

Université du Québec
INRS - Institut Armand-Frappier
531 bd des Prairies, Qc., H7V 1B7, Laval

**Rôle de la région basale du promoteur
dans la régulation transcriptionnelle du
gène *NRAMP1* humain.**

Mémoire présenté pour l'obtention
du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.) en Virologie et Immunologie

Carole G. Campion

Années 2004-2006

Comité d'évaluation :

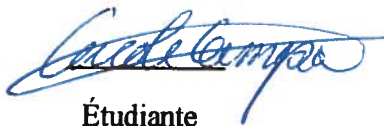
Examineur interne :	Dr. Angéla Pearson. INRS-Institut Armand-Frappier.
Examineur externe :	Dr. John White. Département de Physiologie, Université Mc Gill.
Directeur de recherche :	Dr. Mathieu Cellier. INRS-Institut Armand-Frappier.

Sommaire

Le gène *NRAMP1* humain s'exprime dans les phagocytes professionnels. La protéine correspondante (Natural Resistance-Associated Macrophage Protéine 1) se localise dans la membrane de vésicules cytoplasmiques des phagocytes quiescents et dans la membrane des phagosomes après phagocytose. *NRAMP1* est un co-transporteur de métaux/protons qui contribue à inhiber la survie et la croissance de microbes phagocytés en pompant les métaux divalents de l'intérieur des phagosomes vers le cytoplasme des phagocytes. L'expression maximale de la protéine *NRAMP1* a lieu lors de la phase terminale de la différenciation myéloïde, dans les granulocytes et monocytes du sang périphérique et les macrophages tissulaires.

La lignée de progéniteur promyélocytaire HL-60 a été choisie pour étudier la régulation de l'expression du gène *NRAMP1* au cours de la différenciation myéloïde induite soit avec la forme active de la vitamine D (monocyte/macrophage), soit avec le diméthylsulfoxyde (granulocyte/neutrophile). Ce modèle a permis de révéler par transfection de constructions (promoteur *NRAMP1* + gène de la luciférase) la présence d'une région proximale, -114 pb en amont du site majeur d'initiation de la transcription, qui permet la transcription basale, et une région plus en amont (-498 pb) conférant la spécificité myéloïde.

Dans cette étude, nous avons démontré que le promoteur *NRAMP1* est régulé par les facteurs C/EBP. Les expériences réalisées suggèrent que l'interaction de ces facteurs C/EBP aurait lieu sur le site E14 de la région basale du promoteur. Dans les cellules HL-60 immatures, le promoteur *NRAMP1* serait fixé par le facteur C/EBP α alors que dans ces cellules différenciées en monocyte/macrophage par la VD, il s'agirait de l'isoforme C/EBP β . L'analyse du site E14 a révélé qu'il est essentiel pour l'expression du gène *NRAMP1* dans les cellules myéloïdes et non myéloïdes. En effet, aucune expression du gène *NRAMP1* n'a été détectée dans des clones stables mutés sur le site E14 dans les cellules HL-60 différenciées ou non. Nous avons donc démontré que les facteurs C/EBP α et β sont capables d'induire une transcription basale du gène *NRAMP1*, cependant, une coopération de ces facteurs avec Sp1, qui interagit avec le promoteur *NRAMP1* au niveau de la région distale, est nécessaire pour activer l'expression de ce gène. Les résultats obtenus dans cette étude combinée avec les études antérieures conduisent à penser que la coopération des facteurs Sp1 et C/EBP requiert les régions basale et myéloïde et stimule l'activation du promoteur *NRAMP1*.



Étudiante



Directeur de recherche

Remerciements

Je tiens à remercier,

Mon directeur de recherche le Dr. Mathieu Cellier, pour m'avoir acceptée dans son laboratoire et pour le sujet de recherche très intéressant qu'il m'a confié. Cette maîtrise m'a permis de découvrir le monde de la recherche, d'acquérir les connaissances et l'expérience dans ce domaine. Cela m'a permis aussi de comprendre que le plus important pour réussir dans ce domaine, c'est la détermination et la patience d'obtenir ce que l'on recherche. Je vous remercie donc Mathieu pour m'avoir permis de découvrir tout ceci.

Toutes les personnes qui sont passées dans le laboratoire : Pascal, Frédéric, Etienne, Louise, Evelyn et Laetitia. Je tiens à remercier en particulier Etienne pour m'avoir supervisé pendant mon stage, ce qui m'a permis par la suite d'avancer plus vite dans mon projet de recherche.

Julie et Mélanie pour leur aide autant pour le travail que pour leur amitié, toujours disponibles pour résoudre certaines énigmes de la science mais surtout pour écouter tout simplement...

Ma famille, pour son soutien constant, même si la distance nous sépare, les liens restent aussi forts. Un grand merci surtout à mes parents sans qui tout ceci n'aurait pu se réaliser. Merci de m'avoir toujours soutenue dans mes études, d'avoir toujours été présent dans les bons comme dans les mauvais moments. Vous m'avez donné la détermination et la confiance nécessaire pour réussir.

Francky, mon amour et mon meilleur ami, sans qui tout ceci n'aurait que peu d'importance. Ta présence à mes côtés me permet d'avancer.

A ma grand-mère,

Table des matières

Sommaire	ii
Remerciements	iii
Table des matières	iv
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	x
Introduction	1
Chapitre 1 : Revue de la littérature	5
1.1. Relation hôte – pathogène	6
1.1.1. Co-évolution	6
1.1.2. Identification de gènes de résistance / susceptibilité	6
1.2. Le gène <i>NRAMP1</i>	7
1.2.1. Découverte du gène <i>Nramp1</i> chez la souris	7
1.2.2. Expression et localisation de l'ARNm du gène <i>NRAMP1</i>	7
1.2.3. Structure de la protéine NRAMP1	9
1.2.4. Rôle de la protéine NRAMP1	10
1.3. La Famille Nrap	13
1.3.1. Les membres de la famille Nrap	14
1.3.2. L'évolution de la famille Nrap	15
1.3.3. Implication de la famille Nrap dans l'homéostasie du fer	18
1.3.4. Séquestration du fer lors d'une infection	19
1.4. Polymorphismes du gène <i>NRAMP1</i> humain	20
1.4.1. Les polymorphismes du gène <i>NRAMP1</i>	20
1.4.2. Association : polymorphismes du gène <i>NRAMP1</i> et susceptibilité à certaines maladies infectieuses	22
1.4.3. Cas de l'infection à <i>M. tuberculosis</i> : lien avec l'expression du gène <i>NRAMP1</i>	24
1.5. Modèle d'étude du gène <i>NRAMP1</i>	26
1.5.1. La lignée HL-60	27
1.5.2. Différenciation myéloïde de la lignée HL-60 et expression du gène <i>NRAMP1</i>	27

1.5.2.1. Différenciation monocytaire	27
1.5.2.2. Différenciation granulocytaire	28
1.6. La vitamine D	30
1.6.1. Synthèse de la vitamine D	30
1.6.2. Rôle de la vitamine D dans la réponse immunitaire	31
1.6.3. Association polymorphismes VDR / susceptibilité à la tuberculose ...	33
1.6.4. Les analogues de la vitamine D	33
1.7. La myélopoïèse	35
1.7.1. Régulation de la myélopoïèse	35
1.7.2. Les facteurs de transcription impliqués dans la myélopoïèse	36
1.7.2.1. Le facteur PU.1	37
1.7.2.2. Les facteurs C/EBP	38
1.7.2.3. Le facteur Sp1	39
1.7.2.4. Le facteur CDP	41
1.7.3. Les promoteurs de gènes myéloïdes	43
1.7.3.1. La région proximale des promoteurs myéloïdes	43
1.7.3.2. La région distale des promoteurs myéloïdes	43
1.7.4. Régulation de l'état de la chromatine	44
Mise en contexte du projet de recherche	46
Chapitre 2 : Matériels et méthodes	51
2.1. Traitements des cellules	52
2.1.1. Lignées cellulaires et culture	52
2.1.2. Différenciation des cellules HL-60	52
2.1.3. Analyse des phénotypes cellulaires par cytométrie en flux	53
2.2. Études <i>in vitro</i> de la fixation de facteurs de transcription sur le site E14 du promoteur <i>NRAMP1</i>	54
2.2.1. Mutations des oligonucléotides	54
2.2.2. Marquage des oligonucléotides double brin	55
2.2.3. Extraction des protéines nucléaires des cellules HL-60	55
2.2.4. Expérience de retard sur gel	56
2.2.4.1. Principe	56
2.2.4.2. Expérience	56
2.2.5. Expérience de super retard sur gel	59

2.3. Études <i>in vivo</i> dans les cellules non myéloïdes 293T du rôle des facteurs C/EBP dans la régulation transcriptionnelle du gène <i>NRAMP1</i>	59
2.3.1. Clonage du promoteur <i>NRAMP1</i> dans le vecteur pGL3NR1L	59
2.3.1.1. Constructions de type sauvages: pGL3NR1L, pGL3NR1S	59
2.3.1.2. Constructions de type mutées : pGL3 NR1L E14M1	59
- Mutagenèse dirigée	60
- Clonage du promoteur <i>NRAMP1</i> muté (E14M1)	61
- Transformation des clones pGL3 NR1L E14M1	62
- Purification des plasmides pGL3 NR1L E14M1	62
2.3.2. Transfections et co-transfections transitoires des constructions du promoteur dans les cellules 293T	64
2.3.3. Mesure de l'activité des constructions du promoteur	64
2.4. Études <i>in vivo</i> dans les cellules myéloïdes HL-60 du rôle du site E14 dans la régulation transcriptionnelle du gène <i>NRAMP1</i>	65
2.4.1. Constructions du promoteur <i>NRAMP1</i> dans le vecteur SrL	65
2.4.1.1. Construction de type sauvage : SrL	65
2.4.1.2. Construction de type mutée : SrL E14M1	66
2.4.2. Génération de transfectants stables dans les cellules HL-60	68
2.4.3. Mesure de l'activité des clones stables	69
2.4.4. Différenciation des clones stables mutés	69
2.5. Études <i>in vivo</i> de la fixation des facteurs de transcription C/EBP sur le promoteur <i>NRAMP1</i>	70
2.5.1. Préparation des cellules HL-60 et de la chromatine	70
2.5.2. Immunoprécipitation de la chromatine avec les anticorps anti-C/EBP	71
2.5.3. Analyse des résultats du CHIP par amplification PCR	72
2.5.4. Contrôles utilisés pour le CHIP	73
2.5.4.1. Contrôle du fonctionnement des amorces	73
2.5.4.2. Contrôle de la taille de l'ADN immunoprécipité	73
2.5.4.3. Contrôle de la différenciation myéloïde des cellules HL-60 ...	75
Chapitre 3 : Résultats	77
3.1. Caractérisation <i>in vitro</i> de l'attachement des facteurs C/EBP sur le site E14 de la région basale du promoteur <i>NRAMP1</i>	78
3.1.1. Analyse de l'attachement <i>in vitro</i> des facteurs C/EBP sur le site E14 ..	78
3.1.2. Identification des isoformes de la famille C/EBP se fixant <i>in vitro</i> sur le site E14	81

3.1.3. Définition du site d'attachement des facteurs C/EBP sur le site E14 ...	83
3.1.4. Définition du site d'attachement du facteur Sp1 sur le site E10	85
3.2. Rôle du site E14 dans la régulation transcriptionnelle du promoteur NRAMP1	87
3.2.1. Effet de la mutation E14M1 dans les cellules non myéloïdes	87
3.2.2. Effet de la mutation E14M1 dans les cellules myéloïdes	90
3.2.3. Effet de la mutation E14M1 au cours de la différenciation myéloïde des cellules HL-60	93
3.3. Caractérisation <i>in vivo</i> de l'attachement des facteurs C/EBPα et β sur le promoteur NRAMP1 endogène dans les cellules myéloïdes	95
 Chapitre 4 : Discussion	100
• <i>Les facteurs C/EBPα et β se fixent in vitro sur le site E14 dans la région basale du promoteur NRAMP1</i>	102
• <i>Les facteurs C/EBPα et β se fixent in vivo dans la région basale du promoteur NRAMP1 au cours de la différenciation myéloïde des cellules HL-60</i>	105
• <i>Le site E14 dans la région basale est crucial pour l'expression du gène NRAMP1</i>	106
• <i>Coopération de Sp1 et de C/EBPα et β pour l'activation de l'expression du gène NRAMP1</i>	108
• <i>Mécanisme hypothétique de régulation transcriptionnelle du promoteur NRAMP1 lors de la différenciation myéloïde</i>	109
 Conclusion et perspectives	113
 Annexes	116
Annexe 1 : Immunoprécipitations de la chromatine des facteurs C/EBPα et β sur le promoteur NRAMP1 endogène au cours de la différenciation myéloïde des cellules HL60	117
Annexe 2 : Analyse de l'activation transcriptionnelle du promoteur NRAMP1 par le facteur Sp1 après une inhibition de ce facteur par des oligonucléotides antisens	118
 Références bibliographiques	119

Liste des figures

Figure 1. Rôle hypothétique de la protéine Nramp1 lors de l'interaction hôte-Pathogène	12
Figure 2. Alignement des séquences peptidiques de 4 homologues de la famille Nramp	17
Figure 3. Polymorphismes du gène <i>NRAMP1</i> humain	22
Figure 4. Modèle de différenciation myéloïde du progéniteur HL-60 au sein de l'hématopoïèse	29
Figure 5. Synthèse de la 1,25-déhydroxivitamine D ₃ et son mode d'action dans la réponse aux infections	32
Figure 6. Conformations stéréochimiques de la vitamine D ₃ et de ses analogues, le KH 1060 et le EB 1089	34
Figure 7. Principaux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de gènes myéloïdes	42
Figure 8. Organisation générale du promoteur <i>NRAMP1</i>	46
Figure 9. Régulation transcriptionnelle du promoteur <i>NRAMP1</i> par le facteur Sp1	47
Figure 10. Rôle des facteurs C/EBP, CDP et Sp1 dans l'activité transcriptionnelle du promoteur <i>NRAMP1</i>	48
Figure 11. Analyse des éléments cis régulateurs de la région basale fixant potentiellement les facteurs C/EBP	49
Figure 12. Principe de l'expérience de retard sur gel	58
Figure 13. Clonage du vecteur pGL3 NR1L E14M1	63
Figure 14. Clonage du vecteur SrL E14M1	67
Figure 15. Représentation générale des amplifications par PCR réalisées dans le ChIP C/EBP / <i>NRAMP1</i>	74
Figure 16. Principe de l'immunoprécipitation de la chromatine	75
Figure 17. Analyse de l'attachement <i>in vitro</i> des facteurs C/EBP sur le site E14	80
Figure 18. Identification des facteurs se fixant sur le site E14	82
Figure 19. Caractérisation des bases nécessaires à l'attachement des facteurs C/EBP sur le site E14	84
Figure 20. Caractérisation des bases nécessaires à l'attachement des facteurs Sp1 sur le site E10	86
Figure 21. Effet de la mutation E14M1 sur la régulation transcriptionnelle du promoteur <i>NRAMP1</i> dans les cellules non myéloïdes 293T	89
Figure 22. Effet de la mutation E14M1 sur l'expression du gène <i>NRAMP1</i> dans les cellules myéloïdes HL-60	92

Figure 23. Effet de la mutation E14M1 sur l'expression du gène <i>NRAMP1</i> au cours de la différenciation myéloïdes des cellules HL-60	94
Figure 24. Caractérisation de l'attachement des facteurs C/EBP α et β sur le promoteur <i>NRAMP1</i> endogène au cours de la différenciation myéloïde des cellules HL-60	98
Figure 25. Mécanisme hypothétique de la régulation transcriptionnelle du promoteur <i>NRAMP1</i> lors de la différenciation myéloïde	112

Liste des tableaux

Tableau 1. Paramètres utilisés en cytométrie en flux	54
Tableau 2. Oligonucléotides ou amorces utilisés en retard sur gel ou en PCR ...	76

Liste des abréviations

AML-1	"Acute myeloid leukemia 1 protein"
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATF	Facteur d'Activation de la Transcription
ATRA	"All- <i>trans</i> Rétinoïc Acide"
<i>AtNramp</i>	" <i>Arabidopsis thaliana</i> Natural Resistance Associated Macrophage Protein"
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
CDP	"CCAAT Displacement Protein"
CD14	"Cluster of Differentiation 14"
C/EBP	"CCAAT/Enhancer-Binding Protein"
CHOP	Protéine Homologue des C/EBPs
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
C-Myb	"Myb proto-oncogene protein"
CREB	"cAMP Response Element Binding protein"
DCT1	"Divalent Cation Transporter 1"
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMT1	"Divalent Metal Transporter 1"
DTM	Domaine Transmembranaire
EB	EB 1089, 1 α ,25-dihydroxy-22,24-diene-24,26,27-trihomovitamin D ₃
ETS	"E26 Transforming Sequence"
FSC	"Forward scatter"
GADD153	"Growth Arrest and DNA-Damage-inducible protein 153"
GATA-1	"GATA binding factor-1"
G-CSF	"Granulocyte-Colony Stimulating Factor"
GM-CSF	"Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor"
GM-CSFR	"Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor Receptor"
GRE	Élément de Réponse aux Glucocorticoïdes
GTF	Facteurs de Transcription Généraux
HL-60	"Human Leucocyte 60"
HNF-4	"Hepatocyte Nuclear Factor-4"
HSCs	"Cellule Souches Hématopoïétiques"
IFN- γ	Interféron- γ

IL-1 β	Interleukine-1 β
iNOS	Synthase d'Oxide Nitrique inducible
ISRE	"Interferon Sensitive Response Element"
KC	"Keratinocyte-derived Chemokine"
KH	KH 1060, 20-epi-22-oxa-24a, 26a-trihomo-1 α ,25-dihydroxyvitamin D ₃
Lamp1	"Lysosomal Associated Macrophage Protein 1"
LL-37	Cathélicidine
LPS	Lipopolysaccharides
M-CSF	"Macrophage-Colony Stimulating Factor"
M-CSFR	"Macrophage-Colony Stimulating Factor Receptor"
<i>Mvl</i>	<i>Malvolio</i>
mk/mk	anémie microcytique
<i>MntH</i>	<i>Transporteur de manganèse dépendant du proton</i>
<i>Mramp1</i>	<i>"Mycobacterium Macrophage Resistant Protein 1"</i>
ND	Non Différencié
NF-IL-6	Facteur Nucléaire-Interleukine-6
<i>Nramp1</i>	<i>"Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1"</i>
ODNdb	Oligonucléotide double brin
pb	paire de base
PBL	"Peripheral Blood lymphocyte"
PMA	Phorbol myristate acetate
PMN	Polymorphonucléaire
RARE	Éléments de Réponse à l'Acide Rétinoïque
RXR	Récepteur X des Rétinoïdes
SLC11A	"Solute Carrier Family 11"
<i>Smf</i>	<i>"Suppressor of Mitochondrial import Fonction"</i>
SOD	Superoxide dismutase
Sp1	"Specificity protein 1"
SSC	" Side scatter"
TAF	"TATA-Associated Factor"
TBP	"TATA Binding Protein"
TLR	"Toll Like Receptors"
TNF- α	"Tumor Necrosis Factor α "
UVB	Ultraviolet B

VD	Forme active de la Vitamine D, 1 α ,25-dihydroxyvitamine D ₃
VDR	Récepteur de la vitamine D
VDRE	Élément de réponse à la vitamine D

Introduction

La détermination de la séquence du génome humain a permis une grande avancée dans la compréhension du fonctionnement du corps humain et dans l'amélioration du diagnostic de certaines maladies. L'étape suivante consiste désormais à mettre en évidence les relations entre les phénotypes des maladies et les génotypes mis en jeu. En effet, chaque individu acquiert une information génétique propre qui, en interagissant avec le milieu environnant, sera responsable du déroulement de tous les mécanismes biologiques et physiologiques engendrés au cours du développement et du maintien d'un organisme vivant. Par conséquent, le bagage génétique de l'hôte pourrait alors être responsable de la susceptibilité aux infections. C'est pourquoi, plusieurs études se sont attachées à identifier des gènes de résistance ou de susceptibilité qui, s'ils sont dysfonctionnels, peuvent prédisposer à certaines maladies (Hill 1998).

Découvert en 1993, sur le chromosome 1 chez la souris, le gène *Nramp1* (Natural Resistance-Associated Macrophage Protéine) est responsable d'une sensibilité accrue de certaines lignées génétiquement stables face à différents pathogènes intracellulaires comme : *Mycobacterium bovis*, *Leshmania donovani* et *Salmonella typhimurium* (Vidal, Gros *et al.* 1995). En effet, une mutation (Gly→Asp (169)) dans le domaine transmembranaire 4 de la protéine Nramp1 empêche son expression et est responsable du phénotype de susceptibilité des lignées murines. La protéine Nramp1 est exprimée à la membrane des phagolysosome et a pour rôle d'exclure de la vacuole des métaux divalents comme le fer et le manganèse qui sont essentiels pour la survie du pathogène phagocyté (Blackwell et Searle 1999; Forbes et Gros 2001). Depuis la découverte de son rôle anti-bactérien, le gène *Nramp1*, chez la souris, est par conséquent un facteur génétique de susceptibilité/résistance à certaines infections.

Le gène *Nramp1* appartient à une famille très conservée de transporteurs membranaires de métaux divalents. Les membres de cette famille se retrouvent dans plusieurs espèces phylogénétiquement très éloignées telle que les levures, les plantes, les insectes, les nématodes et les mammifères. D'ailleurs, le pourcentage d'identité

élevé entre les séquences des homologues suggère que la fonction de transport de métaux a été conservée dans les divers membres de cette famille (Nevo et Nelson 2006). Dans cette famille, le gène *Nramp2* est le premier transporteur de fer identifié chez les mammifères. Il est impliqué dans l'absorption intestinale du fer provenant de l'alimentation et participe aussi au recyclage de cet élément dans les macrophages (Andrews 1999).

C'est en 1994 que le gène *NRAMP1* humain a été identifié sur le chromosome 2. Le gène *NRAMP1* code aussi pour une protéine transmembranaire exprimée exclusivement dans les cellules myéloïdes et qui possède vraisemblablement le même rôle que son homologue chez la souris (Cellier, Govoni *et al.* 1994). Bien qu'entre le gène *Nramp1* de la souris et de l'humain il y ait tout de même 88% d'homologie, chez l'homme, aucun lien causal direct n'a été observé entre une mutation du gène *NRAMP1* et une susceptibilité aux infections. Cependant, des polymorphismes des régions en 5' et 3' du gène pourraient prédisposer à la sensibilité à *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae* dans certaines régions endémiques (Blackwell, Barton *et al.* 1995; Abel, Sanchez *et al.* 1998; Soborg, Andersen *et al.* 2002). Par conséquent, pour mieux comprendre l'importance fonctionnelle des polymorphismes dans le promoteur *NRAMP1* et ainsi définir leur rôle possible dans les mécanismes de susceptibilité/résistance de l'hôte aux infections, il est essentiel d'élucider les mécanismes de régulation transcriptionnelle contrôlant l'expression de la protéine *NRAMP1* lors de la différenciation myéloïde.

Étant donné que le gène *NRAMP1* humain est exprimé uniquement dans les phagocytes matures, la lignée promyélocytaires (HL-60) a été choisie comme modèle puisqu'elle possède une bipotentialité de différenciation (Cellier, Shustik *et al.* 1997; Roig, Richer *et al.* 2002). En effet, cette lignée cellulaire peut se différencier soit en monocyte/macrophage, soit en granulocyte. La différenciation de cette lignée en types polymorphonucléaires peut être induite par le DMSO ou l'ATRA. À l'inverse, la différenciation en monocytes matures ou en macrophages peut être induite par la forme active de la vitamine D (VD) ou l'ester de phorbol. Grâce à ces agents de différenciation, la régulation du gène *NRAMP1* au cours de la différenciation myéloïde peut-être mieux définie.

