et Egr-1 (« early growth response factor-1 ») ainsi que des boîtes GC seraient présents le long du promoteur, mais leur activité n'a pas encore été démontrée [130].

IGFBP-5

Chez l'humain, l'IGFB-5 circule à des niveaux équivalents à environ 15% de l'IGFBP-3 circulant et est la principale IGFBP emmagasinée dans les os [130-132]. Les niveaux sériques et osseux diminuent de l'enfance jusqu'à l'âge adulte [130-132]. Comme pour l'IGFBP-3, l'IGFBP-5 peut former un complexe ternaire avec l'IGF-I ou -II et la sous-unité acide-labile et on estime que 55% de l'IGFBP-5 circulant se retrouve sous la forme de ce complexe [133].

Une régulation dynamique de l'expression d'IGFBP-5 a été observée dans les ostéoblastes préparés à partir de cellules pariétales de fœtus de rats (cellules ob). La production d'ARNm d'IGFBP-5 dans ces cellules était augmentée par l'acide rétinoïque, l'IGF-I, la prostaglandine E₂ et par l'interleukine-6 en présence de son récepteur soluble [134-137]. L'ARNm était diminué avec l'utilisation de TGF-β1 (« transforming growth factor- β1 »), de FGF-2 (« fibroblast growth factor-2 »), de PDGF-BB (« platelet-derived growth factor-BB ») et de cortisol [138;139]. L'IGF-I a aussi induit la transcription d'*IGFBP-5* dans les cellules de muscles lisses d'aorte de porc [140]. Dans les lignées cellulaires de myoblastes de souris C2 et C21, la

différenciation cellulaire a provoqué une induction de la transcription d'*IGFBP-5* [141;142].

Le gène codant pour l'*IGFBP-5* se retrouve dans la région 2q33-34 du chromosome 2 et est situé de 20 à 40kb du gène codant pour l'*IGFBP-2* dans une orientation queue à queue [143]. Le gène est composé de 4 exons et couvre une région de 33kb et dont environ 25kb sont compris dans le premier intron [143]. Le site d'initiation de la transcription est situé à 722 nucléotides en amont du site d'initiation de la traduction. Le promoteur d'*IGFBP5* contient une boîte TATA et une boîte CAAT situées respectivement à -33 et -73bp en amont du site d'initiation de la transcription. Il existe une très grande conservation du promoteur d'*IGFBP-5* entre l'humain, le rat et la souris. En effet, les 200 premiers nucléotides de chacun des promoteurs sont identiques entre eux à 90%, y compris une conservation complète de la boîte TATA, de la boîte CAAT et d'un élément de réponse putatif pour le facteur de transcription AP-2 [143-145].

Dans les fibroblastes dermiques de fœtus humains GM-10 et les cellules hépatiques HepG2, l'expression du facteur de transcription AP-2 a activé le promoteur d'*IGFBP-5* par une liaison à un élément de réponse pour AP-2 situé entre les nucléotides -47 et -39 [146]. Dans la lignée cellulaire myogénique C21, la région proximale du promoteur de souris (-156 à +120) a contribué à plus de 70% de l'activité maximale et semblait impliquée dans l'activation du promoteur lors de la différenciation cellulaire [142]. Dans les cellules ob, le cortisol a inhibé l'activité transcriptionnelle du fragment -70 à +120pb du promoteur de souris et cette inhibition est levée lorsque la boîte E située entre les nucléotides -56 et -51 est mutée [139].

IGFBP-6

L'*IGFBP-6* est présente dans le sérum humain à de faibles concentrations, ce qui rend difficile l'étude de la régulation de son expression [147]. Elle est aussi retrouvée dans le liquide cébrospinal [148]. L'*IGFBP-6* a aussi été isolée à partir de milieux conditionnés de fibroblastes humains de poumons transformés [149] ou non [150] par SV-40 ainsi qu'à partir de cellules d'ostéocarcinomes humains U-2

[151]. Chez le rat, des expériences de « Northern Blot » ont montré que l'ARNm d'IGFBP-6 était exprimé de façon ubiquitaire dans tous les tissus étudiés [152].

Chez le rat, la FSH (« follicle-stimulating hormone ») et l'estrogène ont diminué l'expression ovarienne de l'IGFBP-6 [153]. *In vitro*, le cortisol et l'acide rétinoïque ont augmenté l'expression d'IGFBP-6 dans les cellules de cuir chevelu de fœtus de rats [154;155].

Le gène codant pour l'IGFBP-6, qui se trouve sur le chromosome 12 dans la région 12q13, est composé de quatre exons et s'étend sur 4,7kb [152;156]. Le promoteur d'*IGFBP-6* ne contient pas de boîte TATA et de boîtes riches en GC, mais possède un élément de réponse à l'acide rétinoïque situé entre les nucléotides -27 et -1 et il a été montré que l'acide rétinoïque régule l'activité du promoteur [152;156].

ALS

Contrairement aux IGFBPs, l'ALS est retrouvée presque exclusivement dans le sérum [157]. L'ALS est indétectable dans le sérum fœtal à 27 semaines de gestation, mais est présente à la fin de la vie fœtale. Elle est à des niveaux 5 fois plus élevés à la puberté qu'à la naissance et les niveaux demeurent pratiquement inchangés durant la vie adulte [157;158]. À l'âge adulte, l'ALS circule de 2 à 3 fois en excès molaire par rapport à l'IGFBP-3 et c'est ce qui explique la grande quantité de complexes ternaires dans le sang [69;157].

Chez le rat adulte, l'expression de l'ALS est faite majoritairement par les hépatocytes et une faible quantité est produite par les cellules épithéliales du tubule proximal du rein [159]. Après la naissance, durant les premiers jours de vie, l'expression hépatique de l'ALS est rapidement augmentée et l'hormone de croissance en est un puissant inducteur [69;159-161].

Chez l'humain adulte, les niveaux circulants d'ALS sont diminués chez des patients souffrant d'une déficience en hormone de croissance (GH) ou d'un défaut dans le récepteur à la GH, ainsi que chez des patients recevant une infusion chronique d'IGF-I, probablement via une inhibition de la sécrétion de GH [157;162;163]. D'autres conditions peuvent aussi diminuer les niveaux circulants de

l'ALS à la fois chez l'humain et le rat : le jeûne, la sous-alimentation, une blessure par brûlure et certaines maladies cataboliques telles que le diabète et la cirrhose [160;164-169].

Dans les cultures primaires d'hépatocytes de rat, le dexaméthasone, l'AMP cyclique ainsi que l'EGF (« epidermal growth factor ») ont diminué la sécrétion d'ALS principalement en réduisant la production d'ARNm [170;171]. Ces observations pourraient expliquer la diminution de synthèse d'ALS dans les cas de brûlures et de cirrhose du foie car une augmentation en glucocorticoïdes et en AMP cyclique a lieu dans ces situations [167;168].

Aussi, une insuffisance en insuline pourrait être la principale cause de la diminution de la synthèse d'ALS dans les conditions de jeûne, de sous-alimentation et de diabète puisqu'il a été montré que l'insuline stimulait la sécrétion d'ALS de façon post-traductionnelle dans les cultures primaires d'hépatocytes de rat [170].

Le gène codant pour l'ALS se retrouve sur le chromosome 16 dans la région 16p13.3, possède deux exons et couvre une région d'environ 4,5kb [172;173]. Le promoteur ne contient pas de boîte TATA, de séquences initiatrices ou de boîtes riches en GC [172;174]. Le mécanisme d'initiation de la transcription demeure encore inconnu.

L'hormone de croissance stimule la transcription du gène via un élément de réponse situé sur le promoteur entre les nucléotides -575 et -567 par rapport au site d'initiation de la traduction [173]. Cet élément a été appelé ALSGAS1 à cause de sa ressemblance avec la séquence consensus pour le « γ -interferon activated sequence » (GAS) [175]. Même si les promoteurs de rat, de souris, d'humain et de mouton montrent une faible homologie, il y a une complète conservation de la séquence ALSGAS1 entre les espèces [173;175;176].

L'Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3

L'IGFBP-3 est l'IGFBP la plus abondante dans la circulation chez l'humain adulte [69]. À la naissance, les niveaux circulants sont au tiers de ceux

observés chez l'adulte [105]. Les niveaux augmentent dès la naissance pour atteindre des sommets durant la puberté [177-179]. L'expression de l'IGFBP-3 circulant se fait dans le foie, mais la plupart des autres tissus peuvent synthétiser localement l'IGFBP-3 [3].

Tel qu'indiqué plus haut, de 80 à 85% des IGFs circulants se retrouvent sous la forme d'un complexe ternaire de 150kDa qui comprend l'IGFBP-3 et la sous-unité acide-labile [68]. La formation du complexe permet d'augmenter considérablement la demi-vie de l'IGF-I, la faisant passer de 10 minutes à 12 heures [180]. Les capillaires sont imperméables à ce complexe, le rendant inaccessible aux tissus. La formation du complexe s'effectuerait dans le foie, où les trois composantes sont synthétisées, assurant ainsi la formation de ce complexe dans le sang qui circule dans les sinusoides du foie [159;181]. Les IGFs et l'ALS sont produits par les hépatocytes tandis que l'IGFBP-3 provient principalement de macrophagocytes stellaires appelés cellules de Kupffer qui se trouvent dans les sinusoides du foie.

L'ALS circule en excès molaire (environ 250nM) par rapport à l'IGFBP-3 (environ 100nM), qui elle circule en excès molaire par rapport à IGF-I, mais à concentration égale par rapport à l'IGF-I et l'IGF-II combinés [182]. Étant donné la faible liaison ALS-IGFBP-3 (constante d'association : $2,5 \times 10^8$ L/mol) [183], il est fort probable que la dissociation se fasse aisément au contact de la surface endothéliale des vaisseaux sanguins avec l'aide de glycosaminoglycans associés à cette surface, permettant ainsi le transport des IGFs aux tissus [184].

Mis à part l'ALS, l'IGFBP-3 peut interagir avec plusieurs autres protéines. Via un motif de liaison à l'héparine dans le domaine C-terminal de la protéine, l'IGFBP-3 peut lier l'héparine et d'autres glycosaminoglycans, de même que des protéoglycanes à la surface cellulaire [49;185;186]. Il a été montré aussi que le fibrinogène, la fibrine et le plasminogène se liaient avec haute affinité à ce domaine avec l'IGFBP-3 complexée ou non avec l'IGF-1 [187;188]. De plus, la fibronectine a aussi été identifiée comme un partenaire de liaison avec l'IGFBP-3 complexée ou non avec l'IGF-I. Comme toutes les protéines décrites plus haut sont impliquées

dans la coagulation du sang, ces résultats suggèrent que l'IGFBP-3 pourrait concentrer l'IGF-I aux sites de blessures et, après protéolyse, l'IGF-I libéré pourrait exercer ses effets mitogéniques.

Fonctions dépendantes des IGFs

L'inhibition de l'action des IGFs par l'IGFBP-3 a été démontrée dans plusieurs systèmes [3]. Par exemple, l'ajout d'un sérum contenant des IGFBPs endogènes et en plus enrichi avec de l'IGFBP-3 a inhibé l'incorporation du glucose dans des cellules adipeuses [189]. L'inhibition des effets de l'IGF-I a été observée entre autres dans des fibroblastes humains de peau [190] et dans les fibroblastes de souris BALB/c 3T3 [191] lorsque les cellules étaient co-traitées avec IGF-I et IGFBP-3. Par sa grande affinité de liaison, l'IGFBP-3 séquestrerait l'IGF-I, empêchant l'activation par autophosphorylation de l'IGFRI induite par l'IGF-I [65].

Il a aussi été démontré que l'IGFBP-3 pourrait interagir avec l'IGFRI, ce qui empêcherait la liaison de l'IGF-I avec son récepteur [192]. Cependant, un lien physique direct n'a pas encore été prouvé entre l'IGFBP-3 et le récepteur.

Paradoxalement, plusieurs résultats indiquent que l'IGFBP-3 peut aussi accentuer les effets de l'IGF-I [3]. Par exemple, une préincubation de cellules avec l'IGFBP-3 avant un traitement avec l'IGF-I a conduit à une accumulation d'IGFBP-3 liée aux cellules ayant une affinité diminuée pour IGF-I, ce qui aurait accentué la présentation de l'IGF-I au récepteur de type I [190;193;194]. Cependant, ce mécanisme n'a jamais été prouvé clairement et d'autres résultats montrent que l'IGFBP-3 liée aux cellules pourrait quand même diminuer les effets médiés par l'IGF-I [195].

D'autres résultats montrent aussi l'accentuation des effets de l'IGF-I. Par exemple, deux études suggèrent que l'IGFBP-3, par sa liaison avec l'IGF-I, pourrait protéger les cellules de la diminution de l'expression du récepteur d'IGF de type I régulée par l'IGF-I [196;197]. Aussi, il a été montré récemment que les effets d'accentuation de l'IGFBP-3 pourraient être régulés par la voie de signalisation de la PI3-kinase [198].

Fonctions indépendantes des IGFs

Depuis quelques années, il devient de plus en plus clair que l'IGFBP-3 peut exercer une influence sur les cellules par des mécanismes qui ne requièrent pas les IGFs.

Le principal intérêt a été d'étudier la capacité de l'IGFBP-3 à induire ou à moduler l'apoptose de façon indépendante des fonctions de survie de l'IGF-I [199]. Dans les cellules de cancer du sein Hs 578T, il a été montré que l'inhibition de la croissance cellulaire provoquée par la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ était accompagnée par une augmentation de l'expression de l'IGFBP-3 et que ces effets semblent indépendants des IGFs puisque cette lignée cellulaire ne répond pas aux IGFs [200]. Pour supporter ces données, une inhibition de la croissance de cellules prostatiques cancéreuses LNCaP dans un milieu sans IGFs par la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ a été observée et incluait l'induction de l'IGFBP-3 [201]. Une autre preuve a été l'utilisation d'une lignée cellulaire de fibroblastes de souris ne contenant pas de récepteurs d'IGF de type I [202]. Dans ce modèle, l'IGFBP-3, soit par un traitement exogène ou par une transfection dans les cellules, a considérablement augmenté le niveau basal d'apoptose.

Il semble de plus en plus évident que l'IGFBP-3 puisse provoquer l'apoptose par elle-même et aussi augmenter les effets apoptotiques de radiations ionisantes, de radiations UV ou de drogues de chimiothérapie, tous des agents qui créent des dommages à l'ADN [203-206]. Il semble que l'IGFBP-3 puisse agir sans p53 puisque des transfusions d'IGFBP-3 dans les cellules T47D, des cellules de cancer du sein MCF-7 mutantes pour p53, ont induit l'apoptose [203].

Les mécanismes intracellulaires qui médient les effets proapoptotiques ne sont pas encore connus, mais il semble qu'une augmentation des protéines proapoptotiques Bax et Bad et une diminution des protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L soient impliquées dans le mécanisme [203].

Il y a aussi les fragments d'IGFBP-3 qui semblent avoir des effets indépendants des IGFs. Par exemple, le clivage de l'IGFBP-3 par la plasmine produit un fragment N-terminal de 16kDa qui ne lie pas l'IGF-I. Ce fragment s'est avéré aussi efficace que l'IGFBP-3 intacte pour inhiber l'induction de la synthèse

d'ADN par l'IGF-I dans les fibroblastes d'embryons de poulets [21]. Il a été démontré par la suite que le fragment de 16kDa, mais non l'IGFBP-3 intact, pouvait inhiber l'action mitogénique du facteur de croissance fibroblastique dans des fibroblastes de souris invalidés pour l'IGFRI [207]. Ce fragment a même pu induire l'apoptose dans les cellules MCF-7 [208].

Surexpression d'IGFBP-3 chez la souris

Jusqu'à ce jour, quatre modèles de souris surexprimant l'IGFBP-3 humaine ont été étudiés dans la littérature. Le tableau I dresse un portrait des différents phénotypes associés à chacune des souris transgéniques. Fait intéressant, pour les deux modèles de souris exprimant de façon ubiquitaire l'IGFBP-3, les niveaux circulants d'IGF-I ont été augmentés de 1,4 fois par rapport aux souris sauvages [209]. De plus, les niveaux circulants d'IGF-I libre ont été augmentés de 1,8 fois bien que le phénotype prédominant observé démontrait une diminution de l'action de l'IGF-I [210]. Comme l'expression d'IGFBP-3 est ubiquitaire, le phénotype que l'on observe chez ces souris pourrait être causé par les actions locales sur les tissus de l'IGFBP-3 plutôt que par une perturbation dans les niveaux circulants d'IGF-I. Cependant, il faut être prudent avec les valeurs d'IGF-I libre puisqu'il n'est pas encore clair que la technique de dosage de l'IGF-I utilisée soit efficace en présence de niveaux anormalement élevés d'IGFBP-3 dans le sang, environ 17 fois plus que chez la souris sauvage [209;211].

Les résultats obtenus avec la souris transgénique MT-IGFBP-3 sont intéressants. En effet, l'expression du transgène n'a lieu que dans le rein, le petit et le gros intestin. Le niveau d'expression du transgène dans ces organes est assez faible. Malgré cela, l'expression transgénique d'IGFBP-3 dans ces tissus a provoqué une organomégalie du foie, de la rate et du cœur [212], ce qui nous montre tout l'impact que peut avoir IGFBP-3 sur la croissance et le développement d'un organe.

Il reste encore beaucoup de choses à explorer avec les souris transgéniques. Tout d'abord, il serait important d'approfondir les techniques permettant la mesure de l'IGF-I libre. Cela pourrait permettre de déterminer par exemple si l'hyperglycémie observée chez les souris transgéniques est causée par une

séquestration de l'IGF-I libre dans la circulation par l'IGFBP-3. Il serait important aussi d'obtenir un modèle de souris dans lequel l'expression du transgène n'aurait lieu que dans le foie. Cela permettrait d'étudier les effets de l'IGFBP-3 dans la circulation sans que les effets tissulaires de l'IGFBP-3 interviennent.

Pour terminer, un petit mot sur les souris invalidées pour le gène d'*igfbp3*. Il semble que des souris « knockout » aient été obtenues, mais jusqu'à ce jour, aucun article n'a été publié à ce sujet. Il en a été cependant question lors d'un congrès et il semble que le phénotype résultant de l'invalidation ne soit pas simple, probablement à cause de la redondance des autres IGFBPs [315].

Tableau I : Phénotypes des souris transgéniques surexprimant l'IGFBP-3 humaine

Construction^a	Expression	Phénotype
PGK-IGFBP-3	Ubiquitaire	↓poids à la naissance, retard de croissance, ↓de la portée, hyperglycémie, intolérance au glucose, ↓formation osseuse, ↑résorption osseuse [209;210;213]
CMV-BP-3	Ubiquitaire	↓poids à la naissance, retard de croissance, mais rattrapage après puberté, ↓de la portée, hyperglycémie, intolérance au glucose, résistance à l'insuline, ↓formation osseuse, ↑résorption osseuse ↑adiposité [209;210;213]
MT-IGFBP-3	Rein, petit et gros intestin	Organomégalie de la rate, du foie et du cœur [212]
WAP-IGFBP-3	Cellules épithéliales mammaires durant lactation	↓grosueur des alvéoles, inhibition de la glande à déclencher le remodelage et l'apoptose programmés après sevrage [214]

^aPGK, promoteur de la phosphoglycérate kinase I; CMV, promoteur du cytomégalovirus; MT, promoteur de la métallothionéine; WAP, promoteur de « whey acidic protein ».

Dosage d'IGFBP-3 : variation selon l'âge, le sexe et le stade pubertaire

Les niveaux d'IGFBP-3 mesurés dans le cordon ombilical à la naissance sont très bas. Les niveaux sériques augmentent ensuite drastiquement durant les neuf premiers mois de vie. Une augmentation quasi linéaire est notée de la petite enfance jusqu'à la puberté [182].

À la puberté, on note une augmentation des niveaux sériques d'IGFBP-3, mais qui est moins prononcée que l'IGF-I (fig. 2a et b) [182;215]. Ainsi, le ratio IGF-I : IGFBP-3 est augmenté et cela peut refléter la quantité d'IGF-I libre et biologiquement actif [216;217]. Cette augmentation en IGF-I et en IGFBP-3 est causée par une augmentation de la sécrétion de GH [218-220] et possiblement aussi en combinaison avec une plus grande sensibilité à cette dernière lors de la puberté [218].

Dans les vingt premières années de l'âge adulte, on remarque une diminution marquée de l'IGF-I et de l'IGFBP-3 comparativement aux niveaux élevés observés à la puberté [221;222]. On remarque par la suite une diminution presque linéaire des niveaux circulants d'IGF-I et d'IGFBP-3.

Plusieurs facteurs peuvent modifier les niveaux sériques d'IGFBP-3. Le tableau II résume différentes conditions qui peuvent affecter les niveaux circulants d'IGFBP-3.

Il existe une différence selon le sexe pour les niveaux circulants d'IGFBP-3 durant l'enfance et la puberté, mais ensuite, cette différence disparaît (fig. 2b). Il est possible aussi d'observer des niveaux circulants d'IGFBP-3 différents lorsque le développement pubertaire est divisé en différents stades, appelés « Tanner stages » (fig. 2c et d). Malgré qu'il soit possible d'établir des différences dans les niveaux circulants d'IGFBP-3 selon l'âge, le sexe et le stade pubertaire, il existe toujours une grande variabilité interindividuelle qui rend l'utilisation du dosage d'IGFBP-3 difficile. C'est ce problème qui est à la base de la recherche effectuée dans le cadre de ce mémoire.

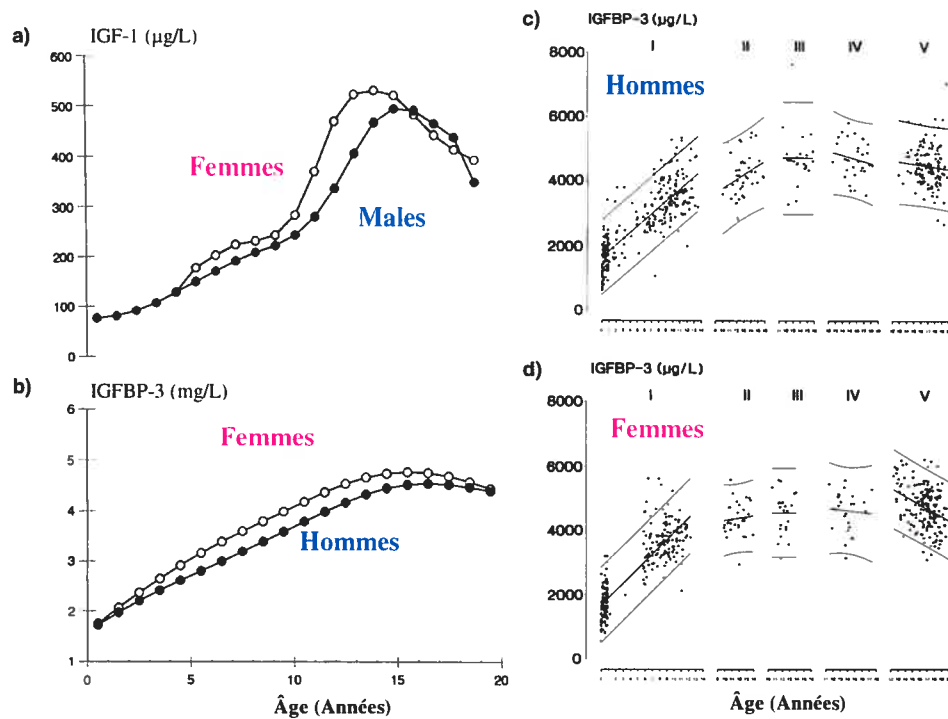


Figure 2. Niveaux circulants d'IGF-I (a) et d'IGFBP-3 (b) durant l'enfance et la puberté selon le sexe ainsi que les niveaux d'IGFBP-3 selon les stades de développement pubertaire (« Tanner stages »). Les niveaux sériques ont été mesurés chez 533 filles et 499 garçons en bonne santé. (Figure tirée de Juul *et al.* [182])

Niveaux d'IGFBP-3 dans différentes conditions physiologiques et pathologiques

Le tableau II montre un aperçu de diverses conditions cliniques qui suggèrent une régulation hormonale de l'expression de l'IGFBP-3. De ces observations, il ressort que la GH, l'insuline et l'estrogène sont de majeurs régulateurs, bien qu'il soit difficile de déduire l'importance relative de chacun étant donné que, dans des situations *in vivo*, il y a rarement des perturbations que pour une seule hormone. Un exemple de cette situation est le syndrome de Cushing, où une hypersécrétion de cortisol mène à une hypersécrétion d'insuline et parfois même au diabète. Les chercheurs se sont donc tournés vers des études *in vitro* pour mieux approfondir la régulation de l'expression de l'IGFBP-3.

Tableau II : Différentes conditions *in vivo* pouvant affecter les niveaux circulants d'IGFBP-3

Condition	Effet sur les niveaux d'IGFBP-3 [réf.]
Déficience en GH	↓ [12]
Traitement avec GH	↑ [223]
Acromégalie (excès en GH)	↑ [221;224]
Déficience en récepteur de GH (Nanisme de type Laron)	↓ [225]
Grossesse	↑ [226;227]
Prééclampsie associée avec RCIU	↓ [228]
Diabète de type 1	↓ [229]
Hypertension	↑ [230]
Obésité	↑ [231]
Dysfonction hépatique	↓ [232]
Insuffisance rénale chronique (CRF)	↑ [233]
Exercice intense à court terme	↑ [234;235]
Syndrome de Cushing	↑ [236]

Régulation in vitro de l'expression d'IGFBP-3

La GH est reconnue comme étant un régulateur majeur de l'expression d'IGFBP-3. En plus des effets produits par l'IGF-I, la GH semble réguler directement l'expression d'IGFBP-3. En effet, dans les cellules d'hépatocarcinomes humains SK-HEP-1, Gucev *et al.* ont pu démontrer que la régulation de l'expression d'IGFBP-3 par la GH pouvait s'effectuer sans l'intermédiaire de l'IGF-I [237]. Suite au traitement avec GH, les auteurs ont remarqué une augmentation de la sécrétion d'IGFBP-3 qui était accompagnée d'une augmentation des niveaux d'ARNm. Pour confirmer l'indépendance de la stimulation par rapport à l'IGF-I, le dosage d'IGF-I sécrété ainsi que la quantification par Northern et par RT-PCR d'ARNm synthétisé ont été effectués et se sont avérés négatifs.

L'IGF-I, qui est directement régulée par la GH, stimule aussi l'expression de l'IGFBP-3. Dans un modèle cellulaire de rat mis au point par Villafuerte *et al.* [238] et qui consiste en une coculture d'hépatocytes et de cellules de Kupffer, l'IGF-I a augmenté la demi-vie de l'ARNm [239]. Dans un modèle de cellules d'hépatomes humains (HepG2), Kalme *et al.* ont démontré que l'IGF-I et l'IGF-II augmentaient la sécrétion d'IGFBP-3 [240].

Plusieurs modèles ont été utilisés pour explorer le rôle de l'insuline dans la régulation d'IGFBP-3. Dans le modèle de coculture d'hépatocytes et de cellules de Kupffer mentionné plus haut, l'insuline a augmenté l'activité transcriptionnelle du promoteur, l'ARNm ainsi que la sécrétion de l'IGFBP-3 [239]. De leur côté, Bale *et al.* ont démontré une augmentation de l'activité transcriptionnelle dans un modèle de fibroblastes bovins après un traitement avec l'insuline [241]. Finalement, dans un modèle cellulaire d'hépatomes humains (HepG2), Kalme *et al.* ont démontré que l'insuline augmentait la sécrétion d'IGFBP-3 [240].

Plusieurs résultats viennent confirmer l'inhibition de l'expression d'IGFBP-3 par l'estrogène. Dans les cellules de cancer du sein MCF-7, positives pour le récepteur aux estrogènes, Huynh *et al.* ont démontré que l'antiestrogène ICI 182780 augmentait la transcription de l'*IGFBP3*, les niveaux d'ARNm ainsi que la sécrétion de la protéine [242]. Ils ont observé aussi que l'estrogène donnait exactement les résultats contraires et que la corrélation inverse entre les niveaux d'ARNm d'*IGFBP3* et la prolifération cellulaire était forte ($r = -0,91$). Toujours chez les cellules MCF-7, il a été montré qu'un traitement avec de l'estradiol diminuait de 25% l'accumulation d'IGFBP-3 secrété dans le milieu de culture [243]. Des études *in vivo* de glandes mammaires de rat ont noté que la prolifération des cellules épithéliales par l'estrogène était associée avec une inhibition de l'expression d'IGFBP-3 [244]. Il a été observé aussi que des rats traités avec 2mg d'antiestrogène ICI 182780 par kg de masse corporelle par semaine se retrouvaient avec des niveaux d'ARNm dans les glandes mammaires 8 fois supérieurs aux rats non traités [244]. L'inhibition de croissance induite par le tamoxifène était associée avec une faible augmentation d'expression d'IGFBP-3 [244].

Deux études viennent démontrer les effets inhibiteurs des glucocorticoïdes sur l'expression de l'IGFBP-3. Tout d'abord, dans le modèle de coculture d'hépatocytes et de cellules de Kupffer, il a été montré que le dexaméthasone diminuait l'activité du promoteur [245]. Ensuite, dans un modèle de cellules d'hépatomes humains HepG2, Kalme *et al.* ont démontré que le cortisol inhibait de 30 à 40% la sécrétion d'IGFBP-3 [240]. Ces résultats *in vitro* à l'opposé de ce qui est observé pour le syndrome de Cushing nous laissent croire que les effets du cortisol sur l'IGFBP-3 sont annulés par d'autres facteurs, possiblement l'insuline.

Parmi les molécules qui ont des effets mitogéniques, notons la cytokine TNF α qui a augmenté les niveaux sécrétés ainsi que l'ARNm dans les cellules porcines de Sertoli [246]. Il y a aussi les facteurs TGF β 1 et OP-1 (osteogenic protein-1) qui ont augmenté l'expression d'IGFBP-3 à la fois dans les cellules osseuses normales et dans les cellules d'ostéocarcinomes humains MG63 [247].

L'identification d'une stimulation de l'expression de l'IGFBP-3 par plusieurs agents anti-proliférateurs vient supporter les fonctions pro-apoptotiques déjà décrites pour l'IGFBP-3. Tout d'abord, dans les cellules de cancer du sein MCF-7, positives pour le récepteur aux estrogènes, Martin *et al.* ont observé une augmentation de la sécrétion d'IGFBP-3 lors d'un traitement avec l'acide rétinoïque ou la forskoline, un agent augmentant la concentration intracellulaire d'AMP cyclique [243]. D'autres résultats pour des traitements avec l'acide rétinoïque sur les cellules MCF-7 sont venus préciser que l'augmentation de l'expression d'IGFBP-3 avait lieu au niveau transcriptionnel [248].

Parmi les autres molécules anti-prolifératrices qui stimulent l'expression de l'IGFBP-3, notons la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ qui a augmenté la sécrétion de l'IGFBP-3 un modèle d'ostéocarcinomes humains [249]. Il y a aussi le butyrate qui a augmenté l'expression d'IGFBP-3 au niveau de la transcription dans les cellules épithéliales humaines dérivées d'adénomes du colon exprimant ou non p53 [250]. L'inositol hexaphosphate, un élément contenu dans les céréales, les légumes, le soya et dont la consommation est associée avec une diminution de divers cancers, a diminué la prolifération de cellules prostatiques cancéreuses tout en augmentant l'expression d'IGFBP-3 [251]. Le même effet a été observé dans le même modèle

cellulaire lors d'un traitement de l'extrait de grain de raisin [252]. Le tableau III résume les différents agents qui affectent *in vitro* l'expression de l'IGFBP-3.