Parmi ses rôles physiologiques classiques, la forme active de la VD, la $1\alpha,25(\text{OH})\text{VitD}_3$, est impliquée dans les mécanismes de défense immunitaire. Synthétisée dans la peau grâce aux UVB, la 7-déhydrocholestérol deviendra la $1\alpha,25$ dihydroxyvitamine D_3 ou calcitriol qui est la forme active de la VD (Zasloff 2006). C'est en se liant avec son récepteur cytoplasmique, le VDR, que cette vitamine va pouvoir être acheminée au noyau où ce complexe [VD-VDR] pourra se fixer sur des séquences promotrices et ainsi réguler certains gènes. Parmi les cibles de la VD, est retrouvé le gène codant pour le peptide antimicrobien LL-37, montrant ainsi que la VD est un élément de la réponse aux infections (Liu, Stenger *et al.* 2006). De même, certaines études démontrent que des polymorphismes de la VD seraient responsables d'une susceptibilité/progression de certaines maladies immunitaires comme la tuberculose.

Pour déterminer les mécanismes moléculaires responsables de l'expression spécifique du gène *NRAMP1* et ainsi mieux comprendre son rôle dans la réponse immunitaire, nous avons tenté de caractériser les éléments cis-activateurs et les facteurs trans impliqués dans la régulation de ce gène durant la myélopoïèse.

Pour cela, des empreintes à la DNase ont été réalisées *in vitro* sur le promoteur *NRAMP1* dans le but d'identifier des régions protégées, indiquant ainsi la présence de sites potentiels pour la fixation de facteurs de transcription (Richer E., Thèse de doctorat, 2005). 14 sites ont été identifiés sur le promoteur soit 10 dans la région en amont, de spécificité myéloïde, et 4 dans la région basale. Dans le but de démontrer l'importance des sites identifiés dans la régulation du gène, nous avons produit des mutations des régions couvrant les sites potentiels spécifiques, qui ont été caractérisées *in vitro* par retard sur gel. Les sites mutés d'intérêts sont ensuite étudiés *in vivo* par des transfections transitoires dans les cellules 293T et stables dans la lignée HL-60.

Les résultats obtenus jusqu'à présent démontrent que le promoteur *NRAMP1* comprend une région active proximale qui fixerait le complexe de transcription basal et une région plus distale responsable du contrôle myéloïde. Nous avons démontré que le site E14, situé dans la région basale, est d'importance majeure pour l'initiation de la

transcription puisque lorsque nous transfectons le promoteur muté sur ce site, on observe une perte totale de l'activité du promoteur. De plus, nous avons démontré *in vitro* et *in vivo* que les facteurs de transcription C/EBP α et β peuvent se fixer sur le site E14 et que cette fixation pourrait être responsable de l'augmentation de l'activité du promoteur *NRAMP1*. Nos résultats suggèrent donc un rôle des facteurs CEBP α et β dans le contrôle de la transcription du gène en se fixant sur le site E14 de la région basale du gène *NRAMP1*.

Ce projet de recherche contribue à définir les mécanismes de régulation transcriptionnelle contrôlant l'expression de la protéine NRAMP1 lors de la différenciation des phagocytes. La poursuite des études sur le modèle établi permettra d'étudier la spécificité d'expression du gène *NRAMP1* humain, ce qui implique la définition *in vivo* des éléments actifs en *cis* ainsi que l'identification des facteurs de transcription recrutés. Les résultats anticipés seront utiles pour étudier les cellules normales du sang. De plus, ces résultats pourront faciliter l'étude de l'importance fonctionnelle des polymorphismes dans le promoteur *NRAMP1* ainsi que leur rôle possible dans les mécanismes de résistance de l'hôte aux infections.

Chapitre 1

Revue de la littérature

1.1. Relation hôte-pathogène

1.1.1. Co-évolution

Au cours de l'évolution, de fréquentes interactions hôtes-pathogènes ont permis aux espèces concernées d'évoluer l'une par rapport à l'autre. En effet, l'association étroite entre un pathogène et son hôte et la pression qu'ils exercent l'un sur l'autre pour survivre, a permis de sélectionner divers mécanismes de défenses complexes. Le devenir de cette interaction, c'est-à-dire l'habilité de l'hôte à limiter l'action d'un pathogène ou à l'inverse l'aptitude du microorganisme à s'évader du système immunitaire de l'hôte, est influencé à la fois par les facteurs génétiques de l'hôte et ceux du pathogène ainsi que par les facteurs environnementaux (Woolhouse, Webster *et al.* 2002). Ce principe de sélection naturelle a favorisé l'apparition et le maintien d'allèles de gènes qui confèrent à l'hôte une résistance face aux différentes maladies infectieuses les plus prévalentes.

1.1.2. Identification de gènes de résistance / susceptibilité

Les maladies infectieuses sont toujours un problème majeur dans le monde actuel et la recherche de mécanismes génétiques expliquant une variabilité dans la susceptibilité naturelle de l'hôte a commencé au début du 20^{ème} siècle. Ces études ont démontré l'implication de quelques gènes de l'hôte dans la détermination d'une susceptibilité/résistance face à certaines maladies (Hill 1998). Cependant, seulement une petite fraction de ces gènes a été identifiée. En effet, parmi les modèles d'études les mieux développés et les plus physiologiquement significatifs, la souris a permis l'identification de nouveaux gènes qui ont un rôle majeur dans la réponse immunitaire de l'hôte (Qureshi, Skamene *et al.* 1999). L'analyse génétique de ces modèles murins est cruciale pour la découverte de gènes candidats pour la susceptibilité/résistance à certaines maladies qui peuvent ensuite être validés en identifiant les homologues humains. Ainsi, le gène *Nramp1* fut le premier gène murin identifié sur la base de son importance dans le contrôle de l'infection et est reconnu aujourd'hui comme gène candidat pour la résistance aux infections humaines (Kramnik et Boyartchuk 2002).

1.2. Le gène *NRAMP1*

1.2.1. Découverte du gène *Nramp1* chez la souris

Dans les années 70, différents groupes de scientifiques ont observé que certaines lignées de souris de laboratoire, génétiquement stables, possédaient un phénotype de résistance ou de susceptibilité face à différents pathogènes intracellulaires comme *S. enterica serovar Typhimurium*, *Leshmania donovani* et *Mycobacterium bovis* (Plant et Glynn 1976; Bradley 1979; Gros, Skamene *et al.* 1981). Ils ont donc formulé l'hypothèse qu'il existait un locus de résistance/susceptibilité chez la souris qui fut nommé par les différents groupes : *Ity*, *Lsh* et *Bcg*. C'est par clonage positionnel de ce locus *Lsh/Ity/Bcg* que Vidal et son équipe en 1993 découvrirent qu'en fait, il ne s'agissait que d'un seul et même gène sur le chromosome 1. De même, l'expression élevée de ce gène dans les macrophages tissulaires matures renforça l'hypothèse que ce gène pouvait être responsable de la résistance/susceptibilité des souris (Vidal, Malo *et al.* 1993). Ce gène fut donc nommé *Nramp* pour Natural Resistance-Associated Macrophage Protein, puis plus tard renommé *Nramp1* ou *Slc11A1* (*Solute carrier family 11 member 1*) lorsque l'on identifia d'autre membre de la famille *Nramp* (Gruenheid, Cellier *et al.* 1995; Vidal, Gros *et al.* 1995). D'ailleurs, peu de temps après, en 1994, son homologue humain fut isolé sur le chromosome 2 par clonage positionnel et nommé *NRAMP1* ou *SLC11A1* (Cellier, Govoni *et al.* 1994).

Plusieurs hypothèses ont alors été formulées sur le rôle du gène *NRAMP1* humain dans la réponse immunitaire de l'hôte. C'est pourquoi de nombreuses recherches se sont portées sur la nature et la fonction de la protéine *NRAMP1* et de son lien avec l'immunité.

1.2.2. Expression et localisation de l'ARNm du gène *NRAMP1*

Des analyses de la distribution tissulaire de l'ARNm du gène *NRAMP1* démontrent que ce gène est spécifiquement exprimé dans certains tissus. En effet, le plus fort taux d'expression de l'ARNm de ce gène est retrouvé dans les cellules du

sang périphérique (PBL) puis plus faiblement dans les poumons, la rate et le foie. Parmi les cellules du sang périphérique, ce sont surtout les polymorphonucléaires (PMN) qui constituent le site d'expression le plus élevé pour le gène *NRAMP1* (Cellier, Govoni *et al.* 1994). Les monocytes aussi expriment ce gène mais plus faiblement, cependant le taux d'expression du gène *NRAMP1* est augmenté lorsque les monocytes migrent vers les tissus et opèrent leur différenciation terminale en macrophages, et ce surtout au niveau des macrophages alvéolaires (Govoni, Vidal *et al.* 1995; Cellier, Shustik *et al.* 1997).

De plus, il a été démontré en utilisant la lignée cellulaire de macrophages murins, RAW264.7, qu'après traitement avec de l'IFN- γ ou du LPS, l'expression de l'ARNm du gène *Nramp1* est régulée à la hausse, simulant ainsi *in vitro* une activation dans un contexte infectieux (Govoni, Gauthier *et al.* 1997).

Afin de déterminer la localisation subcellulaire de la protéine NRAMP1, des analyses avec un anticorps anti-NRAMP1 ont révélé que cette protéine est exclusivement exprimée dans les phagocytes professionnels. Dans les phagocytes murins au repos, la protéine *Nramp1* est localisée dans le compartiment endocytique lysosomal. Après phagocytose d'un microorganisme comme *Salmonella*, *Leishmania* ou *Mycobacterium avium*, la protéine *Nramp1* est recrutée à la membrane du phagosome avec une cinétique semblable au marqueur lysosomal *Lamp1*, mais clairement différent du marqueur endosomal précoce *Rab5* (Gruenheid, Pinner *et al.* 1997; Searle, Bright *et al.* 1998; Govoni, Canonne-Hergaux *et al.* 1999).

Au niveau des PMN, la protéine NRAMP1 est surtout exprimée dans les neutrophiles où elle est retrouvée dans les granules tertiaires. L'hypothèse émise serait que la protéine NRAMP1, présente dans la membrane des granules tertiaires, serait délivrée à la membrane des phagosomes après fusion de ces deux vésicules (Canonne-Hergaux, Calafat *et al.* 2002).

Les PMN jouent un rôle essentiel comme premières lignes de défense contre les infections bactériennes et dans les réactions inflammatoires. Le fait que ce soit ces cellules qui expriment le plus fort taux d'ARNm du gène *NRAMP1* suggère que ce gène a un rôle majeur dans la réponse immunitaire de l'hôte.

1.2.3. Structure de la protéine NRAMP1

Le gène *NRAMP1* code pour une protéine de 550 acides aminés, hydrophobe, constituée de 12 domaines transmembranaires (DTM1 à 12), d'une boucle extra cellulaire extrêmement glycosylée (près de 50% de sa masse) et de plusieurs sites de phosphorylation (Fig. 2) (Cellier, Prive *et al.* 1995; Vidal, Gros *et al.* 1995). De même, la protéine Nramp1 possède un motif ("YGSI") dans son extrémité N-terminale qui permettrait de cibler directement la molécule vers le compartiment endocytique lysosomal (Lam-Yuk-Tseung, Picard *et al.* 2006). Dans la partie cytoplasmique des DTM8 et 9 de la protéine NRAMP1, une séquence consensus homologue à celles retrouvées dans les protéines membranaires de transport (motif de séquence : (E, Q)(S, T, A)₂ (X)₃ G (X)₆ (L, I, V, M, Y, F, A) (X)₄ (F, L, I, V) (P, K)) suggère un rôle possible de cette protéine dans le transport d'ions au niveau des macrophages (Vidal, Malo *et al.* 1993; Buu, Sanchez *et al.* 2000).

La caractérisation de la protéine Nramp1 a permis de mieux comprendre la cause du phénotype de susceptibilité observé chez les lignées murines. En effet, ceci a permis de découvrir qu'une simple mutation ponctuelle est à l'origine de cette susceptibilité. Il s'agit de la substitution d'une guanine par une adénine à la position nucléotidique 596, ce qui résulte en un remplacement non conservatif d'une glycine par un acide aspartique en position 169 dans le domaine transmembranaire 4 (DTM4) de la protéine Nramp1, mutation désignée G169D (Vidal, Tremblay *et al.* 1995). Les conséquences de cette mutation sont donc dues à un changement de charge au niveau du DTM4 puisqu'il s'agit d'un remplacement d'un résidu neutre par un résidu chargé négativement. Il a été démontré que lorsque la mutation G169D est présente sur le gène *Nramp1*, la protéine est absente à la membrane du phagolysosome, suggérant que cette mutation empêche le processus normal d'adressage de la protéine, ce qui conduit probablement à sa dégradation (Vidal, Pinner *et al.* 1996; White, Stewart *et al.* 2004). Chez la souris, les formes alléliques du gène *Nramp1* sont : résistante (dominante : *Nramp1*^{G169}) ou susceptible (récessive : *Nramp1*^{D169}). Les effets majeurs de cette mutation sont d'ailleurs démontrés par le fait que, dans le cas d'une souche virulente de *S. typhimurium*, les souris susceptibles vont succomber rapidement à l'infection alors que les souris résistantes survivent à l'infection (Plant et Glynn 1976).

Par sa localisation, la protéine Nramp1 est donc intimement liée aux pathogènes phagocytés et une mutation dans cette protéine induit un phénotype de susceptibilité important dans des lignées murines infectées par différents pathogènes. Ces observations suggèrent encore une fois que la protéine NRAMP1 participerait à la réponse immunitaire précoce de l'hôte.

1.2.4. Rôle de la protéine NRAMP1

Le rôle de la protéine NRAMP1 a fait l'objet de nombreuses controverses. Celles-ci semblent maintenant résolues, la protéine NRAMP1 est un symporteur dépendant du pH qui permet d'exclure du phagosome des métaux divalents comme le fer et le manganèse qui sont essentiels à la survie des pathogènes (Jabado, Jankowski *et al.* 2000; Forbes et Gros 2003). En effet, les métaux comme le manganèse (Mn), le fer (Fe), ou le cuivre et le zinc (Cu, Zn) sont des cofacteurs essentiels pour les superoxyde dismutases (SOD), enzymes qui permettent de neutraliser le radical superoxyde présent dans la vacuole et ainsi rendre l'environnement du phagolysosome plus propice à la réplication des pathogènes (Fig. 1). Par conséquent, les pathogènes intracellulaires comme *S. typhimurium*, *M. bovis*, *M. tuberculosis* et *L. donovani* qui produisent leur propre SOD, sont privés de leur cofacteur ce qui peut limiter leur survie dans l'environnement hostile du phagosome (Zhang, Lathigra *et al.* 1991; Dey et Datta 1994; Tsolis, Baumler *et al.* 1995). De même, la similarité de localisation de la protéine humaine dans les macrophages comme dans les neutrophiles, suggère qu'elle aurait le même rôle de transporteurs de métaux divalents dans ces deux types de cellules (Canonne-Hergaux, Calafat *et al.* 2002).

Afin de déterminer les effets de la mutation G169D de la protéine Nramp1 sur la résistance naturelle aux infections, et ainsi de mieux comprendre la fonction de la protéine NRAMP1, des souris déficientes pour le gène *Nramp1* (*Nramp1*^{-/-}) ont été créées (Vidal, Tremblay *et al.* 1995). La réplication intracellulaire de *Mycobacterium avium* dans des macrophages provenant de ces deux types de souris, mutées ou sauvages, a ensuite été testée (Frehel, Canonne-Hergaux *et al.* 2002). Les résultats montrent une réplication intense et rapide des bactéries dans les cellules *Nramp1*^{-/-} déficientes alors qu'aucune réplication n'a lieu dans les phagolysosomes de cellules *Nramp1*^{+/+}. Une autre étude montre qu'un traitement avec de fortes doses de fer chez

des souris portant l'allèle *Nramp1*^{G169} ou *Nramp1*^{D169}, infectées par *Mycobacterium avium*, conduit à une forte répllication de ce pathogène dans les organes de ces deux types de souris. Cependant, chez les souris de types sauvages (*Nramp1*^{G169}) cette croissance bactérienne est moins importante que chez les souris portant la mutation G169D (Gomes et Appelberg 1998). Ces résultats confirment que la protéine Nramp1 exerce son action anti-microbienne en transportant le fer hors du phagosome, privant ainsi le pathogène phagocyté d'un élément essentiel à sa survie.

La présence de la protéine Nramp1 dans le phagocyte permet la maturation du phagosome. En effet, dans des macrophages *Nramp1*^{-/-} infectés par *M. avium* ou *tuberculosis*, un arrêt de la maturation des phagosomes à un stade précoce est observé et aucune fusion phago-lysosomale ne se produit entraînant une forte croissance de ces bactéries dans les phagosomes. A l'inverse, un fort taux de fusions phago-lysosomales est constaté dans les phagocytes de type sauvage et ce phénomène est lié à un retard de multiplication de ces pathogènes puis à leur élimination dans les phagosomes (de Chastellier, Frehel *et al.* 1993; Hackam, Rotstein *et al.* 1998).

La délétion du gène *Nramp1* dans ces souris a donc permis de démontrer d'une part l'importance de cette protéine dans le contrôle de la répllication de certains pathogènes intracellulaires mais aussi, cela a permis de révéler que la mutation G169D des souris susceptibles est équivalente à une perte totale du gène *Nramp1* puisque les effets sont similaires. Cependant, le point qui confirme l'importance de cette protéine, c'est le fait que si l'allèle résistant *Nramp1* est transféré dans des souris susceptibles qui possèdent la mutation G169D, cela restaure la résistance aux infections par *Mycobacterium* et *Salmonella* prouvant que l'activité de la protéine est bien l'élément qui confère la résistance à ces infections (Govoni, Vidal *et al.* 1996; Govoni et Gros 1998).

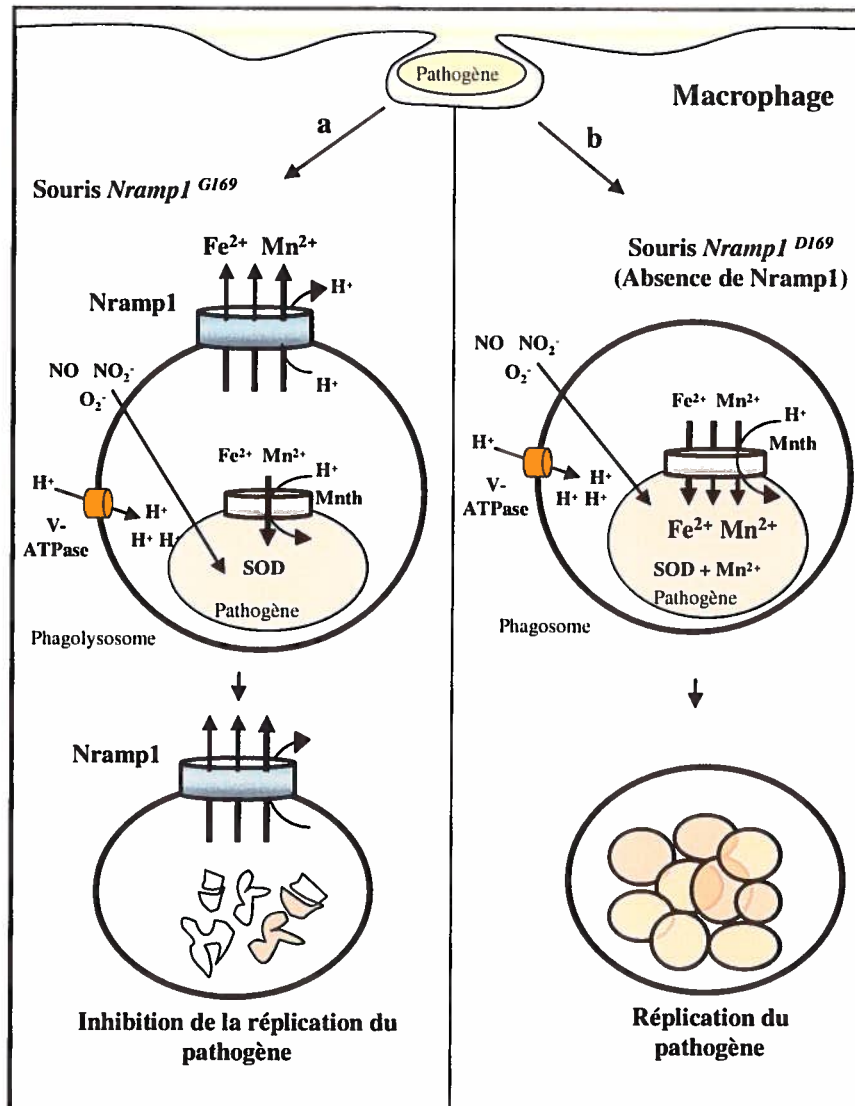


Figure 1. Rôle hypothétique de la protéine Nrpamp1 lors de l'interaction hôte-pathogène. (Adapté de Nevo, Y. et Nelson N. 2006)

(a) Dans les macrophages de type sauvage (*Nrpamp1*^{G169}), le pathogène est phagocyté et se retrouve dans un phagosome qui va fusionner avec un endosome tardif/lysosome-positif pour Nrpamp1. Dans le phagolysosome, la protéine Nrpamp1 de l'hôte et son homologue chez le pathogène, MntH, vont compétitionner ensemble pour l'acquisition de métaux divalents essentiels à partir de la lumière du phagolysosome. En limitant la disponibilité de métaux pour le pathogène, la protéine Nrpamp1 va restreindre la réplication du pathogène. (b) Dans les macrophages portant la mutation G169D (souris *Nrpamp1*^{D169}) qui empêche l'expression de la protéine à la membrane du lysosome, le pathogène peut se procurer les métaux essentiels à sa croissance dans le phagosome et inhiber la fusion phago-lysosomale, rendant l'intérieur du phagosome moins acide et peu bactéricide ce qui favorise la réplication du pathogène.

La découverte de la mutation G169D du gène *Nramp1* et l'utilisation de modèles murins portant cet allèle susceptible a permis de mettre en évidence d'autres fonctions du gène *Nramp1*. Le gène *Nramp1* peut avoir une influence sur la présentation antigénique. En effet, une défectuosité dans la présentation de l'antigène peptidique par les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II est observée dans des macrophages possédant un fragment de chromosome portant l'allèle susceptible du gène *Nramp1* (*Nramp1*^{D169}) après induction avec l'IFN- γ . A l'inverse, dans les macrophages portant l'allèle résistant (*Nramp1*^{G169}), une régulation à la hausse de ces complexes peptides/CMH est observée (Lang, Prina *et al.* 1997). En influençant la présentation antigénique, le gène *Nramp1* est donc indirectement impliqué dans l'activation des cellules T CD4-positives. C'est pourquoi, lors d'une infection, chez les souris portant l'allèle résistante, on observe une activation des cellules T effectrices de type T_H1, alors qu'une réponse de type T_H2 est observée chez les souris susceptibles *Nramp1*^{D169} (Soo, Villarreal-Ramos *et al.* 1998; Blackwell, Black *et al.* 1999).

Le gène *Nramp1* est donc au centre de processus complexes qui permettent l'activation du macrophage et par conséquent le déroulement d'une réponse immunitaire efficace. Le haut degré de conservation de la séquence peptidique de la protéine NRAMP1 au cours de l'évolution suppose déjà que l'introduction d'une charge dans un de ces domaines peut entraîner des effets sévères sur la fonction de cette protéine.

1.3. La famille Nramp

Le gène *NRAMP1* n'est pas un gène isolé mais plutôt membre d'une petite famille de gènes, la famille Nramp, dont la structure et la fonction ont été conservées au cours de l'évolution des espèces.

1.3.1. Les membres de la famille Nramp

L'identification et la caractérisation du gène *NRAMP1* a permis par la suite de découvrir qu'il provenait d'une petite famille de protéines membranaires hautement conservées puisqu'on retrouve des homologues du gène *NRAMP1* chez les plantes, les levures, les insectes, les mycobactéries, les nématodes et les mammifères. Par exemple, la plante *Arabidopsis thaliana* possède cinq homologues du gène *NRAMP1* nommés *AtNramp1* à 5 (Curie, Alonso *et al.* 2000). Chez la levure, trois homologues ont été identifiés : *Smf1*, 2 et 3 (Portnoy, Liu *et al.* 2000). La Drosophile, par contre, ne possède qu'un seul homologue : *MvL* (D'Souza, Cheah *et al.* 1999). Tous les homologues de la famille Nramp possèdent une structure protéique similaire avec un minimum de 11 et un maximum de 12 domaines transmembranaires. D'ailleurs, on observe 88% d'identité entre la protéine NRAMP1 humaine et murine (Vidal, Gros *et al.* 1995).

Chez l'humain et la souris, peu de temps après le clonage du gène *NRAMP1*, un second gène a été identifié désigné *NRAMP2* ou *SLC11A2*, situé sur le chromosome 12 (chromosome 15 chez la souris) (Gruenheid, Cellier *et al.* 1995; Vidal, Belouchi *et al.* 1995). A l'opposé du gène *NRAMP1*, il est exprimé dans tous les tissus mais son expression est plus élevée dans le duodénum et le rein (Canonne-Hergaux, Gruenheid *et al.* 1999). Ce gène code pour une protéine transmembranaire nommée DCT1 ou DMT1 qui possède 78 % d'identité avec la protéine NRAMP1 (Cellier, Prive *et al.* 1995). Des études d'électrophysiologie dans des œufs de xenope ont démontré que la protéine *Nramp2* facilite le transport de métaux comme le fer, le manganèse et le zinc, couplé au transport de protons (Gunshin, Mackenzie *et al.* 1997).

Chez les bactéries aussi il existe des homologues des gènes de la famille Nramp qui possèdent 40-45% de similarité de séquence avec ceux des mammifères. Chez *S. typhimurium*, *E. coli*, *B. subtilis* et *M. tuberculosis* l'homologue du gène *NRAMP1* est nommé *MntH* (Cellier, Bergevin *et al.* 2001). Chez les bactéries, ces protéines fonctionnent aussi comme des transporteurs de métaux divalents. En effet, dans le phagolysosome, la protéine MntH chez la bactérie phagocytée, va

compétitionner avec son homologue NRAMP1, pour acquérir les métaux qui sont essentiels à leur survie dans l'environnement hostile du phagolysosome (De Voss, Rutter *et al.* 1999; Boyer, Bergevin *et al.* 2002).

Une des caractéristiques intéressantes de la famille Nramp est le fort taux d'identité des séquences, bien que les espèces auxquelles elles appartiennent aient divergées il y a très longtemps.

1.3.2. L'évolution de la famille Nramp

Plus de deux milliards d'années d'évolution séparent ces protéines membranaires, pourtant leurs séquences sont fortement conservées. Ceci suggère que les membres de la famille Nramp proviennent tous d'une classe d'anciens transporteurs de métaux dont la structure et la fonction ont été conservées (Nevo et Nelson 2006).

Les séquences les plus conservées de la protéine Nramp, se situent dans un cœur hydrophobe comprenant les 10 premiers domaines transmembranaires (**Fig. 2**). Point intéressant, puisque c'est dans les domaines très conservés 8 et 9 que se situe un motif de séquence pour la fonction de transporteur (Cellier, Prive *et al.* 1995), ce qui révèle que la fonction de transport a été maintenue au cours de l'évolution pour chaque protéine de la famille Nramp.. Une forte homologie a aussi été démontrée entre les domaines transmembranaires 4 de Nramp1 et Nramp2. En effet, une substitution d'une glycine par une arginine en position 185 dans le DTM4 de Nramp2 résulte en un dysfonctionnement majeur du transport du fer et conduit à une anémie microcytique chez la souris (Fleming, Trenor *et al.* 1997; Su, Trenor *et al.* 1998). Cela suggère donc que l'introduction d'une charge dans le domaine transmembranaire 4 pourrait avoir des conséquences biologiques importantes au sein de la famille NRAMP.

Le haut degré d'homologie entre *Nramp1* et *Nramp2* suggère que ces deux gènes proviennent d'un ancêtre commun dont la duplication a permis leur évolution sur deux chromosomes différents. A l'origine, la protéine Nramp serait apparue chez

les procaryotes puis aurait été transmise aux eucaryotes où une première duplication du gène aurait eu lieu. En effet, deux grands groupes de protéines Nramp sont présents chez les eucaryotes : le prototype, qui est retrouvé principalement dans les organismes unicellulaires comme l'amibe *Dictyostelium discoideum*, et l'archétype, présent uniquement chez les eucaryotes supérieurs (Richer, Courville *et al.* 2003; Cellier, Courville *et al.* sous presse). Une deuxième duplication de ce gène à partir de l'archétype serait à l'origine des gènes *Nramp1* et *Nramp2*. Cette duplication a probablement eu lieu avant la radiation des mammifères (Burge, Gauthier *et al.* 2004). La manipulation du gène *Nramp1* dans l'amibe *Dictyostelium discoideum*, qui est un phagocyte professionnel, a permis l'analyse de la fonction de la protéine correspondante au cours d'une infection par les bactéries *Mycobacterium avium* et *Legionella pneumophila* (Peracino, Wagner *et al.* 2006).

Bien que les deux protéines NRAMP1 et NRAMP2 aient une homologie dans leur structure, leurs rôles divergent. La protéine NRAMP1 est impliquée dans la réponse immunitaire alors que la protéine NRAMP2 est associée à l'homéostasie du fer. L'hypothèse suggérée serait qu'après la duplication, la spécialisation du rôle de ces deux homologues chez les mammifères se serait effectuée au niveau de la régulation de l'expression de ces gènes puisque la protéine NRAMP1 est spécifiquement exprimée dans les cellules myéloïdes alors que la protéine NRAMP2 est ubiquitaire. C'est pourquoi, l'identification des mécanismes transcriptionnels mis en jeu pour l'expression du gène *NRAMP1* est nécessaire pour mieux comprendre sa spécificité d'expression.

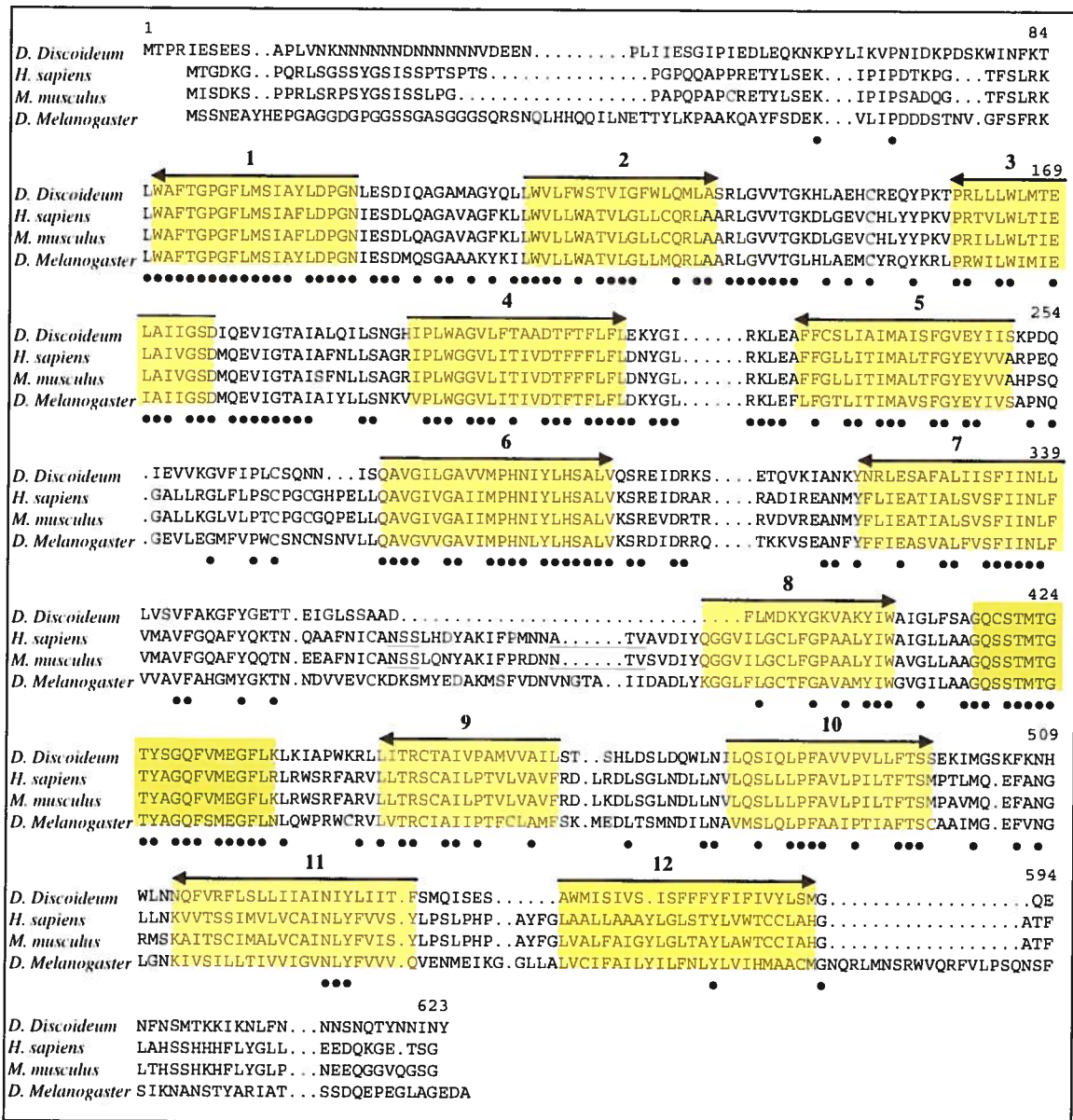


Figure 2. Alignement des séquences peptidiques de 4 homologues de la famille Nramp : la séquence *Nramp1* de *D. discoideum*, *H. sapiens* (NCBI accession N°BAA08907), *M. musculus* (Swiss Prot. N° P41251) et de *D. melanogaster* (N° AAL13772) (Adapté de (Peracino, Wagner *et al.* 2006).

Les 12 DTM potentiels sont désignés en jaune et surlignés par une flèche qui montre leur orientation dans la membrane. Les résidus conservés dans les 4 séquences sont représentés par des cercles pleins (●). Les sites potentiels de glycosylation sont surlignés et la région contenant le motif de transport est coloriée en vert.

1.3.3. Implication de la famille Nramp dans l'homéostasie du fer

Le fer est un élément essentiel à toute forme de vie car il est non seulement indispensable pour le transport de l'oxygène mais aussi pour d'autres réactions cellulaires (transferts d'électrons, synthèse d'ADN, etc).

Apporté par les aliments, le fer doit rapidement être mobilisé et véhiculé à travers les barrières cellulaires pour être mis en réserve sous une forme disponible. Le fer libre Fe^{2+} est rare car il est le plus souvent oxydé et lié à des protéines. Dans la cellule, le fer peut être stocké par la ferritine et dans la circulation sanguine, la transferrine permet de le véhiculer dans tout l'organisme (Hentze, Muckenthaler *et al.* 2004). L'homéostasie du fer repose sur un contrôle strict de son absorption intestinale, au niveau du duodénum, et de son recyclage après dégradation des globules rouges sénescents par les macrophages. Il n'existe aucun processus pour l'organisme d'éliminer le fer absorbé en excès. Or une surcharge en fer est très toxique pour l'organisme et peut conduire à de sévères maladies du sang comme la thalassémie, l'anémie hémolytique ou l'hémochromatose (Andrews 2000).

Par conséquent, pour éviter cette surcharge en fer, il est nécessaire que l'absorption intestinale de ce cation et son recyclage soient finement régulés. Pour cela, au niveau des villosités intestinales, se trouvent des protéines transmembranaires dont la fonction est de transporter le fer de la lumière intestinale vers le cytoplasme de la cellule (Fleming et Andrews 1998). La protéine Nramp2 a d'ailleurs été le premier transporteur de fer identifié chez les mammifères et c'est une des principales protéines transmembranaires qui permet l'entrée du fer dans le duodénum (Fleet 1998; Andrews 1999). Son importance est d'ailleurs illustrée par le fait qu'une mutation dans le gène *Nramp2* (mutation G185R) chez des souris (souris mk/mk) entraîne de sévères déficiences systémiques en fer et une forte anémie (Fleming, Trenor *et al.* 1997; Su, Trenor *et al.* 1998). Des souris déficientes pour le gène *Nramp2* (*Nramp2*^{-/-}) présentent cependant un phénotype plus sévère que celui observé chez les souris homozygote pour la mutation G185R. Les souris *Nramp2*^{-/-} naissent anémiques mais sans anomalies du développement et meurent après 7 jours (Gunshin, Fujiwara *et al.* 2005).

De même, chez l'homme, des mutations dans le gène *NRAMP2* sont aussi responsables de sévères anémies microcytiques, dû à une perte de l'activité de transport ou de recyclage de cette protéine dans le cas de la mutation R416C (Lam-Yuk-Tseung, Camaschella *et al.* 2006), ou à une faible expression de la protéine à cause de la mutation E399D (Lam-Yuk-Tseung, Mathieu *et al.* 2005).

L'organisme d'un être humain adulte contient environ 4 g de fer, dont plus de la moitié est associée à l'hémoglobine des érythrocytes circulants. La phagocytose des globules rouges sénescents par les macrophages assure un recyclage efficace des atomes de fer vers le plasma : environ 25 mg de fer pourraient ainsi être recyclés quotidiennement pour participer à l'érythropoïèse (Knutson et Wessling-Resnick 2003). La protéine *NRAMP2* est aussi exprimée dans la membrane des endosomes de recyclage qui fusionnent avec les phagosomes contenant les érythrocytes sénescents. *NRAMP2* participe à l'acquisition du fer via le cycle de la transferrine notamment dans les érythrocytes (Jabado, Canonne-Hergaux *et al.* 2002).

1.3.4. Séquestration du fer lors d'une infection

Le fer est l'objet d'une guerre acharnée entre les organismes vivants, tous ayant des systèmes plus ou moins sophistiqués pour le solubiliser et le séquestrer. Le succès de l'infection et de la colonisation d'un hôte par un pathogène bactérien dépend donc pour beaucoup de l'issue de cette compétition pour le fer.

Toutes les inflammations entraînent une diminution du fer sérique, un stockage anormal du fer dans les macrophages et une diminution de l'absorption du fer par le duodénum. De ce fait, le fer n'est plus disponible pour la synthèse de l'hémoglobine malgré une concentration normale ou élevée de ferritine, ce qui induit une anémie (Jurado 1997). L'hepcidine est l'hormone qui permet d'adapter l'absorption et la localisation cellulaire du fer aux besoins. L'hyperproduction d'hepcidine en réponse à l'inflammation joue un rôle essentiel dans les anémies inflammatoires. L'hepcidine est augmentée par divers stimuli inflammatoires que ce soit lors d'une infection bactérienne (Shike, Lauth *et al.* 2002) ou après injection de LPS (Pigeon, Ilyin *et al.*

2001). L'interleukine IL-6 qui est produit par les macrophages en réponse à l'inflammation est un agent inducteur positif de l'hepcidine par les hépatocytes (Nemeth, Valore *et al.* 2003). L'augmentation de l'hepcidine dans des situations d'inflammation conduit à une diminution du fer sérique. Cette hormone agit au niveau des entérocytes du duodénum, en diminuant l'expression de la protéine NRAMP2 (Yamaji, Sharp *et al.* 2004) et au niveau du macrophage en réduisant la libération de fer via la ferroportine (Nemeth, Rivera *et al.* 2004). L'hepcidine participe donc, de par son action hyposidéremiante, à lutter contre les infections/inflammations en réduisant le fer libre indispensable aux organismes pathogènes ou aux cellules cancéreuses en prolifération.

La disponibilité du fer dans l'organisme est donc un élément essentiel lors de la réponse aux infections. La protéine NRAMP1, en tant que symporteur de métaux divalents comme le fer, joue donc un rôle direct dans la réponse aux infections puisqu'elle prive les pathogènes de cet élément essentiel à leur survie (Cellier, P. *et al.* 2007, sous presse).

1.4. Polymorphismes du gène *NRAMP1* humain

Des recherches de mutations dans la séquence du gène *NRAMP1*, pouvant causer un phénotype de susceptibilité aussi majeur que chez la souris, ont été entreprises mais sans succès. Cependant, de nombreux polymorphismes ont été identifiés dans le gène *NRAMP1*, et certains pourraient être associés à une prédisposition à certaines maladies.

1.4.1. Les polymorphismes du gène *NRAMP1*

Le gène *NRAMP1* existe sous plusieurs formes alléliques au sein de la population. En effet, il existe 12 variants du gène *NRAMP1* dont 5 sont situés dans les régions codantes (exons), 5 dans les régions non transcrites (introns) et 2 dans le promoteur (Fig. 3). Parmi ces polymorphismes, 4 font principalement l'objet de nombreuses études puisqu'ils se retrouvent plus fréquemment chez les personnes

susceptibles à certaines maladies infectieuses, dont la tuberculose (Liu, Fujiwara *et al.* 1995; Buu, Sanchez *et al.* 2000).

En général, les polymorphismes situés dans les exons d'un gène peuvent engendrer des conséquences importantes sur l'expression et la fonction de la protéine encodée. Dans le cas du gène *NRAMP1*, les variants se retrouvant dans les exons représentent, pour la majorité, des substitutions silencieuses. Parmi eux, le polymorphisme 274C/T dans l'exon 3 serait associé à la résistance/susceptibilité à la tuberculose pédiatrique (Malik, Abel *et al.* 2005). Seul le polymorphisme situé sur le dernier exon du gène *NRAMP1* (exon 15), nommé D543N ne correspond pas à une mutation silencieuse. En effet, il s'agit de la substitution d'un acide aspartique par une asparagine sur le codon 543, c'est-à-dire le remplacement d'un acide aminé chargé négativement par un acide aminé neutre (Liu, Fujiwara *et al.* 1995). Les conséquences de ce changement de charge au niveau de la structure de la protéine NRAMP1 ne sont pas encore connues. Cependant, des études suggèrent que ce polymorphisme pourrait avoir un impact sur la fonction de la protéine NRAMP1 (Stienstra, van der Werf *et al.* 2006).

Les études des polymorphismes au niveau des introns du gène *NRAMP1* se portent principalement sur deux variants. Le polymorphisme situé dans l'intron 4, nommé INT4, correspond à un simple changement d'un nucléotide, une guanine par une cytosine en position 469. De même, à 55 nucléotides en aval du dernier codon de l'exon 15, un autre polymorphisme apparemment significatif a été identifié et nommé 3'UTR. Il s'agit de la délétion d'une séquence TGTG (An, Feng *et al.* 2006).

Parmi les polymorphismes qui pourraient avoir le plus d'impact sur la susceptibilité aux infections et qui font d'ailleurs l'objet de nombreuses études figurent ceux situés dans le promoteur. En effet, des mutations dans cette région du gène peuvent directement influencer l'expression de celui-ci et par conséquent la synthèse et le taux de la protéine encodée. Les deux polymorphismes correspondent pour l'un, à une répétition (GT)*n* et pour l'autre à une substitution d'une cytosine par une thymine en position -236 (Lewis, Victor *et al.* 1996; Searle et Blackwell 1999). Le polymorphisme (GT)*n* se retrouve sous différents allèles dans la population et ceux les plus communs sont les allèles 2 et 3 qui sont d'ailleurs fortement associés à une susceptibilité/résistance à certaines maladies (Blackwell, Searle *et al.* 2003).

Plusieurs hypothèses quant aux conséquences des polymorphismes sur l'expression du gène *NRAMP1* ont été proposées. Par exemple, des études suggèrent qu'il existe sur ce promoteur des éléments de réponse à des stimuli qui pourraient se situer à proximité des deux polymorphismes du promoteur (Zaahl, Robson *et al.* 2004). C'est pourquoi la réponse du gène *NRAMP1* face à une infection peut être différente selon les variants présents dans le promoteur. La protéine NRAMP1 joue un rôle important dans l'inhibition de la réplication des pathogènes, par conséquent, une simple modulation de l'expression de ce gène due aux polymorphismes pourrait avoir des conséquences importantes sur la susceptibilité aux maladies infectieuses et auto-immunes.

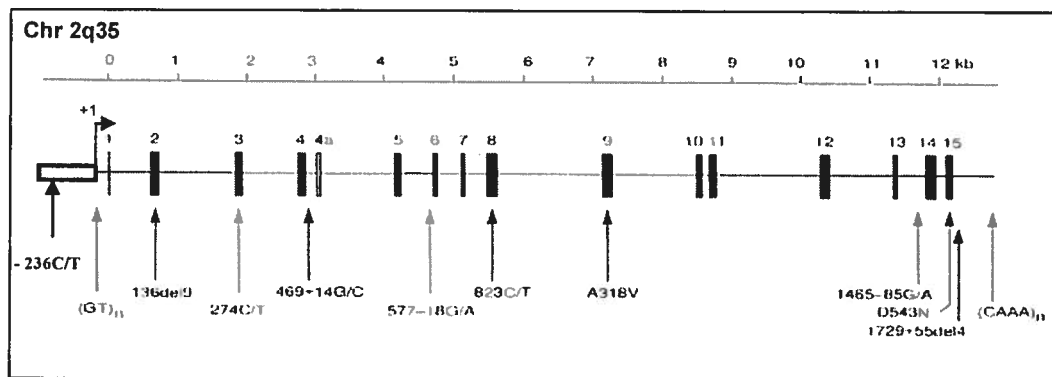


Figure 3. Polymorphismes du gène *NRAMP1* humain.
(Adapté de Buu, Sanchez *et al.* 2000)

5 polymorphismes du gène *NRAMP1* sont situés dans des exons (exons représentés par des rectangles noirs), 5 dans des introns (introns représentés par la ligne) et 2 sont situés dans le promoteur (promoteur représenté par un rectangle blanc).

1.4.2. Association : polymorphismes du gène *NRAMP1* et susceptibilité à certaines maladies infectieuses

L'expression et le devenir d'une infection chez l'humain résultent de l'interaction entre l'agent pathogène et le système immunitaire de l'hôte infecté dans un environnement donné. Alors que certaines personnes vont développer une

immunité efficace face aux pathogènes et ne manifestent aucun signe clinique de maladie, d'autres personnes à l'inverse, présenteront un large spectre de symptômes corrélés avec leur réponse immunitaire. Bien que la susceptibilité à une infection dépende en premier lieu de l'état de santé du sujet, de nombreuses études suggèrent que le bagage génétique de l'hôte serait aussi responsable de la prédisposition à certaines maladies (Woolhouse, Webster *et al.* 2002). Le gène *NRAMP1* est un des candidats qui pourraient contribuer aux prédispositions génétiques à certaines maladies.

En effet, plusieurs études suggèrent que les polymorphismes des régions en 5' et 3' du gène *NRAMP1* pourraient prédisposer à une sensibilité à certaines maladies infectieuses, dont particulièrement la tuberculose et la lèpre dans certaines régions endémiques (Abel, Sanchez *et al.* 1998; Govoni et Gros 1998; Ferreira, Goulart *et al.* 2004). Cependant, grâce aux connaissances plus approfondies sur les effets pléiotropiques du gène *NRAMP1* sur l'activation et la fonction du macrophage (Lang, Prina *et al.* 1997), la liste des maladies, dans lesquelles ce gène pourrait être impliqué, s'allonge. En effet, à ce jour plus d'une centaine d'articles scientifiques associent le gène *NRAMP1* à une susceptibilité à d'autres infections comme la brucellose, la sarcoïdose, la maladie d'Alzheimer, les leishmanioses ou encore dans la progression de certaines infections comme l'hépatite C (Mohamed, Ibrahim *et al.* 2004; Romero-Gomez, Montes-Cano *et al.* 2004; Dubaniewicz, Jamieson *et al.* 2005; Jamieson, White *et al.* 2005). De même, ce facteur génétique prédisposerait aussi à certaines maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde juvénile et le diabète de type 1 (Shaw, Clayton *et al.* 1996; Sanjeevi, Miller *et al.* 2000).

Des études suggèrent que les polymorphismes dans le promoteur *NRAMP1* pourraient contribuer directement à une susceptibilité à ces maladies infectieuses ou auto-immunes. En effet, au niveau du variant 5'(GT)_n du promoteur, une faible expression de l'allèle 2 serait associée à une susceptibilité aux infections mais protégerait contre les maladies auto-immunes. Inversement, la présence de l'allèle 3 de ce polymorphisme, permettrait une résistance aux maladies infectieuses mais une susceptibilité face aux maladies auto-immunes (Searle et Blackwell 1999; Blackwell, Searle *et al.* 2003).