Tableau III : Régulation *in vitro* de l'expression de l'IGFBP-3

Agent	Effets [réf.]	Modèle cellulaire
GH	↑ARNm et ↑sécrétion [237]	SK-HEP-1
IGF-I	↑demi-vie ARNm [239]	Coculture hépatocytes et cellules de Kupffer
	↑sécrétion [240]	HepG2
IGF-II	↑sécrétion [240]	HepG2
Insuline	↑transcription, ↑ARNm et ↑sécrétion [239]	Coculture hépatocytes et cellules de Kupffer
	↑transcription [241]	Fibroblastes bovins
	↑sécrétion [240]	HepG2
Estrogène	↓transcription, ↓ARNm et ↓sécrétion [242]	MCF-7
	↓sécrétion [243]	MCF-7
Antiestrogène ICI 182780	↑transcription, ↑ARNm et ↑sécrétion [242]	MCF-7
Cortisol	↓sécrétion [240]	HepG2
Dexaméthasone	↓transcription [245]	Coculture hépatocytes et cellules de Kupffer
TNF α	↑ARNm et ↑sécrétion [246]	Cellules porcines de Sertoli
TGF β 1	↑ARNm et ↑sécrétion [247]	Cellules osseuses normales et
		ostéocarcinomes humains MG63

		Cellules osseuses
Osteogenic protein-1	↑ARNm et ↑sécrétion [247]	normales et ostéocarcinomes humains MG63
Acide rétinoïque	↑transcription [248]	MCF-7
	↑sécrétion [243]	MCF-7
Forskoline	↑sécrétion [243]	MCF-7
1,25-dihydroxyvitamine D ₃	↑sécrétion [249]	ostéocarcinomes humains MG63
Butyrate de sodium	↑transcription et ↑sécrétion [250]	Adénomes humains de colon

Structure du gène et régulation du promoteur

Tel qu'énoncé plus haut, le gène codant pour IGFBP-3 se retrouve sur le chromosome 7 dans la même région que le gène codant pour IGFBP-1, soit 7p14-12, à environ 20kb de ce dernier et dans une orientation queue à queue [92]. La figure 3 montre la structure du gène codant pour l'IGFBP-3 et de son promoteur ainsi que de l'ARNm. Le gène s'étend sur une longueur de 8,9kb et, contrairement aux autres IGFBPs, contient 5 exons [253]. Cependant, le cinquième exon n'est pas traduit, car il contient presque toute la région 3' non traduite qui comprend entre autre le signal de polyadénylation. L'exon 4 contient l'extrémité 3' codant pour la protéine, le codon stop ainsi que 15 paires de bases de l'extrémité 3' non traduite. Il ne semble pas y avoir d'épissage alternatif puisqu'un seul type d'ARNm mesurant environ 2,5kb a été observé par analyse Northern [254-256]. La seule exception se trouve chez le babouin qui, en plus de l'ARNm de 2,5kb, possède un ARNm de 1,7kb qui est le résultat probable d'un épissage alternatif et dont la production est augmentée lors de la grossesse [257].

Cubbage *et al.* [253] ont été les premiers à caractériser le promoteur d'IGFBP3. Ils ont déterminé qu'un fragment correspondant aux nucléotides -431 à +72 par rapport au site d'initiation de la transcription contenait le promoteur

d'*IGFBP3*. Ils ont déterminé aussi que le site d'initiation de la transcription se trouvait à 132 nucléotides en amont de l'ATG initiateur. Ils ont identifiés à l'intérieur du promoteur une boîte TATA en position -30 ainsi qu'une boîte GC en position -97 contenant des éléments de réponse putatifs pour Sp1 et AP-2 qui se chevauchent. La structure du promoteur d'*IGFBP3* est typique de celle retrouvée chez les promoteurs de gènes eucaryotes [258]. De plus, la structure du gène ainsi que les éléments du promoteur tels que décrits par Cubbage *et al.* sont conservés chez le bovin [259], le rat [260] et le porc [261].

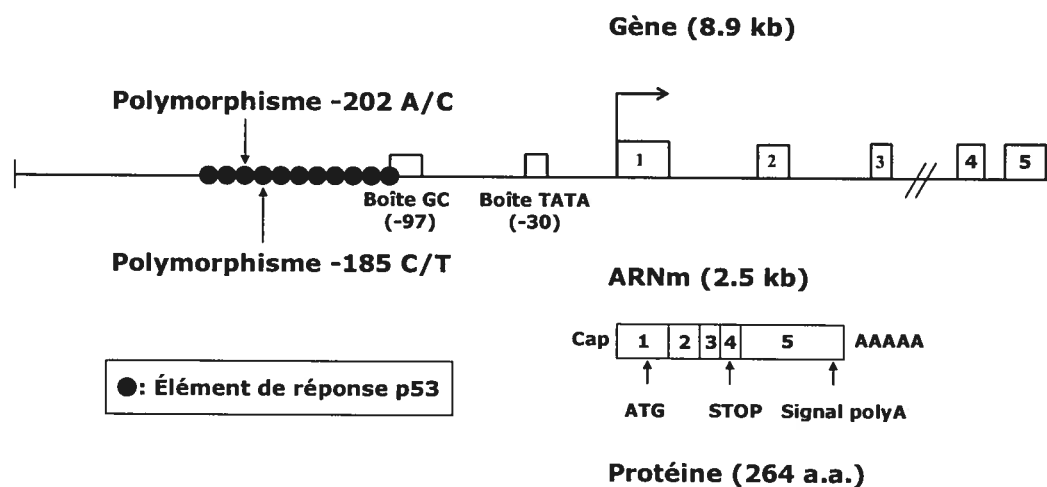


Figure 3. Structure du gène codant pour l'IGFBP-3 et de son promoteur ainsi que de l'ARNm. Les polymorphismes -202 A/C et -185 C/T se retrouvent à l'intérieur des éléments de réponse à p53.

Les bases de données sur les facteurs de transcription permettent l'identification de plusieurs éléments de réponse putatifs pour Sp1 de même que plusieurs autres séquences consensus pour plusieurs régulateurs hormonaux d'IGFBP-3. Cependant, les études fonctionnelles explorant ces éléments de réponse sont limitées.

Parmi les séquences mieux caractérisées, la région provoquant l'activation du promoteur d'*IGFBP3* suite à un traitement avec la trichostatine A (TSA), un agent anti-proliférateur chez les cellules de cancer du sein et un inhibiteur des histones déacétylases (HDAC), a été identifié entre les nucléotides -115 et -30, plus

précisément dans la région de la boîte riche en GC [262]. Les analyses mutationnelles ont démontré que l'effet activateur de la TSA nécessitait le site Sp1 contenu dans cette boîte. Il a été démontré que la phosphorylation du facteur de transcription Sp1 sur ce site était importante puisqu'elle semble déstabiliser le complexe Sp1/Sp3/HDAC1. L'inhibition de la transcription produite par les HDACs serait donc enlevée et permettrait alors l'activation du promoteur.

Un autre agent anti-proliférateur et inhibiteur des histones déacétylases, le butyrate, a lui aussi activé le promoteur d'*IGFBP3* via l'élément de réponse pour Sp1 situé dans la boîte riche en GC [263]. Il a été montré qu'un complexe multiprotéique comprenant le facteur Sp1 lié à son élément de réponse ainsi que le facteur Sp3 lié au site AP-2 adjacent était important pour l'activation de la transcription par le butyrate. Cependant, il semble qu'il n'y ait pas que la séquence Sp1 qui puisse répondre au butyrate. Une autre équipe a identifié deux autres éléments de réponse qui ne contiennent pas de sites consensus pour Sp1 et qui semblent utilisés dans les cellules prostatiques cancéreuses LNCaP traitées avec du sodium butyrate [264]. Un de ces éléments se retrouve dans la région -57 à -48 et l'autre se retrouve en aval de la boîte TATA, mais sa localisation précise reste à déterminer.

Bourdon *et al.* ont démontré la présence d'éléments de réponse fonctionnels pour le facteur p53 [265]. Ces éléments forment une région de 11 décimères couvrant les nucléotides -246 à -92, chaque décimère pouvant lier p53. Tout récemment Hanafusa *et al.* ont démontré que quatre de ces sites de liaison étaient essentiels pour l'activation de la transcription induite par p53 [266]. La figure 3 montre l'emplacement de ces décimères sur le promoteur.

Un élément de réponse à la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ a aussi été identifié sur le promoteur d'*IGFBP3* entre les nucléotides -3296 et -3282 [267]. Un fragment de promoteur allant jusqu'à 300pb en amont du site d'initiation de la transcription a démontré une réponse à l'IGF-I et à la forskoline, un agent qui augmente l'AMP cyclique intracellulaire, mais les éléments de réponses n'ont pas encore été identifiés [268].

Enfin, on note un élément de réponse à l'insuline dans le promoteur de l'*Igfbp3* de rat qui est situé entre les nucléotides -1150 et -1124 [269]. Cependant, la séquence homologue chez l'humain n'a pas été trouvée. C'est pourquoi nous sommes penchés sur la régulation du promoteur d'IGFBP-3 humain par l'insuline dans ce présent mémoire.

Régulation du promoteur d'IGFBP3 par la méthylation

La méthylation de l'ADN est un processus retrouvé dans une multitude de gènes eucaryotes afin de contrôler leur expression [270;271]. En résumé, la méthylation de régions riches en séquences CpG a pour effet de recruter des protéines de liaison aux cytosines méthylées, les MBPs, qui à leur tour viennent recruter des déacétylases d'histone (HDAC). Les histones peuvent ainsi enrouler l'ADN de façon compacte, empêchant la machinerie de transcription d'accéder aux gènes [270;272;273]. Beaucoup de régions riches en CpG sont retrouvées dans les régions promotrices de différents gènes, dont le gène codant pour l'IGFBP-3 [253]. Cela nous amène donc à croire que la méthylation jouerait un rôle dans la régulation de l'expression de l'IGFBP-3.

Une hyperméthylation de promoteurs de gènes importants dans le contrôle de la prolifération cellulaire a été observée dans plusieurs cancers [273]. Cette hyperméthylation a aussi été observée pour le promoteur de l'*IGFB3*. Par exemple, Hanafusa *et al.* ont démontré que l'expression d'IGFBP-3 était diminuée dans différents carcinomes hépatocellulaires et que 33% de cette baisse d'expression était associée à une hyperméthylation du promoteur [274]. De plus, l'expression d'IGFBP-3 était restaurée dans ces cellules par l'ajout de l'agent de déméthylation 5-aza-2'deoxyctidine. Une autre équipe a de son côté observé une méthylation du promoteur d'*IGFBP3* dans la majorité des échantillons provenant de patients souffrant de « non-small-cell lung cancer » (NSCLC), un cancer dans lequel l'expression d'IGFBP-3 est réduite de moitié [275].

Malgré ces résultats, le lien direct entre l'hyperméthylation du promoteur dans certains cancers et la perte d'expression d'IGFBP-3 (« gene silencing ») n'a pas encore été élucidé.

Présentation du projet de recherche

Tel que mentionné plus haut, il existe une grande variabilité interindividuelle pour les niveaux circulants d'IGFBP-3, ce qui rend difficile l'utilisation efficace de ce dosage en clinique. En 1996, une équipe de chercheurs finlandais a démontré que 60% de cette variabilité pouvaient être attribués à des facteurs génétiques [276]. Pour ce faire, ils ont analysé les différences pour les niveaux sériques d'IGFBP-3 entre des paires de jumeaux monozygotiques et dizygotiques.

C'est à partir de cette observation que le projet de recherche du laboratoire s'est développé. Notre hypothèse de travail est la suivante : des polymorphismes situés dans le promoteur du gène codant pour l'IGFBP-3 affectent les niveaux circulants de la protéine.

Un génotypage effectué sur une cohorte de Montréalais par notre laboratoire a identifié quelques sites polymorphiques dont un ayant une fréquence allélique de 40% [277]. Ce polymorphisme est situé à 202 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription et permet l'observation d'un résidu cytosine au lieu d'un résidu adénosine (fig. 3).

Par la suite, en collaboration avec d'autres laboratoires, les niveaux circulants d'IGFBP-3 ont été mesurés dans trois groupes : une cohorte de 478 hommes provenant de la « Physicians Health Study » [277], une cohorte de 310 femmes provenant de la « Young Women's Study » [278] ainsi qu'une cohorte de 242 jeunes Australiens âgés entre 7 et 8 ans (article en préparation). Ces valeurs ont par la suite été regroupées selon le génotype pour le polymorphisme -202 A/C. La figure 4 nous montre les résultats pour les trois cohortes. Dans les trois cas, une diminution des niveaux circulants d'IGFBP-3 est observée lorsque des sujets homozygotes C pour le polymorphisme -202 sont comparés aux sujets homozygotes A. Cela nous montre que le polymorphisme -202 A/C semble avoir un impact sur l'expression de l'IGFBP-3.

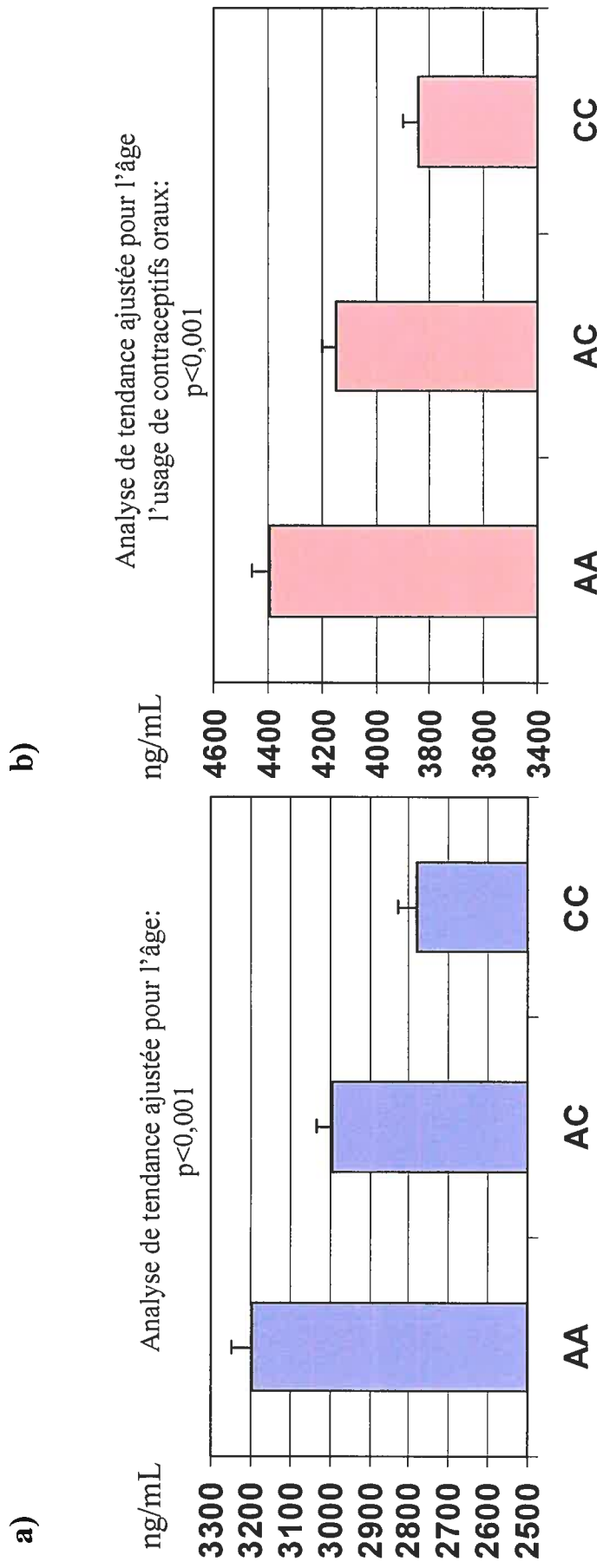


Figure 4: **Corrélation entre le polymorphisme -202 A/C et les niveaux circulants d'IGFBP-3.** a) Niveaux circulants d'IGFBP-3 chez 478 hommes provenant de la «Physicians Health Study» (figure adaptée de Deal *et al.* [REF2]). b) Niveaux circulants chez 310 femmes provenant de la «Young Women's Study» (figure adaptée de Jernstrom *et al.* [REF319]). c) Niveaux circulants chez 242 enfants australiens âgés de 7 et 8 ans (données non publiées).

c)

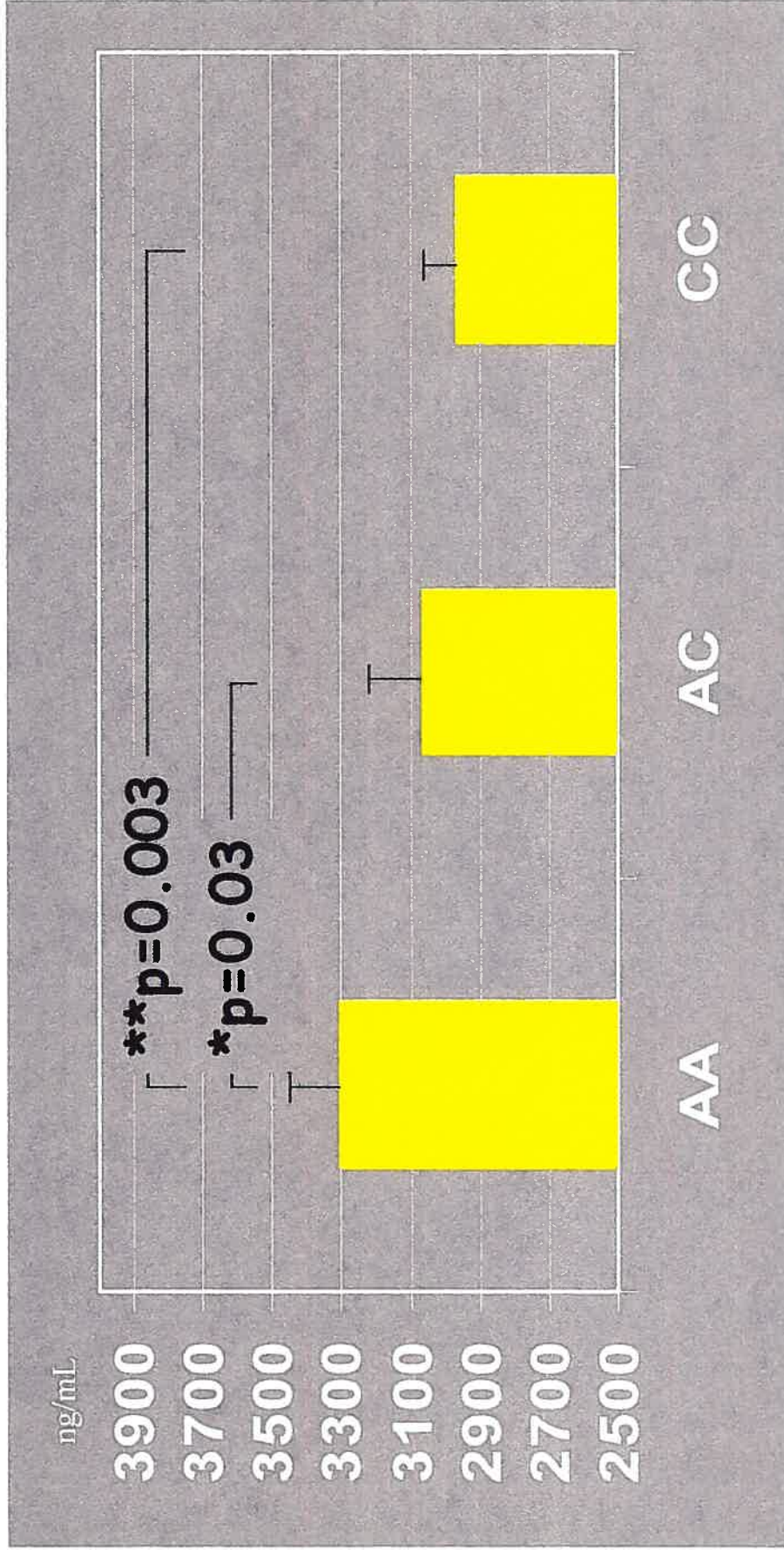


Figure 4: (Suite)

Suite à ces résultats, nous avons voulu étudier *in vitro* l'impact de ce polymorphisme. Nous avons aussi ajouté dans l'étude le polymorphisme -185 C/T qui possède lui aussi une fréquence allélique élevée (32%) [277]. De plus, comme il a été mentionné plus haut que plusieurs molécules pouvaient affecter *in vitro* l'expression de l'IGFBP-3, nous avons choisi pour débiter d'étudier l'impact des polymorphismes sur une stimulation par l'insuline. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle de transfection transitoire dans des cellules d'hépatocarcinomes humains avec des vecteurs rapporteurs d'activité luciférase. Nous avons aussi utilisé la technique de retard sur gel afin d'identifier les facteurs impliqués dans le processus.

2. Matériel et méthodes

Obtention de la région promotrice du gène d'*IGFBP3*

Des études précédentes [253] ont démontré que le gène d'*IGFBP3* contiendrait un promoteur minimal allant jusqu'à 440 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription.

Pour obtenir le promoteur d'*IGFBP3*, un clone BAC contenant un fragment du chromosome 7 humain a été obtenu de la compagnie Genome Systems Inc. (St-Louis, MO). La validation du clone génomique s'est faite par analyse Southern Blot après digestion avec différentes enzymes de restriction et en utilisant comme sonde un produit PCR du promoteur d'*IGFBP3* (-440/+19 avec les amorces PROM4F 5'-CCACGAGGTACACACGAATG-3' et PROM4R 5'-AGCCGCAGTGCTCGCATCTGG-3') (résultats non montrés). Veuillez noter que la numérotation des nucléotides du promoteur d'*IGFBP3* se fait selon la séquence déterminée par Cubbage *et al.* [253] et dont le site d'initiation de la transcription égale +1. Un fragment de restriction de 6.6kb après digestion par EcoRI et contenant le promoteur d'*IGFBP3* a été identifié. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pBluescript II KS (Stratagene, La Jolla, CA).

Création des vecteurs d'expression de la luciférase sous contrôle du promoteur humain d'*IGFBP3*

Le vecteur pGL3-Basic (Promega Corporation, Madison, WI) contenant le gène de la luciférase a été choisi pour évaluer l'activité du promoteur d' *IGFBP3*. Le vecteur pGL3 MX a aussi été utilisé comme vecteur rapporteur. Ce dernier est le vecteur pGL3-Basic dont une séquence dans le site de polyclonage, entre les sites de restriction MluI et XhoI (5'-GCTAGCCCGGG-3'), a été changée pour 5'-GAATTCCATATGGCTAGC-3'. Cette nouvelle séquence comprend les sites de restriction EcoRI, NdeI et NheI et ne contient plus le site de restriction XmaI. Ce vecteur a été créé afin de faciliter l'insertion de fragments de promoteur d'*IGFBP3*.

La figure 5 nous montre les différents vecteurs d'expression qui ont été utilisés pour les transfections.

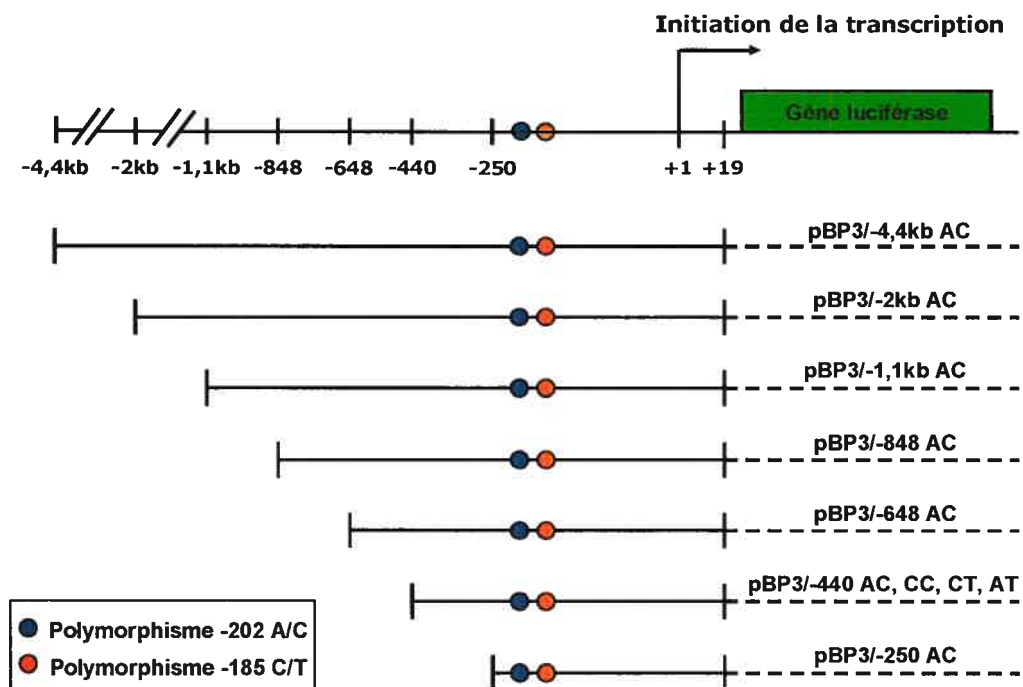


Figure 5 : Vecteurs d'expression de la luciférase sous contrôle du promoteur humain d'*IGFBP3* utilisés pour les transfections. Les haplotypes disponibles pour chaque longueur de promoteur sont indiqués.

Construction contenant le fragment de promoteur d'*IGFBP3* de 4.4kb

Une première construction promoteur *IGFBP3*-gène rapporteur de la luciférase a par la suite été faite. La région -4425/+19 du promoteur d'*IGFBP3* a été amplifiée par PCR à partir du vecteur pBluescript II KS contenant le fragment de 6.6kb du promoteur en utilisant l'amorce sens BP3-8413EcoRI (5'-GGAATTCCTGGGTAAAGACACAGGATTGACACT-3') et l'amorce anti-sens BP3-4RXbaI (5'-GCTCTAGAGCCGCAGTGCTCGCATCTGG-3'). L'amorce BP3-8413EcoRI permettait de flanquer en 5' du fragment amplifié un site EcoRI et l'amorce BP3-4RXbaI permettait d'ajouter un site XbaI en 3'. Les conditions de PCR étaient les suivantes : 45 secondes de dénaturation à 95°C suivi de 30 cycles

d'une minute à 95°C, une minute à 68°C et 9 minutes à 72°C et pour terminer, 10 minutes d'élongation à 72°C. Après digestion de ses extrémités avec les enzymes de restriction EcoRI et XbaI, le fragment -4425/+19 a été cloné en amont du gène codant pour la luciférase dans le vecteur pGL3MX préalablement ouvert par co-digestion avec EcoRI et NheI. Les enzymes NheI et XbaI produisent des fragments cohésifs et compatibles qui peuvent être ligués entre eux. Le vecteur pBP3/-4.4kb a ainsi été obtenu. Afin de faciliter l'appellation de ce vecteur, l'extrémité 3' du fragment du promoteur d'*IGFBP3* correspondant au nucléotide +19 n'est pas indiquée. Il en sera de même pour tous les autres fragments du promoteur d'*IGFBP3* utilisés dans les vecteurs d'expression.

Construction contenant le fragment de promoteur d'IGFBP3 de 2kb

Afin d'obtenir le vecteur pBP3/-2kb AC, un PCR a été effectué à partir du vecteur pBP3/-4.4kb avec l'amorce sens BP3-10821-EcoRI (5'-GGAATTCTGATCTTCCCCTGTCCACTCTCC-3') et l'amorce anti-sens BP3-4R-XbaI (5'-GCTCTAGAGCCGCAGTGCTCGCATCTGG-3'). Les conditions de PCR étaient les suivantes : 45 secondes de dénaturation à 95°C, 30 cycles d'une minute à 95°C, une minutes à 66°C et 4 minutes à 72°C et pour terminer, 10 minutes d'élongation à 72°C. Le fragment de 2kb ainsi obtenu a été purifié et digéré avec les enzymes de restriction EcoRI et XbaI. Ce fragment a ensuite été inséré dans le vecteur pGL3MX préalablement digéré avec les enzymes de restriction NheI et EcoRI.

Construction contenant le fragment de promoteur d'IGFBP3 de 1.1kb

Pour obtenir le vecteur pBP3/-1.1kb AC, une double digestion avec les enzymes EcoRI et Eco81I a été effectuée sur le vecteur pBP3/4.4kb. Le vecteur digéré a été purifié afin d'éliminer un fragment de restriction d'environ 3.3kb et a finalement été refermé par ligation.

Constructions contenant les fragments de promoteur d'IGFBP3 de 848 et 648pb

Pour obtenir les vecteurs pBP3/-848 AC et pBP3/-648 AC, un PCR a été effectué à partir du vecteur pBP3/-4.4kb. Pour créer le vecteur pBP3/-848 AC, l'amorce sens BP3F4-EcoRI (5'-GGAATTCCGTTTCAGCAGTGCCCAGTT-3') et l'amorce anti-sens BP3-4R-XbaI ont été utilisées. Pour créer le vecteur pBP3/-648 AC, l'amorce sens BP3F3-EcoRI (5'-GGAATTCGTCTTCTTGCGTTGAGAAGT-3') et l'amorce anti-sens BP3-4R-XbaI ont été utilisées. Les conditions pour les deux PCRs étaient les suivantes : 5 minutes de dénaturation à 95°C, 35 cycles d'une minute à 96°C, une minute à 64°C et une minute à 72°C et pour terminer, 5 minutes d'élongation à 72°C. Les fragments de 848 et 648pb ont été purifiés et digérés avec les enzymes de restriction EcoRI et XbaI. Ces fragments ont ensuite été insérés dans le vecteur pGL3MX préalablement digéré avec les enzymes de restriction NheI et EcoRI.

Création de vecteurs rapporteurs d'haplotypes différents pour l'analyse des polymorphismes -202 A/C et -185 C/T

Pour explorer la contribution des différents haplotypes du promoteur d'IGFBP3 à l'activité du gène rapporteur, nous les avons générés par PCR à partir de l'ADN génomique de leucocytes d'individus au génotype connu et homozygotes aux sites des polymorphismes -202 et -185. Les haplotypes possibles étaient : -202 A et -185 C, -202 C et -185 C, -202 C et -185 T. Veuillez noter que dans la nomenclature des différents vecteurs d'expression de la luciférase sous contrôle du promoteur d'IGFBP3, les deux dernières lettres du nom correspondent aux polymorphismes -202 A/C et -185 C/T respectivement.

Création des vecteurs pBP3/-440 AC, CC et CT

Les promoteurs minimaux (-440/+19) d'haplotypes différents ont été générés par PCR en utilisant les amorces PROM4F (5'-CCACGAGGTACACACGAATG-3') et PROM4R (5'-AGCCGCAGTGCTCGCATCTGG-3') à partir de l'ADN

génomique de leucocytes d'individus homozygotes aux sites des polymorphismes -202 et -185. Les conditions des PCRs étaient les suivantes : 10 minutes de dénaturation à 94°C, 35 cycles de 30 secondes à 96°C, 30 secondes à 64°C et une minute à 72°C et pour terminer, 5 minutes d'élongation à 72°C. Après phosphorylation des bouts 5' avec la T4 polynucléotide kinase (PNK), les fragments avec haplotypes -202 A/-185 C et -202 C/-185 C ont été sous clonés d'abord dans le vecteur pBluescript II KS (pKS), puis transférés dans le vecteur pGL3MX. Les fragments avec haplotype -202 C/-185T ont été introduits directement dans le vecteur pGL3Basic. Les vecteurs pBP3/-440 AC, pBP3/-440 CC et pBP3/-440 CT ont été ainsi obtenus.