1.4.3. Cas de l'infection à *M. tuberculosis* : lien avec l'expression du gène *NRAMP1*

Mycobacterium tuberculosis peut infecter tous les tissus de l'organisme mais la contamination pulmonaire est la plus néfaste et la principale cause des épidémies de tuberculose. Après inhalation de *Mycobacterium tuberculosis* en suspension dans l'air, ces bacilles vont se déposer sur les alvéoles pulmonaires. Les macrophages alvéolaires, présents dans ces tissus, sont les premières cellules du système immunitaire qui entrent en contact direct avec les bactéries et les phagocytent (Kaufmann 2001). Une fois la réponse immunitaire initiée, il se forme un foyer infectieux dans les poumons et dans la majorité des cas, le sujet ne présentera aucun signe clinique d'une infection à *M. tuberculosis*. Dans d'autres cas cependant, la multiplication des bacilles dans le phagosome est mal contrôlée et des lésions granulomateuses avec nécrose centrale et fibrose apparaissent. Cela représente alors les 10% de personnes symptomatiques parmi les 30% infectés dans la population mondiale (Raviglione, Snider *et al.* 1995).

Il existe aujourd'hui de nombreux traitements pour combattre cette maladie et un vaccin est disponible (le BCG) dans les pays industrialisés. Cependant, l'efficacité du vaccin est variable et l'antibiothérapie nécessite plusieurs mois de traitement ce qui amène souvent à l'arrêt prématuré du traitement, favorisant l'émergence et la dissémination de souches multirésistantes aux antibiotiques (Espinal 2003). Cette maladie infectieuse persiste et la fréquence de personnes atteintes de cette maladie est en progression constante dans certains pays comme l'Amérique du Nord (Fanning 1999). Le fait que certaines personnes infectées par *Mycobacterium tuberculosis* ne développent jamais la maladie sous entend que la réponse de l'hôte, face à l'invasion de ce pathogène, doit jouer un rôle important dans le devenir de l'infection. Par conséquent, des prédispositions génétiques, des facteurs environnementaux, et la résistance de *M. tuberculosis* à de multiples médicaments peuvent contribuer au développement de la maladie.

Dans la recherche de facteurs génétiques responsables de la susceptibilité à *M. tuberculosis*, de nombreuses études se sont portées sur l'analyse des polymorphismes du gène candidat *NRAMP1* (Greenwood, Fujiwara *et al.* 2000). En effet, les macrophages alvéolaires qui sont les premières cellules sur le site de l'infection, sont

également parmi les cellules qui expriment le plus fortement le gène *NRAMP1*. De plus, la position stratégique de la protéine NRAMP1 dans le phagolysosome suppose qu'elle puisse jouer un rôle important dans l'élimination des bacilles phagocytés tout en suscitant plusieurs interrogations quant à l'influence du gène correspondant sur la susceptibilité/résistance à la tuberculose.

Parmi les polymorphismes du gène *NRAMP1*, 4 ont fréquemment été associés à une susceptibilité à la tuberculose : celui situé dans l'intron 4, INT4, le polymorphisme D543N, celui dans la région 3' non traduite du gène, 3'UTR, et le polymorphisme situé dans le promoteur, (GT)_n (Bellamy, Ruwende *et al.* 1998). Cependant, les résultats des études diffèrent selon l'origine ethnique des sujets et l'association de *NRAMP1* avec la susceptibilité à la tuberculose reste encore controversée. Par exemple, les polymorphismes 3'UTR et D543N ont été liés à une susceptibilité à la tuberculose en Afrique de l'est, au Japon et en Corée mais pas en Inde, au Cambodge ou en Taiwan. Une méta-analyse statistique démontre cependant une association significative de ces 4 polymorphismes à une prédisposition à la tuberculose dans la population asiatique et africaine. A l'inverse, les Européens seraient plus résistants à l'infection par *M. tuberculosis* puisque le gène *NRAMP1* serait un facteur de résistance qui aurait été sélectionné pendant plus de 300 ans (Li, Zhang *et al.* 2006).

En parallèle, d'autres études tentent de démontrer qu'en fait les polymorphismes du gène *NRAMP1* contribueraient plus à un développement de la forme sévère de l'infection à *M. tuberculosis* qu'à une susceptibilité à cette maladie (Soborg, Andersen *et al.* 2002; Zhang, Shao *et al.* 2005). En effet, si les différents variants ont un effet sur le rôle de la protéine NRAMP1, cela pourrait influencer la fonction phagolysosomale des macrophages alvéolaires et jouer sur la réplication de *M. tuberculosis* et donc sur la progression et le devenir de l'infection.

Bien qu'aucun lien causal direct entre une mutation du gène *NRAMP1* humain et une susceptibilité à certains pathogènes n'aient encore été mis en évidence à ce jour, le gène *NRAMP1* est néanmoins considéré comme un facteur génétique de prédisposition à certaines maladies. En effet, les études supposent qu'il joue un rôle crucial dans l'activation des macrophages et dans l'élimination des microbes phagocytés (Searle, Bright *et al.* 1998). Une modification dans la synthèse ou la

fonction de cette protéine peut donc avoir des répercussions importantes sur la survie des pathogènes dans les macrophages. C'est pourquoi, de nombreuses études tentent aujourd'hui de mieux comprendre, dans un premier temps, comment se fait la régulation du gène *NRAMP1* car, ultérieurement, cela permettra d'interpréter plus précisément les conséquences des différents polymorphismes sur la régulation de ce gène et donc de leurs associations à une susceptibilité/résistance aux maladies.

1.5. Modèle d'étude du gène *NRAMP1*

Dans le but d'étudier la régulation du gène *NRAMP1* et de démontrer les effets des différents polymorphismes de ce gène sur son expression et sa fonction et donc sur la susceptibilité à certaines maladies, la recherche d'un modèle d'étude est nécessaire.

Searle et Blackwell ont utilisé la lignée monocyttaire humaine U937 pour démontrer que le polymorphisme de répétition dans le promoteur *NRAMP1* (GT)_n pourrait contribuer directement à une susceptibilité aux infections versus maladies auto-immunes, en influençant l'expression de ce gène. Différentes constructions alléliques associées à ce polymorphisme (allèles 1, 2, 3 et 4) ont été transfectées dans ces cellules stimulées avec de l'IFN γ , avec ou sans LPS. Alors que l'addition de LPS n'a aucun effet sur les allèles 1 et 4, il cause une réduction significative de l'expression du gène *NRAMP1* conduit par l'allèle 2 et une augmentation de l'expression de ce gène conduit par l'allèle 3 (Searle et Blackwell 1999). Leurs résultats corrélerent avec l'hypothèse que l'hyperactivation chronique des macrophages associée à la forte expression du gène *NRAMP1* permise par l'allèle 3 peut être fonctionnellement liée à la susceptibilité aux maladies auto-immunes, alors que le faible taux d'expression de *NRAMP1* promu par l'allèle 2 mène à une susceptibilité aux maladies infectieuses (Shaw, Clayton *et al.* 1996).

Le contrôle de l'expression des gènes se fait en partie au niveau de la transcription. C'est pourquoi, l'identification des mécanismes de régulation transcriptionnelle mis en jeu sur le promoteur *NRAMP1* au cours de la différenciation myéloïde est indispensable pour mieux comprendre les conséquences des

polymorphismes sur l'expression de ce gène. La lignée promyélocytaire HL-60 est utilisée comme modèle d'étude du gène *NRAMP1* puisqu'elle peut se différencier en cellules myéloïdes.

1.5.1. La lignée HL-60

La lignée cellulaire promyélocytaire HL-60 a été établie à partir de leucocytes du sang périphérique d'un patient atteint de leucémie promyélocytaire aiguë. Ce sont des cellules promyélocytaires qui possèdent les mêmes caractéristiques morphologiques et histochimiques que les cellules myéloïdes (Collins, Gallo *et al.* 1977; Dalton, Ahearn *et al.* 1988). Une des caractéristiques les plus intéressantes de cette lignée immature HL-60, c'est qu'elle possède une bipotentialité monocytaire et granulocytaire. C'est pourquoi ces cellules sont utilisées fréquemment comme modèle pour la différenciation myéloïde *in vitro*. Cela permet ainsi de mieux comprendre comment se fait la régulation de certains gènes spécifiquement myéloïdes, puisque leur expression peut être contrôlée à différents stades de maturation de ces cellules (Birnie 1988), ce qui est le cas du gène *NRAMP1*.

1.5.2. Différenciation myéloïde de la lignée HL-60 et expression du gène *NRAMP1*

1.5.2.1. Différenciation monocytaire

La différenciation de la lignée promyélocytaire HL-60 en monocyte mature ou en macrophage peut être induite par exposition à la forme active de la vitamine D (VD) ou le phorbol myristate acetate (PMA) (Fig. 4) (Abe, Miyaura *et al.* 1981; Koeffler, Bar-Eli *et al.* 1981; Studzinski, Bhandal *et al.* 1985). L'expression du gène *NRAMP1* est détectée après 1 jour de différenciation et atteint son maximum d'expression après 5 jours de différenciation de la lignée HL-60 par la VD (Roig, Richer *et al.* 2002). La différenciation myéloïde de la lignée HL-60 par la VD se déroule selon deux étapes : une première période de multiplication des cellules (24h et 48h après induction) après laquelle le cycle s'arrête. Cette période est suivie d'une

deuxième étape de maturation terminale en monocytes/macrophages (Studzinski, Bhandal *et al.* 1985). La différenciation monocyttaire peut être vérifiée par l'apparition du récepteur de surface CD14 qui est spécifiquement induit à la surface des phagocytes après une exposition à la VD (Li, Wang *et al.* 2002).

1.5.2.2. Différenciation granulocytaire

La différenciation de la lignée HL-60 en polymorphonucléaires peut être également induite par le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'acide rétinoïque (ATRA) ou encore simplement par une variation de température (**Fig. 4**) (Collins, Ruscetti *et al.* 1978; Breitman, Selonick *et al.* 1980; Richards, Watson *et al.* 1988). Cette différenciation granulocytaire concorde avec une forte induction de l'ARNm du gène *NRAMP1* (Cellier, Shustik *et al.* 1997). Après une induction au DMSO, les cellules HL-60 se différencient en granulocytes de type neutrophiles. Ces cellules possèdent les mêmes fonctions que les PMN matures : génération de superoxyde, ingestion de particules, dégranulation et destruction du pathogène (Collins, Ruscetti *et al.* 1979). Lorsque les cellules HL-60 se différencient en PMN, elles vont alors exprimer à leur surface des marqueurs spécifiques des phagocytes et des cellules NK tel que CD11b. Cependant, à la différence de la différenciation monocyttaire, elles n'exprimeront pas le marqueur CD14 (Canonne-Hergaux, Calafat *et al.* 2002; Chang, Oh *et al.* 2006).

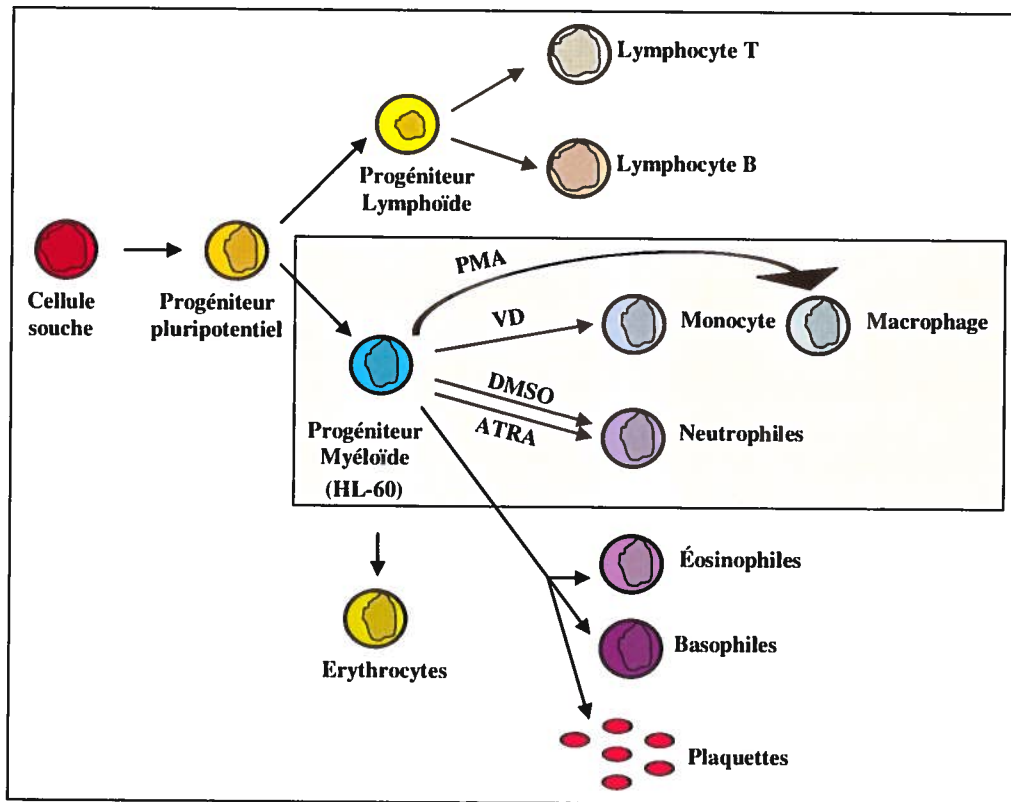


Figure 4. Modèle de différenciation myéloïde du progéniteur HL-60 au sein de l'hématopoïèse.

La lignée promyélocytaire HL-60 est un modèle reconnu intéressant pour l'étude de gènes spécifiquement exprimés au cours de la différenciation myéloïde (Newburger, Chovaniec *et al.* 1979). De plus, la différenciation de cette lignée peut être facilement contrôlée par certains agents chimiques, comme la VD, ce qui permet de cibler la maturation de ces cellules vers un stade de différenciation précis.

1.6. La Vitamine D

La VD, connue pour son importance dans l'homéostasie du calcium, est une molécule qui possède de nombreux rôles physiologiques. En plus de réguler la prolifération et la différenciation cellulaire, comme dans le cas de la lignée HL-60, la vitamine D joue un rôle important dans la réponse immunitaire et dans certains cancers (Bouillon, Eelen *et al.* 2006). De même, elle est utilisée dans de nombreux traitements thérapeutiques de certaines maladies auto-immunes et inflammatoires ainsi que dans la prévention de certains cancers (Ondkova, Macejova *et al.* 2006).

1.6.1. Synthèse de la vitamine D

La vitamine D peut être apportée par l'alimentation mais seulement quelques aliments en sont riches. Sa synthèse dans l'organisme se fait au niveau de la peau grâce à l'exposition au soleil et particulièrement aux rayons ultraviolets (UVB) (Holick 1988). Dans la peau, la vitamine D est au départ une molécule inactive, le 7-déhydrocholestérol et par action des UVB, elle est convertie en une pro hormone, la provitamine D₃. L'activation de cette hormone se réalise en deux étapes qui comprennent deux hydroxylations. La première étape a lieu dans le foie donnant la 25-hydroxyvitamine D₃. La seconde étape, qui peut s'effectuer dans plusieurs tissus comme le rein, les glandes parathyroïdes, l'intestin, les kératinocytes et les monocytes/macrophages, est la plus importante puisqu'elle permet la conversion de la vitamine D en hormone stéroïde active, la 1 α ,25-dihydroxyvitamine D₃ ou calcitriol (Bouillon, Okamura *et al.* 1995; Hewison, Zehnder *et al.* 2004).

Cependant, la vitamine D₃ ne peut agir seule et induire des effets biologiques. Elle doit se lier avec un membre de la superfamille des récepteurs aux hormones stéroïdes, le récepteur de la vitamine D (VDR). Après liaison spécifique de la vitamine D à son récepteur, ce dernier peut former un hétérodimère avec un récepteur aux acides rétinoïques (RXR). Ce complexe va ensuite se fixer sur un élément de réponse à la vitamine D (VDRE) situé en amont des gènes cibles (Carlberg et Dunlop 2006). La liaison de ce complexe sur un gène et son interaction avec des co-activateurs permettent alors le recrutement de facteurs de transcription au site

d'initiation de la transcription et ainsi l'activation de l'expression de ce gène (DeLuca et Zierold 1998; Jones, Strugnell *et al.* 1998). Le VDR est présent dans la plupart des tissus, en particulier dans les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules de Langerhans, les monocytes et les lymphocytes T du tissu cutané.

C'est par ce mécanisme intracellulaire que la vitamine D peut contrôler et réguler certains processus métaboliques, comme l'homéostasie du calcium ou la prolifération cellulaire. Au niveau de la réponse immunitaire, la vitamine D joue aussi un rôle très important puisqu'elle participe directement à l'élimination des pathogènes dans les cellules du système immunitaire, ce qui fait des analogues non-calcémians de la vitamine D un futur traitement possible contre certaines infections (Norman et Silva 2001; Hayes, Nashold *et al.* 2003).

1.6.2. Rôle de la vitamine D dans la réponse immunitaire

En 1895, Niels Finsen du Danemark démontra qu'en exposant des personnes atteintes de tuberculose cutanée ou de lupus à une forte intensité de lumière, leur peau devenait progressivement saine. Il découvrit ainsi un nouveau traitement efficace pour la tuberculose : l'exposition au soleil, découverte qui fit de lui un prix Nobel de médecine en 1903 (Zasloff 2006).

L'explication de ce phénomène est aujourd'hui connue, le soleil stimule la synthèse de la vitamine D dans la peau qui, à son tour, va réguler à la hausse l'expression d'un peptide antimicrobien, le LL-37. En effet, lorsque la Vitamine D₃ est synthétisée dans les kératinocytes, elle entre ensuite dans la circulation systémique et est convertie en 25-D₃ par le foie. Si un microbe est présent dans la circulation, les monocytes circulants seront activés par les agonistes TLR2/1 présents sur les microbes. La vitamine 25-OH-VitD₃ convertie en 1 α ,25-dihydroxyvitamine D₃ (forme active) va se lier à son récepteur, le VDR et ce dernier va alors se fixer sur le gène codant pour le peptide LL-37, déclenchant ainsi l'activation de l'expression de ce gène. Le peptide LL-37 va alors être exprimé fortement dans la cellule, augmentant l'activité antimicrobienne des phagocytes circulants (**Fig. 5**) (Liu, Stenger *et al.* 2006).

Cependant, étant donné que la vitamine D joue un rôle crucial dans de nombreux processus biologiques, une altération génétique du gène *VDR* peut à l'inverse engendrer d'importants dysfonctionnements métaboliques. D'ailleurs, de nombreuses études démontrent un lien entre des polymorphismes du gène *VDR* et une susceptibilité à certaines infections comme la tuberculose, la lèpre ou encore certaines maladies auto-immunes ou cancers (Bellamy, Ruwende *et al.* 1999; Roy, Frodsham *et al.* 1999; McCullough, Stevens *et al.* 2007).

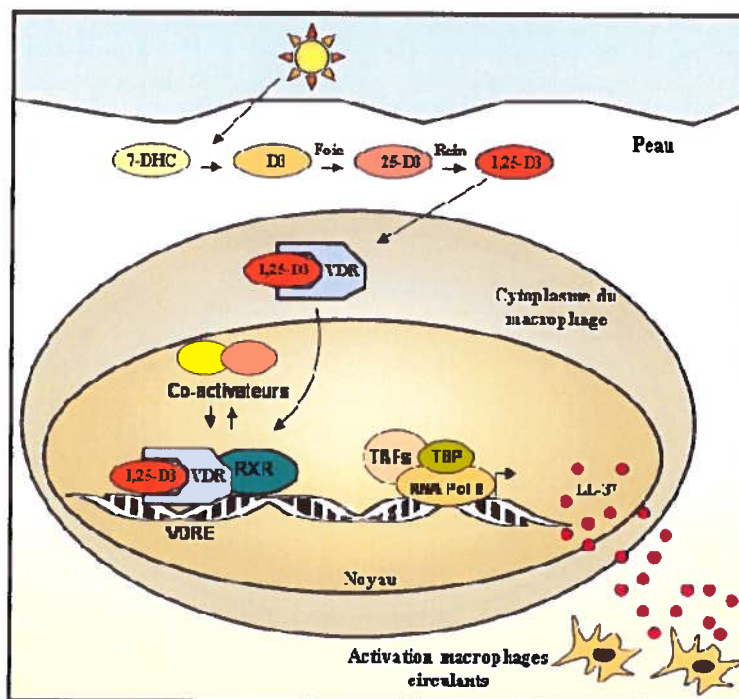


Figure 5. Synthèse de la 1,25-déhydroxivitamine D₃ et son mode d'action dans la réponse aux infections (Adapté de Zasloff, 2006 et de Jones, Strugnell et al. 1998).

Le soleil convertit la 7-dehydrocholesterol (7-DHC) dans les kératinocytes en vitamine D₃, qui va entrer dans la circulation systémique ou elle sera convertie en 25-hydroxy-D₃ (25-D₃) dans le foie. La vitamine D₃ sera ensuite convertie en 1,25-dihydroxy-D₃ (1,25-D₃) dans le rein. Si un microbe est présent dans la circulation, les monocytes circulants seront activés par les agonistes TLR2/1 présents sur les microbes. L'hormone active 1,25-D₃ va passer la membrane cellulaire des macrophages où elle va se fixer au VDR, et ensemble, ils vont former un hétérodimère avec un récepteur aux acides rétinoïques (RXR). Ce complexe va ensuite se fixer sur un élément de réponse à la vitamine D (VDRE) situé en amont du gène codant pour le peptide anti-microbien LL-37. L'interaction de ce complexe avec des co-activateurs va permettre le recrutement de facteurs de transcription au site d'initiation de la transcription et ainsi activer l'expression de ce gène. Le peptide LL-37 va alors être exprimé fortement dans la cellule, augmentant l'activité antimicrobienne des phagocytes circulants.

1.6.3. Association polymorphismes *VDR* / Susceptibilité à la tuberculose

L'effet régulateur de cette vitamine sur l'immunité, vis-à-vis de la tuberculose, est suspecté depuis longtemps. En effet, il existe des liens d'ordre épidémiologique entre la tuberculose et un déficit en vitamine D. D'après des études cas-témoins dans une population d'Afrique de l'est, il a été démontré qu'un des polymorphismes du *VDR* (génotype *tt*) pourrait réduire la susceptibilité à une infection initiale à *M. tuberculosis* ou ralentir la progression d'une infection latente vers le développement de la maladie (Bellamy, Ruwende *et al.* 1999; Valdivielso et Fernandez 2006). Cependant, il est nécessaire que d'autres études soient réalisées pour confirmer cette hypothèse puisqu'elle reste encore controversée. Tout de même, il a été démontré, *in vitro*, qu'une forte concentration de vitamine D_3 augmente la capacité de macrophages en culture à détruire un pathogène phagocyté, comme *M. tuberculosis* (Rook, Steele *et al.* 1986; Rockett, Brookes *et al.* 1998). D'autres études épidémiologiques démontrent aussi une association entre une susceptibilité à avoir certains cancers (sein, prostate, colon) ou certaines maladies infectieuses et auto-immunes (diabète, lupus) et le taux de vitamine D et des polymorphismes de son récepteur (Thomasset 1994; Bouillon, Eelen *et al.* 2006).

La $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_3 est la forme la plus active des vitamines D. Néanmoins, bien qu'elle semble être un traitement efficace pour certaines maladies cutanées, les risques de toxicité (hypercalcémie) dus à un apport chronique et massif de cette vitamine restent élevés. Il s'agit cependant d'une molécule très flexible et plusieurs analogues ont été découverts permettant ainsi d'élargir les potentiels thérapeutiques de cette vitamine.