Création des vecteurs pBP3/-250 AC, CC et CT

Des fragments plus courts des promoteurs minimaux (-250/+19) ont aussi été générés par PCR avec les amorces BP3 PROMF2 (5'-ACCTTGGTTCTTG TAGACGA-3') et PROM4R à partir des vecteurs pBP3/440 AC, CC et CT. Les conditions de PCR étaient les suivantes : 5 minutes de dénaturation à 94°C, 30 cycles de 30 secondes à 96°C, 30 secondes à 62°C et une minute à 72°C et pour terminer, 5 minutes d'élongation à 72°C. Les fragments ainsi obtenus ont tout d'abord été insérés dans le vecteur pKS et ensuite transférés dans le vecteur pGL3MX.

Création du vecteur pBP3/-440 AT par mutagenèse dirigée

Puisque les cohortes dans lesquelles le génotypage pour les polymorphismes -202 A/C et -185 C/T a été effectué ne contenaient pas d'individus avec l'haplotype -202 A et -185 T [277;278], nous avons dû le créer artificiellement.

Le protocole «QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis» de la compagnie Stratagene a été utilisé pour créer le vecteur pBP3/-440 AT. La technique consiste à effectuer un PCR avec une paire d'amorces complémentaires qui correspond à une région de 10 à 12 nucléotides de chaque côté du site à muter dans le vecteur et cette

paire d'amorce doit contenir la mutation. L'amorce sens BP3-185T (5'-GGAGCAGGTGT⁻¹⁸⁵CCGGGCGAGTC-3') et l'amorce anti-sens R-185T (5'-GACTCGCCCGGA⁻¹⁸⁵CACCTGCTCC-3') ainsi que le vecteur pBP3/-440 AC à muter ont été utilisés dans un PCR utilisant les conditions suivantes : 30 secondes de dénaturation à 95°C, 16 cycles de 30 secondes à 95°C et 12 minutes à 68°C. Après digestion de l'ADN parental non méthylé par l'enzyme de restriction DpnI à 37°C durant une heure, le produit de PCR a été transformé dans les cellules super compétentes XL1-Blue selon le protocole fourni pour la mutagenèse. Les clones positifs ont été identifiés par digestion avec l'enzyme de restriction SmaI et par migration sur gel 10% polyacrylamide non dénaturant (29 : 1, acrylamide : bis acrylamide). Un fragment de 209pb était attendu pour un T en -185 comparativement à un fragment de 175pb pour un C en position -185.

Création du vecteur mutant pour un site USF, pBP3/-440-M1, par mutagenèse dirigée

Pour étudier la fonctionnalité du site de liaison putatif du facteur de transcription USF, nous avons créé par mutagenèse une mutation dans cet élément de réponse.

Le protocole utilisé pour créer le vecteur pBP3/-440 AT a été aussi utilisé pour créer le vecteur pBP3/-440-M1. Le site de liaison d'USF entre les nucléotides -200 et -195 sur le promoteur d'*IGFBP3*, 5'-CACGAG-3', a été muté pour produire la séquence 5'-CTCGAG-3' [279]. Les amorces utilisées étaient : 5'-GGGCGTGAGCTCGAGGAGCAGG-3' et 5'-CCTGCTCCTCGAGCTCACGCC-3'. La mutagenèse a été effectuée sur le vecteur pBP3/-440 AC et les clones positifs ont été identifiés par digestion avec l'enzyme de restriction BssSI et par migration sur gel d'agarose 0,8%.

Enzyme de polymérisation et appareil utilisés pour les PCRs

Pour toutes les réactions de PCR décrites ci-haut, nous avons utilisé l'enzyme *Pfu DNA Polymerase* (Stratagene, La Jolla, CA). Nous avons utilisé l'appareil *TGradient Thermocycler* (Biometra, Goettingen, All.) pour effectuer toutes les réactions d'amplification décrites plus haut.

Vérification des vecteurs

Le fragment de promoteur du vecteur pBP3/-4.4kb AC, duquel les autres vecteurs découlent, a été séquencé automatiquement sur toute sa longueur. Les fragments de promoteur des vecteurs pBP3/-440 AC, CC, CT et AT ont aussi été séquencés automatiquement. Les autres vecteurs ont été analysés par restriction au niveau des polymorphismes -202 A/C et -185 C/T.

Culture cellulaire

La lignée cellulaire SK-HEP-1 a été choisie pour nos études de transfection. Des données antérieures suggèrent que cette lignée est capable de synthétiser la protéine IGFBP-3 et qu'elle possède tous les facteurs nécessaires à la transcription du gène [237].

La lignée cellulaire humaine SK-HEP-1 (numéro de catalogue : HTB-52), qui provient d'un hépatocarcinome, a été obtenue de la compagnie American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Les cellules SK-HEP-1 ont été cultivées dans du milieu MEM (Minimum Essential Medium) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) contenant 10% de sérum foetal de veau (Wisent Inc., St-Jean-Baptiste de Rouville, Québec). Les cellules ont été maintenues à 37°C dans

une atmosphère humidifiée et contenant 5% de CO₂. Aucun antibiotique n'était utilisé. Les cellules qui ont été utilisées avaient subi entre 5 et 20 passages.

Transfection de vecteurs et essai luciférase

Pour contrôler l'efficacité de transfection, le vecteur pSV β -galactosidase (Stratagene, La Colla, CA), qui contient le gène codant pour l'enzyme β -galactosidase sous contrôle du promoteur SV40, était co-transfecté avec le vecteur rapporteur.

Des plaques de 12 puits (Corning Incorporated, Corning, NY) étaientensemencées la veille de la transfection. Chaque puits contenait 3×10^5 cellules SK-HEP-1. La journée de la transfection, les cellules étaient confluentes à environ 50-80%. Les transfections étaient effectuées avec le réactif lipidique Fugene 6 (Roche Diagnostics, Laval, Québec) dans un ratio Fugene 6 : ADN de $3 \mu\text{l} : 2 \mu\text{g}$ ($1,5 \mu\text{g}$ vecteur + $0,5 \mu\text{g}$ plasmide contrôle pSV β -galactosidase). La transfection était effectuée selon le protocole fourni par le fabricant (Roche Diagnostics, Laval, Québec). La durée de la transfection était de 6 heures et se faisait dans un milieu sans sérum (MEM). Après ce temps, le milieu était changé pour un milieu sans sérum avec ou sans insuline concentrée à $1,7 \times 10^{-7} \text{M}$. La durée des traitements variait de 4 à 48 heures selon l'expérience. Du BSA 0,1% (Sigma-Aldrich Corporation, St-Louis, MO) était ajouté aux puits afin de saturer le plastique et ainsi empêcher l'insuline de s'y coller. L'insuline utilisée était de l'Humulin R (Eli Lilly Canada Inc., Toronto, Ontario) provenant d'ADN recombinant humain et déjà diluée dans un tampon biologique. Pour obtenir les concentrations plus faibles, les peptides étaient dilués dans le milieu de culture au moment de l'expérience.

À la fin de la durée du traitement, les cellules étaient lavées 3 fois avec $500 \mu\text{l}$ de PBS (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Ensuite, $150 \mu\text{l}$ de tampon de lyse (Triton X-100 1% (Sigma-Aldrich Corporation, St-Louis, MO) et KPO₄ 0,1M pH 7,8) étaient ajoutés et les plaques étaient placées 15 minutes à 4°C. Les plaques étaient agitées 2 fois durant cette incubation. Les lysats étaient ensuite récoltés dans

des tubes 1,5ml. Si un essai luciférase n'était pas fait aussitôt après la récolte, les tubes étaient congelés à -20°C.

Pour l'essai luciférase, les tubes étaient tout d'abord vortexés légèrement durant 10 secondes puis centrifugés durant 1 minute à 13 200rpm dans une centrifugeuse de table afin de culotter les débris cellulaires. 30µl du surnageant étaient mis dans une plaque 96 puits spécialement conçue pour la prise de luminescence avec l'appareil Victor 1420 (Wallac, Turku, Finlande). L'appareil injectait dans chaque puits 20µl d'un mélange pour essai luciférase composé d'un tampon luciférase (tricine à 20mM, $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 1mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 2,7mM et EDTA à 0,1mM), de luciférine à 0,48mM, d'ATP à 0,5mM, de Coenzyme A à 0,28mM et de DTT à 34,6mM. Pour la mesure de l'activité β -galactosidase, 20µl du surnageant étaient mis dans une plaque 96 puits avec 20µl de tampon β -galactosidase (ONPG à 0,43mM, tampon sodium phosphate, KCl 10mM, MgCl_2 1mM et β -mercapto-ethanol 50mM) et incubés à 37°C durant 15 minutes. L'absorbance à 405nm était ensuite prise. Finalement, le rapport de la luminescence sur l'absorbance était calculé.

Détermination *in silico* des éléments de réponse du promoteur d'*IGFBP3*

Le logiciel TESS (Transcription Element Search System) a été utilisé pour déterminer des éléments de réponse putatifs du promoteur d'*IGFBP3* et se trouve sur le site www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess.

Expérience de retard sur gel

Dans le but de déterminer *in vitro* les facteurs de transcription qui pourraient potentiellement se lier à la région polymorphique du promoteur d'*IGFBP3*, nous avons effectué des essais de retard sur gel.

Préparation d'extraits nucléaires

Les cellules SK-HEP-1 étaient cultivées dans des flacons T75 (BD Biosciences, Two Oak Park, Bedford, MA) jusqu'à ce qu'elles atteignent une confluence d'environ 60-80%. Les cellules étaient alors incubées durant 6 heures dans un milieu sans sérum. Après ce temps, le milieu était changé pour un milieu sans sérum contenant du BSA à 0,1% avec $1,7 \times 10^{-7}$ M d'insuline. Le traitement était d'une durée de 24 heures. Une fois le traitement terminé, les cellules étaient lavées deux fois avec du phosphate-buffered saline (PBS) froid, puis récoltées dans 1 ml de PBS. La lyse s'effectuait en ajoutant 200 μ L de tampon de lyse A (HEPES pH 7,9 à 10mM, $MgCl_2$ à 1,5mM, KCl à 10mM, DTT à 0,5mM et PMSF à 0,5mM) et en faisant trois cycles de congélation/décongélation. Les noyaux étaient par la suite récoltés par centrifugation et re-suspendus dans deux tiers de volume de tampon d'extraction nucléaire B (HEPES pH 7,9 à 20mM, glycérol à 25%, $MgCl_2$ à 1,5mM, KCl à 420mM, EDTA à 0,2mM, DTT à 0,5mM et PMSF à 0,5mM). Après incubation et centrifugation, le surnageant contenant les extraits nucléaires était dosé par Bradford, aliquoté et congelé à $-70^\circ C$. Les aliquots étaient dégelés une seule fois et utilisés dans les 3 mois suivant la préparation.

Préparation de compétiteurs méthylés

Pour la méthylation des sondes, nous avons utilisé le protocole publié par Ghosal et al. [280] avec quelques modifications.

Les oligonucléotides simple brin BP3-AC sens (5'-TCGACGTGAGCACGAGGAGCAGGTGCCCGG-3') et BP3-AC antisens (5'-GATCCCGGGCACCTGCTCCTCGTGCTCACG-3') ont tout d'abord été hybridés à $95^\circ C$ durant 5 minutes dans un tampon d'hybridation (Tris-HCl pH 8 à 250mM et $MgCl_2$ à 100mM) et les bouts ont été ensuite remplis avec la Klenow (DNA polymérase I large fragment) durant 10 minutes à $37^\circ C$ suivi de 10 minutes d'inactivation à $70^\circ C$. La méthylation de la sonde a été faite avec l'enzyme M.SssI (New England BioLabs Ltd., Pickering, Ontario), une CpG Methylase, durant 5 heures à $37^\circ C$ suivi de 20 minutes d'inactivation à $65^\circ C$. Le tampon utilisé était le NEBuffer2 (NaCl à 50mM, Tris-HCl à 10mM pH 7,9, $MgCl_2$ à 10mM et

dithiothreitol à 1mM) dans lequel était ajouté du S-adenosylmethionine à 160 μ M comme source de groupement méthyl. L'efficacité de la méthylation a été vérifiée avec les enzymes de restriction MspI et HpaII. Ces deux enzymes reconnaissent le site 5'-CCGG-3' et clivent après la première cytosine. Cependant, HpaII est sensible à la méthylation CpG et ne peut pas cliver un site méthylé. Comme ce site de restriction est retrouvé à l'extrémité 3' de la sonde, il a été possible d'évaluer la méthylation de la sonde en faisant migrer sur gel polyacrylamide les produits de digestion.

Marquage des sondes

Le marquage des sondes se faisait par remplissage des bouts des sondes avec la Klenow (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) durant 15 minutes à 30°C suivi de 10 minutes d'inactivation à 70°C. 50 μ Ci de α^{32} dATP et une concentration finale de dCTP, dGTP et dTTP de 0,2mM étaient utilisés. La purification des sondes marquées se faisait avec l'ensemble ProbeQuant G-50 Micro Column (Amersham Biosciences Corp., Baie d'Urfé, Québec).

Expérience de retard sur gel

Nous avons étudié la liaison *in vitro* du facteur de transcription USF (*Upstream Stimulatory Factor*) à un élément de réponse potentiel situé entre les polymorphismes -202 A/C et -185 C/T.

Pour les essais de compétition, un oligonucléotide double brin contenant l'élément de réponse à USF du promoteur du gène *Fatty Acid Synthase* (5'-AGCTGTCAGCCCATGTGGCGTGGCCGCCAGCTG-3') était ajouté au mélange de liaison composé du tampon de liaison [281] (Tris-HCl pH 7,9 à 20mM, MgCl₂ à 2mM, EDTA à 1mM, KCl à 50mM, DTT à 0,5mM, glycérol à 10% et IGEPAL à 0,1%), de 1 μ g de poly dIdC et de 5 μ g d'extrait nucléaire de cellules SK-HEP-1. Le mélange était alors incubé sur glace 30 minutes. La sonde contenant la séquence -206 à -181 du promoteur d'*IGFBP3* (1 X10⁵cpm) était ensuite ajoutée et l'incubation se poursuivait pour encore 20 minutes. Pour terminer, le mélange était

laissé à température de la pièce pendant 15 minutes. Le tout était résolu sur un gel 5% polyacrylamide (29 : 1, acrylamide : bis acrylamide).

Pour les retards sur gel avec les anticorps spécifiques aux sous-unités USF-1 et USF-2, soient les anticorps anti-USF-1 et anti-USF-2 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), 2 μ g d'anticorps étaient ajoutés au mélange de liaison décrit plus haut et pré incubés 30 minutes à température ambiante. La suite est identique à la méthode utilisée pour la compétition.

Expérience de traitement au bisulfite

Traitement au bisulfite d'ADN génomique de leucocytes

Afin d'examiner l'impact de l'haplotype sur le statut de méthylation du promoteur d'*IGFBP3*, nous avons utilisé une stratégie de traitement au bisulfite. Le bisulfite transforme un résidu cytosine en résidu uracile, mais la méthylation d'un résidu cytosine empêche cette réaction. Nous avons utilisé la méthodologie de Clark et al. [282] avec quelques modifications.

Avant d'effectuer le traitement au bisulfite, 1 μ g d'ADN génomique de leucocytes a été digéré avec EcoRI durant environ 16 heures à 37°C. Les réactions se sont déroulées dans un volume de 300 μ l. Une fois la digestion complétée, l'ADN a été extrait par phénol : chloroforme : isoamylOH (25 : 24 : 1) ainsi que précipité dans de l'acétate d'ammonium concentré à 0,5M et de l'éthanol 70% à 75%. L'ADN a été mis en suspension dans 100 μ l d'eau. L'ADN a été dénaturé par l'ajout de 0,3M de NaOH frais en incubant 30 minutes à 42°C. Des solutions de 10mM d'hydroquinone (Sigma-Aldrich Corporation, St-Louis, MO) et 2,5M de bisulfite de sodium à pH 5 (Sigma-Aldrich Corporation, St-Louis, MO) fraîchement préparées ont été utilisées dans un volume final de 1,2ml en présence de 110 μ l d'ADN dénaturé, de 2,5M de bisulfite de sodium et de 0,5mM d'hydroquinone. Suite à l'ajout d'une goutte d'huile minérale, les tubes ont été incubés à 50°C durant 16 heures. Par la suite, l'ADN a été purifié suivant le protocole de la trousse commerciale QIAEX II (Qiagen Inc., Mississauga, Ontario). Le volume final a été

ajusté à 100µl avec de l'eau. Pour compléter la réaction (désulphonation de l'uracil), 0,3M de NaOH ont été ajoutés suivi d'une incubation de 30 minutes à 37°C. La réaction a été neutralisée par l'ajout d'acétate d'ammonium à 3M pH 7 et l'ADN a été précipité avec de l'éthanol 100%, centrifugé à vitesse maximale pour 15 minutes, lavé avec éthanol 70%, séché et mis en suspension dans 100µl d'eau.

Amplification par PCR du promoteur d'IGFBP3 après traitement au bisulfite

La première ronde d'amplification par PCR du promoteur d'IGFBP3 a été effectuée à partir de 5µl d'ADN modifié dans un volume de 25µl et en utilisant les amorces BP3MF2 (5'-GGGTGTTGAGGTGGTTTGGAGTGT-3') et BP3MR2 (5'-AACTATAAAATCCAAACAAAAAAC-3'). Les conditions de PCR utilisées étaient les suivantes : 35 cycles d'une minutes à 95°C, d'une minute à 52°C et d'une minute à 72°C et pour terminer, 5 minutes d'élongation à 72°C. La deuxième ronde d'amplification par PCR a été effectuée avec 5µl du produit PCR de la première ronde. Les amorces BP3MF1 (5'-GGGTATATTTTGGTTTTTGTAGA-3') et BP3MR1 (5'-AAAAACCRAAATAACCCAAAACAC-3') ont été utilisées et les conditions du PCR étaient les suivantes : 35 cycles d'une minute à 95°C, d'une minute à 55°C et d'une minute à 72°C et pour terminer, 5 minutes d'élongation à 72°C [274]. Les fragments obtenus ont été purifiés par migration sur gel d'agarose 2% et par le « kit » QIAEX II (Qiagen Inc., Mississauga, Ontario).

Séquençage du produit de PCR de l'ADN génomique traité au bisulfite

Une fois purifiés, les fragments ont été préparés pour le séquençage suivant les étapes décrites au protocole «Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit» (USB Corporation, Cleveland, Ohio). Ce kit utilise des ddNTPs de terminaison marqués au ³³Phosphore en position α et la « Thermo Sequenase DNA Polymerase » comme enzyme de polymérisation. Seuls les produits d'extension correctement terminés sont marqués, diminuant ainsi le bruit de fond. 2pmol d'amorce BP3MF1 et 0,25pmol du produit de PCR ont été utilisées. La migration de la séquence a été effectuée sur gel dénaturant avec 6% de polyacrylamide 19 : 1 contenant de l'urée à 8M.

Amorces

Toutes les amorces utilisées proviennent de la compagnie Alpha DNA (Montréal, Québec).

Statistiques

Pour les résultats de transfection, le rapport luciférase/ β -galactosidase était calculé pour chaque puits. La moyenne des triplicatas était alors calculée ainsi que l'écart-type. L'écart-type de la moyenne a été calculé quand les résultats découlaient de plusieurs expériences. Pour comparer les moyennes obtenues pour différentes semaines, un test de t non pairé avec un intervalle de confiance de 95% était effectué. Le logiciel Prism 3.0 a été utilisé à cette fin.

3. Résultats

Optimisation des conditions expérimentales pour l'étude de l'activité du promoteur d'*IGFBP3*

Avant de débiter l'étude de l'activité du promoteur d'*IGFBP3*, une série d'expériences ont été effectuées afin de déterminer les paramètres optimaux pour les transfections transitoires et les traitements avec l'insuline. Le vecteur pBP3/-440 AC a été utilisé en co-transfection avec le vecteur rapporteur d'activité β -galactosidase pSV β dans un ratio 3 : 1. Ce ratio avait déjà été optimisé dans notre laboratoire et il a été utilisé pour toutes les transfections décrites dans ce mémoire. L'activité β -galactosidase a été mesurée afin de contrôler l'efficacité de la transfection et de normaliser l'activité luciférase.

Quantité de vecteur

La quantité de vecteur à utiliser lors de la transfection a tout d'abord été étudiée. La figure 6 nous montre les rapports luciférase/ β -galactosidase pour différentes quantités de vecteur utilisées, avec ou sans stimulation à l'insuline. Le protocole de la compagnie Roche pour le produit de transfection Fugene 6 suggère d'effectuer les transfections avec un ratio 3 μ L Fugene 6 pour 2 μ g de plasmide. Les transfections ont donc été faites avec 3 μ L de Fugene 6 et les quantités de vecteur ont été changées. La figure 6 démontre que le niveau d'expression avec ou sans stimulation à l'insuline est à son maximum lorsque 2 μ g de plasmide sont utilisés, ce qui concorde avec ce qu'indiquait le protocole. Un ratio plus élevé de 6 μ L de Fugene 6 pour 2 μ g de vecteur a ensuite été essayé afin de s'assurer d'avoir le meilleur ratio Fugene 6 : vecteur, mais aucune différence n'a été observée (données non montrées). Donc, les essais luciférase ont été faits avec 3 μ L de Fugene 6 et un mélange de 2 μ g de plasmide contenant 1,5 μ g de vecteur rapporteur d'activité luciférase et 0,5 μ g de vecteur rapporteur d'activité β -galactosidase.

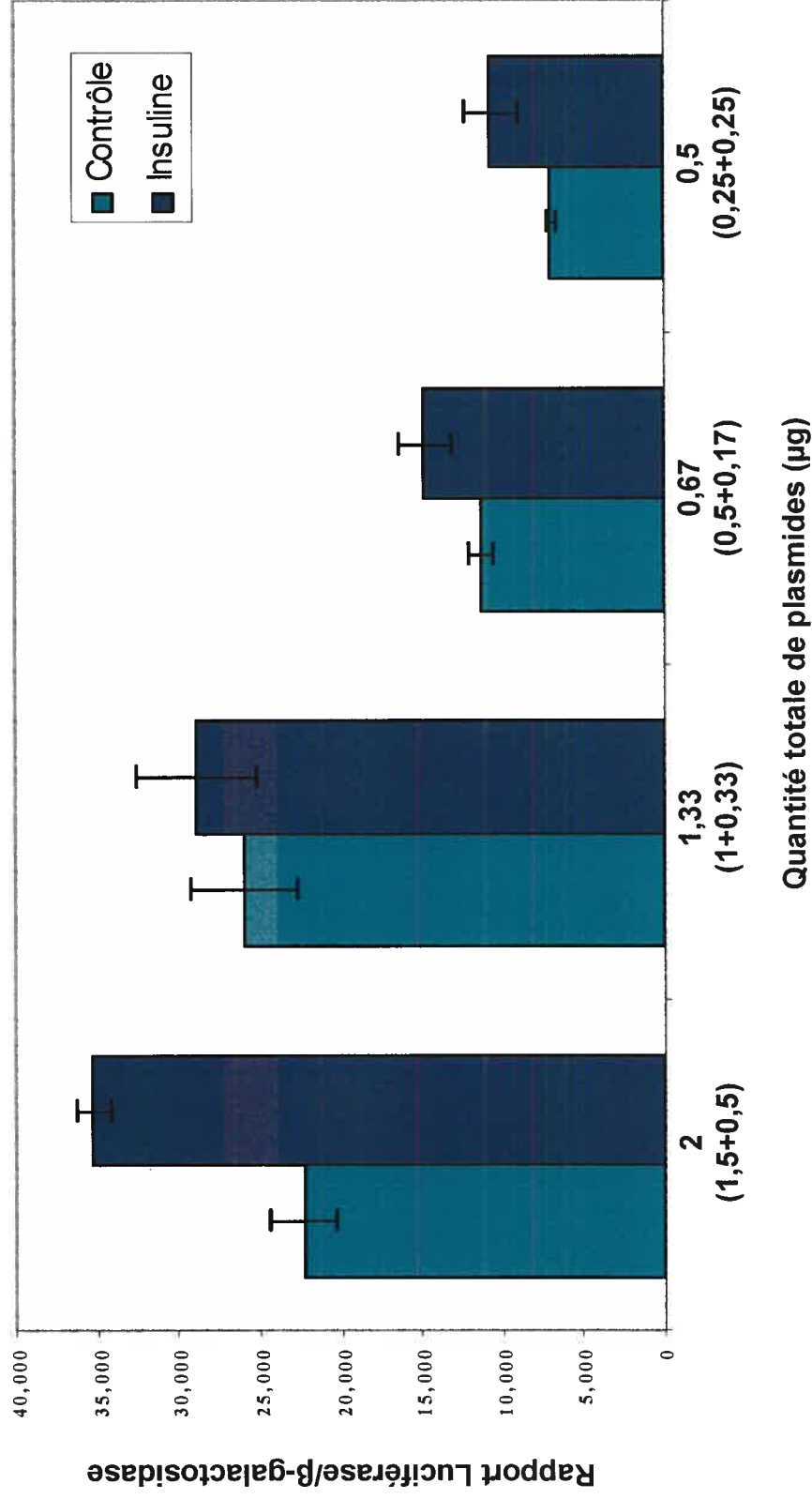


Figure 6. **Détermination de la quantité optimale de plasmides à utiliser pour les transfections.** Les cellules SK-HEP-1 ont été transfectées avec différentes quantités des vecteurs pBP3/-440 AC et pSV β -galactosidase. Les cellules ont ensuite été traitées avec insuline ($1,7 \times 10^{-7}M$) ou véhicule seulement (contrôle) durant 24h. Le graphique montre les valeurs moyennes ainsi que l'écart-type pour une expérience représentative effectuée en triplicate. Les valeurs de luciférase ont été normalisées par l'activité β -galactosidase.

Nombre de cellules

La quantité de cellules SK-HEP-1 donnant une meilleure efficacité de transfection dans les plaques de 12 puits a ensuite été déterminée. La figure 7 nous montre l'activité luciférase corrigée avec ou sans stimulation à l'insuline pour différentes quantités de cellules SK-HEP-1. De 100 000 à 300 000 cellules ont été mises dans chaque puits la veille de la transfection. On peut observer que l'activité luciférase corrigée augmente avec la quantité de cellules mises dans les puits et que la stimulation à l'insuline est la plus forte avec 300 000 cellules. De plus, à cette quantité, les cellules sont confluentes à environ 60% le jour de la transfection, ce qui est en accord avec le protocole de Roche qui suggère une confluence entre 50 et 80%. Des essais avec de plus grandes quantités de cellules ont été effectués, mais le jour de la transfection, les cellules étaient confluentes à près de 100% et commençaient à se décoller. Les essais luciférase ont donc été effectués avec 3×10^5 cellules SK-HEP-1 ensemencées la veille de la transfection.

Concentration d'insuline

Dans un troisième temps, la concentration d'insuline à utiliser pour les traitements a été étudiée. Dans la littérature, différentes concentrations sont utilisées pour les traitements *in vitro*, allant de 10^{-6} M à 10^{-10} M. Par exemple, une étude sur le promoteur d'IGFBP-3 de rat [269] et une autre sur la régulation du cycle cellulaire [283] ont utilisé des concentrations d'insuline de 10^{-6} M. Une étude sur l'identification d'éléments de réponse à l'insuline dans le promoteur du gène « Glucose-6-phosphatase catalytic subunit » [284] a été faite avec 10^{-8} M d'insuline. Deux études sur la régulation de la transcription du gène « Fatty Acid Synthase » ont utilisé respectivement des concentrations d'insuline de 10^{-8} M et 10^{-9} M [285;286]. Puisqu'il existe une certaine variabilité dans les concentrations d'insuline utilisées pour les traitements *in vitro* et qu'il n'y a aucune étude spécifique aux cellules SK-HEP-1, nous avons voulu déterminer la concentration qui conviendrait le mieux à ces cellules.

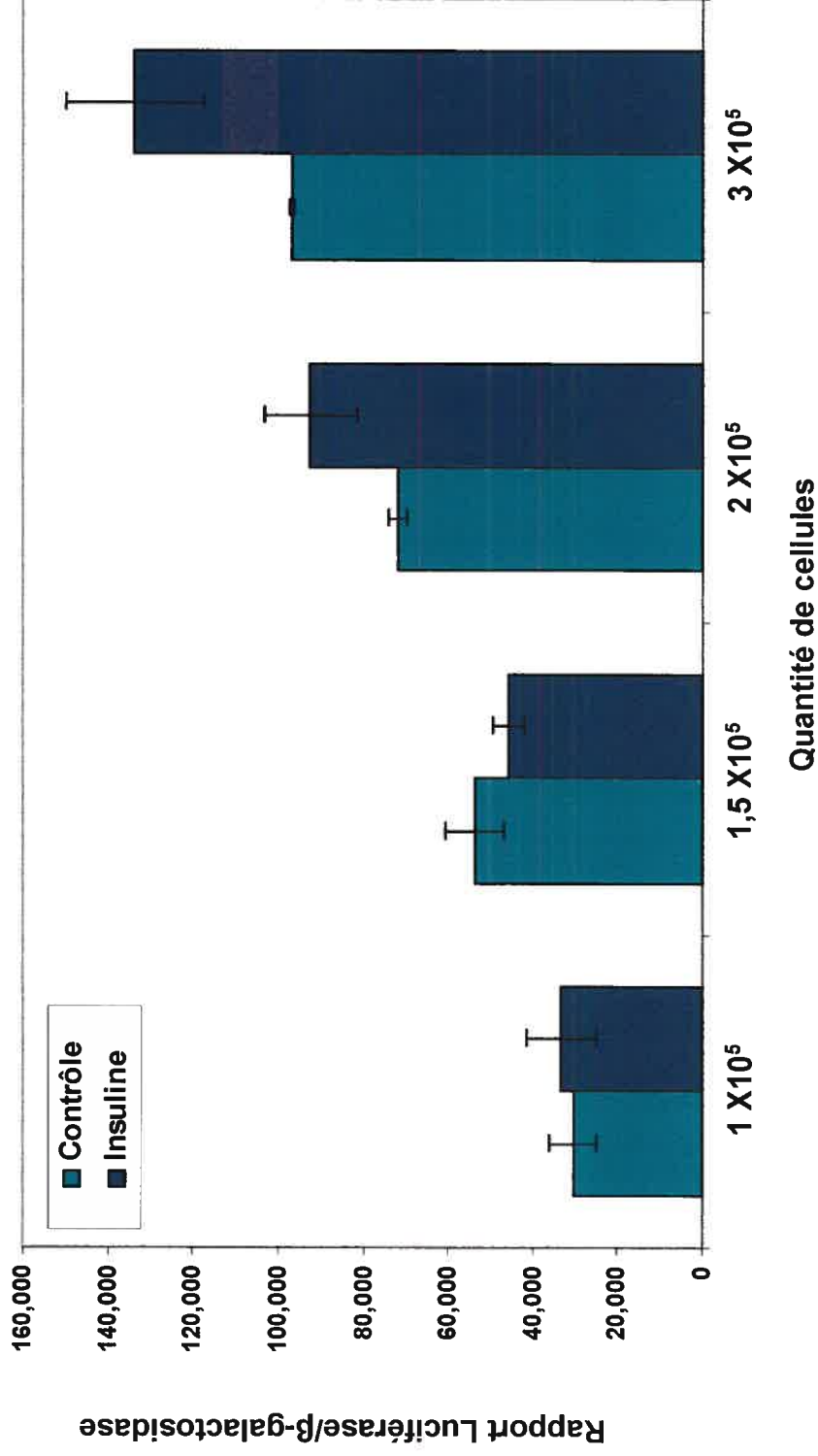


Figure 7. Détermination de la quantité optimale de cellules SK-HEP-1 à utiliser pour les transfections. Différentes quantités de cellules SK-HEP-1 ont été transfectées avec 1,5 μ g de vecteur pBP3/-440 AC et 0,5 μ g de vecteur pSV β -galactosidase. Les cellules ont ensuite été traitées avec insuline (1,7 X10⁻⁷M) ou véhicule seulement (contrôle) durant 24h. Le graphique montre les valeurs moyennes ainsi que l'écart-type pour une expérience représentative effectuée en triplicata. Les valeurs de luciférase ont été normalisées par l'activité β -galactosidase.

Les expériences de stimulation précédentes effectuées dans notre laboratoire ont été réalisées avec $1,7 \times 10^{-7} \text{M}$ d'insuline et nous voulions vérifier si cette concentration donnait des résultats optimaux. La figure 8 nous montre l'activité luciférase corrigée du gène rapporteur dans les cellules SK-HEP-1 transfectées avec le vecteur pBP3/-440 AC et traitées avec des concentrations d'insuline allant de 10^{-6}M à 10^{-9}M . Nous pouvons voir que l'activité luciférase est très semblable pour les quatre concentrations. Il n'y a pas de différence d'activité luciférase entre les cellules traitées avec $1,7 \times 10^{-7} \text{M}$ et les cellules traitées avec $1,7 \times 10^{-9} \text{M}$, concentration qui se rapproche des niveaux physiologiques. Comme $1,7 \times 10^{-7} \text{M}$ d'insuline se trouvait dans l'échelle des concentrations retrouvées dans la littérature et que cette concentration a déjà été utilisée dans notre laboratoire, nous avons décidé de garder cette concentration pour effectuer les traitements sur les cellules SK-HEP-1.

Durée du traitement

Ensuite, nous avons voulu déterminer la durée optimale du traitement des cellules SK-HEP-1 avec l'insuline. La figure 9 nous montre l'activité luciférase dans les cellules SK-HEP-1 transfectées avec le vecteur pBP3/-440 AC et traitées à l'insuline $1,7 \times 10^{-7} \text{M}$ avec différents temps de stimulation. On peut observer pour 4 heures et 12 heures de traitement qu'il n'y a pas de stimulation. On remarque une stimulation de l'activité luciférase corrigée à partir de 24 heures et elle semble maximale, car on peut noter une diminution de l'activité luciférase avec et sans traitement à l'insuline après 48 heures. Ce phénomène est causé par une activité luciférase et une activité β -galactosidase diminuées après 48 heures. Nous avons donc utilisé des stimulations avec insuline d'une durée de 24 heures puisque nous recherchions les niveaux de stimulation maximaux.

Utilisation du sérum foetal de veau

Nous avons aussi voulu déterminer l'effet de l'utilisation de sérum foetal de veau concentré à 0,1% sur les niveaux d'expression de la luciférase. En effet, certaines lignées cellulaires supportent mal l'absence de sérum foetal de veau dans le

milieu de culture pour une période prolongée, ce qui peut affecter les résultats. Veuillez noter que les cellules non traitées sont aussi en présence de sérum foetal de veau. La figure 10 montre les niveaux d'expression de la luciférase dans les cellules SK-HEP-1 transfectées avec le vecteur pBP3/-440 AC et traitées à l'insuline $1,7 \times 10^{-7} \text{M}$ durant 24 heures en présence de 0,1% SFV ou sans sérum. Nous pouvons remarquer qu'il n'y a aucune différence dans les niveaux d'expression de la luciférase entre les cellules qui ont été en présence ou en absence de sérum foetal de veau 0,1%, qu'elles aient été traitées avec de l'insuline ou non. Un examen sommaire des cellules par microscopie à la fin des traitements n'a décelé aucune différence apparente entre un milieu contenant ou non du sérum foetal de veau. Les cellules avaient la même morphologie et la quantité de débris cellulaires flottant dans le milieu était semblable (résultats non montrés). Nous avons donc continué à utiliser un milieu de culture ne contenant aucun sérum lors des traitements avec insuline puisque l'absence de sérum foetal de veau n'affecte pas les niveaux d'expression de la luciférase.

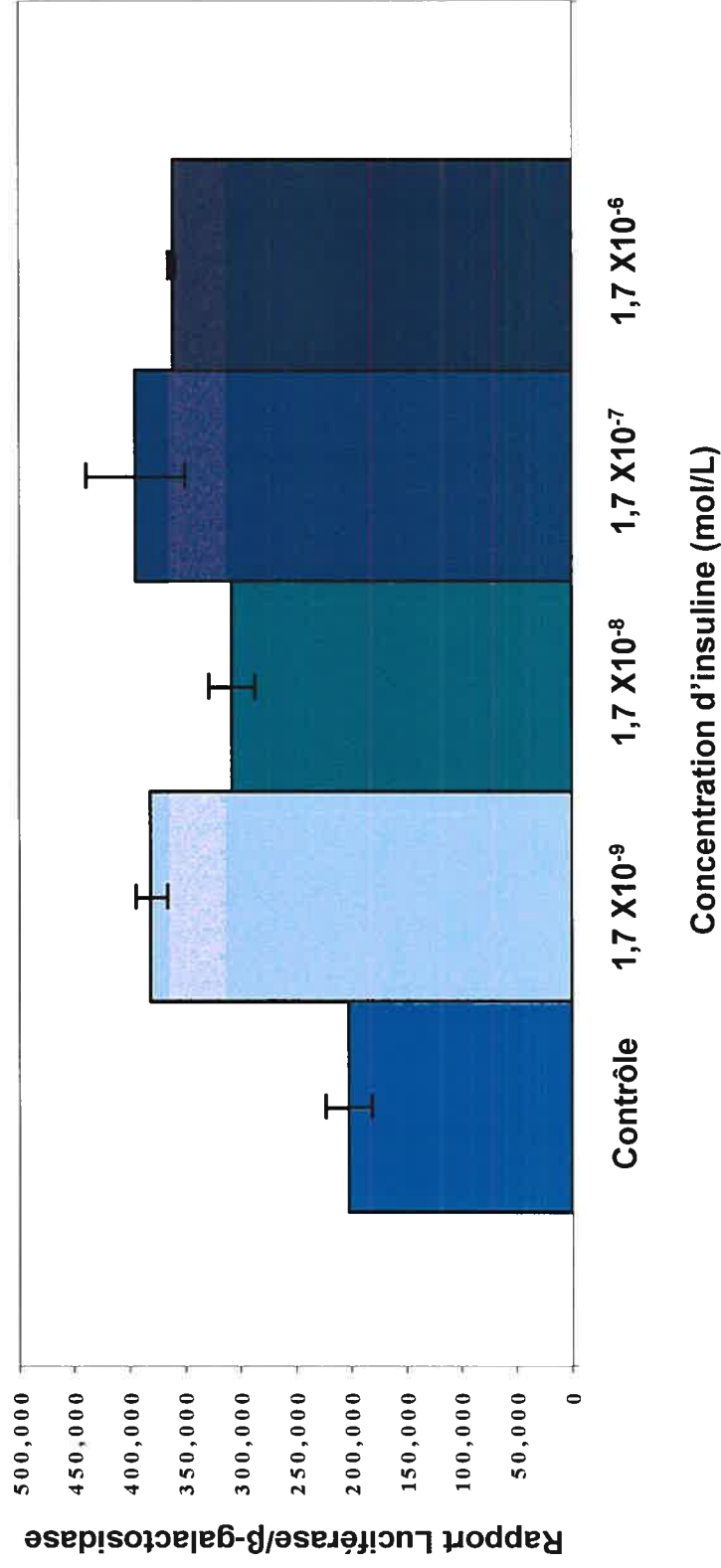


Figure 8. Détermination de la concentration d'insuline à utiliser pour les traitements. Les cellules SK-HEP-1 ont été transfectées avec 1,5µg de vecteur pBP3/-440 AC et 0,5µg de vecteur pSVβ-galactosidase. Les cellules ont ensuite été traitées avec différentes concentrations d'insuline ou avec véhicule seulement (contrôle) durant 24h. Le graphique montre les valeurs moyennes ainsi que l'écart-type pour une expérience représentative effectuée en triplicata. Les valeurs de luciférase ont été normalisées par l'activité β-galactosidase.

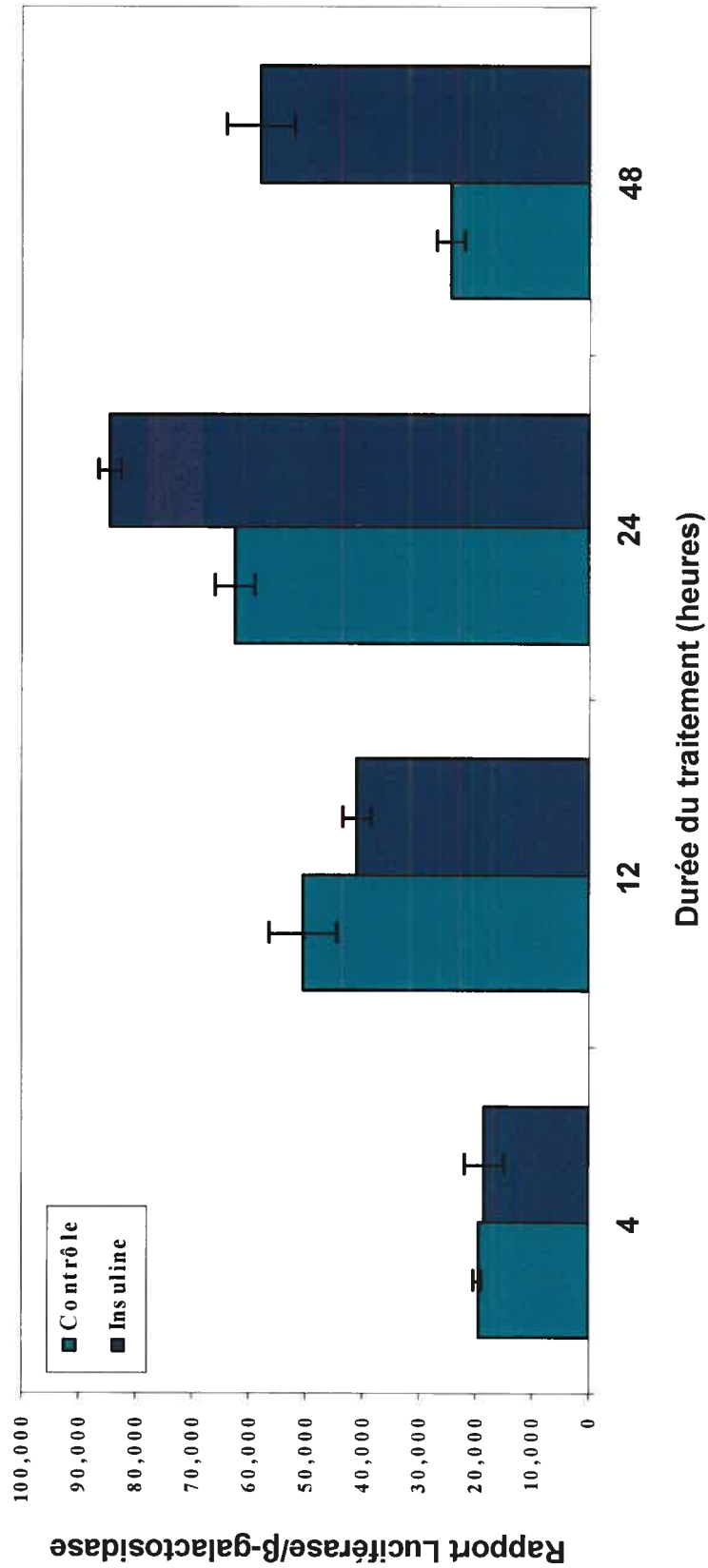


Figure 9. Détermination de la durée optimale de traitement avec l'insuline. Les cellules SK-HEP-1 ont été transfectées avec 1,5µg de vecteur pBP3/-440 AC et 0,5µg de vecteur pSVβ-galactosidase. Les cellules ont ensuite été traitées avec insuline (1,7 X10⁻⁷M) ou véhicule seulement (contrôle) durant 4 à 48h. Le graphique montre les valeurs moyennes ainsi que l'écart-type pour une expérience représentative effectuée en triplicate. Les valeurs de luciférase ont été normalisées par l'activité β-galactosidase.

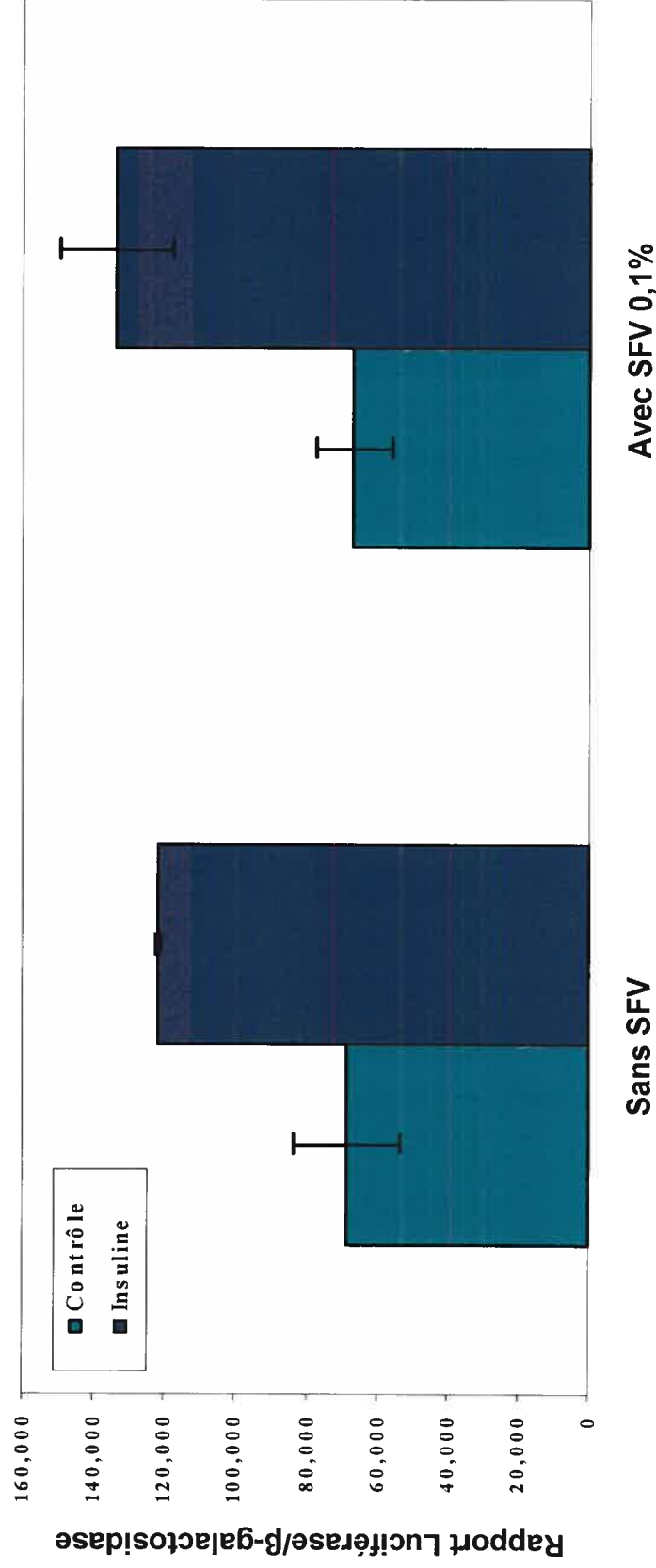


Figure 10. Effet de l'utilisation de sérum fœtal de veau lors du traitement avec l'insuline. Les cellules SK-HEP-1 ont été transfectées avec 1,5µg de vecteur pBP3/-440 AC et 0,5µg de vecteur pSVβ-galactosidase. Les cellules ont ensuite été traitées avec insuline (1,7 X10⁻⁷M) ou véhicule seulement (contrôle) durant 24h dans un milieu contenant ou non du sérum fœtal de veau concentré à 0,1%. Le graphique montre les valeurs moyennes ainsi que l'écart-type pour une expérience représentative effectuée en triplicata. Les valeurs de luciférase ont été normalisées par l'activité β-galactosidase.

Effet du rouge de phénol

Finale­ment, nous avons voulu déter­miner l'effet du rouge de phé­nol contenu dans le milieu de culture sur les niveaux d'ex­pres­sion de la luciférase. Le noyau aromatique du phé­nol peut mimer l'action des estrogènes et il a été dé­mon­tré que les estrogènes peuvent inhiber l'ex­pres­sion du gène *IGFBP3* dans différents systèmes [242;244;287-289]. La figure 11 montre les ratios d'induction de la luciférase (ins./cont..) dans les cellules SK-HEP-1 transfectées avec le vecteur pBP3/-440 AC et traitées à l'insuline $1,7 \times 10^{-7}M$, avec ou sans rouge de phé­nol. Lorsque nous comparons ces ratios, nous remarquons qu'il n'y a pas de différence entre les cellules traitées avec ou sans rouge de phé­nol. À la lumière de ces résultats, il n'a donc pas été nécessaire d'effectuer les expériences d'activité du promoteur d'*IGFBP3* dans un milieu de culture sans rouge de phé­nol.

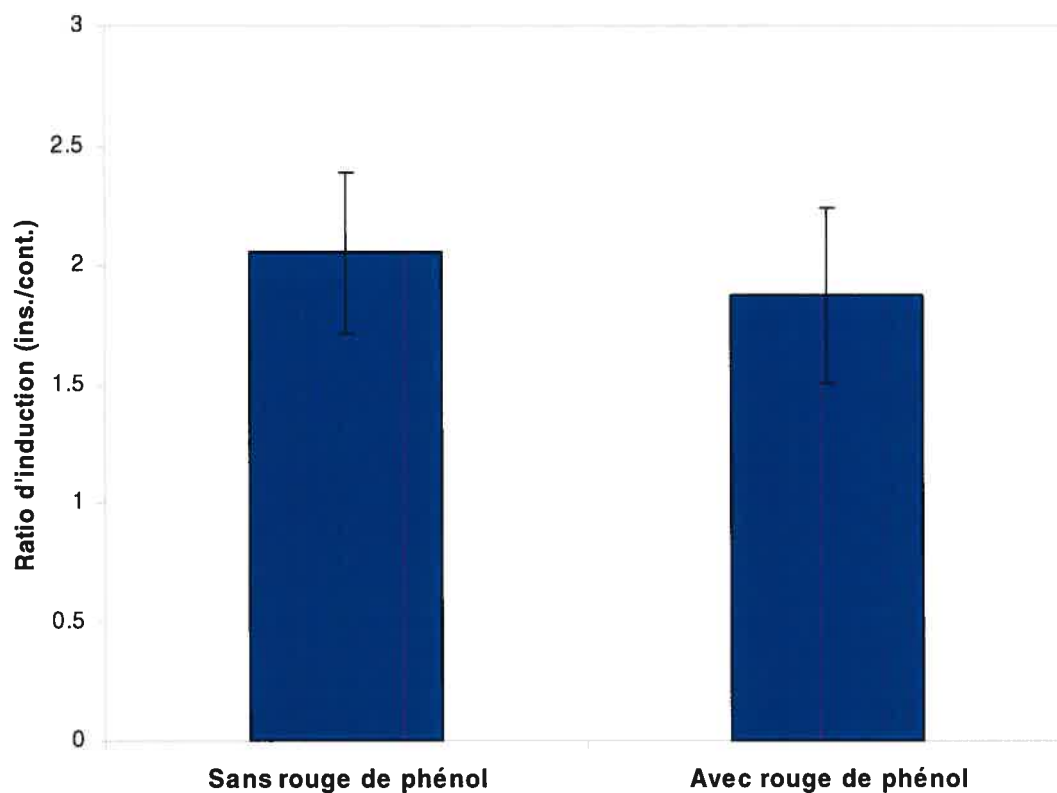


Figure 11. **Effet du rouge de phénol.** Les cellules SK-HEP-1 ont été transfectées avec 1,5 μ g de vecteur pBP3/-440 AC et 0,5 μ g de vecteur pSV β -galactosidase. Les cellules ont ensuite été traitées avec insuline ($1,7 \times 10^{-7}$ M) ou véhicule seulement (contrôle) durant 24h dans un milieu sans ou avec rouge de phénol. Les cellules ont été traitées durant 24 heures avant d'être lysées. Le graphique montre les valeurs moyennes ainsi que l'écart-type pour une expérience représentative effectuée en triplicata. Les valeurs de luciférase ont été normalisées par l'activité β -galactosidase.

Le promoteur minimal d'*IGFBP3*

Cubbage et al. ont été les premiers à caractériser le gène codant pour IGFBP-3 et son promoteur en 1990 [253]. Ils avaient établi le promoteur minimal comme étant une séquence couvrant la région -431 à 72pb par rapport au site putatif d'initiation de la transcription.

Nous avons donc décidé d'utiliser la même région pour nos expérimentations, mais dans un premier temps, nous voulions étudier l'impact de la longueur du promoteur sur son activité transcriptionnelle. Pour ce faire, les cellules SK-HEP-1 ont été transfectées avec des vecteurs rapporteurs d'activité luciférase sous contrôle de différentes longueurs de la région en amont du gène codant pour l'IGFBP-3. Les cellules ont été traitées ou non à l'insuline $1,7 \times 10^{-7} \text{M}$ durant 24 heures. Les figures 12 a) et b) nous montrent deux résultats représentatifs démontrant une certaine variabilité inter-expérience. Les niveaux d'expression de la luciférase obtenus pour des fragments de promoteur d'*IGFBP3* de 2kb, 1,1kb, 440pb et 250pb en amont du site d'initiation de la transcription y sont montrés. Nous pouvons remarquer que les niveaux de luciférase maximaux avec et sans traitement à l'insuline sont obtenus avec le fragment de promoteur de 440pb. Les niveaux de transcription pour les fragments de promoteur de 2kb et 1,1kb sont très inférieurs à ceux obtenus pour le fragment de 440pb, soit moins de 50% de l'activité maximale. Cette différence est cependant moins grande pour le fragment de 250pb. Nous observons que les niveaux basaux de celui-ci sont inférieurs à ceux du fragment de 440pb, mais que les niveaux suite à un traitement avec insuline se rapprochent beaucoup.

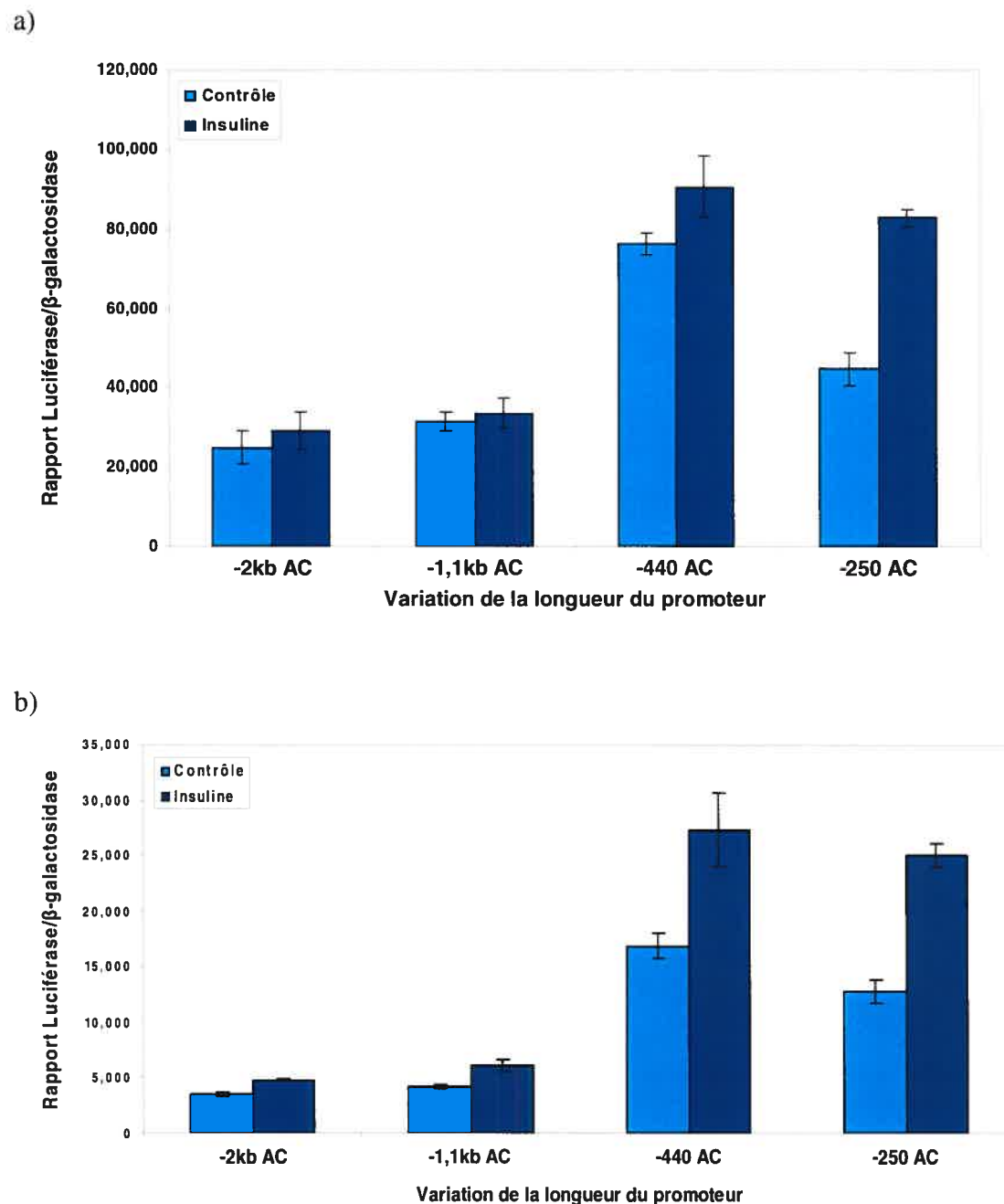
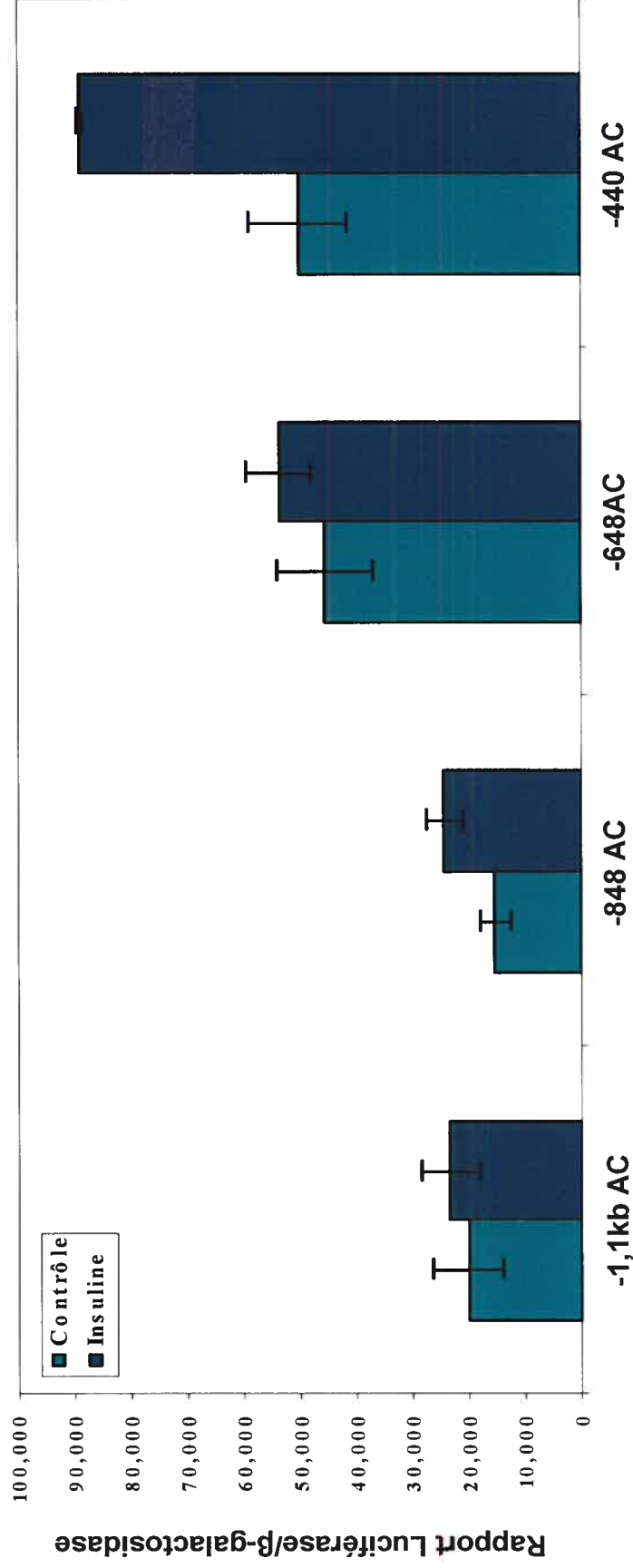


Figure 12. **Étude de l'influence de la longueur du promoteur d'*IGFBP3***. Les cellules SK-HEP-1 ont été transfectées avec 1,5 μ g de vecteur pBP3/-2kb AC, -1,1kb AC, -440 AC ou -250 AC et 0,5 μ g de vecteur pSV β -galactosidase. Les cellules ont ensuite été traitées avec insuline ($1,7 \times 10^{-7}$ M) ou véhicule seulement (contrôle) durant 24h. Les figures 6 a) et b) montrent les valeurs moyennes ainsi que l'écart-type pour 2 expériences effectuées en triplicata. Les valeurs de luciférase ont été normalisées par l'activité β -galactosidase.

La diminution de l'activité luciférase pour les fragments de promoteur plus grands que 440pb pourrait être expliquée par la présence d'éléments répresseurs dans la région -1,1kb à -440pb en amont du site d'initiation de la transcription. Nous avons donc créé des vecteurs d'expression avec des fragments de promoteur d'*IGFBP3* de 648pb et 848pb afin de mieux cibler cette région. La figure 13 nous montre les niveaux d'expression de la luciférase dans les cellules transfectées avec ces nouveaux vecteurs avec et sans traitement à l'insuline. Nous pouvons remarquer qu'il n'y a pas de différence entre les fragments de 440pb et de 648pb pour les niveaux d'expression sans traitement à l'insuline. Cependant, le fragment de promoteur de 848pb produit un niveau d'expression beaucoup plus bas que ces derniers, ce qui démontre que la région comprise entre les nucléotides -848 et -648 est impliquée dans la régulation de la transcription. Cette séquence de 200 nucléotides pourrait donc contenir des éléments de répression de la transcription.