1.6.4. Les analogues de la vitamine D

Plus de 278 analogues de la forme active de la Vitamine D ont été répertoriés à ce jour. Ces analogues diffèrent de la $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_3 par un changement dans la position et le nombre de carbone dans leur structure primaire (Bouillon, Okamura *et al.* 1995). Parmi ces analogues, ceux ayant dans leur chaîne latérale carbonée une orientation 20-épi possèdent un meilleur potentiel d'activation. En effet,

leur catabolisme est plus faible car leur conformation, différente de la $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_3 ou des autres analogues permet au VDR d'être moins sensible à la digestion protéolytique partielle (Vaisanen, Ryhanen *et al.* 1999). Cependant, aucune différence dans l'affinité à se fixer sur le récepteur de la vitamine D (VDR) n'a été observée entre ces analogues et la $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_3 . Parmi les analogues les plus actifs, on retrouve le KH 1060 (20-epi-22-oxa-24a, 26a-trihomo- $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3) et le EB 1089 ($1\alpha,25$ -dihydroxy-22,24-diene-24,26,27-trihomovitamin D_3)(Fig. 6). Le potentiel d'activation de ces deux analogues de la vitamine D, a déjà été démontré dans une étude portant sur l'expression du gène *NRAMP1* après différenciation de la lignée cellulaire HL-60 par ces deux composés (Roig, Richer *et al.* 2002). D'ailleurs, cette étude a démontré que la différenciation des cellules HL-60 est plus efficacement induite avec le KH 1060 et le EB 1089 qu'avec le calcitriol, puisque le niveau d'expression de l'ARNm du gène *CD14*, marqueur de la maturation des cellules myéloïdes en macrophages, est beaucoup plus élevé et soutenu que le niveau obtenu avec les mêmes concentration en vitamine D. De même, l'expression du gène *NRAMP1* est beaucoup plus importante et plus précoce avec ces deux agonistes. L'efficacité d'action du KH 1060 et du EB 1089 est due à leur capacité de retenir le taux de VDR, dans la cellule, beaucoup plus longtemps que le calcitriol, permettant ainsi une efficacité d'action plus longue (Jaaskelainen, Ryhanen *et al.* 2000; Maenpaa, Vaisanen *et al.* 2001).

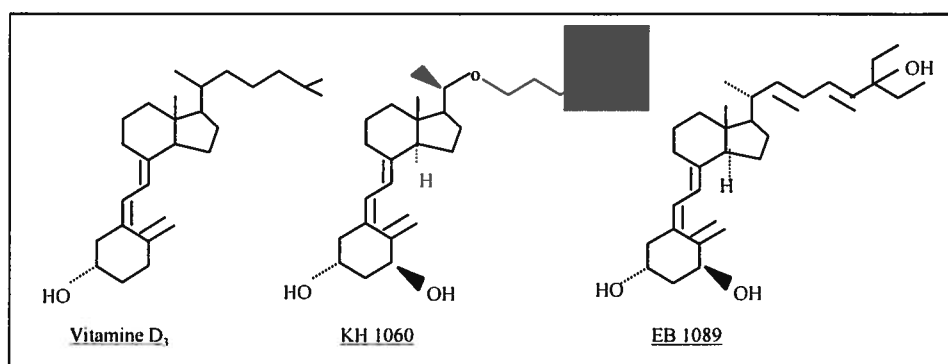


Figure 6. Conformations stéréochimiques de la vitamine D_3 et de ses analogues, le KH 1060 et le EB 1089 (en gris : orientation "épi ")

(Adapté de Bouillon, Okamura *et al.*, 1995).

La vitamine D et ses analogues ont donc la capacité, une fois liés au VDR, d'activer de nombreux gènes. Cependant, ce potentiel d'activation dépend aussi du niveau d'expression et de la spécificité de distribution tissulaire des co-activateurs nucléaires avec lesquels le complexe [analogue/VDR] interagit. L'expression spécifique de certains gènes dans des types cellulaires précis, comme le gène *NRAMP1* au cours de la myélopoïèse, dépend donc de différents facteurs nucléaires.

1.7. La myélopoïèse

Bien que toutes les cellules de l'organisme possèdent la même information génétique, le devenir phénotypique de chaque cellule va dépendre de l'expression de gènes spécifiques. Au cours de la myélopoïèse, des signaux externes de différenciation vont réguler l'expression de facteur de transcription. L'effet combinatoire de ces facteurs permet alors l'expression de gènes spécifiquement myéloïdes, déterminant ainsi le devenir de la cellule souche hématopoïétique.

1.7.1 Régulation de la myélopoïèse

Les cellules souches hématopoïétiques multipotentes (HSCs) ont la possibilité de se différencier en de multiples types cellulaires suite à une cascade d'événements finement régulés. Le devenir phénotypique de chaque progéniteur est donc déterminé par des mécanismes de régulation précis. En effet, au cours de la différenciation cellulaire, des récepteurs aux facteurs de croissance vont être exprimés sur les précurseurs médullaires, déterminant ainsi la programmation et le devenir d'une cellule vers une lignée hématopoïétique donnée. Par exemple, au cours de la myélopoïèse, les cellules pluripotentes vont exprimer des récepteurs aux GM-CSF, non spécifiques d'une lignée donnée, mais qui vont permettre de cibler ces cellules vers un stade de différenciation granulo-monocytaire. Puis, d'autres récepteurs seront ensuite induits à la surface cellulaire, comme les récepteurs aux G-CSF, impliqués dans la différenciation des progéniteurs myéloïdes en granulocytes et les récepteurs

aux M-CSF pour la différenciation en monocytes (Fig. 7) (Clarke et Gordon 1998; Friedman 2002).

Cependant, l'expression de ces récepteurs à la surface des HSC dépend elle-même d'une régulation génétique via des facteurs nucléaires de transcription plus ou moins spécifiques d'un stade et d'un type de différenciation. Ces facteurs de transcription qui sont exprimés dans les cellules souches et les progéniteurs, vont agir directement ou indirectement pour induire la transcription de marqueurs de lignée. Par exemple, les promoteurs des gènes codant pour les récepteurs aux GM-CSF et G-CSF sont activés principalement par les facteurs de transcription C/EBP et PU.1 (Hohaus, Petrovick *et al.* 1995; Zhang, Hohaus *et al.* 1996).

Par conséquent, le contrôle transcriptionnel joue un rôle clé dans l'expression spécifique des gènes aux niveaux des tissus. En effet, ces gènes ont besoin de facteurs de transcription dont l'expression est restreinte à un type cellulaire donné. Par conséquent, l'identification de ces facteurs de transcription est nécessaire à la compréhension des mécanismes gouvernant la spécificité d'expression de certains gènes.

1.7.2. Les facteurs de transcription impliqués dans la myélopoïèse

Parmi les facteurs de transcription impliqués dans les différents stades de la différenciation myéloïde, certains ont un rôle crucial au sein de la cellule, leur expression étant notamment essentielle à la survie des cellules souches ou pluripotentes. D'autres jouent un rôle indirect dans l'activation de gènes myéloïdes et sont dépendants de l'action d'autres facteurs de transcription (Valledor, Borrás *et al.* 1998).

Le promoteur *Nramp1* murin est régulé par les facteurs de transcription Miz-1, IRF-8 et PU.1 qui activent synergiquement la transcription du gène spécifiquement dans les cellules myéloïdes (Alter-Koltunoff, Ehrlich *et al.* 2003). IRF-8 est un facteur essentiel pour la différenciation des progéniteurs myéloïdes bipotentiels en macrophages matures (Tamura et Ozato 2002). L'expression restreinte du gène

Nramp1 murin dans les cellules myéloïdes serait donc due au facteur IRF-8. Bien que certaines régions du promoteur *Nramp1* murin aient été conservées chez son homologue humain, l'activité du promoteur *NRAMP1* humain reste minimale lors d'une co-transfection de celui-ci avec le facteur IRF-8 dans la lignée cellulaire 293T (Richer E., Thèse de doctorat, 2005). Par conséquent, l'identification des mécanismes de régulation mis en jeu lors de la transcription du gène *NRAMP1* humain est nécessaire pour comprendre l'expression restreinte de ce gène dans les cellules myéloïdes humaines. Dans la section suivante, une description des facteurs de transcription souvent retrouvés dans la littérature comme étant des éléments régulateurs importants de gènes myéloïdes est présentée.

1.7.2.1. Le facteur PU.1

Le facteur de transcription PU.1 est un produit du gène *Spi-1/Sfp-1*, un membre de la famille des proto-oncogènes ETS. Ce facteur se fixe sur des séquences riches en purine (5'-GGAA-3') appelée "boîtes PU". L'expression de ce facteur est restreinte à la lignée hématopoïétique, et seulement quelques types cellulaires matures expriment le facteur PU.1, incluant les lymphocytes B, les monocytes/macrophages et les neutrophiles.

Dans la lignée myéloïde, de nombreux promoteurs de gène sont contrôlés par le facteur PU.1. Ce sont principalement les récepteurs aux facteurs de croissance (M-CSFR, GM-CSFR) et les molécules d'adhésion comme CD11b. L'importance de ce facteur dans la régulation de ces cellules est démontrée par le fait qu'une mutation du locus PU.1 chez la souris a pour conséquence, soit le décès à un stade de gestation tardif ou 48h après la naissance suite à une sévère septicémie (Oikawa, Yamada *et al.* 1999). En effet, ces souris *PU.1^{-/-}*, présentent des anomalies majeures dans le développement des différentes lignées hématopoïétiques et des analyses sanguines de ces souris révèlent un manque total de macrophages matures, de neutrophiles, de lymphocytes T et B. De même, l'expression de gènes associés au stade tardif de la différenciation myéloïde, comme le récepteur au GM-CSF, n'est pas détectée dans ces cellules dépourvues de PU.1. Ces données suggèrent que PU.1 joue un rôle critique et essentiel dans le bon déroulement de la différenciation myéloïde et lymphoïde

(Shivdasani et Orkin 1996; Fisher, Olson *et al.* 1998; Fisher et Scott 1998; Yamamoto et Oikawa 1999).

1.7.2.2. Les facteurs C/EBP

La famille des facteurs C/EBP comprend plusieurs isoformes : C/EBP α , β (ou NF-IL-6), γ , δ , ϵ et CHOP/GADD153. Ces facteurs reconnaissent un site consensus, 5'-T(T/G)NNGNAA(T/G)-3', dans les régions régulatrices de promoteurs cibles (Friedman 2002). Les C/EBP peuvent former des homodimères ou des hétérodimères via leur domaine C-terminal de dimérisation (motif leucine-zipper) mais ils peuvent aussi se fixer à d'autres facteurs comme Fox/Jun, ATF/CREB, ou encore interagir avec NF- κ b et Sp1 via leur domaine N-terminal de transactivation. Les C/EBP sont aussi composés d'une région riche en acides aminés basiques qui leur permet de se lier à l'ADN. La famille des facteurs de transcription C/EBP joue un rôle essentiel dans la différenciation de nombreux tissus et l'importance relative de ces isoformes varie de tissu en tissu (Friedman 2002).

Dans l'hématopoïèse, l'expression des C/EBP est limitée à la lignée myéloïde, puisqu'ils sont surtout exprimés dans les granulocytes, les monocytes et les éosinophiles mais à des temps différents. En effet, l'isoforme C/EBP α a une expression prédominante dans les cellules myéloïdes pluripotentes et son expression persiste dans le stade précoce de la granulopoïèse. Pendant la maturation des macrophages, l'expression du facteur C/EBP α diminue graduellement et ce sont les isoformes β et δ qui sont régulés à la hausse (Valledor, Borrás *et al.* 1998). Il a par ailleurs été démontré que le facteur C/EBP β est essentiel pour la différenciation de la lignée myéloïde HL-60 induite par la VD (Ji et Studzinski 2004). Le facteur C/EBP ϵ s'exprime au cours du stade de maturation tardif des granulocytes et des lymphocytes T. L'isoforme CHOP se retrouve dans les granulocytes qu'après un stress ou un dommage à l'ADN (Yamanaka, Kim *et al.* 1997). Par contre, l'expression de l'isoforme C/EBP γ n'a pas encore été caractérisée dans cette lignée.

Parmi les C/EBP, l'isoforme α est le facteur le plus essentiel pour le développement de la lignée myéloïde. En effet, avec la coopération du facteur PU.1, il

contrôle l'expression du récepteur au GM-CSF et au M-CSF et il est essentiel pour l'initiation de la différenciation granulocytaire puisque des souris possédant une ablation génétique du gène *C/EBP α* (*C/EBP α ^{-/-}*) ne possèdent pas de granulocytes (neutrophiles et éosinophiles) tandis que le gène codant pour le récepteur au G-CSF n'y est pas exprimé (Zhang, Zhang *et al.* 1997; Friedman 2002). De même, des souris *C/EBP ϵ ^{-/-}*, montrent un problème majeur dans la maturation terminale des granulocytes, ces derniers étant déficients dans la production de granules secondaires. Par contre, la production et la différenciation des macrophages ne sont pas bloquées lorsque les souris sont mutées pour le gène *C/EBP β* . Cependant, l'activation de ces cellules est sévèrement affectée, suggérant que ce facteur contrôle seulement certains stades de maturation et d'activation fonctionnelle du macrophage (Clarke et Gordon 1998).

En résumé, les facteurs de transcription C/EBP et PU.1 doivent être considérés comme des éléments essentiels pour le développement de la lignée myéloïde puisqu'ils activent directement des gènes indispensables pour chacun des stades de la différenciation myéloïde (Fig. 7). Cependant, ces facteurs sont au centre d'un complexe formé par d'autres facteurs de transcription qui, bien que moins critiques, sont tout de même nécessaires au bon déroulement de l'hématopoïèse.

1.7.2.3. Le facteur Sp1

Beaucoup de promoteurs possèdent des éléments riches en GC comme les boîtes GC ou GT/CACCC. Le facteur de transcription Sp1 se fixe et agit via ces boîtes GC et c'est pourquoi de nombreux gènes sont régulés par ce facteur. La protéine Sp1 est un membre de la famille Sp qui comprend d'autres protéines désignées Sp2, Sp3 et Sp4. Le facteur Sp1 reste le plus étudié et le mieux caractérisé de cette famille. Exprimé ubiquitairement dans les cellules, Sp1 est impliqué dans l'activation de beaucoup de gènes (gènes de ménage¹, gènes spécifiques de tissus ou gènes du cycle cellulaire) ainsi que dans la prévention de la méthylation des îlots CpG (Resendes et Rosmarin 2004). Des souris Sp1^{-/-} montrent un sévère retard du développement et les embryons décèdent autour du onzième jour de gestation. La fonction du facteur Sp1

¹ « housekeeping gene »

est donc essentielle dans la différenciation des cellules après 10 jours de gestation (Suske 1999; Li, He *et al.* 2004).

Le facteur Sp1 est un fort activateur transcriptionnel et il peut interagir avec d'autres protéines nucléaires, comme celles impliquées dans la machinerie transcriptionnelle, formant ainsi des complexes multimériques. Ainsi, le facteur Sp1 va agir en synergie avec d'autres facteurs de transcription pour activer la transcription d'un gène. De même, dans le compartiment myéloïde, plusieurs gènes spécifiquement exprimés dans les macrophages et les granulocytes sont régulés par la combinaison de facteurs de transcription incluant Sp1, C/EBP, GATA-1, PU.1, C-Myb, et AML-1. C'est le cas des gènes *CD11b*, *CD14* ou du gène de la lactoferrine (Chen, Pahl *et al.* 1993; Zhang, Hetherington *et al.* 1994; Khanna-Gupta, Zibello *et al.* 2000). On retrouve également trois motifs riches en GC dans le promoteur du gène codant pour le récepteur de la vitamine D et des mutations dans ces sites consensus abolissent la réponse de ce promoteur à la $1\alpha,25$ dihydroxyvitamine D₃, suggérant que le facteur Sp1 est important dans la régulation de ce gène (Wietzke, Ward *et al.* 2005). Le facteur Sp1 peut aussi interagir avec des récepteurs nucléaires pour initier l'expression d'un gène. Par exemple, le récepteur de la progestérone, en interagissant avec le facteur Sp1 au niveau de son site d'attachement sur le promoteur p21^{Waf-1}, active l'expression de ce gène (Owen, Richer *et al.* 1998). De même, une autre étude portant sur l'induction du gène p27^{Kip1} par la vitamine D₃, suggère que le facteur Sp1 pourrait servir de protéine d'ancrage pour le récepteur de la VD afin qu'il puisse transactiver ce gène, puisqu'aucun élément de réponse à la VD n'a été identifié sur ce promoteur (Huang, Chen *et al.* 2004; Cheng, Chen *et al.* 2006).

Cependant, les mécanismes par lesquels le facteur Sp1 permet l'expression d'un gène à un stade et dans un tissu de façon spécifique ne sont pas encore connus. Les hypothèses suggèrent que des interactions entre ce facteur ubiquitaire et des facteurs spécifiquement exprimés dans une lignée, comme C/EBP α , pourraient conduire à un effet tissu-spécifique (**Fig. 7**) (Khanna-Gupta, Zibello *et al.* 2000; Resendes et Rosmarin 2004).

1.7.2.4. Le facteur CDP

A l'inverse des autres facteurs de transcription, le facteur CDP agit comme un répresseur sur la régulation de l'expression de gènes spécifiques, comme les gènes myéloïdes de la lactoferrine et de C/EBP ϵ (Khanna-Gupta, Zibello *et al.* 2001; Khanna-Gupta, Zibello *et al.* 2003). Toutefois, une participation de ce facteur dans l'activation transcriptionnelle est aussi suggérée par certaines études (Nepveu 2001; Truscott, Raynal *et al.* 2003). Ce facteur se fixe à l'ADN sur des motifs "5'-CCAAT-3'" en compétitionnant avec d'autres facteurs activateurs qui possèdent le même site de fixation sur l'ADN (Friedman 2002). Le facteur CDP est exprimé lors de la granulopoïèse mais diminue lors de la maturation terminale des neutrophiles. Or le facteur C/EBP ϵ , comme nous l'avons vu précédemment, est essentiel à la maturation tardive des granulocytes et une analyse du promoteur de C/EBP ϵ a permis de révéler la présence d'un site de fixation au facteur CDP. Par conséquent, au cours de la granulopoïèse, le facteur CDP se fixe sur le promoteur du gène C/EBP ϵ , inhibant ainsi son expression. Lorsque l'étape de maturation terminale des granulocytes approche, l'activité du facteur CDP diminue, permettant alors l'expression du gène C/EBP ϵ et la maturation des granulocytes (Martin-Soudant, Drachman *et al.* 2000; Bjerregaard, Jurlander *et al.* 2003) (Fig. 7). Le facteur CDP peut aussi s'auto-inhiber, permettant de lever la répression de la transcription occasionnée par ce facteur. Il a été démontré qu'un domaine dans la région N-terminale de cette protéine est capable, par un mécanisme intramoléculaire, d'inhiber sa propre fixation à l'ADN, permettant ainsi la fixation d'autres facteurs activateurs sur le promoteur (Truscott, Raynal *et al.* 2004).

Le facteur de transcription CDP est donc indirectement essentiel à la différenciation myéloïde puisqu'il est un des éléments régulateurs majeurs d'un facteur de la famille des C/EBP, facteurs essentiels pour le développement de la lignée myéloïde.

Un facteur de transcription peut par conséquent s'avérer indispensable pour l'expression d'un gène dans un stade donné et dans un tissu spécifique mais il ne permet pas à lui seul l'expression d'un gène. C'est une combinaison et une interaction de plusieurs facteurs de transcription sur le promoteur fonctionnel de ce gène qui va permettre l'expression de ce gène.

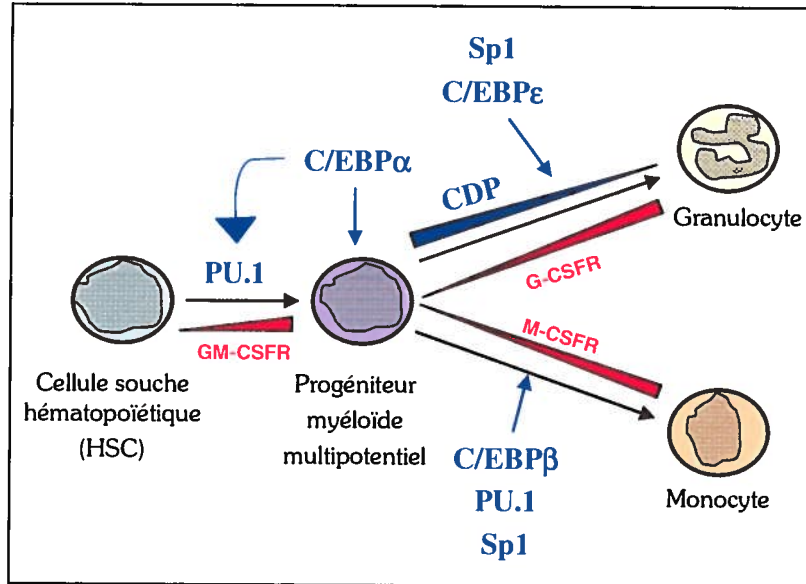


Figure 7. Principaux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de gènes myéloïdes. (Adapté de Friedman, 2002 et Tenen, 2000).

Le facteur PU.1, avec la coopération du facteur C/EBP α , est important pour induire la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (HSC) en progéniteurs myéloïdes multipotentiels. Le facteur C/EBP α est essentiel pour l'initiation de la différenciation granulocytaire, son expression est prédominante dans les cellules myéloïdes pluripotentes indifférenciées et diminue graduellement au cours de la différenciation de ces cellules en macrophages mais persiste dans le stade précoce de la granulopoïèse. La maturation terminale des granulocytes est induite par le facteur C/EBP ϵ dont l'expression est régulée au cours de la granulopoïèse par le facteur CDP. Celui-ci se fixe précocement sur le promoteur du gène C/EBP ϵ , inhibant son expression, et lorsque l'étape de maturation terminale des granulocytes approche, l'activation du facteur CDP est diminué, permettant alors l'expression du gène C/EBP ϵ et la maturation des granulocytes. Lors de la maturation des progéniteurs myéloïdes en monocytes, ce sont les facteurs C/EBP β et PU.1 qui sont régulés à la hausse et le facteur Sp1 va agir en synergie avec ces facteurs de transcription pour activer la transcription des gènes myéloïdes. Lors de la différenciation myéloïde, les promoteurs des gènes codant pour les récepteurs aux GM-CSF, G-CSF et M-CSF, dont l'expression est essentielle à l'acquisition des caractères de différenciation spécifique des cellules matures, sont activés principalement par les facteurs de transcription C/EBP et PU.1

1.7.3. Les promoteurs de gènes myéloïdes

En général, les promoteurs de gènes myéloïdes sont divisés en deux régions : une région proximale et une région de spécificité myéloïde.

1.7.3.1. La région proximale des promoteurs myéloïdes

La région proximale permet la fixation du complexe d'initiation de la transcription. Il est donc responsable de l'activité transcriptionnelle basale du gène. A l'inverse des autres promoteurs eucaryotes, aucune boîte TATA ou d'éléments Inr n'ont été identifiés sur les promoteurs myéloïdes, bien qu'ils s'agissent d'éléments régulateurs essentiels pour l'assemblage des facteurs initiant la transcription (Kishi, Tanizawa *et al.* 1996; Greaves et Gordon 2002). Par contre, les promoteurs myéloïdes sont généralement compacts et possèdent plusieurs sites d'initiation de la transcription. De même, immédiatement en amont de ces sites, une séquence d'ADN contenant le motif GGAA, permettant la fixation de facteurs de la famille ETS dont le facteur PU.1, est fréquemment rencontrée suggérant le rôle possible de ce facteur dans l'initiation de la transcription. En effet, le facteur PU.1 peut agir de concert avec une combinaison de facteurs de transcription, comme les C/EBP, PEBP2/CBF et Sp1, permettant le recrutement du complexe d'initiation de la transcription composé des TBP, des TAF et des GTF (Tenen, Hromas *et al.* 1997; Clarke et Gordon 1998; Fisher et Scott 1998).

1.7.3.2. La région distale des promoteurs myéloïdes

L'analyse de promoteurs de gènes dont l'expression est restreinte à une lignée spécifique a permis de mettre en évidence une région plus en amont du site d'initiation de la transcription qui pourrait être responsable de la spécificité d'expression de ces gènes. En effet, sur cette région distale du promoteur se fixent des facteurs de transcription spécifiques d'une lignée, comme par exemple la protéine GATA-1, restreinte à la lignée érythroïde, ou encore le facteur HNF-4, spécifique au tissu hépatique (Greaves et Gordon 2002). De plus, cette région contient de nombreuses

séquences activatrices², éléments qui permettent d'augmenter la transcription et conséquemment l'expression du gène. De même, certains promoteurs possèdent des éléments de réponses à différents stimuli situés en 5' du promoteur, comme les éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE), à l'acide rétinoïque (RARE), à l'IFN- γ (ISRE) (Schoneveld, Gaemers *et al.* 2004; Cohen, Lasso *et al.* 2006; De Ambrosis, Casciano *et al.* 2006). Des études suggèrent aussi que l'expression spécifique du gène *NRAMP1* humain au cours de la différenciation myéloïde serait associée à la présence d'éléments régulateurs spécifiques sur son promoteur (Cellier, Shustik *et al.* 1997). De même, l'induction de l'expression du gène *NRAMP1* par la vitamine D ou de l'interféron- γ supporte l'idée d'une présence d'éléments de réponse à la vitamine D (VDREs) ou à l'interféron (ISRE) dans la région distale du promoteur (Roig, Richer *et al.* 2002).