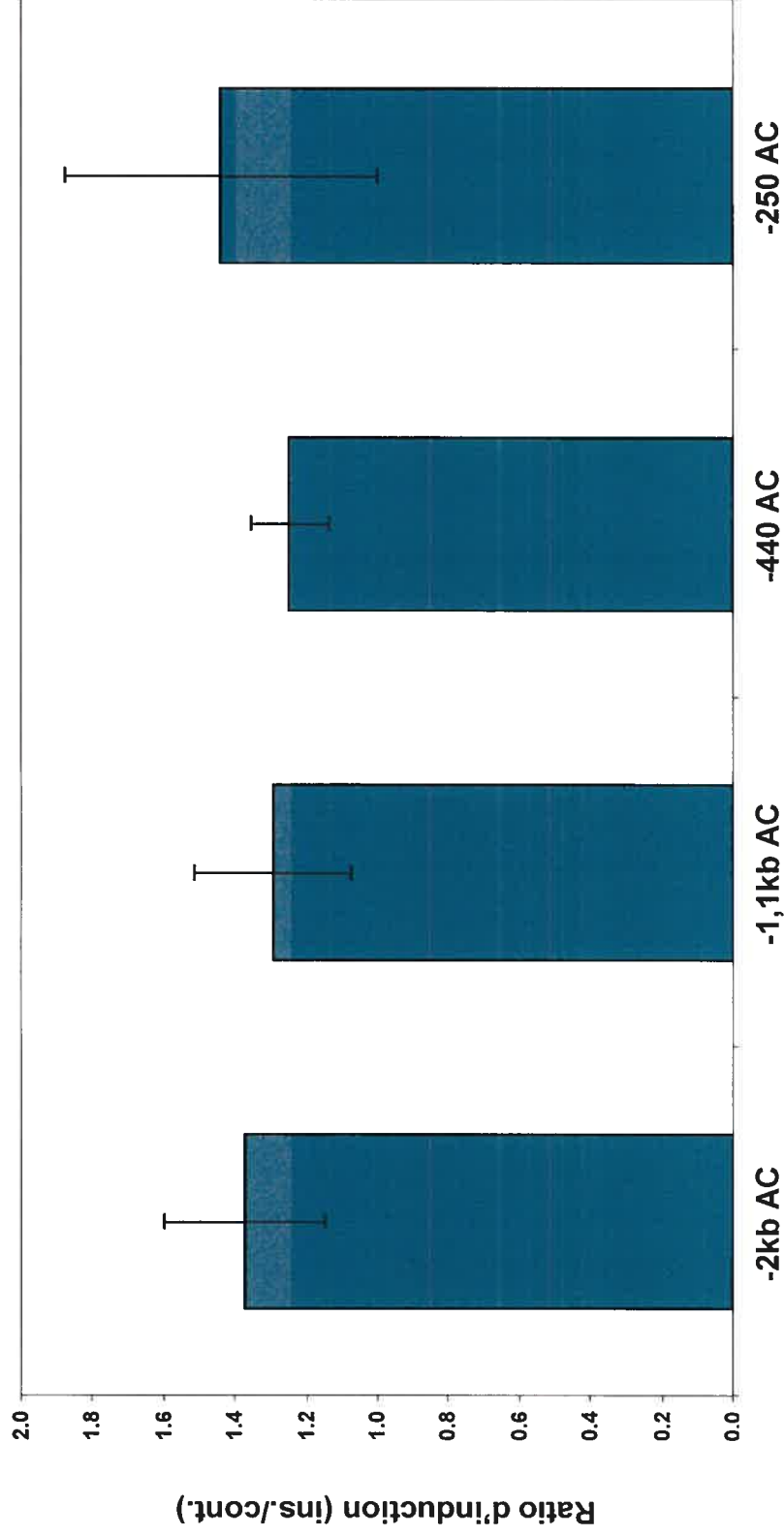
Nous avons par la suite voulu vérifier l'impact de la longueur des fragments de promoteur sur l'activation de la transcription par l'insuline. La figure 14 nous montre les ratios d'induction (insuline/contrôle) de différents fragments de promoteur d'*IGFBP3* pour quatre expériences effectuées en triplicata. Nous observons que les ratios d'induction sont similaires pour tous les fragments. Ces résultats nous indiquent que les régions importantes pour la réponse à une stimulation à l'insuline se trouvent en aval du nucléotide -250.

En conclusion à l'étude de la région 5' du gène codant pour *IGFBP-3*, nous pouvons dire que le promoteur minimal est constitué du fragment de 440pb en amont du site d'initiation de la transcription comme l'avait décrit Cubbage en 1990. Nous avons observé aussi que la région comprise entre les nucléotides -848 et -648 régule le promoteur d'*IGFBP3* en réprimant son activité transcriptionnelle. Nous avons finalement observé que les éléments de réponse à l'insuline se retrouvent en aval du nucléotide -250.



Variation de la longueur du promoteur

Figure 13. Étude de la région -1,1kb à -440pb du promoteur d'*IGFBP3*. Des cellules SK-HEP-1 ont été transfectées avec 1,5µg de vecteur pBP3/-1,1kb AC, -848 AC, -648 AC ou -440 AC et 0,5µg de vecteur pSVβ-galactosidase. Les cellules ont ensuite été traitées avec insuline (1,7 X10⁻⁷M) ou véhicule seulement (contrôle) durant 24h. Le graphique montre les valeurs moyennes ainsi que l'écart-type pour une expérience représentative effectuée en triplicate. Les valeurs de luciférase ont été normalisées par l'activité β-galactosidase.



Variation de la longueur du promoteur

Figure 14. Ratios d'induction à l'insuline obtenus en fonction de la longueur du promoteur d'*IGFBP3*. Les cellules SK-HEP-1 ont été transfectées avec 1,5µg de vecteur pBP3/-2kb AC, -1,1kb AC, -440 AC ou -250 AC et 0,5µg de vecteur pSVβ-galactosidase. Les cellules ont ensuite été traitées avec insuline (1,7 X10⁻⁷M) ou véhicule seulement (contrôle) durant 24h. Le graphique montre les valeurs moyennes des ratios d'induction pour 4 expériences, chacune effectuée en triplicate, ainsi que l'écart-type de la moyenne. Le ratio est calculé en faisant le rapport cellules traitées/contrôles. Les valeurs de luciférase ont été normalisées par l'activité β-galactosidase.

Les polymorphismes -202 A/C et -185 C/T affectent *in vitro* l'activité de transcription du promoteur d'*IGFBP3*

Afin de vérifier *in vitro* l'impact des polymorphismes -202 A/C et -185 C/T, les cellules SK-HEP-1 ont été transfectées avec quatre vecteurs d'expression de la luciférase, soient les vecteurs pBP3/-440 AC, CC, CT et AT. Veuillez noter que, dans la nomenclature des vecteurs rapporteurs, la première lettre fait référence au polymorphisme -202 et que la seconde fait référence au polymorphisme -185. Suite à la transfection, les cellules SK-HEP-1 ont été traitées durant 24 heures avec ou sans insuline $1,7 \times 10^{-7}M$. Les figures 15 a) et b) montrent les niveaux d'expression de la luciférase relatifs aux cellules transfectées avec le vecteur pBP3/-440 CT. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences chacune en triplicata. Nous pouvons noter que le niveau d'expression sans stimulation (a) est significativement plus élevé pour le vecteur pBP3/-440 AC que pour les autres haplotypes (AC>CC, $p=0,02$; AC>AT, $p=0,03$) et que la même chose se produit suite à un traitement avec insuline (b) (AC>CC, $p=0,04$). La variabilité semble cependant plus grande pour les expériences de stimulation à l'insuline. La figure 16 montre pour ces mêmes expériences le ratio d'induction à l'insuline (cellules traitées/cellules non traitées). Nous observons que les ratios d'induction pour les cellules transfectées avec les vecteurs pBP3/-440 CC et AT sont significativement plus élevés que pour les cellules transfectées avec les vecteurs pBP3/-440 AC et CT (CC>AC, $p=0,03$; CC>CT, $p=0,03$; AT>AC, $p=0,03$; AT>CT, $p=0,04$). Nous pouvons donc affirmer que les polymorphismes -202 et -185 ont un impact sur l'activité promotrice du fragment -440pb/+19pb du promoteur d'*IGFBP3* tant au niveau basal qu'avec stimulation avec insuline dans les cellules SK-HEP-1.

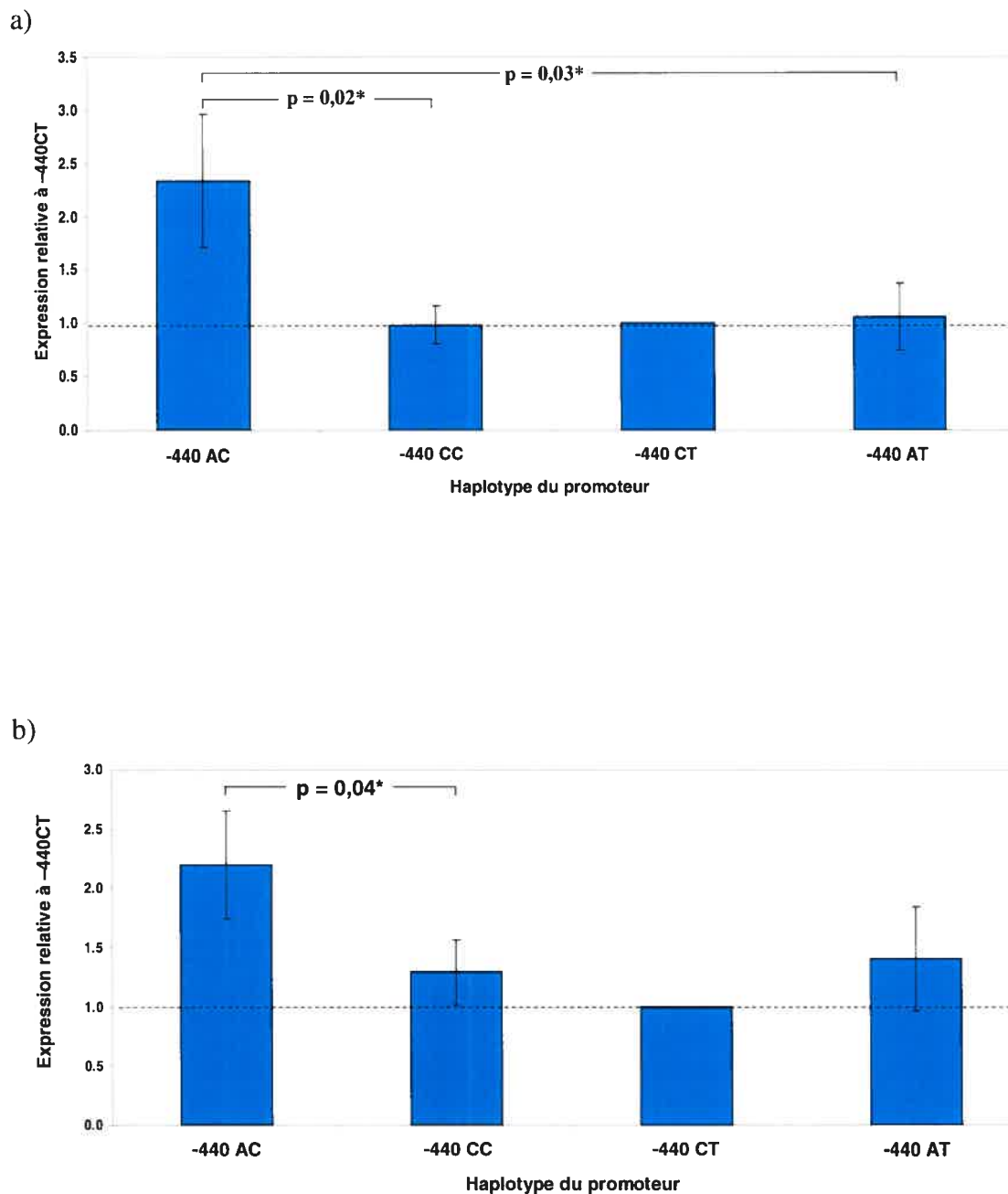


Figure 15. **Impact des polymorphismes du promoteur d'IGFBP3.** Les cellules SK-HEP-1 ont été transfectées avec 1,5 μ g de vecteur pBP3/-440 AC, CC, CT ou AT et 0,5 μ g de vecteur pSV β -galactosidase. Les cellules ont ensuite été incubées dans un milieu sans insuline (a) ou contenant 1,7 X10⁻⁷M d'insuline (b) durant 24h. Les données sont exprimées par rapport au vecteur pBP3/-440 CT et représentent la moyenne de 3 expériences, chacune en triplicata. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de la moyenne pour ces expériences. Les valeurs de luciférase ont été normalisées par l'activité β -galactosidase.

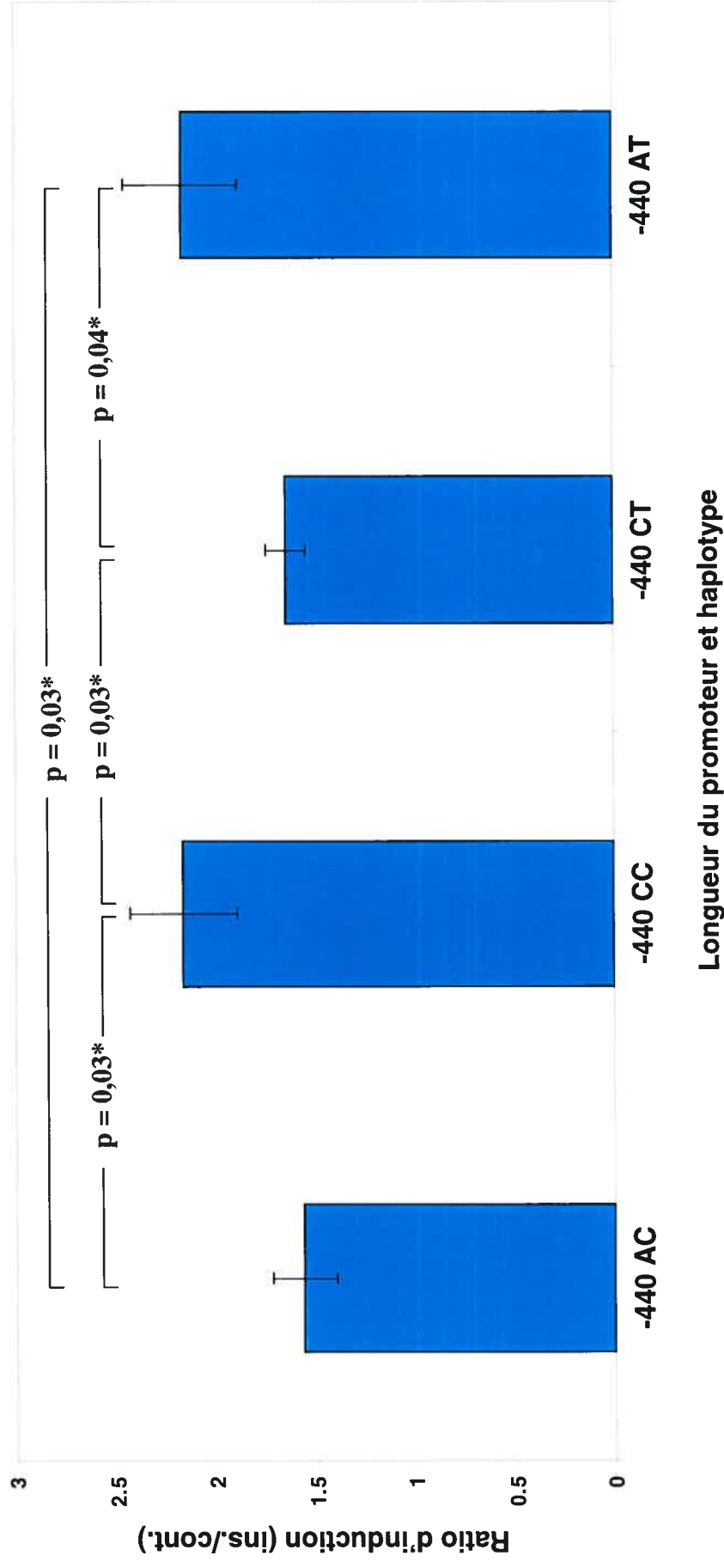


Figure 16. Impact des polymorphismes du promoteur d'*IGFBP3*: ratios d'induction par l'insuline. Les ratios ont été obtenus en calculant le rapport cellules traitées/contrôles. Les calculs ont été fait à partir des résultats obtenus à la figure 15.

La région du promoteur d'*IGFBP3* comprise entre les polymorphismes -202 A/C et -185 C/T contient un site de liaison au facteur de transcription USF (Upstream Stimulatory Factor)

Afin d'identifier des facteurs de transcription possédant des sites de liaison putatifs dans la région des polymorphismes du promoteur d'*IGFBP3*, une recherche a été effectuée *in silico* en utilisant le logiciel TESS (Transcription Element Search System; www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess). Ce logiciel utilise la base de données TRANSFAC. La recherche a été faite avec le fragment de promoteur -440/+19 et les paramètres par défaut ont été utilisés (« Maximum Allowable String Mismatch » de 10%, « Minimum log-likelihood ratio score » de 12). La recherche a été limitée aux facteurs de transcription retrouvés chez l'humain. Cette analyse nous a permis d'identifier plusieurs facteurs putatifs pouvant interagir avec la région des polymorphismes, dont le facteur de transcription « Upstream Stimulatory Factor » (USF). Ce facteur est particulièrement intéressant, car il a été démontré que ce facteur pouvait se lier à l'élément de réponse à l'insuline contenu dans le promoteur du gène « Fatty Acid Synthase » [290]. La figure 17 nous montre que le site de liaison putatif d'USF se trouve entre les polymorphismes -202 A/C et -185 C/T. L'élément de réponse potentiel du promoteur d'*IGFBP3*, 5'-CACGAG-3', se rapproche de la séquence consensus de liaison pour USF qui est 5'-CANNTG-3'.



Figure 17. Site de liaison putatif du facteur de transcription USF entre les polymorphismes du promoteur d'*IGFBP3*. Le site de liaison potentiel se rapproche du site consensus de liaison d'USF (5'-CANNTG-3').

Le facteur de transcription USF se lie *in vitro* à la région comprise entre les polymorphismes -202 et -185 et cette liaison est influencée par la méthylation CpG

Afin de déterminer si le facteur de transcription USF se liait *in vitro* dans la région polymorphique, des essais de retard sur gel ont été effectués. Une sonde double brin radioactive comprenant les sites polymorphiques -202 et -185 (5'-tcgaCGTGA⁻²⁰²GCACGAGGAGAGGTGC⁻¹⁸⁵CCGGgatc-3') a été utilisée en présence d'extraits nucléaires de cellules SK-HEP-1 traitées ou non à l'insuline. Nous pouvons remarquer à la figure 18 a) que la migration de la sonde est retardée lorsqu'elle est combinée aux extraits nucléaires provenant de cellules non traitées. Cette bande n'apparaît pas en absence d'extraits nucléaires. La même bande est visible pour les extraits nucléaires provenant de cellules traitées à l'insuline et l'intensité de la bande est similaire. Afin de déterminer si la protéine USF se retrouve dans ce complexe, une compétition avec une sonde froide contenant le site de liaison pour USF du promoteur provenant du gène FAS a été effectuée [290]. Les extraits nucléaires provenant de cellules traitées à l'insuline ont été utilisés. À la figure 18 a), on note une disparition quasi complète de la bande retardée en présence d'une quantité de compétiteur 10 fois supérieure à la sonde marquée. En utilisant 20 fois plus de compétiteur que de sonde marquée, la bande disparaît complètement.

Puisque chez les mammifères, le facteur de transcription USF se retrouve majoritairement sous forme d'un hétérodimère composé des protéines USF-1 et USF-2, qui sont les produits de deux gènes distincts, nous avons voulu déterminer si ces deux facteurs étaient présents dans le complexe retardé. Pour ce faire, nous avons utilisé deux anticorps, anti-USF-1 et anti-USF-2, qui sont spécifiques à chaque protéine. Nous observons à la figure 18 a) un changement dans la migration du complexe, ou « supershift », lorsque l'anticorps anti-USF-2 est utilisé. Cependant, ce changement de migration n'a pas lieu en présence de l'anticorps anti-USF-1. Nous remarquons plutôt une disparition complète du complexe retardé. L'anticorps anti-USF-1 agirait ici comme un compétiteur, car son site de liaison à

USF se retrouve près de la région de la liaison à l'ADN. Ces résultats nous indiquent qu'USF-1 et USF-2 se retrouvent dans le complexe qui lie la sonde radioactive.

Comme il a été démontré que la liaison du facteur USF à son élément de réponse est diminuée lorsque ce dernier est méthylé [291], nous avons voulu vérifier s'il en était de même pour notre élément de réponse. Nous avons tout d'abord effectué une compétition avec la sonde USF non méthylée. Nous pouvons observer à la figure 18 b) qu'une quantité de compétiteur non méthylé 20 fois supérieure à la sonde radioactive réussit à diminuer l'intensité de la bande retardée. Si on utilise une quantité de compétiteur 100 fois supérieure, on remarque une disparition quasi complète de la bande retardée. Nous avons par la suite effectué une compétition avec la même sonde, mais cette fois-ci méthylée *in vitro* par la méthylase M.SssI. Nous remarquons qu'une quantité de sonde méthylée 20 fois supérieure à la sonde radioactive diminue beaucoup moins l'intensité de la bande retardée que le compétiteur non méthylé. La même situation est observée avec une quantité de sonde méthylée 100 fois supérieure. En effet, à cette quantité, la sonde méthylée ne peut faire disparaître la bande retardée comparativement à la sonde non méthylée qui le fait presque totalement. Cela nous montre que la méthylation de la région des polymorphismes -202 et -185 sur le promoteur d'*IGFBP3* peut affecter *in vitro* la liaison du facteur de transcription USF.

En conclusion aux essais de retard sur gel, nous pouvons suggérer que le facteur de transcription USF, sous forme d'hétérodimère USF-1 et USF-2, peut se lier *in vitro* à un fragment du promoteur comprenant un élément de réponse à USF trouvé *in silico* et qui se trouve entre les polymorphismes -202 A/C et -185 C/T. De plus, lorsque méthylée, la sonde comprenant les nucléotides -206 à -181 du promoteur d'*IGFBP3* ne lie pas USF avec une affinité aussi forte que la sonde non méthylée.

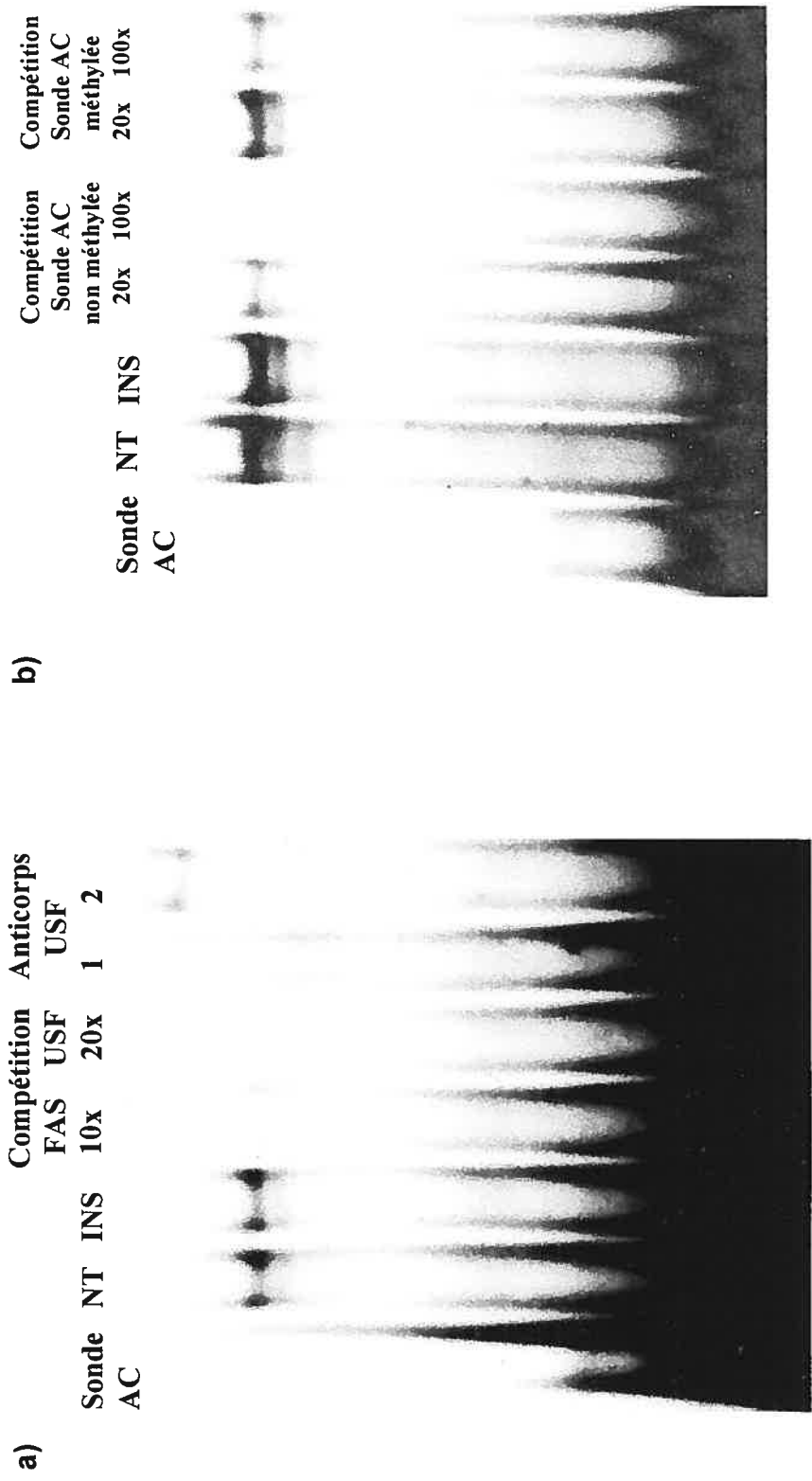


Figure 18. **Étude de la liaison *in vitro* d'USF au promoteur d'IGFBP3.** Expériences de retard sur gel utilisant des extraits nucléaires de cellules SK-HEP-1 traitées ou non avec 1,7 X10⁻⁷M d'insuline durant 24 heures. Nous avons utilisé une sonde radioactive double brin contenant la région -206 à -181 du promoteur d'IGFBP3. En a), compétition avec sonde non radioactive comprenant l'élément de réponse d'USF du promoteur du gène « Fatty acid synthase » et utilisation des anticorps anti-USF-1 et anti-USF-2. En b), compétition avec la sonde comprenant les polymorphismes, mais non radioactive et compétition avec cette même sonde non radioactive, mais méthylée. NT, extraits nucléaires de cellules non traitées; INS, extraits nucléaires de cellules traitées avec insuline.

L'élément de réponse au facteur de transcription USF compris entre les polymorphismes -202 et -185 semble important pour la réponse au traitement à l'insuline

Afin de vérifier l'implication du site de liaison d'USF compris entre les polymorphismes -202 et -185 lors d'un traitement à l'insuline, nous avons effectué une mutation ponctuelle par mutagenèse dirigée dans le vecteur rapporteur d'activité luciférase pBP3/-440 AC. L'élément de réponse à USF, 5'-CACGAG-3', a été changé pour 5'-CTCGAG-3' [279]. La figure 19 montre les niveaux d'expression de la luciférase suite à un traitement avec de l'insuline $1,7 \times 10^{-7} \text{M}$ sur des cellules SK-HEP-1 transfectées avec le vecteur pBP3/-440 AC de type sauvage ou mutant (pBP3/-440 AC-M1). Nous remarquons tout d'abord que les niveaux d'expression sans stimulation à l'insuline pour le promoteur sauvage ou mutant sont semblables. Cependant, suite à un traitement à l'insuline, on remarque que l'activation de la transcription par le promoteur muté est grandement diminuée par rapport au promoteur sauvage ($p=0,013$) et qu'elle se rapproche des niveaux d'expression sans traitement à l'insuline. Nous pouvons donc affirmer que l'élément de réponse pour USF qui se situe entre les polymorphismes -202 A/C et -185 C/T du promoteur d'*IGFBP3* semble impliqué dans la réponse à l'insuline.

Les polymorphismes -202 A/C et -185 C/T affectent les patrons de méthylation de l'ADN génomique dans les leucocytes

Afin de vérifier l'impact *in vivo* des polymorphismes -202 A/C et -185 C/T sur la méthylation du promoteur d'*IGFBP3*, nous avons traité au bisulfite l'ADN génomique provenant de leucocytes pour trois haplotypes : trois homozygotes -202 A et -185 C, trois homozygotes -202 C et -185 C ainsi que trois homozygotes -202 C et -185 T. Nous avons par la suite séquencé la région des deux polymorphismes. La figure 20 nous montre les patrons de méthylation obtenus. Nous pouvons observer en général que la méthylation est plus importante chez les individus

homozygotes -202 C et -185 C que chez les individus homozygotes -202 A et -185 C. En plus d'ajouter une séquence CpG qui se retrouve méthylée chez les individus homozygotes -202 C et -185 C, il semble qu'un C en position -202 affecte aussi la méthylation des cytosines avoisinantes. De plus, quand nous observons la méthylation chez les individus homozygotes -202 C et -185 T, on remarque qu'elle est plus faible que chez les individus homozygotes -202 C et -185 C. La présence d'un T en -185 n'ajoute ni n'enlève de séquence CpG, mais on remarque cependant que la méthylation de la cytosine -183 est diminuée en présence d'un T en -185, indiquant que le polymorphisme -185 peut influencer l'état de méthylation des CpGs adjacents. En conclusion, nous avons pu montrer que les polymorphismes -202 A/C et -185 C/T ont une influence sur la méthylation locale *in vivo* du promoteur d'*IGFBP3* dans les cellules leucocytaires et par le fait même potentiellement sur la liaison à l'ADN du facteur de transcription USF.

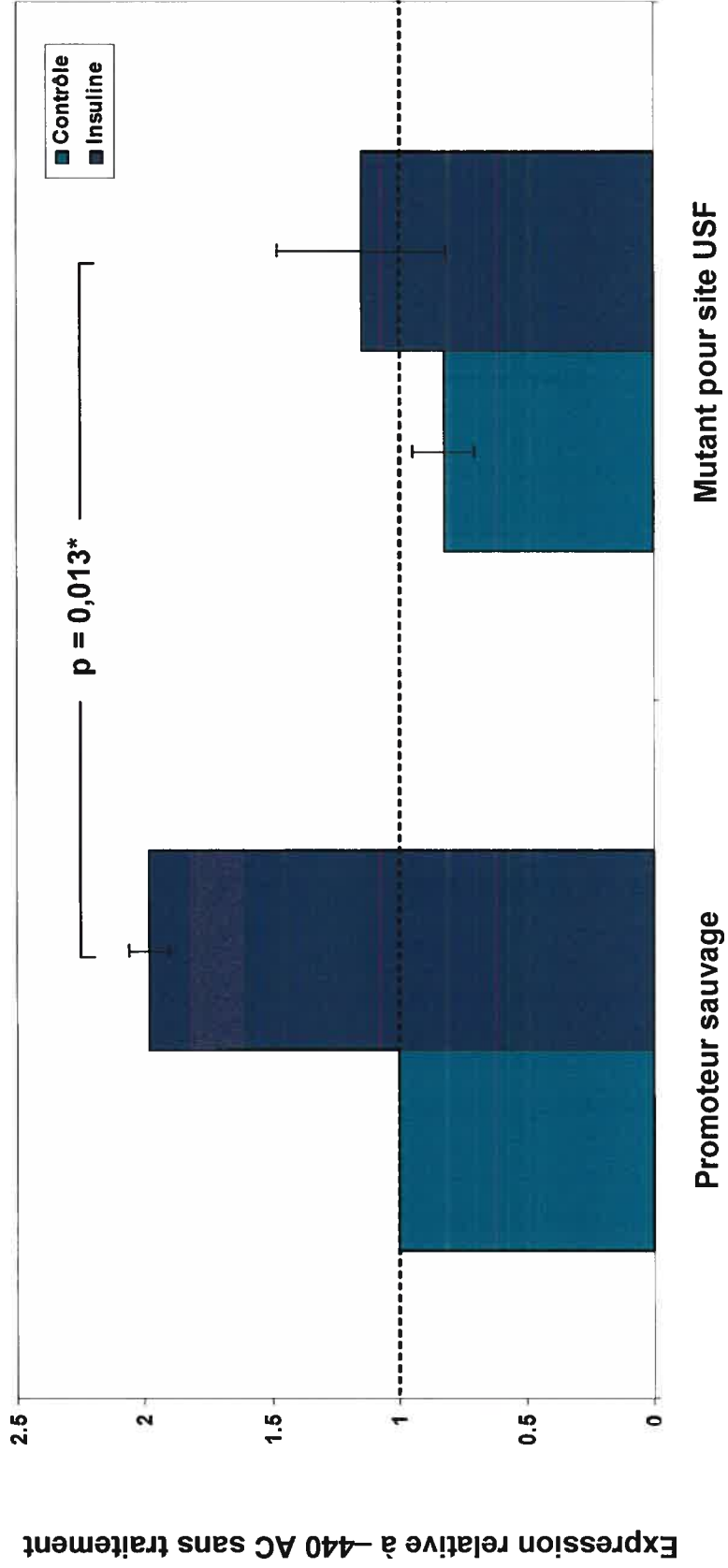


Figure 19. **Impact du site de liaison d'USF dans la réponse à l'insuline du promoteur d'IGFBP3.** Les cellules SK-HEP-1 ont été transfectées avec 1,5µg de vecteur pBP3/-440 AC ou pBP3/-440 AC-M1 (mutant pour le site de liaison d'USF) et 0,5µg de vecteur pSVβ-galactosidase. Les cellules ont ensuite été traitées avec insuline (1,7 X10⁻⁷M) ou véhicule seulement (contrôle) durant 24h. Les données sont exprimées par rapport au vecteur pBP3/-440 AC sans traitement dont on a assigné la valeur 1. Les valeurs représentent la moyenne ainsi que l'écart-type de la moyenne pour 3 expériences, chacune en triplicate. Les valeurs de luciférase ont été normalisées par l'activité β-galactosidase.