Il existe donc sur le promoteur différents éléments qui permettent l'activation ou l'inhibition de l'expression des gènes à un stade et dans un tissu spécifique. Cependant, l'activation de ces sites n'est possible que s'ils sont accessibles aux facteurs nucléaires. L'état de la chromatine est donc un autre élément crucial pour l'activation d'un gène.

1.7.4. Régulation de l'état de la chromatine

La chromatine joue un rôle critique dans la régulation de l'expression des gènes, puisque l'accessibilité des promoteurs aux facteurs de transcription ou toutes autres protéines régulatrices est essentielle à leur expression. La régulation d'un gène dépend donc, en premier lieu, de l'état de la chromatine. Celle-ci peut se trouver sous différents états, dus à des modifications épigénétiques qui altèrent sa structure. En effet, les protéines histones, qui permettent la compaction de l'ADN, peuvent être l'objet d'acétylations, de méthylations, de phosphorylations ou encore d'ubiquitinations (He et Lehming 2003). Il a été démontré, par exemple, que des régions hyperacétylées du génome sont plus accessibles pour l'attachement des protéines nucléaires que les régions hypoacétylées. Par conséquent, ces modifications

² « enhancer »

peuvent directement influencer la conformation de l'ADN et ainsi moduler l'expression de certains gènes. L'état de la chromatine permet donc de contrôler l'expression tissu-spécifique de certains gènes au cours de l'hématopoïèse (Jenuwein et Allis 2001; Rosmarin, Yang *et al.* 2005).

L'expression spécifique de certains gènes à un stade de différenciation précis de la cellule résulte donc d'une cascade de plusieurs événements finement contrôlés et qui dépendent chacun les uns des autres. Cette régulation génétique est capitale au sein de la cellule puisqu'une expression inappropriée ou au contraire l'absence d'expression d'un seul gène peut résulter en de dramatiques conséquences, possiblement à la base de certaines maladies. La régulation génétique est donc un élément clé qui contrôle le devenir d'une cellule, c'est pourquoi, de nombreuses études tentent aujourd'hui de mieux caractériser la régulation de certains gènes afin de mieux comprendre et prévenir certaines maladies.

Mise en contexte du projet de recherche

Le promoteur *NRAMP1* est relativement court (647 pb) et il ne possède pas de boîte TATA. Il peut être divisé en deux régions : une région dite **myéloïde** (de -647 à -263pb), obligatoirement requise pour la spécificité d'expression myéloïde du gène *NRAMP1* en réponse à la VD et au DMSO, et une région dite **basale** (de -263 à +1pb) permettant vraisemblablement la fixation d'un complexe de transcription basale sur ce gène et dont l'activité est indépendante du lignage cellulaire (myéloïde, lymphoïde, épithéliale) et de la présence ou non d'inducteurs (Roig, Richer *et al.* 2002) (**Fig. 8**). Des études ont identifié plusieurs sites d'initiation sur le promoteur *NRAMP1* dans différents types cellulaires et par extension d'amorces avec la transcriptase inverse (Blackwell, Barton *et al.* 1995; Kishi, Tanizawa *et al.* 1996). Au laboratoire la lignée HL-60 a été utilisée comme modèle cellulaire myéloïde et a permis de confirmer, par protection contre la nucléase S1, la présence de 2 sites d'initiation, un site mineur (-28) et un majeur (+1) (**Fig.8**) (Thèse E. Richer, 2005). Dans cette lignée cellulaire, il a été démontré que l'expression de l'ARNm de *NRAMP1* lors de la différenciation induite par la VD corrèle avec l'expression de la protéine NRAMP1.

Afin de définir des éléments cis-activateurs dans le promoteur *NRAMP1*, une étude d'empreinte à la DNase a permis de révéler plusieurs sites (**E1 à E14**) protégés par des facteurs de transcription *in vitro* (**Fig. 8**).

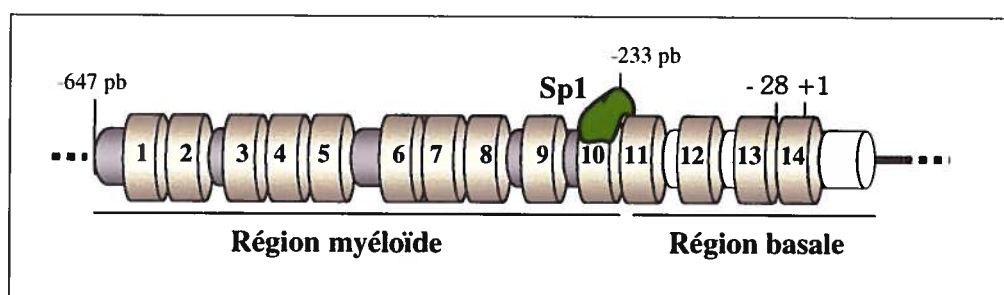


Figure 8. Organisation générale du promoteur *NRAMP1*

Le promoteur *NRAMP1* peut être divisé en deux régions : une région myéloïde (-647 à -223 pb, en gris) et une basale (-223 à +1, en blanc). 14 sites potentiellement protégés par la fixation de facteurs de transcription *in vitro* sont représentés (en jaune). Des études précédentes démontrent que le site E10 dans la région myéloïde du promoteur *NRAMP1* est fixé par le facteur Sp1 (en vert) (Richer E., Thèse de doctorat, 2005).

Les objectifs initiaux étaient d'identifier les éléments agissant en *cis* et en *trans* qui confèrent la réponse à la VD dans un contexte myéloïde. L'étude des éléments cis-activateurs dans la région myéloïde, révéla que la fixation du site E10 par le facteur Sp1 est requis pour activer l'expression du gène *NRAMP1* lors de la différenciation myéloïde (**Fig. 8 et 9B**) (Richer E., Thèse de doctorat, 2005). Cependant, le facteur Sp1 est donc un premier élément contrôlant l'expression du gène *NRAMP1* dans les cellules myéloïdes.

Cependant, une mutation sur le site E10 a été effectuée pour adresser le rôle fonctionnel du facteur Sp1 dans la régulation du gène *NRAMP1* dans les cellules myéloïdes. La mutation E10M0 révèle que ce motif est requis pour l'induction du gène au cours de la différenciation myéloïde. Cependant une activité basale, indépendante de la différenciation, persiste et l'utilisation de la même construction en transfections transitoires, dans des cellules non myéloïdes, a révélé qu'il y a probablement d'autres sites répondant à Sp1 (**Fig. 9A**). De même, une activité transcriptionnelle basale du promoteur *NRAMP1* persiste dans des transfectants stables mutés sur le site E10 (mutation E10M0), différenciés ou non avec du KH ou du DMSO (**Fig. 9B**).

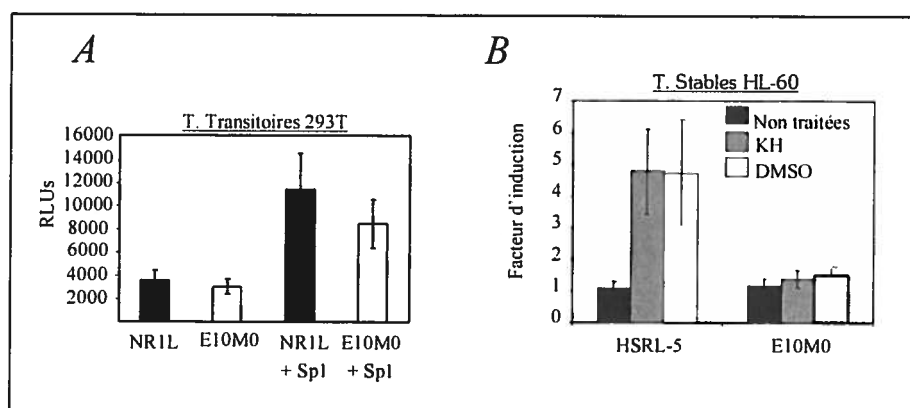


Figure 9. Régulation transcriptionnelle du promoteur *NRAMP1* par le facteur Sp1 (Richer E., Thèse de doctorat, 2005).

(A). Co-transfection transitoires du promoteur *NRAMP1* de type sauvage (NR1L) ou muté sur le site E10 (E10M0) avec des plasmides exprimant le facteur de transcription Sp1. (B). Des clones HL-60 obtenus par transfection stable avec les constructions du promoteur de type sauvage (HSRL-5) ou muté sur le site E10 (E10M0) ont été utilisés pour mesurer l'activité du promoteur (en RLU) dans des cellules non traitées, et différenciées avec du KH ou du DMSO pendant 4 jours.

Plusieurs autres facteurs de transcription qui pouvaient contribuer à l'activité basale du promoteur *NRAMP1* ont donc été testés (Voir Thèse E. Richer). En sachant que les facteurs de la famille C/EBP et CDP ont un rôle prééminent dans la différenciation myéloïde, nous avons testé leur participation dans la régulation du promoteur *NRAMP1*. Des co-transfections transitoires dans les cellules non myéloïdes 293T de constructions du promoteur *NRAMP1*, complet (pGL3NR1L) ou ne contenant que la région basale (pGL3NR1S) avec des plasmides exprimant les facteurs de transcription C/EBP α , β ou ϵ , Sp1 et CDP ont été réalisées.

Les résultats ont permis de mettre en évidence une forte activation de l'expression du gène *NRAMP1* par les facteurs C/EBP. De même, des co-transfections avec le facteur CDP/Cux p200 n'induisent pas d'activité du promoteur *NRAMP1* et inhibe l'activation du gène *NRAMP1* par le facteur Sp1. Cependant, des co-transfections avec l'isoforme CDP/Cux p110, qui a perdu son domaine d'inhibition (Truscott, Raynal *et al.* 2004), augmentent la transcription du gène *NRAMP1*, suggérant que l'isoforme CDP/cut p200 peut réprimer le gène *NRAMP1*. D'autre part, ces résultats montrent que, contrairement au facteur Sp1, l'activité des facteurs C/EBP ou CDP n'est pas affecté par la longueur du promoteur *NRAMP1* étudiée ce qui signifie que la fixation de ces facteurs C/EBP pourrait avoir lieu dans la région basale du promoteur *NRAMP1* (Fig. 10).

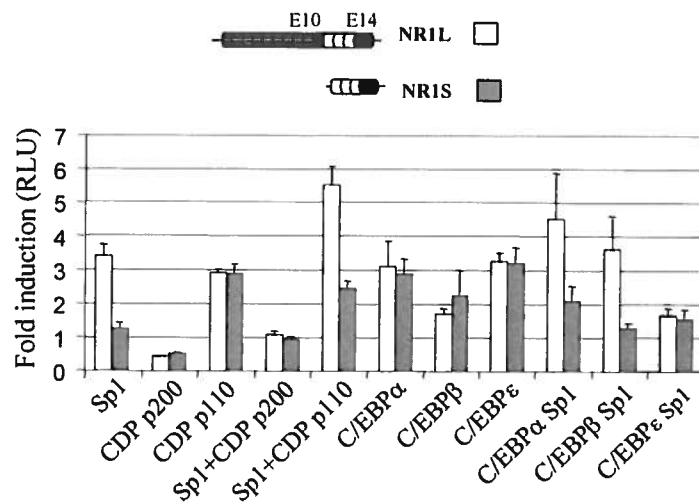


Figure 10. Rôle des facteurs C/EBP, CDP et Sp1 dans l'activité transcriptionnelle du promoteur *NRAMP1* (Thèse E. Richer, 2005).

Co-transfections transitoires de cellules 293T avec 2 constructions du promoteur *NRAMP1* (pleine longueur, NR1L, et région basale, NR1S, pour *NRAMP1* short) et des plasmides exprimant le facteur de transcription Sp1 et différents isoformes des facteurs C/EBP et CDP.

Nous avons donc recherché la présence de sites potentiels de fixation de ces facteurs trans-activateurs, C/EBP, sur le promoteur *NRAMP1* par une analyse avec les logiciels de prédilection de liaison de facteurs de transcription (Alibaba2 et Match 1.0). Les résultats ont révélé la présence de plusieurs séquences consensus potentielles pour les facteurs de la famille C/EBP sur le promoteur, dont trois dans la région basale, dans les sites E11, E12 et E14 repérés par empreinte à la DNase (Fig. 11). Or, la présence du site majeur (+1) d'initiation de la transcription adjacent au site E14 pourrait supporter l'hypothèse que ce dernier soit le siège de processus impliquant le recrutement des composants du complexe de la transcription.

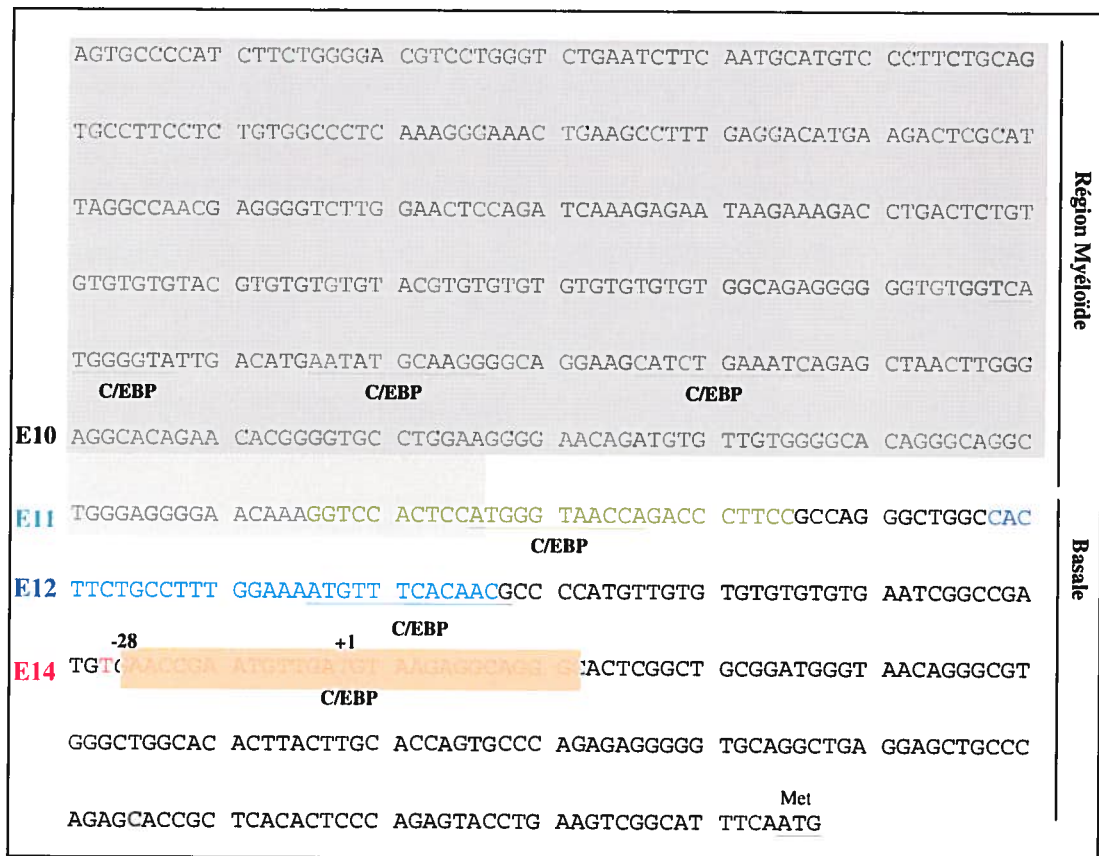


Figure 11. Analyse des éléments cis régulateurs de la région basale fixant potentiellement les facteurs C/EBP.

Analyse du promoteur *NRAMP1* par le logiciel AliBaba2.1 et identification de plusieurs sites potentiels de fixation des facteurs de transcription de la famille des C/EBP (score : 75.0).

Une expérience de retard sur gel utilisant des ODNdb centrés sur l'élément cis E14, mis en présence d'extraits nucléaires provenant de cellules HL-60 traitées avec du KH et de l'IFN- γ a permis de révéler la liaison spécifique d'un facteur sur ce site. L'attachement de ce facteur sur le site E14 est d'ailleurs supprimé ou fortement diminué par les mutations E14M1 et E14M2 mais pas avec celles de E14M3. Or, les mutations E14M1 et E14M2 recouvrent le site prédit d'attachement pour les C/EBP (5'-T(T/G)NNGNAA(T/G)-3') (Friedman 2002) (voir Fig. 17, chap. 3).

Par conséquent, la position du site E14 et son interaction potentielle avec les facteurs C/EBP permettent de supposer que l'élément E14 cis-activateur pourrait être essentiel à l'expression du gène *NRAMP1*.

Les objectifs de mon projet de recherche étaient donc de confirmer la fixation des facteurs C/EBP sur le site E14 de la région basale du promoteur *NRAMP1* et de déterminer l'importance du site E14 dans la régulation transcriptionnelle du promoteur *NRAMP1* au cours de la différenciation myéloïde.

Chapitre 2

Matériels et Méthodes³

³ Toutes les expériences dont les résultats sont présentés dans le chapitre 3 ont au moins été effectuées trois fois.

2.1. Traitement des cellules

2.1.1. Lignées cellulaires et culture

Les cellules de la lignée promyélocytaire HL-60 et les cellules humaines 293T de rein embryonnaire ont été obtenues de la banque ATCC (American Type Culture Collection; Manassas, VA). Ces cellules ont été maintenues dans du milieu RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT) contenant 10% de sérum de veau foetal inactivé pendant 30 min à 56°C (HyClone, Logan, UT), 2 mM de L-Glutamine et 25 mM d'HEPES pH 7,4 (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). Ces lignées cellulaires ont été cultivées dans un incubateur à 37°C ayant une atmosphère humide à 5% de CO₂. Les passages cellulaires ont été effectués 2 fois par semaine pour la lignée cellulaire 293T (confluence des cellules désirée au passage : 20%, le lundi et 10 %, le jeudi). Pour la lignée cellulaire HL-60, les passages cellulaires ont été réalisés 3 fois par semaine (nombre de cellules désirée au passage : 2×10^5 cellules/ml, le lundi, mercredi et vendredi).

2.1.2. Différenciation des cellules HL-60

Pour différencier la lignée cellulaire HL-60 en monocyte/macrophage, nous avons traité pendant 4 jours ces cellules avec 10^{-8} M de KH 1060 ou de EB 1089, des analogues de la vitamine D (2×10^5 cells/ml au jour 0) avec ajout de milieu frais au jour 3 (pour obtenir une concentration finale de 5×10^5 cells/ml). Un ajout au troisième jour de 100 U/mL d'IFN γ (KH-IFN γ) a été effectué seulement pour les cultures cellulaires utilisées dans les expériences de retard sur gel. Il a été démontré que l'expression du gène *NRAMP1* est détectée par Northern Blot après 1 jour de différenciation et il atteint son maximum d'expression après 5 jours de différenciation par ces composés (Roig, Richer *et al.* 2002).

La différenciation des cellules HL-60 en granulocytes a été obtenue par un traitement de ces cellules pendant 6 jours avec 1.25% de DMSO (6×10^5 de cellules/ml au jour 0).

Les analogues de la vitamine D ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), le KH 1060 et le EB 1089 ont été généreusement fournis par le Dr. Lise Binderup (Leo Pharmaceutical Products, Ballerup, Denmark). Les solutions stocks sont dans de l'isopropanol à 4×10^{-3} M et sont stockées à -20°C , protégées de la lumière. L'IFN γ humain recombinant provient d'Endogène (Woburn, MA).

2.1.3. Analyse des phénotypes cellulaires par cytométrie en flux

Le phénotype des cellules différenciées ou non par la VD a été analysé par cytométrie en flux. 50×10^5 cellules ont été recueillies dans chaque condition de différenciation, centrifugées à 800 rpm pendant 5min à 4°C et resuspendues dans une solution de PBS-BSA- NaN_3 (phosphate-tamponé salin (PBS) - 0.1% d'albumine de sérum bovin (BSA) - 0.01 % d'azide de sodium (NaN_3)). Les cellules ont été réparties dans des tubes à raison de 1×10^6 cells/10 μl . Une première incubation a été réalisée avec 20 μl d'IgG humain (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pendant 30 min sur glace pour bloquer les récepteurs Fc. L'anticorps primaire (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a ensuite été ajouté à la solution bloquante d'IgG à raison de 100 μl d'anticorps/30 μl de cellules. L'ensemble a été incubé 45 min à 4°C .

Pour vérifier la différenciation myéloïde des cellules HL-60, nous avons examinés l'expression du récepteur CD14, marqueur de la différenciation myéloïde des cellules HL-60 (Li, Wang *et al.* 2002). Un anti-CD14 humain (surnageant d'hybridome, 3C10, ATCC) a donc été utilisé comme anticorps primaire. Nous avons aussi pris un témoin isotypique, c'est-à-dire un anticorps monoclonal, IgG2b (MG2b00, Cedarlane, Burlington, ON), dirigé contre un antigène sans rapport avec le CD14 mais du même isotype que l'anticorps CD14 employé.

Les cellules ont ensuite été lavées et centrifugées deux fois avec 1 mL de PBS- NaN_3 . Finalement, une incubation de 45 min avec un second anticorps, un anti-IgG de souris conjugué à la fluorescéine (FITC) a été effectuée (716-096-151; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Après deux lavages/centrifugations avec du PBS-BSA- NaN_3 , les cellules ont été resuspendues dans 300 μL de PBS-5% BSA.

Les tubes ont ensuite été analysés par cytométrie en flux avec un cytomètre FACSCalibur Becton Dickinson (BD Biosciences, Mississauga, ON) en utilisant les paramètres décrits dans le **tableau 1**.

Tableau 1. Paramètres utilisés en cytométrie en flux.

Dectectors/Amp				
Param.	Dectector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E-1	4.59	Lin
P2	SSC	335	4.59	Lin
P3	FL1	535	3.94	Log
P4	FL2	520	1.00	Log
P5	FL3	505	1.00	Log
P6	FL2-A		1.00	Lin
P7	FL4	830		Lin

Compensation
FL1 – 0.7% FL2
FL2 – 22.3% FL1

Les cellules en suspension défilent devant un faisceau laser et pour chacune d'elle est mesuré très précisément la fluorescence émise à diverses longueurs d'ondes. Les lasers à ions d'argon (faisceaux laser 1 (FL1) et 2 (FL2)) permettent d'exciter entre autre la fluorescéine (FITC) et l'iodure de propidium (PI) à 488 nm. La lumière diffusée renseigne aussi sur la morphologie et la structure de la cellule. Elle est recueillie dans 2 directions différentes, l'une peut être corrélée avec la taille de la cellule (FSC) et la seconde est représentative de son contenu cytoplasmique (SSC). Les résultats sont ensuite présentés sur un histogramme monoparamétrique où l'axe des abscisses représente l'intensité du signal analysé et l'axe des ordonnées le nombre de cellules.

2.2. Études *in vitro* de la fixation de facteurs de transcription sur le site E14 du promoteur *NRAMP1*

2.2.1. Mutations des oligonucléotides

Des oligonucléotides simple brin, sens et antisens, de 30 pb ont été synthétisés par la compagnie Sigma (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). Ces ODNsb sont centrés sur l'élément E14 du promoteur *NRAMP1* et mutés sur 3 bases (E14M1A, E14M1B, E14M2A, E14M2B et E14M1M) ou sur 2 bases (E14M1.1 à E14M1.6) afin de délimiter les bases les plus importantes du site prédit d'attachement des facteurs

C/EBP, 5' – TT/GN NGN AAT/G – 3' (Friedman 2002). Les mêmes mutations ont été utilisées dans les balayages à 6, 3 ou 2 bases.