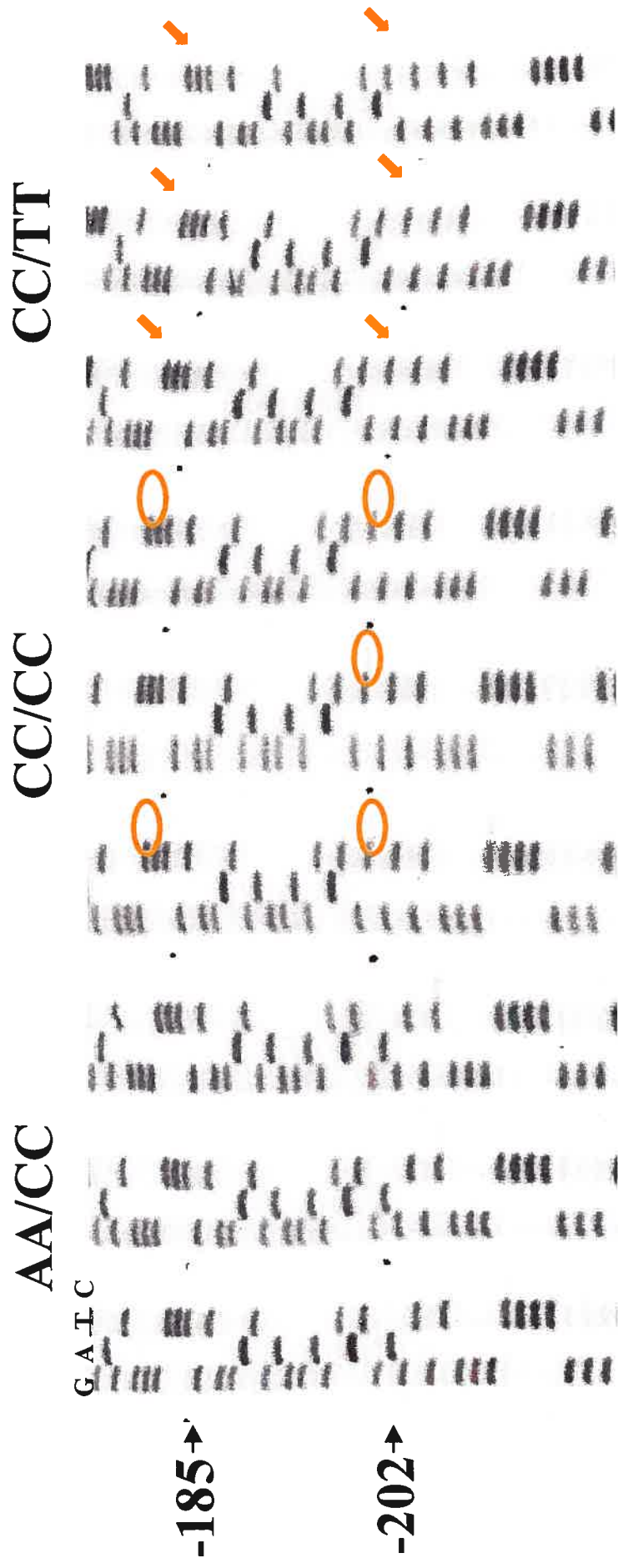


Figure 20. Impact des polymorphismes -202 et -185 sur la méthylation de l'ADN génomique. Séquençage du promoteur d'*IGFBP3* après un traitement au bisulfite de l'ADN génomique de leucocytes extrait d'individus avec différents génotypes. Trois individus pour chacun des génotypes suivants ont été analysés: homozygote -202 A et -185 C, homozygote -202 C et -185 C ainsi qu'homozygote -202 C et -185 T. Le bisulfite transforme les résidus cytosines non méthylés en résidus uraciles qui sont changés en résidus thymines lors de l'amplification par PCR. Les résidus cytosines méthylés demeurent intacts. Les cercles indiquent les résidus cytosines (en CpG) méthylés; les flèches aussi, mais à un niveau d'intensité moindre.

4. Discussion

La variabilité interindividuelle est un important sujet de la médecine du XXI^e siècle. L'investigation de diverses conditions cliniques telles que la déficience en GH, l'hypertension et différents cancers a permis de faire un lien entre phénotype (risque pour certaines maladies, réponse aux médicaments, variabilité normale de la population) et génétique. Cependant, très peu de mutations codantes peuvent expliquer ces phénotypes, d'où l'importance d'étudier en profondeur le rôle des polymorphismes dans les régions non codantes et leur impact sur le fonctionnement des gènes. Les polymorphismes les plus étudiés sont du type SNP (« Single Nucleotide Polymorphism ») et sont des variations d'un seul nucléotide dans l'ADN génomique. Chaque combinaison possible d'un ou de plusieurs polymorphismes sur le même chromosome dans une région déterminée de l'ADN est appelée haplotype.

Les résultats de recherches précédentes ont pu démontrer pour l'IGFBP-3, une protéine de liaison pour les IGFs qui joue un rôle primordial dans la croissance normale et néoplasique, un lien entre génotype et phénotype. Tel que mentionné dans l'introduction, 2 SNPs en déséquilibre de liaison situés à l'intérieur du promoteur d'*IGFBP3* sont associés avec les niveaux circulants d'IGFBP-3 [277;278]. Autant chez les adultes que chez les enfants et ce pour les deux sexes, le polymorphisme -202 A/C a été corrélé avec les niveaux circulants d'IGFBP-3 (AA>AC>CC). Une tendance similaire était observée dans toutes les cohortes pour le génotype -185 (CC>CT>TT), mais à cause d'une plus faible relation, les données statistiques n'atteignaient pas toujours un seuil significatif.

Dans ma démarche scientifique, le phénotype que je cherchais à mieux comprendre était le niveau sérique d'IGFBP-3. C'est afin de mieux comprendre le rôle des SNPs dans le promoteur d'*IGFBP3* et leur impact sur l'expression de ce gène que la présente recherche a été effectuée.

Avant de débiter avec les expériences proprement dites, nous avons dû optimiser les conditions de transfection. Nous avons utilisé comme modèle les cellules SK-HEP-1 parce qu'il a déjà été montré que ces cellules exprimaient l'IGFBP-3 [237] et aussi parce que notre laboratoire avait déjà démontré la stimulation de l'IGFBP-3 par l'insuline [277]. Nous avons décidé d'étudier

l'insuline parce que plusieurs études *in vivo* montraient clairement qu'il s'agit d'un régulateur hormonal de cette protéine de liaison [229;231;236]. De plus, des études *in vitro* ont pu démontrer une augmentation de la protéine, des niveaux d'ARNm ainsi que de la transcription suite à une stimulation avec insuline [239-241].

Une fois les conditions optimales obtenues, nous avons vérifié la longueur du promoteur minimal de l'*IGFBP3*. Nous avons ainsi pu démontrer que le promoteur minimal était constitué des nucléotides -440 à +19 et qu'il correspondait à celui décrit par Cabbage *et al.* (fig. 12)[253]. Nous avons aussi pu observer une diminution de l'activité de transcription en fonction de la longueur du promoteur. Cela pourrait s'expliquer par la présence d'éléments répresseurs le long du promoteur. Une importante diminution de la transcription a été observée entre les nucléotides -848 et -648 (fig.13). Notre laboratoire est en train d'analyser cette région avec le programme TESS afin d'identifier des facteurs de transcription potentiels. Nous avons pu récemment identifier deux sites putatifs pour c-myc (-744/-739 et -654/649). Ce facteur de transcription peut agir directement comme agent de répression ou par l'intermédiaire de son partenaire de liaison MAD [293]. Nous pourrions ensuite construire des vecteurs d'expression en tenant compte des éléments de réponse identifiés et étudier leur impact sur l'activité du promoteur.

Ensuite, nous avons pu démontrer que les polymorphismes -202 A/C et -185 C/T affectaient *in vitro* l'activité de transcription du promoteur d'*IGFBP-3*. Nous avons observé que l'activité luciférase avec ou sans stimulation avec insuline était plus élevée pour l'haplotype AC du promoteur d'*IGFBP3* que pour les haplotypes CC et CT (fig. 15), ce qui correspond à ce qui a été observé *in vivo* pour le polymorphisme -202 [277;278]. Cependant, il semble que le polymorphisme -185 T interagisse avec le polymorphisme -202 A pour diminuer la transcription du gène rapporteur dans les cellules transfectées, avec ou sans stimulation avec l'insuline (AC>CC=CT=AT).

Étrangement, le génotype AT n'a été retrouvé dans aucune des cohortes étudiées jusqu'à ce jour (adulte, pédiatrique, homme ou femme). Cela pourrait s'expliquer de plusieurs façons. Le polymorphisme -185 C/T n'a pas encore atteint l'équilibre Hardy-Weinberg, c'est-à-dire que ce polymorphisme est encore récent. Il

se peut aussi que l'haplotype AT soit soumis à une pression de sélection négative, c'est-à-dire que de bas niveaux d'IGFBP-3 seraient en quelque sorte délétères.

En calculant le ratio d'induction suite à une stimulation avec l'insuline, nous avons pu démontrer que les polymorphismes affectaient ces ratios (fig. 16). Cette différence entre les haplotypes nous montre que la région polymorphique semble impliquée dans la régulation du promoteur par l'insuline. Cependant, il faut toujours se rappeler que nous avons enlevé le promoteur de son contexte chromosomique. Une façon de contourner ce problème serait de créer des lignées cellulaires ayant des génotypes différents par recombinaison homologe et ensuite étudier les niveaux de transcription de l'*IGFBP3*.

D'une expérience de transfection à une autre, il existait une grande variabilité pour les niveaux d'activité luciférase normalisés pour l'activité β -galactosidase. La variabilité intra essai, établie par l'utilisation de triplicatas, était acceptable, mais il était impossible de faire la moyenne absolue des valeurs pour plusieurs expériences. C'est pourquoi nous avons dû normaliser les résultats pour chaque expérience avec le vecteur -440 CT. Ainsi, il nous a été possible de mieux analyser les résultats. Nous avons aussi effectué une normalisation avec le vecteur -440 CC et les mêmes résultats ont été obtenus (données non montrées).

Plusieurs facteurs pourraient expliquer cette variabilité entre les expériences. L'état des cellules joue un grand rôle dans cette variabilité bien que la même quantité de cellules était utilisée dans chaque puits. Le degré de confluence des cellules dans les T75 au moment de l'ensemencement était évalué visuellement et se situait entre 70 et 90%. Il pouvait donc y avoir une légère différence de confluence dans les flacons d'une semaine à l'autre. Des cellules trop confluentes au moment de la mise en plaque pourraient être en inhibition de contact, un phénomène qui arrête le cycle cellulaire. Les cellules en inhibition de contacts seraient alors moins actives métaboliquement que des cellules en pleine expansion. Le fait de mieux contrôler la croissance des cellules aurait peut-être permis une plus faible variabilité entre les expériences. Puisque d'une semaine à l'autre différents réactifs étaient utilisés (lot du sérum foetal de veau, demi-vie de la luciférine, etc.), il se peut que ceux-ci pouvaient affecter les niveaux d'activité mesurés.

En plus de la démonstration d'un rôle fonctionnel des polymorphismes -202 et -185 pour les niveaux d'expression avec ou sans stimulation avec l'insuline en utilisant des constructions de gènes rapporteurs, une autre importante observation est que ces polymorphismes pourraient moduler les interactions de facteurs de transcription spécifiques. En faisant une recherche *in silico* des facteurs de transcription susceptibles de se lier à la région polymorphique, nous avons remarqué qu'une quantité considérable de facteurs pouvait s'y fixer. Parmi tous ces facteurs, USF a attiré notre attention puisqu'il pouvait potentiellement se lier directement entre les deux polymorphismes. De plus, Wang *et al.* ont démontré que USF se liait à un élément de réponse à l'insuline situé dans le promoteur du gène FAS [290] et qu'une méthylation de dinucléotides CpG pouvait diminuer cette liaison [291]. En utilisant la technique de retard sur gel, nous avons pu établir que les deux facteurs, USF-1 et USF-2, se liaient à l'élément de réponse et que cette liaison pouvait être abolie par une compétition avec l'élément de réponse à l'insuline du gène FAS (fig. 18). En plus, nous avons démontré que cette liaison est affectée par l'état de méthylation de l'ADN. Cette observation est très intéressante puisque nous avons déterminé que les polymorphismes affectent les patrons de méthylation de l'ADN génomique de leucocytes (fig. 20). Nos expériences ont démontré que les polymorphismes peuvent non seulement introduire un nouveau CpG accessible à la méthylation (-202 A→C), mais également influencer l'état de la méthylation avoisinante. Cela pourrait refléter une accessibilité accrue des méthylases causée par une modification de la configuration de l'ADN.

Finalement, nous avons mis en évidence l'importance de la liaison du facteur USF entre les deux polymorphismes dans la réponse à un traitement avec l'insuline. En effet, en mutant ce site *in vitro* de façon ponctuelle selon le mutant de Greaves *et al.* [279], nous avons observé une importante diminution de l'activité de transcription du promoteur par rapport au promoteur non muté suite à une stimulation avec l'insuline (fig. 19). Il serait important de se rappeler que les gènes situés à l'intérieur des vecteurs plasmidiques ne subissent pas de méthylation une fois transfectés dans les cellules. Donc, les effets spécifiques d'une stimulation à

l'insuline selon les haplotypes doivent impliquer la liaison différentielle ou le recrutement d'autres facteurs de transcription en plus d'USF.

Lorsqu'on observe le promoteur minimal d'*IGFBP3*, on note la présence de plusieurs éléments de réponse pour divers facteurs. Parmi eux, il y a les sites pour le facteur de transcription Sp1 qui sont particulièrement intéressants. Une équipe travaillant sur le promoteur du gène codant pour la « deoxycytidine kinase » (dCK) a identifié des éléments de réponses à USF et à Sp1 et a démontré que ces deux facteurs étaient impliqués dans la régulation de l'expression du gène [294]. En plus, elle a démontré par des essais « pull-down » que les deux facteurs pouvaient interagir entre eux par des interactions protéine-protéine. Dans le cas du promoteur de la dCK, les deux éléments de réponse étaient juxtaposés l'un à l'autre. Dans le promoteur d'*IGFBP3*, il existe en effet un site putatif de liaison à Sp1 directement en amont du site de liaison à USF entre les nucléotides -209 et -204. Cette observation est intéressante puisque le polymorphisme -202 se trouve directement entre ces deux sites. Il se peut que ce polymorphisme affecte la liaison entre USF et Sp1, affectant ainsi la transcription. Même s'ils ne sont pas directement à côté, plusieurs autres sites de liaisons potentiels pour Sp1 de même que le site déjà décrit dans la boîte GC pourraient interagir avec le site pour USF via un repliement de l'ADN. À ce sujet, il a été montré que la liaison d'USF provoquait une courbure dans l'ADN [295].

Un autre facteur de transcription intéressant est p53. Tel que mentionné plus haut, le promoteur d'*IGFBP-3* contient des sites de liaison putatifs pour p53 qui consistent en 11 décimères. Les polymorphismes -202 A/C et -185 C/T se retrouvent chacun dans un de ces décimères (GGGCGTGA/CG et GAGCTCGGCC/T). En se fiant à la séquence consensus du décimère (Pu-Pu-Pu-C-A/T-T/A-G-Py-Py-Py), la présence d'un C en -202 favoriserait la liaison de p53 tandis qu'un A nuirait à ce consensus et aucun effet ne serait remarqué pour le polymorphisme -185 C/T. Cette situation n'est pas observée dans des conditions cellulaires physiologiques puisque nous notons *in vitro* des niveaux d'expression plus élevés pour un A en -202. Ceci est normal puisque p53 est un facteur de transcription qui est activé lors d'un dommage à l'ADN et non dans des conditions

normales [296]. Nous avons tenté de vérifier par retard sur gel si p53 pouvait se lier à la sonde utilisée pour l'étude d'USF et contenant les deux polymorphismes, mais aucune liaison n'a été observée. En regardant la sonde utilisée, nous avons remarqué qu'elle ne contenait que deux décarnères. Il a été démontré qu'il fallait un minimum de quatre décarnères afin qu'il y ait une activité de liaison sur le promoteur d'*IGFBP3* [265]. Tout récemment, Hanafusa *et al.* ont démontré, avec une sonde contenant les polymorphismes du promoteur et quatre éléments de réponse, une liaison de p53 à cette région du promoteur et que cette liaison était affectée par la méthylation du promoteur [266]. Donc, il serait peut-être intéressant d'effectuer des retards sur gels avec des sondes contenant plus de décarnères afin de vérifier s'il y a une différence selon l'haplotype du promoteur. Il serait aussi intéressant de co-transfecter avec les vecteurs rapporteurs des vecteurs d'expression de p53 et de vérifier s'il existe une différence dans l'activation du promoteur selon l'haplotype.

Un autre fait intéressant sur p53 est que ce facteur peut se lier avec Sp1 et ainsi former un complexe d'activation. Une équipe a en effet démontré que la formation d'un complexe p53-Sp1 était nécessaire dans l'activation de l'expression du facteur p21 dans les cellules T humaines [297]. De plus, cette activation se faisait par une liaison à un élément de réponse à Sp1 et ne requérait pas la présence d'un élément de réponse à p53. Une autre équipe a démontré que le complexe p53-Sp1 pouvait se lier avec haute affinité aux deux éléments de réponse dans les cellules leucémiques [298].

Un troisième facteur de transcription important à considérer est c-myc qui est impliqué dans le processus d'oncogenèse, la progression dans le cycle cellulaire et dans l'induction de l'apoptose [299;300]. Il a été montré que c-myc pouvait se lier à la séquence 5'-CACGAG-3' qui se trouve à être l'élément de réponse pour USF que nous avons identifié [293]. Il pourrait donc y avoir une compétition entre les deux facteurs pour ce site et il serait donc intéressant d'ajouter un anticorps anti-c-myc à nos expériences de retard sur gel. Une forte corrélation a été observée entre la capacité de c-myc à transformer les cellules et son activité de répression de certains promoteurs [301;302]. Du côté d'USF, des effets d'activation de promoteurs de plusieurs gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération

cellulaire (*Cox-2*, *BRCA2*, *cathepsin D*, *CDK4*) ont été observés [303-306]. Pour venir appuyer cette hypothèse de compétition entre les deux facteurs, Choe *et al.* ont observé une diminution de la tumorigénicité chez les fibroblastes transformés par c-myc et exprimant USF-2 actif [307].

En mettant toutes ces observations ensembles, il semble que les facteurs Sp1, p53 et c-myc soient en relation avec le facteur USF et comme le promoteur d'IGFBP3 contient des sites pour tous ces facteurs, il devient intéressant de se pencher sur leurs rôles dans la régulation du promoteur d'*IGFBP3*.

Suite aux résultats que nous avons obtenus, quelques pistes seraient intéressantes à étudier. Il y a tout d'abord les expériences de retard sur gel et de co-transfection mentionnées plus haut afin d'étudier d'autres facteurs de transcription qui interagissent avec la région polymorphique. Récemment dans notre laboratoire, des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine ont confirmé que le facteur USF se liait à l'élément de réponse situé entre les polymorphismes dans un contexte cellulaire plus près de la réalité. Des résultats préliminaires semblent aussi démontrer que cette liaison peut être affectée par un traitement avec l'insuline.

Des études futures porteront sur la réponse du promoteur à des facteurs autres que l'insuline. Comme la GH est le principal régulateur de l'expression de l'IGFBP-3, il serait intéressant de vérifier son impact dans notre modèle cellulaire ainsi que son lien avec les polymorphismes en identifiant les éléments de réponse par des transfections qui utiliseraient les constructions de longueur et d'haplotype différents que nous avons. D'autres régulateurs d'intérêt clinique à étudier seraient les molécules pro-apoptiques telles que le butyrate de sodium, la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ dont on connaît l'élément de réponse [267], l'acide rétinoïque et les antioestrogènes tamoxifène et raloxifène. Ces molécules sont reconnues pour leurs effets stimulateurs sur IGFBP3 en augmentant soit l'activité de transcription, la stabilité de l'ARNm ou le niveau d'expression de la protéine. Il serait aussi important d'étudier les effets d'inhibition de l'estrogène sur la transcription. Comme nous avons déjà toutes les constructions pour tester ces composés, nous pourrions obtenir des résultats plus rapidement.

D'autres lignées cellulaires sont nécessaires afin de comparer les effets d'un type de cellule à l'autre et ainsi valider nos observations concernant l'impact des polymorphismes au niveau de la réponse à l'insuline. Quand vient le temps de choisir les lignées cellulaires appropriées pour les transfections, il est important de vérifier que la machinerie nécessaire à la transcription de l'*IGFBP3* soit intacte. Cela a été fait pour plusieurs lignées cellulaires telles que les cellules de cancer du sein MCF-7, les cellules d'hépatoblastomes HepG2 ainsi que plusieurs lignées provenant de carcinomes de poumon et de côlon [240;242;243;308]. Il serait peut-être aussi désirable de jeter un regard sur des cellules non transformées bien que les transfections transitoires ne soient pas toujours évidentes dans ce contexte.

Une étude approfondie de l'impact des polymorphismes du promoteur sur la régulation de l'expression de l'IGFBP-3 nous permettra de mieux comprendre la variabilité interindividuelle et cela aura d'importantes répercussions sur le plan clinique. L'étude du rôle fonctionnel des polymorphismes du promoteur d'*IGFBP3* fait déjà l'objet de recherches au niveau de l'évaluation de la croissance anormale durant l'enfance ainsi que dans l'épidémiologie du cancer. La pertinence clinique des polymorphismes par rapport à la croissance a récemment été montrée pour des enfants normaux en croissance (article en préparation) et pour des enfants nés petits pour leur âge gestationnel chez qui la croissance et la réponse à la GH étaient associées avec le génotype du promoteur d'*IGFBP3* [309].

La pertinence de ces SNPs quant au risque de cancer a été suggérée par plusieurs études épidémiologiques qui examinaient leur association avec différents cancers. Une étude a démontré que les patients avec une hyperplasie prostatique avec un génotype -202 AC ou CC avaient un risque plus élevé d'avoir une maladie métastatique que les patients homozygotes AA [310]. Une autre étude effectuée avec des femmes chinoises a montré que les femmes homozygotes CC pour le polymorphisme -202 avaient un risque de développer un cancer du sein plus élevé que les autres [311]. Une troisième étude a démontré un risque élevé de développement d'un cancer du côlon chez les gens possédant un génotype AC ou CC en combinaison avec l'allèle IRS1 G972R qui est un polymorphisme dans l'« insulin receptor substrate 1 » [312]. Finalement, deux équipes ont observé des

niveaux circulants d'IGFBP-3 inférieurs aux contrôles chez des patients atteints d'un cancer de la vessie [313;314]. Puisque les travaux sur les interactions de molécules telles que l'acide rétinoïque, la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ et les anti-estrogènes avec le promoteur d'*IGFBP3* progressent, le génotypage pour les SNPs du promoteur de l'*IGFBP3* pourrait permettre de prédire l'efficacité clinique de ces molécules dans la prévention et/ou le traitement du cancer. Évidemment, la compréhension des bases moléculaires de la variabilité interindividuelle des niveaux tissulaires et sériques d'IGFBP-3 est la prochaine étape.

5. Conclusion

En conclusion, nous avons pu démontrer que les polymorphismes -202 A/C et -185 C/T affectaient l'activité de transcription du promoteur de l'*IGFBP3* dans un modèle cellulaire *in vitro*. Ces résultats concordent avec les données obtenues *in vivo* démontrant que les niveaux sériques d'IGFBP-3 sont associés avec le génotype du promoteur d'*IGFBP3*. Nous avons aussi observé que ces polymorphismes affectaient l'activité du promoteur suite à un traitement avec l'insuline. Une recherche *in silico* nous a permis d'identifier un site de liaison au facteur de transcription USF entre les deux polymorphismes et cette liaison a été prouvée par des essais de retard sur gel. Par ces expériences, nous avons démontré qu'USF-1 et USF-2 se liaient au site de liaison et que cette interaction était affectée par la méthylation du promoteur. Ce lien entre l'état de la méthylation et la liaison méthyl-sensible du facteur USF est important puisque nous avons déjà observé que les patrons de méthylation du promoteur de l'*IGFBP3* étaient influencés par les polymorphismes -202 et -185 dans les leucocytes humains. Nous avons de plus déterminé que le site de liaison du facteur USF était important dans la réponse à un traitement à l'insuline puisque la mutation de ce site a grandement diminué cette réponse par rapport au site non muté. Nous suggérons que les polymorphismes étudiés dans ce projet, par leur impact sur la méthylation locale de séquences CpG, modulent l'interaction de facteurs de transcription tels qu'USF avec le promoteur d'*IGFBP3*.

Une meilleure compréhension de la régulation du promoteur d'*IGFBP3* et de l'implication des polymorphismes aura de nombreuses répercussions cliniques. Il sera possible de mieux comprendre la diversité biologique et expliquer les traits complexes. Cela nous permettra d'optimiser l'usage de l'IGFBP-3 dans l'investigation des patients de petite taille. Nous pourrons aussi mieux prédire la réponse à des régulateurs connus (insuline, GH, estrogène, rétinol) selon l'haplotype. Nous pourrons finalement mieux évaluer le risque relatif pour différents cancers et aussi mieux évaluer l'efficacité de diverses molécules dans la prévention et/ou le traitement de ces cancers.

Bibliographie

- [1] Zapf J, Schmid C, Froesch ER. Biological and immunological properties of insulin-like growth factors (IGF) I and II. *Clin Endocrinol Metab* 1984; 13: 3-30.
- [2] Rosen CJ. Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins: clinical implications. *Clin Chem* 1999; 45: 1384-1390.
- [3] Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16: 3-34.
- [4] Hall K. Human somatomedin. Determination, occurrence, biological activity and purification. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1972; 163: 1052.
- [5] Elkin M, Shevelev A, Schulze E, Tykocinsky M, Cooper M, Ariel I, Pode D, Kopf E, de GN, Hochberg A. The expression of the imprinted H19 and IGF-2 genes in human bladder carcinoma. *FEBS Lett* 1995; 374: 57-61.
- [6] Jarrard DF, Bussemakers MJ, Bova GS, Isaacs WB. Regional loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene occurs in human prostate tissues. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1471-1478.
- [7] Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, McNoe LA, Yun K, Maw MA, Smith PJ, Reeve AE. Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature* 1993; 362: 749-751.
- [8] Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* 1993; 362: 747-749.
- [9] Suzuki H, Ueda R, Takahashi T, Takahashi T. Altered imprinting in lung cancer. *Nat Genet* 1994; 6: 332-333.
- [10] LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 1995; 16: 143-163.
- [11] Nielsen FC. The molecular and cellular biology of insulin-like growth factor II. *Prog Growth Factor Res* 1992; 4: 257-290.
- [12] Juul A. Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. *Growth Horm IGF Res* 2003; 13: 113-170.

- [13] Campbell PG, Novak JF, Yanosick TB, McMaster JH. Involvement of the plasmin system in dissociation of the insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology* 1992; 130: 1401-1412.
- [14] Wetterau LA, Moore MG, Lee KW, Shim ML, Cohen P. Novel aspects of the insulin-like growth factor binding proteins. *Mol Genet Metab* 1999; 68: 161-181.
- [15] Angelloz-Nicoud P, Harel L, Binoux M. Recombinant human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 stimulates prostate carcinoma cell proliferation via an IGF-dependent mechanism. Role of serine proteases. *Growth Regul* 1996; 6: 130-136.
- [16] Bereket A, Wilson TA, Kolasa AJ, Fan J, Lang CH. Regulation of the insulin-like growth factor system by acute acidosis. *Endocrinology* 1996; 137: 2238-2245.
- [17] Fowlkes JL, Suzuki K, Nagase H, Thrailkill KM. Proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 during rat pregnancy: a role for matrix metalloproteinases. *Endocrinology* 1994; 135: 2810-2813.
- [18] Fowlkes JL, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H. Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem* 1994; 269: 25742-25746.
- [19] Rajah R, Katz L, Nunn S, Solberg P, Beers T, Cohen P. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteases: functional regulators of cell growth. *Prog Growth Factor Res* 1995; 6: 273-284.
- [20] Cohen P, Peehl DM, Graves HC, Rosenfeld RG. Biological effects of prostate specific antigen as an insulin-like growth factor binding protein-3 protease. *J Endocrinol* 1994; 142: 407-415.
- [21] Lalou C, Lassarre C, Binoux M. A proteolytic fragment of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 that fails to bind IGFs inhibits the mitogenic effects of IGF-I and insulin. *Endocrinology* 1996; 137: 3206-3212.
- [22] Angelloz-Nicoud P, Binoux M. Autocrine regulation of cell proliferation by the insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein-3 protease system in a human prostate carcinoma cell line (PC-3). *Endocrinology* 1995; 136: 5485-5492.
- [23] Lalou C, Lassarre C, Binoux M. Isolation and characterization of proteolytic fragments of insulin-like growth factor-binding protein-3. *Horm Res* 1996; 45: 156-159.

- [24] Angeloz-Nicoud P, Lalou C, Binoux M. Prostate carcinoma (PC-3) cell proliferation is stimulated by the 22-25-kDa proteolytic fragment (1-160) and inhibited by the 16-kDa fragment (1-95) of recombinant human insulin-like growth factor binding protein-3. *Growth Horm IGF Res* 1998; 8: 71-75.
- [25] Salahifar H, Baxter RC, Martin JL. Differential regulation of insulin-like growth factor-binding protein-3 protease activity in MCF-7 breast cancer cells by estrogen and transforming growth factor-beta1. *Endocrinology* 2000; 141: 3104-3110.
- [26] Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 1999; 20: 761-787.
- [27] Forbes BE, Turner D, Hodge SJ, McNeil KA, Forsberg G, Wallace JC. Localization of an insulin-like growth factor (IGF) binding site of bovine IGF binding protein-2 using disulfide mapping and deletion mutation analysis of the C-terminal domain. *J Biol Chem* 1998; 273: 4647-4652.
- [28] Neumann GM, Marinaro JA, Bach LA. Identification of O-glycosylation sites and partial characterization of carbohydrate structure and disulfide linkages of human insulin-like growth factor binding protein 6. *Biochemistry* 1998; 37: 6572-6585.
- [29] Neumann GM, Bach LA. The N-terminal disulfide linkages of human insulin-like growth factor-binding protein-6 (hIGFBP-6) and hIGFBP-1 are different as determined by mass spectrometry. *J Biol Chem* 1999; 274: 14587-14594.
- [30] Hashimoto R, Ono M, Fujiwara H, Higashihashi N, Yoshida M, Enjoh-Kimura T, Sakano K. Binding sites and binding properties of binary and ternary complexes of insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3, and acid-labile subunit. *J Biol Chem* 1997; 272: 27936-27942.
- [31] Kalus W, Zweckstetter M, Renner C, Sanchez Y, Georgescu J, Grol M, Demuth D, Schumacher R, Dony C, Lang K, Holak TA. Structure of the IGF-binding domain of the insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): implications for IGF and IGF-I receptor interactions. *EMBO J* 1998; 17: 6558-6572.
- [32] Chelius D, Baldwin MA, Lu X, Spencer EM. Expression, purification and characterization of the structure and disulfide linkages of insulin-like growth factor binding protein-4. *J Endocrinol* 2001; 168: 283-296.
- [33] Firth SM, Baxter RC. Characterisation of recombinant glycosylation variants of insulin-like growth factor binding protein-3. *J Endocrinol* 1999; 160: 379-387.

- [34] Cheung PT, Smith EP, Shimasaki S, Ling N, Chernausek SD. Characterization of an insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-4) produced by the B104 rat neuronal cell line: chemical and biological properties and differential synthesis by sublines. *Endocrinology* 1991; 129: 1006-1015.
- [35] Conover CA, Kiefer MC. Regulation and biological effect of endogenous insulin-like growth factor binding protein-5 in human osteoblastic cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 1153-1159.
- [36] Coverley JA, Baxter RC. Phosphorylation of insulin-like growth factor binding proteins. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 128: 1-5.
- [37] Conover CA, Durham SK, Zapf J, Masiarz FR, Kiefer MC. Cleavage analysis of insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF-binding protein-4 proteolysis and expression of protease-resistant IGF-binding protein-4 mutants. *J Biol Chem* 1995; 270: 4395-4400.
- [38] Imai Y, Busby WH, Jr., Smith CE, Clarke JB, Garmong AJ, Horwitz GD, Rees C, Clemmons DR. Protease-resistant form of insulin-like growth factor-binding protein 5 is an inhibitor of insulin-like growth factor-I actions on porcine smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 1997; 100: 2596-2605.
- [39] Salahifar H, Firth SM, Baxter RC, Martin JL. Characterization of an amino-terminal fragment of insulin-like growth factor binding protein-3 and its effects in MCF-7 breast cancer cells. *Growth Horm IGF Res* 2000; 10: 367-377.
- [40] Twigg SM, Kiefer MC, Zapf J, Baxter RC. A central domain binding site in insulin-like growth factor binding protein-5 for the acid-labile subunit. *Endocrinology* 2000; 141: 454-457.
- [41] Song H, Shand JH, Beattie J, Flint DJ, Allan GJ. The carboxy-terminal domain of IGF-binding protein-5 inhibits heparin binding to a site in the central domain. *J Mol Endocrinol* 2001; 26: 229-239.
- [42] Yamanaka Y, Fowlkes JL, Wilson EM, Rosenfeld RG, Oh Y. Characterization of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) binding to human breast cancer cells: kinetics of IGFBP-3 binding and identification of receptor binding domain on the IGFBP-3 molecule. *Endocrinology* 1999; 140: 1319-1328.
- [43] Reinecke M, Collet C. The phylogeny of the insulin-like growth factors. *Int Rev Cytol* 1998; 183: 1-94.
- [44] Jones JJ, Gockerman A, Busby WH, Jr., Wright G, Clemmons DR. Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and

- binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90: 10553-10557.
- [45] Binkert C, Landwehr J, Mary JL, Schwander J, Heinrich G. Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2). EMBO J 1989; 8: 2497-2502.
- [46] Firth SM, Ganeshprasad U, Baxter RC. Structural determinants of ligand and cell surface binding of insulin-like growth factor-binding protein-3. J Biol Chem 1998; 273: 2631-2638.
- [47] Firth SM, Clemmons DR, Baxter RC. Mutagenesis of basic amino acids in the carboxyl-terminal region of insulin-like growth factor binding protein-5 affects acid-labile subunit binding. Endocrinology 2001; 142: 2147.
- [48] Twigg SM, Kiefer MC, Zapf J, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein 5 complexes with the acid-labile subunit. Role of the carboxyl-terminal domain. J Biol Chem 1998; 273: 28791-28798.
- [49] Booth BA, Boes M, Andress DL, Dake BL, Kiefer MC, Maack C, Linhardt RJ, Bar K, Caldwell EE, Weiler J, . IGFBP-3 and IGFBP-5 association with endothelial cells: role of C-terminal heparin binding domain. Growth Regul 1995; 5: 1-17.
- [50] Schedlich LJ, Le Page SL, Firth SM, Briggs LJ, Jans DA, Baxter RC. Nuclear import of insulin-like growth factor-binding protein-3 and -5 is mediated by the importin beta subunit. J Biol Chem 2000; 275: 23462-23470.
- [51] Weinzimer SA, Gibson TB, Collett-Solberg PF, Khare A, Liu B, Cohen P. Transferrin is an insulin-like growth factor-binding protein-3 binding protein. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 1806-1813.
- [52] Nam TJ, Busby W, Jr., Clemmons DR. Insulin-like growth factor binding protein-5 binds to plasminogen activator inhibitor-I. Endocrinology 1997; 138: 2972-2978.
- [53] Buckway CK, Wilson EM, Ahlsen M, Bang P, Oh Y, Rosenfeld RG. Mutation of three critical amino acids of the N-terminal domain of IGF-binding protein-3 essential for high affinity IGF binding. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 4943-4950.
- [54] Hong J, Zhang G, Dong F, Rechler MM. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 mutants that do not bind IGF-I or IGF-II stimulate apoptosis in human prostate cancer cells. J Biol Chem 2002; 277: 10489-10497.

- [55] Imai Y, Moralez A, Andag U, Clarke JB, Busby WH, Jr., Clemmons DR. Substitutions for hydrophobic amino acids in the N-terminal domains of IGFBP-3 and -5 markedly reduce IGF-I binding and alter their biologic actions. *J Biol Chem* 2000; 275: 18188-18194.
- [56] Zeslawski W, Beisel HG, Kamionka M, Kalus W, Engh RA, Huber R, Lang K, Holak TA. The interaction of insulin-like growth factor-I with the N-terminal domain of IGFBP-5. *EMBO J* 2001; 20: 3638-3644.
- [57] Ho PJ, Baxter RC. Characterization of truncated insulin-like growth factor-binding protein-2 in human milk. *Endocrinology* 1997; 138: 3811-3818.
- [58] Qin X, Strong DD, Baylink DJ, Mohan S. Structure-function analysis of the human insulin-like growth factor binding protein-4. *J Biol Chem* 1998; 273: 23509-23516.
- [59] Brinkman A, Kortleve DJ, Schuller AG, Zwarthoff EC, Drop SL. Site-directed mutagenesis of the N-terminal region of IGF binding protein 1; analysis of IGF binding capability. *FEBS Lett* 1991; 291: 264-268.
- [60] Carrick FE, Forbes BE, Wallace JC. BIAcore analysis of bovine insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-2 identifies major IGF binding site determinants in both the amino- and carboxyl-terminal domains. *J Biol Chem* 2001; 276: 27120-27128.
- [61] Standker L, Braulke T, Mark S, Mostafavi H, Meyer M, Honing S, Gimenez-Gallego G, Forssmann WG. Partial IGF affinity of circulating N- and C-terminal fragments of human insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) and the disulfide bonding pattern of the C-terminal IGFBP-4 domain. *Biochemistry* 2000; 39: 5082-5088.
- [62] Vorwerk P, Yamanaka Y, Spagnoli A, Oh Y, Rosenfeld RG. Insulin and IGF binding by IGFBP-3 fragments derived from proteolysis, baculovirus expression and normal human urine. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1392-1395.
- [63] Horney MJ, Evangelista CA, Rosenzweig SA. Synthesis and characterization of insulin-like growth factor (IGF)-1 photoprobes selective for the IGF-binding proteins (IGFBPS). photoaffinity labeling of the IGF-binding domain on IGFBP-2. *J Biol Chem* 2001; 276: 2880-2889.
- [64] Wang JF, Hampton B, Mehlman T, Burgess WH, Rechler MM. Isolation of a biologically active fragment from the carboxy terminus of the fetal rat binding protein for insulin-like growth factors. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 718-726.
- [65] Devi GR, Yang DH, Rosenfeld RG, Oh Y. Differential effects of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 and its proteolytic fragments on

ligand binding, cell surface association, and IGF-I receptor signaling. *Endocrinology* 2000; 141: 4171-4179.

- [66] Galanis M, Firth SM, Bond J, Nathanielsz A, Kortt AA, Hudson PJ, Baxter RC. Ligand-binding characteristics of recombinant amino- and carboxyl-terminal fragments of human insulin-like growth factor-binding protein-3. *J Endocrinol* 2001; 169: 123-133.
- [67] Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 2002; 23: 824-854.
- [68] Baxter RC, Martin JL. Structure of the Mr 140,000 growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex: determination by reconstitution and affinity-labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 6898-6902.
- [69] Baxter RC. Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: a review. *Horm Res* 1994; 42: 140-144.
- [70] Bach LA, Hsieh S, Sakano K, Fujiwara H, Perdue JF, Rechler MM. Towards identification of a binding site on insulin-like growth factor-II for IGF-binding proteins. *Adv Exp Med Biol* 1993; 343: 55-61.
- [71] Bach LA, Hsieh S, Sakano K, Fujiwara H, Perdue JF, Rechler MM. Binding of mutants of human insulin-like growth factor II to insulin-like growth factor binding proteins 1-6. *J Biol Chem* 1993; 268: 9246-9254.
- [72] Pova G, Enberg G, Jornvall H, Hall K. Isolation and characterization of a somatomedin-binding protein from mid-term human amniotic fluid. *Eur J Biochem* 1984; 144: 199-204.
- [73] Drop SL, Kortleve DJ, Guyda HJ, Posner BI. Immunoassay of a somatomedin-binding protein from human amniotic fluid: levels in fetal, neonatal, and adult sera. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59: 908-915.
- [74] Hall K, Lundin G, Pova G. Serum levels of the low molecular weight form of insulin-like growth factor binding protein in healthy subjects and patients with growth hormone deficiency, acromegaly and anorexia nervosa. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988; 118: 321-326.
- [75] Suikkari AM, Koivisto VA, Rutanen EM, Yki-Jarvinen H, Karonen SL, Seppala M. Insulin regulates the serum levels of low molecular weight insulin-like growth factor-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66: 266-272.
- [76] Suikkari AM, Koivisto VA, Koistinen R, Seppala M, Yki-Jarvinen H. Dose-response characteristics for suppression of low molecular weight

- plasma insulin-like growth factor-binding protein by insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 135-140.
- [77] Busby WH, Snyder DK, Clemmons DR. Radioimmunoassay of a 26,000-dalton plasma insulin-like growth factor-binding protein: control by nutritional variables. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 1225-1230.
- [78] Brismar K, Gutniak M, Pova G, Werner S, Hall K. Insulin regulates the 35 kDa IGF binding protein in patients with diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest* 1988; 11: 599-602.
- [79] Suikkari AM, Sane T, Seppala M, Yki-Jarvinen H, Karonen SL, Koivisto VA. Prolonged exercise increases serum insulin-like growth factor-binding protein concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 141-144.
- [80] Cotterill AM, Cowell CT, Baxter RC, McNeil D, Silinik M. Regulation of the growth hormone-independent growth factor-binding protein in children. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 882-887.
- [81] Seneviratne C, Luo JM, Murphy LJ. Transcriptional regulation of rat insulin-like growth factor-binding protein-1 expression by growth hormone. *Mol Endocrinol* 1990; 4: 1199-1204.
- [82] Orlowski CC, Ooi GT, Rechler MM. Dexamethasone stimulates transcription of the insulin-like growth factor-binding protein-1 gene in H4-II-E rat hepatoma cells. *Mol Endocrinol* 1990; 4: 1592-1599.
- [83] Orlowski CC, Ooi GT, Brown DR, Yang YW, Tseng LY, Rechler MM. Insulin rapidly inhibits insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression in H4-II-E rat hepatoma cells. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1180-1187.
- [84] Unterman TG, Oehler DT, Murphy LJ, Lacson RG. Multihormonal regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in rat H4IIE hepatoma cells: the dominant role of insulin. *Endocrinology* 1991; 128: 2693-2701.
- [85] Unterman TG, Lacson RG, Jentel JJ, Oehler DT. Divergent effects of phorbol esters and insulin on insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) production and mRNA in rat H4IIE hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 182: 262-268.
- [86] Villafuerte BC, Goldstein S, Murphy LJ, Phillips LS. Nutrition and somatomedin. XXV. Regulation of insulinlike growth factor binding protein 1 in primary cultures of normal rat hepatocytes. *Diabetes* 1991; 40: 837-841.

- [87] Lewitt MS, Baxter RC. Regulation of growth hormone-independent insulin-like growth factor-binding protein (BP-28) in cultured human fetal liver explants. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69: 246-252.
- [88] Lewitt MS, Baxter RC. Inhibitors of glucose uptake stimulate the production of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-1) by human fetal liver. *Endocrinology* 1990; 126: 1527-1533.
- [89] Conover CA, Lee PD. Insulin regulation of insulin-like growth factor-binding protein production in cultured HepG2 cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 1062-1067.
- [90] Lewitt MS, Baxter RC. Cytochalasin B stimulates insulin-like growth factor-binding protein-1 production by Hep G2 cells. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 77: 149-157.
- [91] Powell DR, Suwanichkul A, Cabbage ML, DePaolis LA, Snuggs MB, Lee PD. Insulin inhibits transcription of the human gene for insulin-like growth factor-binding protein-1. *J Biol Chem* 1991; 266: 18868-18876.
- [92] Ehrenborg E, Larsson C, Stern I, Janson M, Powell DR, Luthman H. Contiguous localization of the genes encoding human insulin-like growth factor binding proteins 1 (IGBP1) and 3 (IGBP3) on chromosome 7. *Genomics* 1992; 12: 497-502.
- [93] Ekstrand J, Ehrenborg E, Stern I, Stellan B, Zech L, Luthman H. The gene for insulin-like growth factor-binding protein-1 is localized to human chromosomal region 7p14-p12. *Genomics* 1990; 6: 413-418.
- [94] Brinkman A, Groffen CA, Kortleve DJ, Drop SL. Organization of the gene encoding the insulin-like growth factor binding protein IBP-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 898-907.
- [95] Suwanichkul A, Cabbage ML, Powell DR. The promoter of the human gene for insulin-like growth factor binding protein-1. Basal promoter activity in HEP G2 cells depends upon liver factor B1. *J Biol Chem* 1990; 265: 21185-21193.
- [96] Mendel DB, Crabtree GR. HNF-1, a member of a novel class of dimerizing homeodomain proteins. *J Biol Chem* 1991; 266: 677-680.
- [97] Montminy MR, Gonzalez GA, Yamamoto KK. Characteristics of the cAMP response unit. *Recent Prog Horm Res* 1990; 46: 219-229.
- [98] Suwanichkul A, Allander SV, Morris SL, Powell DR. Glucocorticoids and insulin regulate expression of the human gene for insulin-like growth factor-binding protein-1 through proximal promoter elements. *J Biol Chem* 1994; 269: 30835-30841.

- [99] Goswami R, Lacson R, Yang E, Sam R, Unterman T. Functional analysis of glucocorticoid and insulin response sequences in the rat insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter. *Endocrinology* 1994; 134: 736-743.
- [100] Suwanickul A, Morris SL, Powell DR. Identification of an insulin-responsive element in the promoter of the human gene for insulin-like growth factor binding protein-1. *J Biol Chem* 1993; 268: 17063-17068.
- [101] O'Brien RM, Lucas PC, Forest CD, Magnuson MA, Granner DK. Identification of a sequence in the PEPCK gene that mediates a negative effect of insulin on transcription. *Science* 1990; 249: 533-537.
- [102] O'Brien RM, Bonovich MT, Forest CD, Granner DK. Signal transduction convergence: phorbol esters and insulin inhibit phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription through the same 10-base-pair sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 6580-6584.
- [103] O'Brien RM, Granner DK. PEPCK gene as model of inhibitory effects of insulin on gene transcription. *Diabetes Care* 1990; 13: 327-339.
- [104] Lewitt MS, Denyer GS, Cooney GJ, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-1 modulates blood glucose levels. *Endocrinology* 1991; 129: 2254-2256.
- [105] Bang P, Westgren M, Schwander J, Blum WF, Rosenfeld RG, Stangenberg M. Ontogeny of insulin-like growth factor-binding protein-1, -2, and -3: quantitative measurements by radioimmunoassay in human fetal serum. *Pediatr Res* 1994; 36: 528-536.
- [106] Clemmons DR, Snyder DK, Busby WH, Jr. Variables controlling the secretion of insulin-like growth factor binding protein-2 in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 727-733.
- [107] Young SC, Clemmons DR. Changes in insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins after IGF-I injections in noninsulin-dependent diabetics. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 609-614.
- [108] Zapf J. Role of insulin-like growth factor II and IGF binding proteins in extrapancreatic tumor hypoglycemia. *Horm Res* 1994; 42: 20-26.
- [109] Ernst CW, McCusker RH, White ME. Gene expression and secretion of insulin-like growth factor-binding proteins during myoblast differentiation. *Endocrinology* 1992; 130: 607-615.
- [110] Ernst CW, McFarland DC, White ME. Expression of insulin-like growth factor II (IGF-II), IGF binding protein-2 and myogenin during

differentiation of myogenic satellite cells derived from the turkey. *Differentiation* 1996; 61: 25-33.

- [111] Boni-Schnetzler M, Schmid C, Mary JL, Zimmerli B, Meier PJ, Zapf J, Schwander J, Froesch ER. Insulin regulates the expression of the insulin-like growth factor binding protein 2 mRNA in rat hepatocytes. *Mol Endocrinol* 1990; 4: 1320-1326.
- [112] Schmid C, Schlapfer I, Waldvogel M, Meier PJ, Schwander J, Boni-Schnetzler M, Zapf J, Froesch ER. Differential regulation of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-2 mRNA in liver and bone cells by insulin and retinoic acid in vitro. *FEBS Lett* 1992; 303: 205-209.
- [113] Agarwal N, Hsieh CL, Sills D, Swaroop M, Desai B, Francke U, Swaroop A. Sequence analysis, expression and chromosomal localization of a gene, isolated from a subtracted human retina cDNA library, that encodes an insulin-like growth factor binding protein (IGFBP2). *Exp Eye Res* 1991; 52: 549-561.
- [114] Ehrenborg E, Vilhelmsdotter S, Bajalica S, Larsson C, Stern I, Koch J, Brondum-Nielsen K, Luthman H. Structure and localization of the human insulin-like growth factor-binding protein 2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176: 1250-1255.
- [115] Binkert C, Margot JB, Landwehr J, Heinrich G, Schwander J. Structure of the human insulin-like growth factor binding protein-2 gene. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 826-836.
- [116] Boisclair YR, Brown AL, Casola S, Rechler MM. Three clustered Sp1 sites are required for efficient transcription of the TATA-less promoter of the gene for insulin-like growth factor-binding protein-2 from the rat. *J Biol Chem* 1993; 268: 24892-24901.
- [117] Kutoh E, Margot JB, Schwander J. Genomic structure and regulation of the promoter of the rat insulin-like growth factor binding protein-2 gene. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 1205-1216.
- [118] Campbell PG, Novak JF. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) inhibits IGF action on human osteosarcoma cells. *J Cell Physiol* 1991; 149: 293-300.
- [119] Mohan S, Bautista CM, Wergedal J, Baylink DJ. Isolation of an inhibitory insulin-like growth factor (IGF) binding protein from bone cell-conditioned medium: a potential local regulator of IGF action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 8338-8342.

- [120] Cerro JA, Grewal A, Wood TL, Pintar JE. Tissue-specific expression of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) mRNAs in mouse and rat development. *Regul Pept* 1993; 48: 189-198.
- [121] Shimasaki S, Uchiyama F, Shimonaka M, Ling N. Molecular cloning of the cDNAs encoding a novel insulin-like growth factor-binding protein from rat and human. *Mol Endocrinol* 1990; 4: 1451-1458.
- [122] LaTour D, Mohan S, Linkhart TA, Baylink DJ, Strong DD. Inhibitory insulin-like growth factor-binding protein: cloning, complete sequence, and physiological regulation. *Mol Endocrinol* 1990; 4: 1806-1814.
- [123] Rosen CJ, Donahue LR, Hunter SJ. Insulin-like growth factors and bone: the osteoporosis connection. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 206: 83-102.
- [124] Di Battista JA, Dore S, Morin N, He Y, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Prostaglandin E2 stimulates insulin-like growth factor binding protein-4 expression and synthesis in cultured human articular chondrocytes: possible mediation by Ca(++)-calmodulin regulated processes. *J Cell Biochem* 1997; 65: 408-419.
- [125] Kudo Y, Iwashita M, Iguchi T, Takeda Y, Hizuka N, Takano K, Muraki T. Estrogen and parathyroid hormone regulate insulin-like growth factor binding protein-4 in SaOS-2 cells. *Life Sci* 1997; 61: 165-170.
- [126] Glantschnig H, Varga F, Klaushofer K. Thyroid hormone and retinoic acid induce the synthesis of insulin-like growth factor-binding protein-4 in mouse osteoblastic cells. *Endocrinology* 1996; 137: 281-286.
- [127] Allander SV, Bajalica S, Larsson C, Luthman H, Powell DR, Stern I, Weber G, Zazzi H, Ehrenborg E. Structure and chromosomal localization of human insulin-like growth factor-binding protein genes. *Growth Regul* 1993; 3: 3-5.
- [128] Bajalica S, Allander SV, Ehrenborg E, Brondum-Nielsen K, Luthman H, Larsson C. Localization of the human insulin-like growth-factor-binding protein 4 gene to chromosomal region 17q12-21.1. *Hum Genet* 1992; 89: 234-236.
- [129] Qin X, Morales S, Lee KW, Boonyaratanakornkit V, Baylink DJ, Mohan S, Strong DD. Structural and functional analysis of the 5'-flanking region of the human insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 gene. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1350: 136-140.
- [130] Dai B, Widen SG, Mifflin R, Singh P. Cloning of the functional promoter for human insulin-like growth factor binding protein-4 gene: endogenous regulation. *Endocrinology* 1997; 138: 332-343.

- [131] Mohan S, Libanati C, Dony C, Lang K, Srinivasan N, Baylink DJ. Development, validation, and application of a radioimmunoassay for insulin-like growth factor binding protein-5 in human serum and other biological fluids. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2638-2645.
- [132] Mohan S, Farley JR, Baylink DJ. Age-related changes in IGFBP-4 and IGFBP-5 levels in human serum and bone: implications for bone loss with aging. *Prog Growth Factor Res* 1995; 6: 465-473.
- [133] Baxter RC, Meka S, Firth SM. Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 271-276.
- [134] Dong Y, Canalis E. Insulin-like growth factor (IGF) I and retinoic acid induce the synthesis of IGF-binding protein 5 in rat osteoblastic cells. *Endocrinology* 1995; 136: 2000-2006.
- [135] Franchimont N, Durant D, Canalis E. Interleukin-6 and its soluble receptor regulate the expression of insulin-like growth factor binding protein-5 in osteoblast cultures. *Endocrinology* 1997; 138: 3380-3386.
- [136] McCarthy TL, Casinghino S, Mittanck DW, Ji CH, Centrella M, Rotwein P. Promoter-dependent and -independent activation of insulin-like growth factor binding protein-5 gene expression by prostaglandin E2 in primary rat osteoblasts. *J Biol Chem* 1996; 271: 6666-6671.
- [137] Pash JM, Canalis E. Transcriptional regulation of insulin-like growth factor-binding protein-5 by prostaglandin E2 in osteoblast cells. *Endocrinology* 1996; 137: 2375-2382.
- [138] Canalis E, Gabbitas B. Skeletal growth factors regulate the synthesis of insulin-like growth factor binding protein-5 in bone cell cultures. *J Biol Chem* 1995; 270: 10771-10776.
- [139] Gabbitas B, Pash JM, Delany AM, Canalis E. Cortisol inhibits the synthesis of insulin-like growth factor-binding protein-5 in bone cell cultures by transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 1996; 271: 9033-9038.
- [140] Duan C, Hawes SB, Pevette T, Clemmons DR. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) regulates IGF-binding protein-5 synthesis through transcriptional activation of the gene in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 4280-4288.
- [141] James PL, Jones SB, Busby WH, Jr., Clemmons DR, Rotwein P. A highly conserved insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-5) is expressed during myoblast differentiation. *J Biol Chem* 1993; 268: 22305-22312.

- [142] Rotwein P, James PL, Kou K. Rapid activation of insulin-like growth factor binding protein-5 gene transcription during myoblast differentiation. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 913-923.
- [143] Allander SV, Larsson C, Ehrenborg E, Suwanichkul A, Weber G, Morris SL, Bajalica S, Kiefer MC, Luthman H, Powell DR. Characterization of the chromosomal gene and promoter for human insulin-like growth factor binding protein-5. *J Biol Chem* 1994; 269: 10891-10898.
- [144] Kou K, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Rotwein P. Organization, expression, and chromosomal location of the mouse insulin-like growth factor binding protein 5 gene. *Genomics* 1994; 20: 412-418.
- [145] Zhu X, Ling N, Shimasaki S. Cloning of the rat insulin-like growth factor binding protein-5 gene and DNA sequence analysis of its promoter region. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 190: 1045-1052.
- [146] Duan C, Clemmons DR. Transcription factor AP-2 regulates human insulin-like growth factor binding protein-5 gene expression. *J Biol Chem* 1995; 270: 24844-24851.
- [147] Zapf J, Kiefer M, Merryweather J, Musiarz F, Bauer D, Born W, Fischer JA, Froesch ER. Isolation from adult human serum of four insulin-like growth factor (IGF) binding proteins and molecular cloning of one of them that is increased by IGF I administration and in extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Biol Chem* 1990; 265: 14892-14898.
- [148] Roghani M, Lassarre C, Zapf J, Pova G, Binoux M. Two insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins are responsible for the selective affinity for IGF-II of cerebrospinal fluid binding proteins. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 658-666.
- [149] Martin JL, Willetts KE, Baxter RC. Purification and properties of a novel insulin-like growth factor-II binding protein from transformed human fibroblasts. *J Biol Chem* 1990; 265: 4124-4130.
- [150] Forbes B, Ballard FJ, Wallace JC. An insulin-like growth factor-binding protein purified from medium conditioned by a human lung fibroblast cell line (He[39]L) has a novel N-terminal sequence. *J Endocrinol* 1990; 126: 497-506.
- [151] Andress DL, Birnbaum RS. A novel human insulin-like growth factor binding protein secreted by osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176: 213-218.
- [152] Shimasaki S, Gao L, Shimonaka M, Ling N. Isolation and molecular cloning of insulin-like growth factor-binding protein-6. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 938-948.

- [153] Rohan RM, Ricciarelli E, Kiefer MC, Resnick CE, Adashi EY. Rat ovarian insulin-like growth factor-binding protein-6: a hormonally regulated theca-interstitial-selective species with limited antigonadotropic activity. *Endocrinology* 1993; 132: 2507-2512.
- [154] Gabbitas B, Canalis E. Retinoic acid stimulates the transcription of insulin-like growth factor binding protein-6 in skeletal cells. *J Cell Physiol* 1996; 169: 15-22.
- [155] Gabbitas B, Canalis E. Cortisol enhances the transcription of insulin-like growth factor-binding protein-6 in cultured osteoblasts. *Endocrinology* 1996; 137: 1687-1692.
- [156] Ehrenborg E, Zazzi H, Lagercrantz S, Granqvist M, Hillerbrand U, Allander SV, Larsson C, Luthman H. Characterization and chromosomal localization of the human insulin-like growth factor-binding protein 6 gene. *Mamm Genome* 1999; 10: 376-380.
- [157] Baxter RC. Circulating levels and molecular distribution of the acid-labile (alpha) subunit of the high molecular weight insulin-like growth factor-binding protein complex. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 1347-1353.
- [158] Lewitt MS, Scott FP, Clarke NM, Baxter RC. Developmental regulation of circulating insulin-like growth factor-binding proteins in normal pregnancies and in pre-eclampsia. *Prog Growth Factor Res* 1995; 6: 475-480.
- [159] Chin E, Zhou J, Dai J, Baxter RC, Bondy CA. Cellular localization and regulation of gene expression for components of the insulin-like growth factor ternary binding protein complex. *Endocrinology* 1994; 134: 2498-2504.
- [160] Dai J, Baxter RC. Regulation in vivo of the acid-labile subunit of the rat serum insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology* 1994; 135: 2335-2341.
- [161] Gargosky SE, Tapanainen P, Rosenfeld RG. Administration of growth hormone (GH), but not insulin-like growth factor-I (IGF-I), by continuous infusion can induce the formation of the 150-kilodalton IGF-binding protein-3 complex in GH-deficient rats. *Endocrinology* 1994; 134: 2267-2276.
- [162] Gargosky SE, Wilson KF, Fielder PJ, Vaccarello MA, Guevara-Aguirre J, Diamond FB, Baxter RC, Rosenbloom AL, Rosenfeld RG. The composition and distribution of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins (IGFBPs) in the serum of growth hormone receptor-deficient patients: effects of IGF-I therapy on IGFBP-3. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1683-1689.

- [163] Kupfer SR, Underwood LE, Baxter RC, Clemmons DR. Enhancement of the anabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor I by use of both agents simultaneously. *J Clin Invest* 1993; 91: 391-396.
- [164] Bereket A, Wilson TA, Blethen SL, Sakurai Y, Herndon DN, Wolfe RR, Lang CH. Regulation of the acid-labile subunit of the insulin-like growth factor ternary complex in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and severe burns. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996; 44: 525-532.
- [165] Fukuda I, Hotta M, Hizuka N, Takano K, Ishikawa Y, sakawa-Yasumoto K, Tagami E, Demura H. Decreased serum levels of acid-labile subunit in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2034-2036.
- [166] Lang CH, Fan J, Frost RA, Gelato MC, Sakurai Y, Herndon DN, Wolfe RR. Regulation of the insulin-like growth factor system by insulin in burn patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2474-2480.
- [167] Lang CH, Liu X, Nystrom GJ, Frost RA. Acute response of IGF-I and IGF binding proteins induced by thermal injury. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E1087-E1096.
- [168] Moller S, Juul A, Becker U, Henriksen JH. The acid-labile subunit of the ternary insulin-like growth factor complex in cirrhosis: relation to liver dysfunction. *J Hepatol* 2000; 32: 441-446.
- [169] Oster MH, Levin N, Fielder PJ, Robinson IC, Baxter RC, Cronin MJ. Developmental differences in the IGF-I system response to severe and chronic calorie malnutrition. *Am J Physiol* 1996; 270: E646-E653.
- [170] Dai J, Scott CD, Baxter RC. Regulation of the acid-labile subunit of the insulin-like growth factor complex in cultured rat hepatocytes. *Endocrinology* 1994; 135: 1066-1072.
- [171] Delhanty PJ, Baxter RC. The regulation of acid-labile subunit gene expression and secretion by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 1998; 139: 260-265.
- [172] Boisclair YR, Seto D, Hsieh S, Hurst KR, Ooi GT. Organization and chromosomal localization of the gene encoding the mouse acid labile subunit of the insulin-like growth factor binding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 10028-10033.
- [173] Suwanichkul A, Boisclair YR, Olney RC, Durham SK, Powell DR. Conservation of a growth hormone-responsive promoter element in the human and mouse acid-labile subunit genes. *Endocrinology* 2000; 141: 833-838.