Des ODNsb centrés sur l'élément E10 du promoteur *NRAMP1* ont aussi été synthétisés, de même que des ODNsb mutés sur 6 bases (E14M0 à 3) (Richer E., Thèse de doctorat, 2005). J'ai ensuite réalisé des ODNsb mutés sur 3 bases sur le site E10 (E10M0A, E10M0B, E10M0C, E10M0D, E10M2A, E10M2B et E10M3A). Les bases mutées ont été choisies d'après l'analyse *in silico* de la séquence du site E10 en utilisant les logiciels de prédilection de liaison de facteurs de transcription AliBaba 2.1 (Grabe 2002) et MATCH 1.0 (Kel, Gossling *et al.* 2003). Ces deux logiciels déterminent les bases potentiellement nécessaires à l'attachement des facteurs Sp1.

2.2.2. Marquage des oligonucléotides double brin

Pour hybrider les ODNsb synthétisés, 200 pmol de chaque ODNsb ont été incubés dans du tampon 0.1X NEB2 (New England Biolabs, NEB, Mississauga ON) pour un volume final de 20 µl à 95°C pendant 2 min suivi d'un refroidissement à température ambiante pendant 1 heure. Le volume final a été complété à 100 µl avec de l'eau stérile. Ensuite, 8 pmol de ces oligonucléotides double brin ont été marqués pendant 3-4 heures à 37°C avec 15 unités de T4 Polynucleotide kinase (NEB) en présence de 15 µCi de $\gamma^{32}\text{P}$ ATP (Amersham, Baie d'Urfé, QC). Les sondes ont été purifiées en utilisant le kit Qiaquick Nucleotide Removal (Qiagen, Mississauga ON) et éluées dans 80 µl de tampon EB (Qiagen) selon les instructions du manufacturier.

2.2.3. Extraction des protéines nucléaires des cellules HL-60

Les extraits nucléaires ont été préparés avec le kit d'extraction Nu-Clear (Sigma, Oakville ON) selon le protocole du manufacturier. La totalité des cellules a été collectée dans un tube et centrifugée pendant 5 min à 450g à 4°C. Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS frais et centrifugées pendant 5 min à 450g à 4°C. Une estimation de la quantité du culot de cellules (Packed Cell Volume, PCV) est

notée à cette étape et la quantité de tampon de lyse à rajouter est calculée selon le "PCV", soit 5 fois le PCV (incluant le DTT et le cocktail d'inhibiteur de protéases (PIC)). Le culot de cellule a été incubé dans le tampon de lyse pendant 15 min sur glace. Une solution d'IGEPAL CA-630 (10%) a ensuite été ajoutée au mélange, à une concentration finale de 0.6% (6 µl par 100 µl de lysat) et l'ensemble a été vortexé vigoureusement pendant 15 min et centrifugé immédiatement pendant 30 sec à 11 000g à 4°C. Le surnageant, qui contient la fraction cytoplasmique des cellules, a été éliminé et le culot a été resuspendu avec du tampon d'extraction (volume correspondant au 2/3 du PCV + DTT et PIC). Chaque échantillon a ensuite été agité sur un vortex pendant 30 min à 4°C, puis centrifugé 5 min à 21 000g à 4°C.

Le surnageant qui contient les extraits nucléaires a été transféré dans un nouveau tube et la concentration des protéines a été déterminée avec le kit Non-Interfering Protein Assay (CalBiochem, San Diego CA) et ajustée à 2µg/ml avec le tampon de dilution fourni par le kit d'extraction Nu-Clear.

2.2.4. Expérience de retard sur gel

2.2.4.1. Principe

Cette technique est basée sur le retard de migration, dans un gel de polyacrylamide non dénaturant (préservant l'état natif des facteurs nucléaires), de sonde marquée (*) en présence d'extraits nucléaires dont on veut déterminer si ils contiennent des protéines (ou des complexes protéiques) ayant la propriété de reconnaître spécifiquement la séquence d'intérêt. La variation de migration de ces sondes* complexées aux protéines par rapport aux ODNdb (ou sondes) libres est suivie grâce au marquage radioactif au ³²P des sondes nucléotidiques (**Fig. 12**).

2.2.4.2. Expérience

2 µg d'extraits nucléaires ont été incubés sur glace pendant 10 min avec 1.5 µg de Poly (dI-dC) (Amersham) et 1.125 µg de BSA (pour bloquer l'attachement non

spécifiques des protéines, le poly (dI-dC) agit comme un acide nucléique non-spécifique) dans un volume total de 15 µl avec un excès de 5 à 50 fois d'oligonucléotides double brin (ODNdb) de 30 pb, centrés sur un site choisi du promoteur *NRAMP1* ou des ODNdb mutés sur 6 bases. De plus, des sites d'attachement consensus pour les facteurs C/EBP (Pereira, Delany *et al.* 2004) et CDP (Nirodi, Hart *et al.* 2001), connus pour être actifs dans les cellules myéloïdes, ont été utilisés comme « appât » pour compétitionner la fixation de ces facteurs sur le promoteur *NRAMP1*. Ces séquences consensus ont également été mutées pour servir de contrôle négatif.

La séquence « appât » pour les facteurs de transcription C/EBP utilisée est (Pereira, Delany *et al.* 2004) :

Type sauvage : 5' – TGC AGA TTG CGC AAT CTG CA – 3'

Type mutée : 5' – TGC AGA GAC TAG TCT CTG CA – 3'

La séquence « appât » pour les facteurs de transcription CDP utilisée est (Nirodi, Hart *et al.* 2001) :

Type sauvage : 5'- AAA AGA AGC TTA TCG ATA CCG T -3'

Type mutée : 5'- AAA AGA AGC TTA TTC ATA CCG T -3'

Une sonde radioactive à 0.5 pmol a été ajoutée à ce mélange et le tout incubé sur glace pendant 1 heure. Une quantité de 8 µl de ces échantillons a ensuite été chargée sur un gel de polyacrylamide à 5% (5 ml d'une solution d'acrylamide 30 % (29 g d'acrylamide et 1 g de bis-acrylamide)) pour une migration de 1h30 dans du tampon TBE 0.5X à 200mV, puis exposée entre 16 et 70 heures dans une cassette Phosphor Imager (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA). L'intensité des signaux a été mesurée par le logiciel ImageQuant (version 5.0; Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

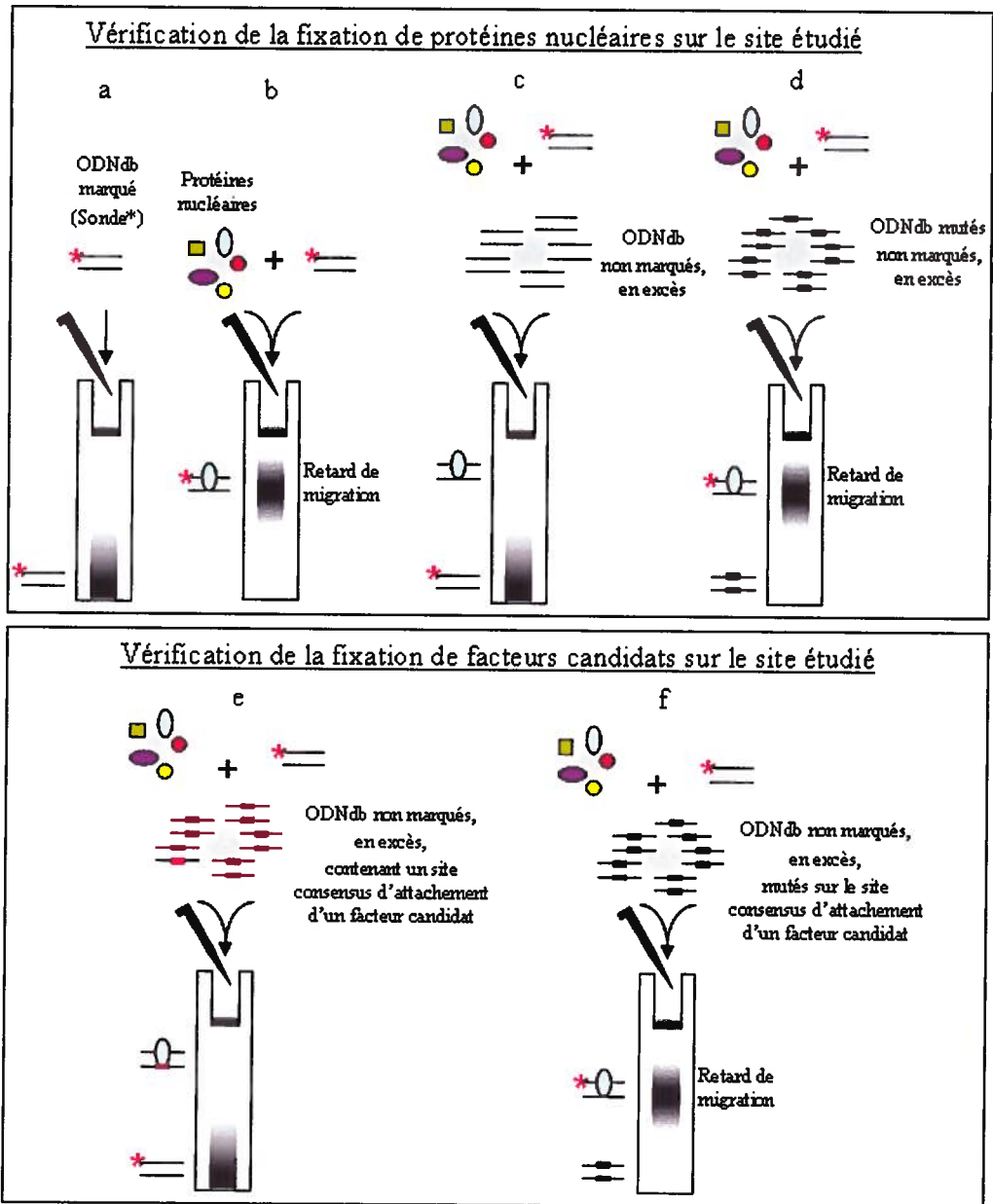


Figure 12. Principe de l'expérience de retard sur gel.

La variation de migration des sondes* complexées aux protéines par rapport aux ODNdb (ou sondes) libres est suivie grâce au marquage radioactif au ^{32}P des sondes nucléotidiques (a, b). La spécificité de reconnaissance du site par une ou plusieurs protéines est testée par l'ajout en excès (5 à 50 fois) du même duplex non radioactif qui entre en compétition avec la forme radioactive (c). L'incidence d'une mutation sur la spécificité de l'interaction site/protéine(s), est testée par l'ajout en excès (5 à 50 fois) du même duplex non radioactif mais muté sur certaines bases afin de tester leur rôle (d). Pour déterminer l'identité des protéines interagissant avec la sonde*, des ODNdb contenant une séquence consensus d'attachement pour les facteurs candidats, sont utilisés, en excès (5 à 50 fois), pour compétitionner la fixation de ces facteurs (e). Ces mêmes ODNdb, mais mutés de manière à empêcher la fixation du facteur sur la séquence consensus, sont aussi testés comme contrôles négatifs (f).

2.2.5. Expérience de super retard sur gel

La présence de protéines spécifiques dans le complexe retardé peut être mise en évidence par l'ajout d'anticorps spécifiques qui permettent un retard plus important sur le gel appelé "supershift". Des anticorps anti-C/EBP α (sc-61, Santa-Cruz Biotech., Santa Cruz, CA) ou anti-C/EBP β (sc-150, Santa-Cruz Biotech., Santa Cruz, CA) ont été ajoutés dans le mélange (voir parag. 2.2.4.) pour 30 min supplémentaires sur glace (2, 3 ou 6 μ g pour le supershift utilisant l'anticorps anti-C/EBP α , anti-C/EBP β et le contrôle anti-IgG de lapin (12-370, Upstate, Lake Placid, NY).

2.3. Études *in vivo* dans les cellules non myéloïdes 293T du rôle des facteurs C/EBP dans la régulation transcriptionnelle du gène *NRAMP1*

2.3.1. Clonage du promoteur *NRAMP1* dans le vecteur pGL3NR1L

2.3.1.1. Constructions de type sauvage : pGL3 NR1L, pGL3 NR1S

Les deux constructions du promoteur, pleine longueur (NR1L) et courte (NR1S) ont été antérieurement décrites (Roig, Richer *et al.* 2002). Ces deux plasmides proviennent de l'insertion du promoteur *NRAMP1* long ou court dans le vecteur pGL3 Basic. Le plasmide pGL3Basic, qui possède le gène reporteur de la luciférase, est dépourvu de promoteur eucaryote, par conséquent l'activité transcriptionnelle du promoteur inséré peut être étudié en mesurant l'intensité de la luciférase émise. Ce plasmide possède une résistance à l'ampicilline pour permettre une sélection positive des clones après transformation bactérienne.

2.3.1.2. Construction de type mutée : pGL3 NR1L E14M1

La construction de type mutée pGL3 NR1L E10M0 a été antérieurement décrite (Richer E., Thèse de doctorat, 2005).

- Mutagenèse dirigée

La mutation E14M1 du promoteur *NRAMP1*, préalablement définie *in vitro*, a été réalisée par mutagenèse dirigée. Les paires d'oligonucléotides pour EMSA E14M1 ont été utilisées en combinaison avec les amorces LucIR et RVP₃ pour produire 2 fragments de PCR avec la polymérase *Pfu* (Stratagene) (**Fig. 13A**).

L'amplification par PCR a été réalisée dans un volume réactionnel final contenant : 0.5 µl de MgSO₄ (100 mM), 0.2 µl de dNTPs (25mM), 2.5 µl de tampon Pfu, 0.2 µl de Pfu et 1 µl d'ADN (plasmide pGL3 NR1L possédant le promoteur *NRAMP1* complet). Deux amplifications par PCR ont été réalisées : une avec 1 µl d'amorce RVP₃ (5 pmol/µl) et 1 µl d'amorce E14M1 antisens et l'autre avec 1 µl d'amorce LucIR (5 pmol/µl) et 1 µl d'amorce E14M1 sens. Une quantité d'eau MilliQ nécessaire pour compléter le volume à 25 µl a été rajoutée pour chacun des mélanges réactionnels.

Les deux réactions d'amplification ont été réalisées comme suit dans le thermocycleur Programmable Thermal Controller PTC-100 (MJ Research Inc.) :

- 95°C pour 45s,
- 4 cycles à (95°C pour 45s, 48°C pour 1 min, 72°C pour 2 min),
- 22 cycles à (95°C pour 45s, 54°C pour 1 min, 72°C pour 2 min),
- 72°C pour 10min, 4°C.

Les produits PCR (613 et 233 pb) ont ensuite été purifiés par migration sur gel d'agarose avec les colonnes Qiaquick (Qiagen, Mississauga ON) selon le protocole du manufacturier.

Une deuxième PCR a été ensuite réalisée pour synthétiser le promoteur *NRAMP1* muté sur le site E14 (mutation E14M1). Le volume réactionnel contenait 0.5 µl de MgSO₄ (100 mM), 0.2 µl de dNTPs (25mM), 2.5 µl de tampon Pfu, 0.2 µl de Pfu, 1 µl d'amorce RVP₃ (5 pmol/µl), 1µl d'amorce LucIR (5 pmol/µl), 1 µl d'ADN provenant de chacun des produits PCR élués précédemment (2 µl d'ADN au total) et une quantité d'eau MilliQ nécessaire pour compléter le volume à 25 µl.

Les mêmes conditions d'amplification que celles décrites précédemment ont été utilisées.

Les produits PCR ont été à nouveau purifiés sur gel et traités avec les enzymes de restriction *Nhe I* et *Nar I* (NEB ; Mississauga, Ontario) et purifiés par le kit Nucléotide Removal (Qiagen) avant d'être recombinaés au vecteur pGL3NR1L traité avec les mêmes enzymes (Fig. 13B).

- Clonage du promoteur *NRAMP1* muté (E14M1)

La ligation de l'insert (promoteur *NRAMP1* possédant la mutation E14M1) au vecteur pGL 3 NR1L a été effectuée grâce à la T4 DNA ligase, enzyme capable de lier les extrémités de fragments d'ADNdb entre elles. Les conditions utilisées pour la ligation ont été les suivantes : 2 µl d'insert, 2 µl de vecteur, 2 µl de tampon à ligase 5X, 0.2 µl de T4 DNA ligase et la quantité d'eau MilliQ nécessaire pour compléter le volume à 10 µl. L'ordre dans lequel chaque produit a été ajouté est le suivant : vecteur + insert + eau. Ce mélange a été placé à 65°C pendant 5 min pour séparer les bouts cohésifs. Puis l'enzyme et le tampon ont été ensuite ajoutés. Deux contrôles ont aussi été préparés : un ne contenant pas d'insert dans le mélange et l'autre ne contenant ni l'insert, ni l'enzyme. L'ensemble a été incubé à 16°C pendant 4 à 16 heures.

Une précipitation de l'ADN de chaque ligation a ensuite été effectuée pour concentrer l'ADN dans un volume plus petit. Dans les 10 µL des ligations a été rajouté : 1.5 µL de glycogène 1X, 5 µL de NaCl 1M et 2.5 volume d'éthanol 100%, soit 32.5 µL. L'ensemble a été incubé à -20°C pendant 3-4h. Après une centrifugation de 5 min à 21 000 g, le surnageant a été éliminé et le culot d'ADN est resuspendu dans 150 µl d'éthanol 75 % puis centrifugé à nouveau pendant 5 min à 21 000 g. Après avoir laissé sécher le culot pendant 10-15 min, celui-ci a finalement été resuspendu dans 5 µl d'eau MilliQ. Deux incubations de 5 min, glace/-65°C, ont ensuite été réalisées deux fois de suite chacune. L'insertion du promoteur dans la bonne orientation a été vérifiée par une digestion avec *EagI* (NEB).

- Transformation des clones pGL3 NR1L E14M1

Le plasmide pGL3 NR1L E14M1 créé a été électroporé dans des cellules électrocompétentes. Un volume de 3 µl de chaque échantillon d'ADN précipité après ligation, a été mélangé à 50 µl de bactéries électrocompétentes. Ces bactéries ont été préparées selon le protocole de Sambrook *et al.* (Sambrook, Fritsch *et al.* 1989). L'ensemble a été transféré dans une cuvette d'électroporation de 1mm (Biorad). L'électroporation a été faite grâce au Gene Pulser (Biorad) avec les conditions suivantes : un voltage de 1.6 kV, une résistance de 400 Ohms et une capacitance de 25 µF. Les cellules ont ensuite été incubées dans un volume de 1 mL de milieu SOC préparé frais (1L de milieu SOB (20g de Tryptone, 5g d'extrait de levure, 0.5g de NaCl et 10 ml de KCl à 250 mM), 10 ml de MgCl₂ et 20 ml de glucose) pendant 1h dans un incubateur à 37°C, en rotation.

100 µl de cette suspension ont ensuite étéensemencés sur gélose LB contenant 100µg/ml d'ampicilline pour la sélection. En effet, le plasmide pGL3 NR1L possède une résistance à l'ampicilline pour permettre une sélection positive des clones après transformation bactérienne. Le volume de la suspension restant a été centrifugé à 6000 g pendant 1 min puis seulement 100 µl de surnageant a été gardé pour resuspendre le culot qui a été à nouveauensemencé sur gélose LB contenant 100µg/ml d'ampicilline. Les géloses ont été incubées pendant 16 heures à 37°C.

Plusieurs colonies bactériennes résistantes à l'ampicilline (résistance du vecteur pGL3NR1L) ont ensuite été choisies de façon aléatoire et resuspendues dans 3 mL de milieu LB contenant 100µg/ml d'ampicilline.

- Purification des plasmides pGL3 NR1L E14M1

Le kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen) a été utilisé suivant le protocole du fabricant. La vérification de la bonne intégration du promoteur *NRAMP1* muté dans le plasmide pGL3 NR1L et dans la bonne orientation a ensuite été vérifiée dans chacun des clones obtenus par une digestion avec *EagI* (NEB).

Le kit HiSpeed Plasmid Maxi (Qiagen) a été utilisé suivant le protocole du fabricant. Cette étape permet d'obtenir une plus grande quantité de plasmides. La présence du promoteur *NRAMP1* muté et l'absence de toute autre mutation dans les clones sélectionnés a ensuite été vérifiée par séquençage.

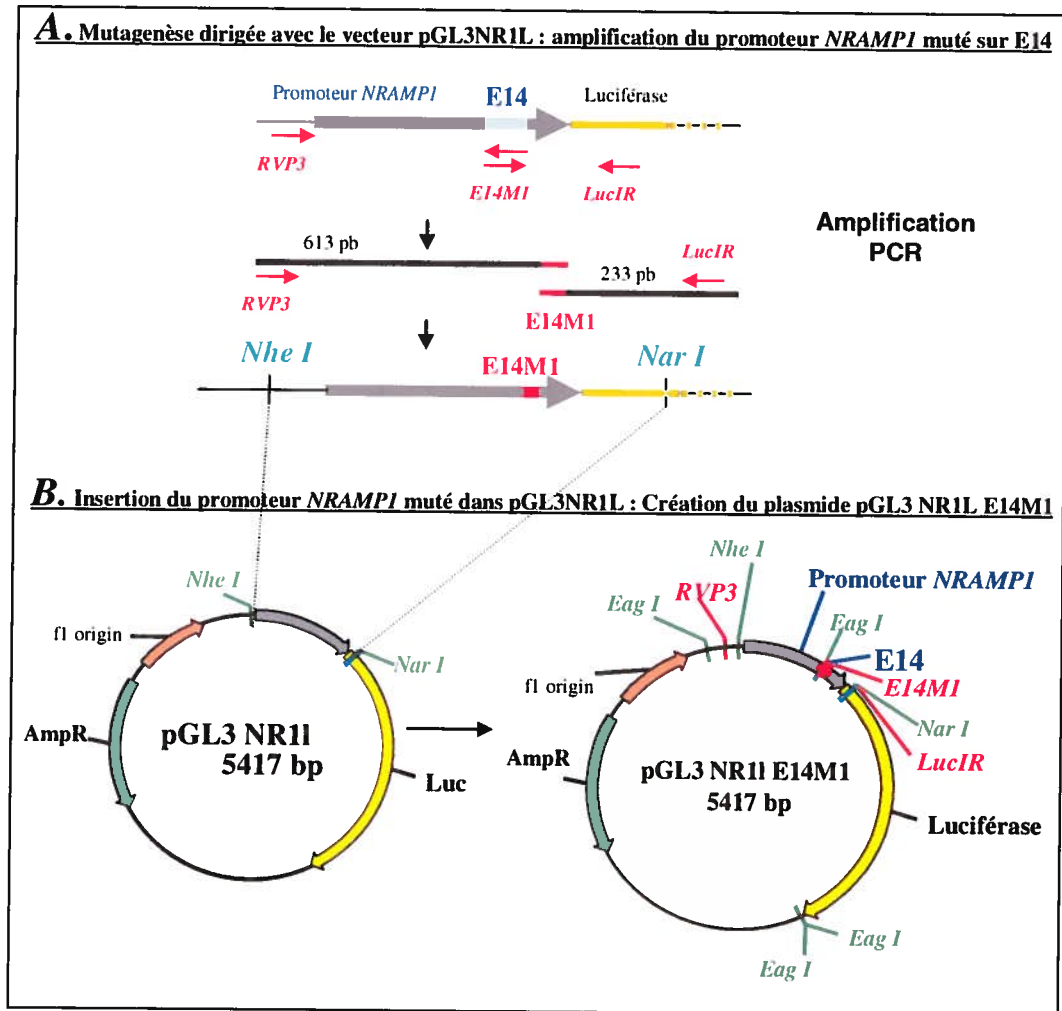


Figure 13. Clonage du vecteur pGL3 NR1L E14M1

(A) Mutagenèse dirigée du promoteur *NRAMP1* pour créer la mutation E14M1 dans le site E14. (B) Clonage du promoteur *NRAMP1* muté sur le site E14 (E14M1) dans le vecteur pGL3NR1L pour créer le plasmide pGL3 NR1L E14M1.