- [174] Delhanty PJ, Baxter RC. Cloning and characterization of the rat gene for the acid-labile subunit of the insulin-like growth factor binding protein complex. *J Mol Endocrinol* 1997; 19: 267-277.
- [175] Schindler C. Cytokine signal transduction. *Receptor* 1995; 5: 51-62.
- [176] Rhoads RP, Greenwood PL, Bell AW, Boisclair YR. Organization and regulation of the gene encoding the sheep acid-labile subunit of the 150-kilodalton insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology* 2000; 141: 1425-1433.
- [177] Baxter RC, Martin JL. Radioimmunoassay of growth hormone-dependent insulinlike growth factor binding protein in human plasma. *J Clin Invest* 1986; 78: 1504-1512.
- [178] Blum WF, Ranke MB, Kietzmann K, Gauggel E, Zeisel HJ, Bierich JR. A specific radioimmunoassay for the growth hormone (GH)-dependent somatomedin-binding protein: its use for diagnosis of GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 1292-1298.
- [179] Donovan SM, Oh Y, Pham H, Rosenfeld RG. Ontogeny of serum insulin-like growth factor binding proteins in the rat. *Endocrinology* 1989; 125: 2621-2627.
- [180] Guler HP, Zapf J, Schmid C, Froesch ER. Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989; 121: 753-758.
- [181] Arany E, Afford S, Strain AJ, Winwood PJ, Arthur MJ, Hill DJ. Differential cellular synthesis of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) and IGFBP-3 within human liver. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1871-1876.
- [182] Juul A, Dalgaard P, Blum WF, Bang P, Hall K, Michaelsen KF, Muller J, Skakkebaek NE. Serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) in healthy infants, children, and adolescents: the relation to IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, age, sex, body mass index, and pubertal maturation. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2534-2542.
- [183] Holman SR, Baxter RC. Insulin-like growth factor binding protein-3: factors affecting binary and ternary complex formation. *Growth Regul* 1996; 6: 42-47.
- [184] Baxter RC. Glycosaminoglycans inhibit formation of the 140 kDa insulin-like growth factor-binding protein complex. *Biochem J* 1990; 271: 773-777.

- [185] Fowlkes JL, Serra DM. Characterization of glycosaminoglycan-binding domains present in insulin-like growth factor-binding protein-3. *J Biol Chem* 1996; 271: 14676-14679.
- [186] Smith EP, Lu L, Chernausek SD, Klein DJ. Insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) concentration in rat Sertoli cell-conditioned medium is regulated by a pathway involving association of IGFBP-3 with cell surface proteoglycans. *Endocrinology* 1994; 135: 359-364.
- [187] Campbell PG, Durham SK, Suwanichkul A, Hayes JD, Powell DR. Plasminogen binds the heparin-binding domain of insulin-like growth factor-binding protein-3. *Am J Physiol* 1998; 275: E321-E331.
- [188] Campbell PG, Durham SK, Hayes JD, Suwanichkul A, Powell DR. Insulin-like growth factor-binding protein-3 binds fibrinogen and fibrin. *J Biol Chem* 1999; 274: 30215-30221.
- [189] Zapf J, Schoenle E, Jagars G, Sand I, Grunwald J, Froesch ER. Inhibition of the action of nonsuppressible insulin-like activity on isolated rat fat cells by binding to its carrier protein. *J Clin Invest* 1979; 63: 1077-1084.
- [190] De Mellow JS, Baxter RC. Growth hormone-dependent insulin-like growth factor (IGF) binding protein both inhibits and potentiates IGF-I-stimulated DNA synthesis in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 156: 199-204.
- [191] Okajima T, Iwashita M, Takeda Y, Sakamoto S, Tanabe T, Yasuda T, Rosenfeld RG. Inhibitory effects of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins-1 and -3 on IGF-activated glucose consumption in mouse BALB/c 3T3 fibroblasts. *J Endocrinol* 1993; 136: 457-470.
- [192] Mohseni-Zadeh S, Binoux M. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 interacts with the type 1 IGF receptor, reducing the affinity of the receptor for its ligand: an alternative mechanism in the regulation of IGF action. *Endocrinology* 1997; 138: 5645-5648.
- [193] Conover CA. Glycosylation of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) is not required for potentiation of IGF-I action: evidence for processing of cell-bound IGFBP-3. *Endocrinology* 1991; 129: 3259-3268.
- [194] Conover CA. Potentiation of insulin-like growth factor (IGF) action by IGF-binding protein-3: studies of underlying mechanism. *Endocrinology* 1992; 130: 3191-3199.
- [195] Karas M, Danilenko M, Fishman D, LeRoith D, Levy J, Sharoni Y. Membrane-associated insulin-like growth factor-binding protein-3 inhibits insulin-like growth factor-I-induced insulin-like growth factor-I receptor

signaling in ishikawa endometrial cancer cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 16514-16520.

- [196] Chen JC, Shao ZM, Sheikh MS, Hussain A, LeRoith D, Roberts CT, Jr., Fontana JA. Insulin-like growth factor-binding protein enhancement of insulin-like growth factor-I (IGF-I)-mediated DNA synthesis and IGF-I binding in a human breast carcinoma cell line. *J Cell Physiol* 1994; 158: 69-78.
- [197] Conover CA, Powell DR. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 blocks IGF-I-induced receptor down-regulation and cell desensitization in cultured bovine fibroblasts. *Endocrinology* 1991; 129: 710-716.
- [198] Conover CA, Bale LK, Durham SK, Powell DR. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 potentiation of IGF action is mediated through the phosphatidylinositol-3-kinase pathway and is associated with alteration in protein kinase B/AKT sensitivity. *Endocrinology* 2000; 141: 3098-3103.
- [199] Perks CM, McCaig C, Clarke JB, Clemmons DR, Holly JM. A non-IGF binding mutant of IGFBP-3 modulates cell function in breast epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 988-994.
- [200] Colston KW, Perks CM, Xie SP, Holly JM. Growth inhibition of both MCF-7 and Hs578T human breast cancer cell lines by vitamin D analogues is associated with increased expression of insulin-like growth factor binding protein-3. *J Mol Endocrinol* 1998; 20: 157-162.
- [201] Boyle BJ, Zhao XY, Cohen P, Feldman D. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates 1 alpha,25-dihydroxyvitamin d(3) growth inhibition in the LNCaP prostate cancer cell line through p21/WAF1. *J Urol* 2001; 165: 1319-1324.
- [202] Rajah R, Valentinis B, Cohen P. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem* 1997; 272: 12181-12188.
- [203] Butt AJ, Firth SM, King MA, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-3 modulates expression of Bax and Bcl-2 and potentiates p53-independent radiation-induced apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 39174-39181.
- [204] Hollowood AD, Lai T, Perks CM, Newcomb PV, Alderson D, Holly JM. IGFBP-3 prolongs the p53 response and enhances apoptosis following UV irradiation. *Int J Cancer* 2000; 88: 336-341.
- [205] Lee DY, Yi HK, Hwang PH, Oh Y. Enhanced expression of insulin-like growth factor binding protein-3 sensitizes the growth inhibitory effect of

- anticancer drugs in gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 480-486.
- [206] Williams AC, Collard TJ, Perks CM, Newcomb P, Moorghen M, Holly JM, Paraskeva C. Increased p53-dependent apoptosis by the insulin-like growth factor binding protein IGFBP-3 in human colonic adenoma-derived cells. *Cancer Res* 2000; 60: 22-27.
- [207] Zadeh SM, Binoux M. The 16-kDa proteolytic fragment of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the mitogenic action of fibroblast growth factor on mouse fibroblasts with a targeted disruption of the type 1 IGF receptor gene. *Endocrinology* 1997; 138: 3069-3072.
- [208] Bernard L, Babajko S, Binoux M, Ricort JM. The amino-terminal region of insulin-like growth factor binding protein-3, (1-95)IGFBP-3, induces apoptosis of MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 55-60.
- [209] Modric T, Silha JV, Shi Z, Gui Y, Suwanichkul A, Durham SK, Powell DR, Murphy LJ. Phenotypic manifestations of insulin-like growth factor-binding protein-3 overexpression in transgenic mice. *Endocrinology* 2001; 142: 1958-1967.
- [210] Silha JV, Gui Y, Murphy LJ. Impaired glucose homeostasis in insulin-like growth factor-binding protein-3-transgenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E937-E945.
- [211] Silha JV, Murphy LJ. Insights from insulin-like growth factor binding protein transgenic mice. *Endocrinology* 2002; 143: 3711-3714.
- [212] Murphy LJ, Molnar P, Lu X, Huang H. Expression of human insulin-like growth factor-binding protein-3 in transgenic mice. *J Mol Endocrinol* 1995; 15: 293-303.
- [213] Silha JV, Mishra S, Rosen CJ, Beamer WG, Turner RT, Powell DR, Murphy LJ. Perturbations in bone formation and resorption in insulin-like growth factor binding protein-3 transgenic mice. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 1834-1841.
- [214] Neuenschwander S, Schwartz A, Wood TL, Roberts CT, Jr., Hennighausen L, LeRoith D. Involution of the lactating mammary gland is inhibited by the IGF system in a transgenic mouse model. *J Clin Invest* 1996; 97: 2225-2232.
- [215] Argente J, Barrios V, Pozo J, Munoz MT, Hervas F, Stene M, Hernandez M. Normative data for insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins, and growth hormone-binding protein in a healthy Spanish

pediatric population: age- and sex-related changes. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1522-1528.

- [216] Juul A, Scheike T, Nielsen CT, Krabbe S, Muller J, Skakkebaek NE. Serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein 3 levels are increased in central precocious puberty: effects of two different treatment regimens with gonadotropin-releasing hormone agonists, without or in combination with an antiandrogen (cyproterone acetate). *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3059-3067.
- [217] Juul A, Flyvbjerg A, Frystyk J, Muller J, Skakkebaek NE. Serum concentrations of free and total insulin-like growth factor-I, IGF binding proteins -1 and -3 and IGFBP-3 protease activity in boys with normal or precocious puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996; 44: 515-523.
- [218] Blum WF, bertsson-Wikland K, Rosberg S, Ranke MB. Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 1610-1616.
- [219] Martha PM, Jr., Rogol AD, Veldhuis JD, Blizzard RM. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. III. The neuroendocrine growth hormone axis during late prepuberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4068-4074.
- [220] Rose SR, Municchi G, Barnes KM, Kamp GA, Uriarte MM, Ross JL, Cassorla F, Cutler GB, Jr. Spontaneous growth hormone secretion increases during puberty in normal girls and boys. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 428-435.
- [221] Juul A, Main K, Blum WF, Lindholm J, Ranke MB, Skakkebaek NE. The ratio between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healthy adults and is increased in acromegalic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994; 41: 85-93.
- [222] Juul A, Bang P, Hertel NT, Main K, Dalgaard P, Jorgensen K, Muller J, Hall K, Skakkebaek NE. Serum insulin-like growth factor-I in 1030 healthy children, adolescents, and adults: relation to age, sex, stage of puberty, testicular size, and body mass index. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 744-752.
- [223] Ghigo E, Aimaretti G, Maccario M, Fanciulli G, Arvat E, Minuto F, Giordano G, Delitala G, Camanni F. Dose-response study of GH effects on circulating IGF-I and IGFBP-3 levels in healthy young men and women. *Am J Physiol* 1999; 276: E1009-E1013.

- [224] Blum WF, Ranke MB. Use of insulin-like growth factor-binding protein 3 for the evaluation of growth disorders. *Horm Res* 1990; 33 Suppl 4: 31-37.
- [225] Laron Z, Klinger B, Blum WF, Silbergeld A, Ranke MB. IGF binding protein 3 in patients with Laron type dwarfism: effect of exogenous rIGF-I. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1992; 36: 301-304.
- [226] Wang HS, Cheng BJ, Soong YK. Serum levels of insulin-like growth factor-binding protein-3 in normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995; 61: 157-160.
- [227] Suikkari AM, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-3 is functionally normal in pregnancy serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 177-183.
- [228] Wang HS, Lee JD, Cheng BJ, Soong YK. Insulin-like growth factor-binding protein 1 and insulin-like growth factor-binding protein 3 in pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103: 654-659.
- [229] Jehle PM, Jehle DR, Mohan S, Bohm BO. Serum levels of insulin-like growth factor system components and relationship to bone metabolism in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus patients. *J Endocrinol* 1998; 159: 297-306.
- [230] Watanabe T, Itokawa M, Nakagawa Y, Iguchi T, Katagiri T. Increased levels of insulin-like growth factor binding protein-3 in hypertensive patients with carotid atherosclerosis. *Am J Hypertens* 2003; 16: 754-760.
- [231] Wabitsch M, Blum WF, Mucic R, Heinze E, Haug C, Mayer H, Teller W. Insulin-like growth factors and their binding proteins before and after weight loss and their associations with hormonal and metabolic parameters in obese adolescent girls. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996; 20: 1073-1080.
- [232] Kratzsch J, Blum WF, Schenker E, Keller E. Regulation of growth hormone (GH), insulin-like growth factor (IGF)I, IGF binding proteins -1, -2, -3 and GH binding protein during progression of liver cirrhosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1995; 103: 285-291.
- [233] Lee PD, Hintz RL, Sperry JB, Baxter RC, Powell DR. IGF binding proteins in growth-retarded children with chronic renal failure. *Pediatr Res* 1989; 26: 308-315.
- [234] Bang P, Brandt J, Degerblad M, Enberg G, Kaijser L, Thoren M, Hall K. Exercise-induced changes in insulin-like growth factors and their low molecular weight binding protein in healthy subjects and patients with growth hormone deficiency. *Eur J Clin Invest* 1990; 20: 285-292.

- [235] Schwarz AJ, Brasel JA, Hintz RL, Mohan S, Cooper DM. Acute effect of brief low- and high-intensity exercise on circulating insulin-like growth factor (IGF) I, II, and IGF-binding protein-3 and its proteolysis in young healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3492-3497.
- [236] Bang P, Degerblad M, Thoren M, Schwander J, Blum W, Hall K. Insulin-like growth factor (IGF) I and II and IGF binding protein (IGFBP) 1, 2 and 3 in serum from patients with Cushing's syndrome. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1993; 128: 397-404.
- [237] Gucev ZS, Oh Y, Kelley KM, Labarta JI, Vorwerk P, Rosenfeld RG. Evidence for insulin-like growth factor (IGF)-independent transcriptional regulation of IGF binding protein-3 by growth hormone in SKHEP-1 human hepatocarcinoma cells. *Endocrinology* 1997; 138: 1464-1470.
- [238] Villafuerte BC, Koop BL, Pao CI, Gu L, Birdsong GG, Phillips LS. Coculture of primary rat hepatocytes and nonparenchymal cells permits expression of insulin-like growth factor binding protein-3 in vitro. *Endocrinology* 1994; 134: 2044-2050.
- [239] Villafuerte BC, Zhang WN, Phillips LS. Insulin and insulin-like growth factor-I regulate hepatic insulin-like growth factor binding protein-3 by different mechanisms. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 622-630.
- [240] Kalme T, Loukovaara M, Koistinen H, Koistinen R, Seppala M, Leinonen P. Factors regulating insulin-like growth factor binding protein-3 secretion from human hepatoma (HepG2) cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 78: 131-135.
- [241] Bale LK, Conover CA. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 messenger ribonucleic acid expression by insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1992; 131: 608-614.
- [242] Huynh H, Yang X, Pollak M. Estradiol and antiestrogens regulate a growth inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3 autocrine loop in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 1016-1021.
- [243] Martin JL, Coverley JA, Pattison ST, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-3 production by MCF-7 breast cancer cells: stimulation by retinoic acid and cyclic adenosine monophosphate and differential effects of estradiol. *Endocrinology* 1995; 136: 1219-1226.
- [244] Chan TW, Pollak M, Huynh H. Inhibition of insulin-like growth factor signaling pathways in mammary gland by pure antiestrogen ICI 182,780. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2545-2554.

- [245] Villafuerte BC, Koop BL, Pao CI, Phillips LS. Glucocorticoid regulation of insulin-like growth factor-binding protein-3. *Endocrinology* 1995; 136: 1928-1933.
- [246] Besset V, Le Magueresse-Battistoni B, Collette J, Benahmed M. Tumor necrosis factor alpha stimulates insulin-like growth factor binding protein 3 expression in cultured porcine Sertoli cells. *Endocrinology* 1996; 137: 296-303.
- [247] Srinivasan N, Baylink DJ, Sampath K, Mohan S. Effects of inhibitors of signal transduction pathways on transforming growth factor beta1 and osteogenic protein-1-induced insulinlike growth factor binding protein-3 expression in human bone cells. *J Cell Physiol* 1997; 173: 28-35.
- [248] Shang Y, Baumrucker CR, Green MH. Signal relay by retinoic acid receptors alpha and beta in the retinoic acid-induced expression of insulin-like growth factor-binding protein-3 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 18005-18010.
- [249] Moriwake T, Tanaka H, Kanzaki S, Higuchi J, Seino Y. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates the secretion of insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) by cultured human osteosarcoma cells. *Endocrinology* 1992; 130: 1071-1073.
- [250] Collard TJ, Guy M, Butt AJ, Perks CM, Holly JM, Paraskeva C, Williams AC. Transcriptional upregulation of the insulin-like growth factor binding protein IGFBP-3 by sodium butyrate increases IGF-independent apoptosis in human colonic adenoma-derived epithelial cells. *Carcinogenesis* 2003; 24: 393-401.
- [251] Singh RP, Sharma G, Mallikarjuna GU, Dhanalakshmi S, Agarwal C, Agarwal R. In vivo suppression of hormone-refractory prostate cancer growth by inositol hexaphosphate: induction of insulin-like growth factor binding protein-3 and inhibition of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 244-250.
- [252] Singh RP, Tyagi AK, Dhanalakshmi S, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3. *Int J Cancer* 2004; 108: 733-740.
- [253] Cabbage ML, Suwanichkul A, Powell DR. Insulin-like growth factor binding protein-3. Organization of the human chromosomal gene and demonstration of promoter activity. *J Biol Chem* 1990; 265: 12642-12649.
- [254] Albiston AL, Herington AC. Cloning and characterization of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-3) in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 166: 892-897.

- [255] Conover CA, Ronk M, Lombana F, Powell DR. Structural and biological characterization of bovine insulin-like growth factor binding protein-3. *Endocrinology* 1990; 127: 2795-2803.
- [256] Shimasaki S, Koba A, Mercado M, Shimonaka M, Ling N. Complementary DNA structure of the high molecular weight rat insulin-like growth factor binding protein (IGF-BP3) and tissue distribution of its mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 907-912.
- [257] Gargosky SE, Giudice LC, Rosenfeld RG, Fazleabas AT. Different molecular and messenger ribonucleic acid forms of insulin-like growth factor-binding protein-3 in the pregnant baboon (*Papio anubis*). *J Endocrinol* 1995; 147: 449-461.
- [258] Maniatis T, Goodbourn S, Fischer JA. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 1987; 236: 1237-1245.
- [259] Erondy NE, Toland B, Boes M, Dake B, Moser DR, Bar RS. Bovine insulin-like growth factor binding protein-3: organization of the chromosomal gene and functional analysis of its promoter. *Endocrinology* 1997; 138: 2856-2862.
- [260] Albiston AL, Saffery R, Herington AC. Cloning and characterization of the promoter for the rat insulin-like growth factor-binding protein-3 gene. *Endocrinology* 1995; 136: 696-704.
- [261] Onger EM, Zhu Q, Verderame MF, Hammond JM. Insulin-like growth factor-binding protein-3 in porcine ovarian granulosa cells: gene cloning, promoter mapping, and follicle-stimulating hormone regulation. *Endocrinology* 2004; 145: 1776-1785.
- [262] Choi HS, Lee JH, Park JG, Lee YI. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, activates the IGFBP-3 promoter by upregulating Sp1 activity in hepatoma cells: alteration of the Sp1/Sp3/HDAC1 multiprotein complex. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 1005-1012.
- [263] Walker GE, Wilson EM, Powell D, Oh Y. Butyrate, a histone deacetylase inhibitor, activates the human IGF binding protein-3 promoter in breast cancer cells: molecular mechanism involves an Sp1/Sp3 multiprotein complex. *Endocrinology* 2001; 142: 3817-3827.
- [264] Tsubaki J, Hwa V, Twigg SM, Rosenfeld RG. Differential activation of the IGF binding protein-3 promoter by butyrate in prostate cancer cells. *Endocrinology* 2002; 143: 1778-1788.
- [265] Bourdon JC, Guin-Chambon V, Lelong JC, Dessen P, May P, Debuire B, May E. Further characterisation of the p53 responsive element--

identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene* 1997; 14: 85-94.

- [266] Hanafusa T, Shinji T, Shiraha H, Nouse K, Iwasaki Y, Yumoto E, Ono T, Koide N. Functional promoter upstream p53 regulatory sequence of IGFBP3 that is silenced by tumor specific methylation. *BMC Cancer* 2005; 5: 9.
- [267] Peng L, Malloy PJ, Feldman D. Identification of a functional vitamin D response element in the human insulin-like growth factor binding protein-3 promoter. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 1109-1119.
- [268] Cohick WS, Wang B, Verma P, Boisclair YR. Insulin-Like growth factor I (IGF-I) and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulate IGF-binding protein-3 gene expression by transcriptional and posttranscriptional mechanisms in mammary epithelial cells. *Endocrinology* 2000; 141: 4583-4591.
- [269] Villafuerte BC, Zhao W, Herington AC, Saffery R, Phillips LS. Identification of an insulin-responsive element in the rat insulin-like growth factor-binding protein-3 gene. *J Biol Chem* 1997; 272: 5024-5030.
- [270] Graessmann M, Graessmann A. DNA methylation, chromatin structure and the regulation of gene expression. *EXS* 1993; 64: 404-424.
- [271] Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP. Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 1989; 58: 499-507.
- [272] Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16: 168-174.
- [273] Baylin SB, Belinsky SA, Herman JG. Aberrant methylation of gene promoters in cancer---concepts, misconcepts, and promise. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1460-1461.
- [274] Hanafusa T, Yumoto Y, Nouse K, Nakatsukasa H, Onishi T, Fujikawa T, Taniyama M, Nakamura S, Uemura M, Takuma Y, Yumoto E, Higashi T, Tsuji T. Reduced expression of insulin-like growth factor binding protein-3 and its promoter hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2002; 176: 149-158.
- [275] Chang YS, Wang L, Suh YA, Mao L, Karpen SJ, Khuri FR, Hong WK, Lee HY. Mechanisms underlying lack of insulin-like growth factor-binding protein-3 expression in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2004; 23: 6569-6580.

- [276] Harrela M, Koistinen H, Kaprio J, Lehtovirta M, Tuomilehto J, Eriksson J, Toivanen L, Koskenvuo M, Leinonen P, Koistinen R, Seppala M. Genetic and environmental components of interindividual variation in circulating levels of IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, and IGFBP-3. *J Clin Invest* 1996; 98: 2612-2615.
- [277] Deal C, Ma J, Wilkin F, Paquette J, Rozen F, Ge B, Hudson T, Stampfer M, Pollak M. Novel promoter polymorphism in insulin-like growth factor-binding protein-3: correlation with serum levels and interaction with known regulators. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1274-1280.
- [278] Jernstrom H, Deal C, Wilkin F, Chu W, Tao Y, Majeed N, Hudson T, Narod SA, Pollak M. Genetic and nongenetic factors associated with variation of plasma levels of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 in healthy premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 377-384.
- [279] Greaves RF, O'Hare P. Sequence, function, and regulation of the Vmw65 gene of herpes simplex virus type 2. *J Virol* 1991; 65: 6705-6713.
- [280] Ghoshal K, Majumder S, Datta J, Motiwala T, Bai S, Sharma SM, Frankel W, Jacob ST. Role of human ribosomal RNA (rRNA) promoter methylation and of methyl-CpG-binding protein MBD2 in the suppression of rRNA gene expression. *J Biol Chem* 2004; 279: 6783-6793.
- [281] Ge Y, Konrad MA, Matherly LH, Taub JW. Transcriptional regulation of the human cystathionine beta-synthase -1b basal promoter: synergistic transactivation by transcription factors NF-Y and Sp1/Sp3. *Biochem J* 2001; 357: 97-105.
- [282] Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 2990-2997.
- [283] Lai A, Sarcevic B, Prall OW, Sutherland RL. Insulin/insulin-like growth factor-I and estrogen cooperate to stimulate cyclin E-Cdk2 activation and cell Cycle progression in MCF-7 breast cancer cells through differential regulation of cyclin E and p21(WAF1/Cip1). *J Biol Chem* 2001; 276: 25823-25833.
- [284] Vander Kooi BT, Streeper RS, Svitek CA, Oeser JK, Powell DR, O'Brien RM. The three insulin response sequences in the glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter are functionally distinct. *J Biol Chem* 2003; 278: 11782-11793.
- [285] Moustaid N, Beyer RS, Sul HS. Identification of an insulin response element in the fatty acid synthase promoter. *J Biol Chem* 1994; 269: 5629-5634.

- [286] Yin D, Clarke SD, Etherton TD. Transcriptional regulation of fatty acid synthase gene by somatotropin in 3T3-F442A adipocytes. *J Anim Sci* 2001; 79: 2336-2345.
- [287] Hung H, Pollak M. Regulation of IGFBP-3 expression in breast cancer cells and uterus by estradiol and antiestrogens: correlations with effects on proliferation: a review. *Prog Growth Factor Res* 1995; 6: 495-501.
- [288] Kam GY, Leung KC, Baxter RC, Ho KK. Estrogens exert route- and dose-dependent effects on insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 and the acid-labile subunit of the IGF ternary complex. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1918-1922.
- [289] Peterson AJ, Ledgard AM, Hodgkinson SC. Oestrogen regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) and expression of IGFBP-3 messenger RNA in the ovine endometrium. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10: 241-247.
- [290] Wang D, Sul HS. Upstream stimulatory factors bind to insulin response sequence of the fatty acid synthase promoter. USF1 is regulated. *J Biol Chem* 1995; 270: 28716-28722.
- [291] di Fagagna FD, Marzio G, Gutierrez MI, Kang LY, Falaschi A, Giacca M. Molecular and functional interactions of transcription factor USF with the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1995; 69: 2765-2775.
- [292] O'Brien RM, Granner DK. Regulation of gene expression by insulin. *Physiol Rev* 1996; 76: 1109-1161.
- [293] James L, Eisenman RN. Myc and Mad bHLHZ domains possess identical DNA-binding specificities but only partially overlapping functions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 10429-10434.
- [294] Ge Y, Jensen TL, Matherly LH, Taub JW. Physical and functional interactions between USF and Sp1 proteins regulate human deoxycytidine kinase promoter activity. *J Biol Chem* 2003; 278: 49901-49910.
- [295] Fisher DE, Parent LA, Sharp PA. Myc/Max and other helix-loop-helix/leucine zipper proteins bend DNA toward the minor groove. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 11779-11783.
- [296] Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996; 10: 1054-1072.
- [297] Schavinsky-Khrapunsky Y, Huleihel M, Aboud M, Torgeman A. Role of protein kinase C and the Sp1-p53 complex in activation of p21(WAF-1)

expression by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in human T cells. *Oncogene* 2003; 22: 5315-5324.

- [298] Borellini F, Glazer RI. 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* 1993; 268: 7923-7928.
- [299] Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992; 69: 119-128.
- [300] Luscher B, Eisenman RN. New light on Myc and Myb. Part I. *Myc. Genes Dev* 1990; 4: 2025-2035.
- [301] Gartel AL, Shchors K. Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res* 2003; 283: 17-21.
- [302] Wanzel M, Herold S, Eilers M. Transcriptional repression by Myc. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 146-150.
- [303] Davis PL, Miron A, Andersen LM, Iglehart JD, Marks JR. Isolation and initial characterization of the BRCA2 promoter. *Oncogene* 1999; 18: 6000-6012.
- [304] Pawar SA, Szentirmay MN, Hermeking H, Sawadogo M. Evidence for a cancer-specific switch at the CDK4 promoter with loss of control by both USF and c-Myc. *Oncogene* 2004; 23: 6125-6135.
- [305] Sayasith K, Bouchard N, Sawadogo M, Lussier JG, Sirois J. Molecular characterization and role of bovine upstream stimulatory factor 1 and 2 in the regulation of the prostaglandin G/H synthase-2 promoter in granulosa cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 6327-6336.
- [306] Xing W, Archer TK. Upstream stimulatory factors mediate estrogen receptor activation of the cathepsin D promoter. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 1310-1321.
- [307] Choe C, Chen N, Sawadogo M. Decreased tumorigenicity of c-Myc-transformed fibroblasts expressing active USF2. *Exp Cell Res* 2005; 302: 1-10.
- [308] Chang YS, Wang L, Liu D, Mao L, Hong WK, Khuri FR, Lee HY. Correlation between insulin-like growth factor-binding protein-3 promoter methylation and prognosis of patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3669-3675.

- [309] Hendriks E, Paquette J, Arends NJT, Hokken-Koelega ACS, Deal C. Impact of IGFBP-3 promoter polymorphisms on circulating levels of IGFBP-3 and on growth in short children born small for gestational age. Abstracts of the Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE). Basel, Switzerland, September 10-13, 2004. *Horm Res* 2004; 62 Suppl 2: 1-215.
- [310] Wang L, Habuchi T, Tsuchiya N, Mitsumori K, Ohyama C, Sato K, Kinoshita H, Kamoto T, Nakamura A, Ogawa O, Kato T. Insulin-like growth factor-binding protein-3 gene -202 A/C polymorphism is correlated with advanced disease status in prostate cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 4407-4411.
- [311] Ren Z, Cai Q, Shu XO, Cai H, Li C, Yu H, Gao YT, Zheng W. Genetic polymorphisms in the IGFBP3 gene: association with breast cancer risk and blood IGFBP-3 protein levels among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1290-1295.
- [312] Slattery ML, Samowitz W, Curtin K, Ma KN, Hoffman M, Caan B, Neuhausen S. Associations among IRS1, IRS2, IGF1, and IGFBP3 genetic polymorphisms and colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1206-1214.
- [313] Shariat SF, Kim J, Nguyen C, Wheeler TM, Lerner SP, Slawin KM. Correlation of preoperative levels of IGF-I and IGFBP-3 with pathologic parameters and clinical outcome in patients with bladder cancer. *Urology* 2003; 61: 359-364.
- [314] Zhao H, Grossman HB, Spitz MR, Lerner SP, Zhang K, Wu X. Plasma levels of insulin-like growth factor-1 and binding protein-3, and their association with bladder cancer risk. *J Urol* 2003; 169: 714-717.
- [315] Pintar JE, Single and multiple knockouts of the IGFBPs. Program of the 83rd Annual Meeting of The Endocrine Society, Denver, CO. 2001; p 44 (Abstract S33-1)