2.3.2. Transfections et co-transfections transitoires des constructions du promoteur dans les cellules 293T

Les cellules 293T ont été transfectées transitoirement avec le réactif GenePORTER (GeneTherapy system, San Diego, CA) selon les instructions du fabricant. Les cellules ont été réparties dans des 96 puits à 25 % de confluence, une journée avant la transfection. Le volume de transfection utilisé était de 100µl, utilisant 1.5 µl de GenePORTER avec un total de 400 ng d'ADN : 50 ng d'un plasmide contrôle pRLTK, 150 ng d'un plasmide rapporteur et 200 ng de plasmide exprimant un facteur de transcription et/ou un plasmide pBluescript KS+ utilisé comme témoin négatif et/ou pour maintenir la quantité d'ADN total constante. Les plasmides d'expression encodant les facteurs de transcription ont été généreusement fournis par Robert Tjian, pour le facteur Sp1 (University of California, Berkeley) (Courey et Tjian 1988) et Timothy Bigby, pour les facteurs C/EBP α , β et ϵ (University of California, San Diego) (Reddy, Serio *et al.* 2003). Le mélange GenePORTER-ADN a été incubé à température ambiante pendant 40 min puis ajouté aux cellules à 37°C pendant 5 heures. Un volume de 100µl de RPMI 20% FCS a ensuite été ajouté pour toute la nuit.

2.3.3. Mesure de l'activité des constructions du promoteur

L'activité de la luciférase a été déterminée avec le kit Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI) selon le protocole du fabricant. Ce kit permet de mesurer l'activité de deux enzymes, la Rénilla luciférase et la Firefly luciférase, directement dans le même tube. L'activité des différentes constructions du promoteur *NRAMP1* sera déterminée par mesure de l'activité de la Firefly luciférase qui est codée par les plasmides pGL3. Le niveau d'expression du gène de la luciférase est donc révélateur de l'activité transcriptionnelle du promoteur *NRAMP1* muté ou non.

L'ajout de plasmide pRLTK dans chaque co-transfection a servi de contrôle interne, permettant de normaliser les résultats entre eux et de minimiser la variabilité entre les échantillons, due à une différence de viabilité des cellules ou d'efficacité de transfection. L'induction de ce contrôle sera déterminée par mesure de l'expression du

gène de la Renilla luciférase qui est sous contrôle, dans ce plasmide, du promoteur HSV-TK (Herpes Simplex Virus-Thymidine Kinase), actif constitutivement.

Le surnageant des cellules co-transfectées a été éliminé et 100 µl de tampon de lyse 1X a été ajouté aux cellules pour les lyser. L'ensemble a été incubé à 4°C pendant 10 min avec agitation. Chaque lysat de cellule a ensuite été transféré dans un épendorf et une série de congélation/décongélation ont été effectuée pour assurer la bonne lyse des cellules. 20 µl de ce lysat ont ensuite été transférés dans des tubes adaptés au luminomètre. Pour mesurer l'activité du reporter de la Firefly luciférase (constructions du promoteur *NRAMP1*), 50 µl de réactif luciférase II (Lar II, luciférase assay reagent) est ajouté dans le tube pour chaque échantillon. Le signal luminescent stable généré par ce réactif a été lu à l'aide d'un luminomètre Lumat LB9507 (Berthold, Australie). La réaction a ensuite été stoppée et la réaction de la Renilla luciférase a été simultanément initiée par ajout du réactif Stop & Glo, dans le même tube.

Les résultats obtenus ont ensuite été normalisés (Ratio (RLU Firefly)/ (RLU Renilla)) pour obtenir un graphique présentant l'activité luciférase des constructions du promoteur dans chaque co-transfections réalisées.

2.4. Études *in vivo* dans les cellules myéloïdes HL-60, du rôle du site E14 dans la régulation transcriptionnelle du gène *NRAMP1*

2.4.1. Constructions du promoteur *NRAMP1* dans le vecteur SrL

Toutes les étapes de précipitation des ligations, électroporation, minipreps et maxipreps ont été décrites précédemment dans la section 2.3.

2.4.1.1. Construction de type sauvage : SrL

La construction du plasmide SrL a été antérieurement décrite (Roig, Richer *et al.* 2002). Le plasmide SrL est constitué du promoteur *NRAMP1* de type sauvage

couplé au gène de la luciférase que l'on a intégré dans le vecteur Sr α . Le plasmide Sr α est utilisé pour l'étude de l'expression stable de gènes dans des cellules eucaryotes. Il possède à la fois une résistance à l'ampicilline permettant une première sélection positive des clones après transformation bactérienne et une résistance à la puromycine favorisant une deuxième sélection positive après transfection des cellules.

2.4.1.2. Construction de type mutée : SrL E14M1

La mutation E14M1 sur le promoteur *NRAMP1* dans le plasmide SrL a été réalisée par mutagenèse dirigée avec les mêmes amorces et dans les mêmes conditions de PCR que celles utilisées pour produire le plasmide pGL3 NR1L E14M1 (voir le paragraphe 2.3.1.2). Les produits PCR ont été purifiés sur gel et traités avec les enzymes de restriction *BamHI* et *Kpn I* (NEB ; Mississauga, Ontario). Les fragments de 2598 pb obtenus après digestion ont ensuite été purifiés par le kit Nucléotide Removal (Qiagen) avant d'être ligués au fragment de 4191 pb du vecteur d'intégration SrL digéré avec les mêmes enzymes de restriction. L'insertion du promoteur dans la bonne orientation a été vérifiée par une digestion avec *EagI* (NEB) (**Fig. 14**).

Plusieurs colonies bactériennes résistantes à l'ampicilline ont été choisies de façon aléatoire, suite à une transformation bactérienne. La présence du promoteur *NRAMP1* muté et l'absence de toute autre mutation dans les clones sélectionnés a ensuite été vérifiée par séquençage.

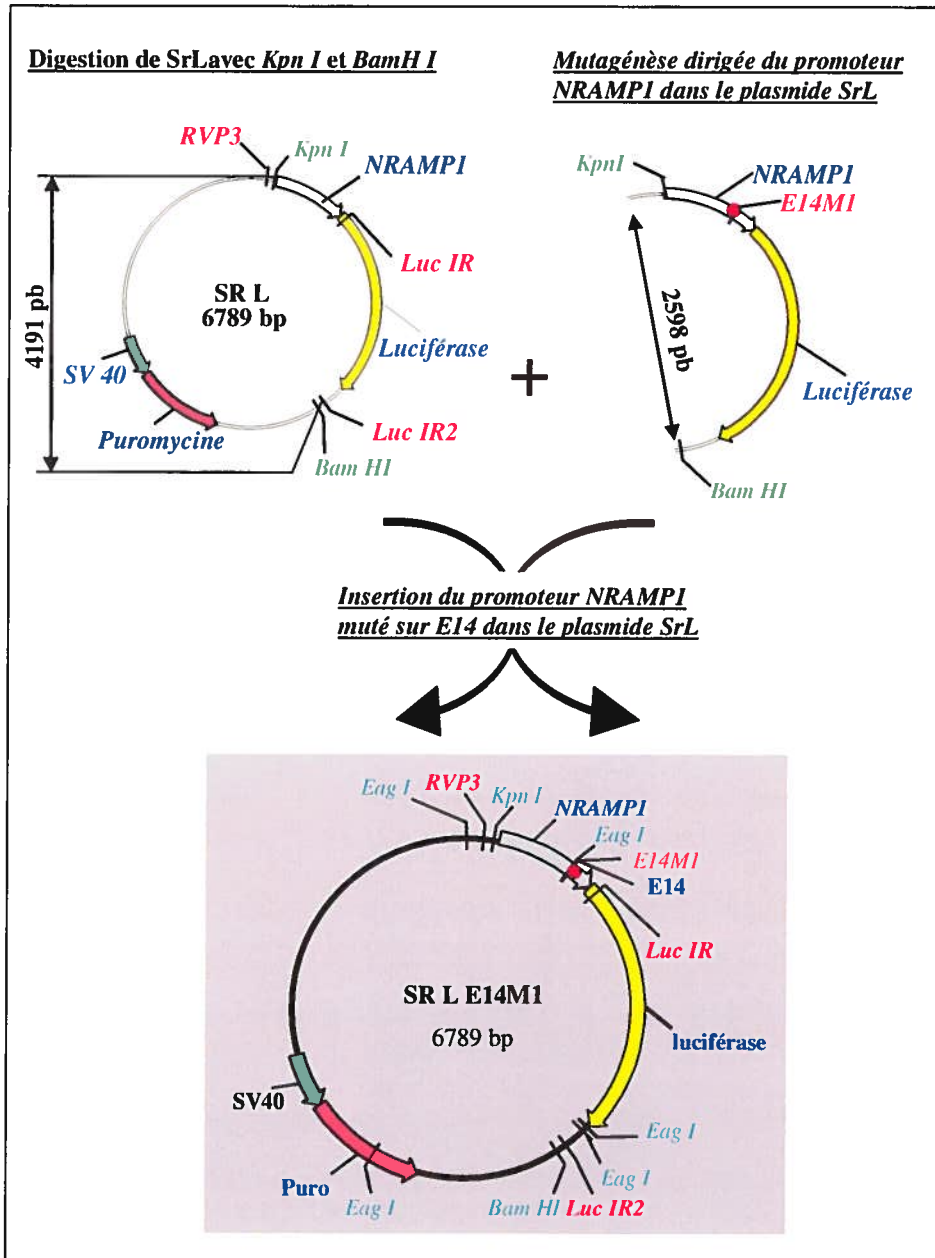


Figure. 14. Clonage du vecteur SrL E14M1

2.4.2. Génération de transfectants stables dans les cellules HL-60

La transfection du promoteur *NRAMP1* de type sauvage (SrL) dans la lignée HL-60 a été antérieurement décrite (Roig, Richer *et al.* 2002). Plusieurs clones stables ont été obtenus et comparés. Un seul clone représentatif a ensuite été utilisé comme référence, nommé HSRL-5.

Les transfectants stables mutés sur le promoteur *NRAMP1* (mutation E14M1) ont été obtenus par électroporation de la lignée cellulaire HL-60 (950µF, 250V) avec le plasmide SrL E14M1. Les clones ont été sélectionnés avec 1.5µg/mL de puromycine et ceux positifs pour leur capacité à produire de la luciférase.

Une extraction d'ADN a été réalisée pour les clones stables sélectionnés afin de vérifier l'intégrité du promoteur muté dans le plasmide SrL par une analyse de l'ADN génomique des clones obtenus par amplification PCR. Le kit DNeasy blood and tissue a été utilisé selon le protocole du manufacturier. L'ADN élué a ensuite été dosé par spectrophotométrie.

Le mélange réactionnel suivant a été utilisé pour l'amplification par PCR : 0.2 µl de dNTPs (25 mM), 0.5 µl de MgSO₄ (100 mM), 2.5 µl de Tampon Taq, 1 µl d'amorces RVP3 (sens) (5 pmol/µl), 1 µl d'amorces LucIR (antisens) (5 pmol/µl), 0.2 µl de Taq DNA polymérase 400 unités (NEB, n°: M0627S), 5 µl d'ADN (pour avoir une concentration de 100 ng par PCR) et une quantité d'eau MilliQ nécessaire pour compléter le volume à 25 µl.

La réaction d'amplification a été réalisée comme suit :

- 95°C pour 3 min,
- 30 cycles à (95°C pour 1 min, 54°C pour 1 min 30, 72°C pour 1 min),
- 72°C pour 10min, 4°C.

Afin de s'assurer que les résultats nuls obtenus avec les clones stables mutés E14M1 constituent une conséquence de leur mutation, nous avons aussi vérifié la présence du gène complet de la luciférase dans deux des quatre clones, E14M1-2 et E14M1-4. Le mélange réactionnel suivant a été utilisé : 2.5 µl de (NH₄)₂SO₄ 10X (750mM de Tris-HCl (pH 8.8 à 25°C), 200mM de (NH₄)₂SO₄ et 0.1% Tween 20), 2.5

μl de MgCl_2 (25 mM), 0.2 μl de dNTPs (25 mM), 1 μl d'amorces LucIR (antisens), 1 μl d'amorces LucIR2 (sens), 0.3 μl de Taq DNA polymérase, 15 μl d'ADN (pour avoir environ 300 à 400 ng d'ADN par PCR) et une quantité d'eau MilliQ nécessaire pour compléter le volume à 25 μl .

Les réactions d'amplification ont été réalisées comme suit :

- 95°C pour 3 min,
- 30 cycles à (95°C pour 1 min, 61°C pour 1 min, 72°C pour 3 min),
- 72°C pour 10min, 4°C.

2.4.3. Mesure de l'activité des clones stables

L'activité de la luciférase a été déterminée avec le kit Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI) selon le protocole du fabricant. Ce kit permet de déterminer l'activité du promoteur *NRAMP1* muté dans les clones stables obtenus par mesure de l'activité de la Firefly luciférase qui est couplée au promoteur.

Un volume de 100 μl de cellules ont été récupéré de chaque culture de clones stables et centrifugé à 1200 rpm pendant 5 min. Le culot de cellules a ensuite été resuspendu dans 50 μl de tampon de lyse 1X et incubé 10 min à 4°C. Une série de congélation/décongélation a ensuite été effectuée pour assurer la bonne lyse des cellules. Un volume de 20 μl de ce lysat a ensuite été transféré dans des tubes adaptés au luminomètre. La réaction de la Firefly luciférase a été induite par ajout de 50 μl du réactif pour l'essai luciférase et le signal luminescent émis a été mesuré à l'aide du luminomètre.

2.5. Études *in vivo* de la fixation des facteurs de transcription C/EBP sur le promoteur *NRAMP1*

2.5.1. Préparation de la chromatine des cellules HL-60

La technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) a été réalisée en utilisant le protocole de l'équipe de recherche du laboratoire du Dr. John White (Département de Physiologie, McIntyre, Université de Mc Gill) ainsi que le protocole EZ ChIP (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Les cellules HL-60 ont été stimulées ou non (ND : non différenciées) pendant 24h ou 48h avec 10^{-8} M de EB1089 (EB), un analogue de la VD. Les cellules dans chaque condition de différenciation ont été traitées de la même façon par la suite. Les traitements décrits ci-dessous sont applicables pour chacune des conditions de différenciation précédentes.

Les cellules ont été réparties dans des flasques de 25 cm² contenant 1×10^7 cellules dans 10 ml de milieu RPMI contenant 10% de sérum de veau fœtal inactivé. Après les différents temps de stimulation, les cellules ont été fixées par incubation de 10 minutes à 37°C en présence de 1% de paraformaldéhyde, gouttes directement ajoutées dans le milieu de culture (540 µl de Paraformaldéhyde 18.5% préparé frais) (**Fig. 16a**). La réaction a été stoppée par une incubation de 5 minutes à température ambiante avec 1 ml de Glycine 1.25 M. Les cellules ont été rincées deux fois avec 2 ml de PBS 1X froid, contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (5 µl par ml) (Sigma, n°: P8340) et resuspendues dans 300 µl de tampon de lyse (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris, pH 8.1 + 3 µl d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase (PIC), ajouté au dernier moment).

L'ADN a ensuite été soniqué 15 fois pendant 30 secondes à une amplitude de 4%, sur glace, avec une pause de 1 minute entre chaque coup, à l'aide d'un sonicateur, High Intensity Ultrasonic Liquid Processors (Sonics & Materials inc.) et d'une sonde de 3 mm (Sonics & Materials inc.) (**Fig. 16b**). Un prélèvement de 5 µl d'ADN soniqué a été effectué à ce stade pour une analyse sur gel d'agarose de la taille des fragments d'ADN. Celle-ci doit être courte, entre 100 et 500 pb. En effet, la présence de longs fragments d'ADN lors de l'immunoprécipitation par les anticorps pourrait entraîner une mauvaise interprétation du résultat final. Dans ce cas, un résultat positif

ne signifiera alors pas forcément que la protéine ciblée se fixe sur le promoteur étudié, mais peut-être sur un promoteur à proximité.

L'ADN soniqué a ensuite été dosé par spectrométrie à 260 nm et la concentration des échantillons de chaque condition (ND, 24h et 48h de différenciation EB) a été ajustée entre 0.6 et 0.7 µg/µl par ajout de tampon de lyse + PIC jusqu'à un volume maximum de 500 µl par échantillon. Ce lysat d'ADN soniqué a été centrifugé à 13 000 rpm, 10 min à 4°C, pour éliminer les débris cellulaires et le surnageant a été récupéré.

100 µl de ce surnageant (représentant environ 2×10^6 cellules HL-60) ont été utilisés pour une immunoprécipitation de la chromatine. Il a été dilué 10 fois dans un tampon de dilution (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-HCl, pH8.1, 167mM NaCl). Le lysat a ensuite été incubé pendant 3-4 heures en utilisant 60 µl de protéine G PLUS-Agarose (sc-2002, Santa-Cruz), 48 µl d'ADN simple brin de sperme de hareng (Sigma, n°: D7290) et 4.5 µl de PIC (Sigma, n°: P8340) pour diminuer la fixation non spécifique de composants du lysat aux protéines G (protéines qui serviront à purifier les complexes anticorps/chromatine). A ce stade, un volume de 500 µl (sur un volume total d'environ 4 ml) a été prélevé pour servir de témoin positif, nommé « Input » et le reste a été réparti dans des épendorfs : en 1 ml par immunoprécipitation.

2.5.2. Immunoprécipitation de la chromatine avec les anticorps anti-C/EBP

Les complexes de chromatine ont été ensuite immunoprécipités pendant 1 heure à 4°C en rotation avec 2 µg d'anti-C/EBPβ (sc-150, Santa-Cruz, Santa Cruz, CA), d'anti-C/EBPα (sc-61, Santa-Cruz, Santa Cruz, CA) ou d'un contrôle anti-IgG de lapin (12-370, Upstate, Lake Placid, NY) (**Fig. 16c**). Les complexes d'ADN immunoprécipités ont ensuite été récupérés par incubation pendant 1 heure à 4°C en rotation avec 60 µl de protéine G PLUS-Agarose préalablement incubés pendant 16h avec 48 µl d'ADN de sperme de hareng (**Fig. 16d**). Ces complexes ont été lavés successivement pendant 5 minutes à 4°C en rotation avec du tampon I, faible en sel (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 8.1, 150mM NaCl),

du tampon II, fort en sel (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 8.1, 500mM NaCl), du tampon LiCl (0.25M LiCl, 1% IGEPAL CA630, 1% d'acide déoxycholique (sodium salt), 1mM EDTA, 10mM Tris, pH 8.1), puis deux fois avec du tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0). Après chaque lavage les tubes ont été centrifugés 1 min à 1000g à 4°C excepté pour la dernière centrifugation qui se fait à 3000g, puis les surnageants ont été éliminés.

Les complexes de chromatine ont ensuite été élués des Protéines G-PLUS Agarose par deux incubations de 15 minutes à température ambiante sans rotation dans 100 µl de tampon d'éluion (1% SDS, 0.1M NaHCO₃), volume final élué : 200 µl. Un ajout de 8 µl de NaCl 5M a été effectué dans chaque éluion et l'ensemble a été incubé à 65°C pendant 16h pour inverser les pontages covalents ADN-protéines (**Fig. 16e**). Les solutions ont été digérées pendant 30 minutes à 37°C avec 1 µl de RNaseA (10mg/ml) (Invitrogen) puis pendant 1-2h à 45°C avec 10 µg/µl de protéinase K, 10 mM EDTA et 40 mM Tris-HCl, pH 6.5. L'ADN a ensuite été purifié en utilisant le kit Qiagen de purification de PCR (Qiagen, Mississauga ON) selon le protocole du manufacturier puis élué dans 50µl de tampon EB.

2.5.3. Analyse des résultats du ChIP par amplification PCR

Pour rechercher la présence du promoteur *NRAMP1* dans les fragments d'ADN qui ont été immunoprécipités par les anticorps anti-C/EBPα ou β, 1µl d'ADN élué a été analysé par PCR en utilisant des amorces spécifiques du promoteur *NRAMP1*, désignées amorces + (**Fig. 15 et 16f**). Ces amorces permettent d'amplifier un fragment de 275 pb du promoteur *NRAMP1* qui contient le site E14, site de fixation pour les facteurs C/EBP.

La séquence des amorces + utilisée est :

Amorces sens : 5'-TGGGTAACCAGACCCTTC CGC-3'

Amorces antisens : 5'-CCTTGTCACCTGTCATTGAAATG-3'

L'amplification par PCR de l'ADN élué a été réalisée dans un volume réactionnel final de 20 µl contenant : 2 µl de MgCl₂ (25mM), 0.16 µl de dNTPs (25mM), 1.6 µl d'amorces + ou - (5 pmol/µl). Pour chaque réaction de PCR seulement 1 µl d'ADN élué a été utilisé.

La réaction d'amplification a été réalisée comme suit :

- 94°C pour 3 min,
- Ajout sur glace de 2,24 µl d'un mélange contenant 0.24 µl d'ADN polymérase 400 unités (NEB, n°: M0627S) et de 2 µl de (NH₄)₂SO₄ 10X,
- 11 cycles à (94°C pour 1min, 62.4°C pour 45s, 72°C pour 25s),
- 21 cycles à (94°C pour 1min, 60°C pour 45s, 72°C pour 25s),
- 72°C pour 10 min, 4°C.

Les produits de PCR ont été analysés sur un gel à 2% d'agarose et visualisés par une coloration au bromure d'éthidium (**Fig. 16g**).

2.5.4. Contrôles utilisés pour le ChIP

La technique utilisée dans cette expérience est très délicate et nécessite dans sa mise en œuvre plusieurs points de contrôle de façon à obtenir des conditions optimales d'immunoprécipitation et de fragmentation de l'ADN. Le choix des amorces pour l'amplification PCR finale est aussi très important. Le strict respect de ces conditions expérimentales constitue un préalable à la validation du résultat final observé.

2.5.4.1. Contrôle du fonctionnement des amorces

Pour vérifier le bon fonctionnement des amorces utilisées et pour contrôler la présence d'ADN avant d'effectuer l'immunoprécipitation avec les anticorps, nous avons réalisé une amplification PCR sur l'ADN isolé dans chaque condition avec les amorces + et - (témoin désigné Input) dans les mêmes conditions de PCR que celles décrites au paragraphe 2.5.3. Le témoin "Input" a été dilué pour obtenir une concentration de 30 ng/µl avant d'être utilisé pour l'amplification par PCR.

2.5.4.2. Contrôle de la taille de l'ADN immunoprécipité

Pour vérifier que l'attachement des facteurs C/EBP a bien lieu sur le promoteur *NRAMP1* et non sur un promoteur à proximité du gène *NRAMP1*, nous avons réalisé

une amplification PCR de l'exon 3 du gène *NRAMP1* qui se trouve à 1839 pb de l'ATG du promoteur (Fig. 15). La PCR a été réalisée avec des amorces spécifiques (amorces -) qui amplifient un fragment de 216 pb couvrant l'exon 3.

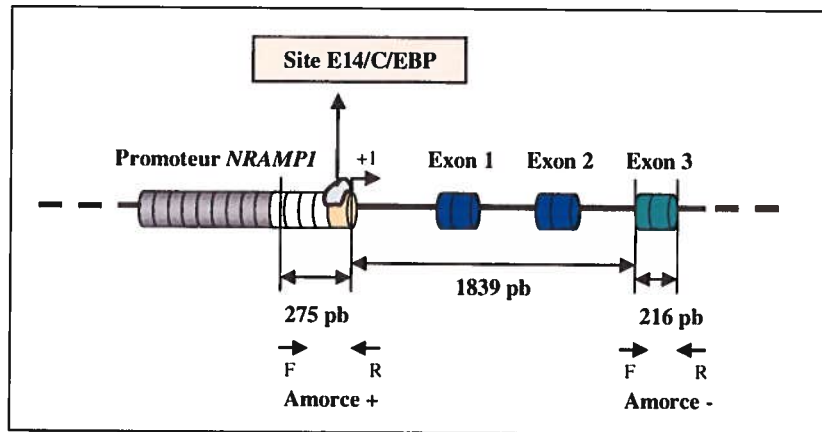


Figure 15. Représentation générale des amplifications par PCR réalisées dans le ChIP C/EBP / *NRAMP1*.

Cependant, le contrôle de l'amplification de l'ADN immunoprécipité par les amorces -, ne permet pas à lui seul d'éliminer l'hypothèse que l'attachement des facteurs C/EBP n'a pas lieu sur un promoteur à distance de *NRAMP1*. Pour écarter définitivement cette hypothèse, nous avons vérifié la taille des fragments d'ADN obtenus après sonication, par migration de ces échantillons d'ADN sur un gel d'électrophorèse. La taille des fragments d'ADN immunoprécipités par les anticorps doit se situer en général entre 100 et 500 pb.

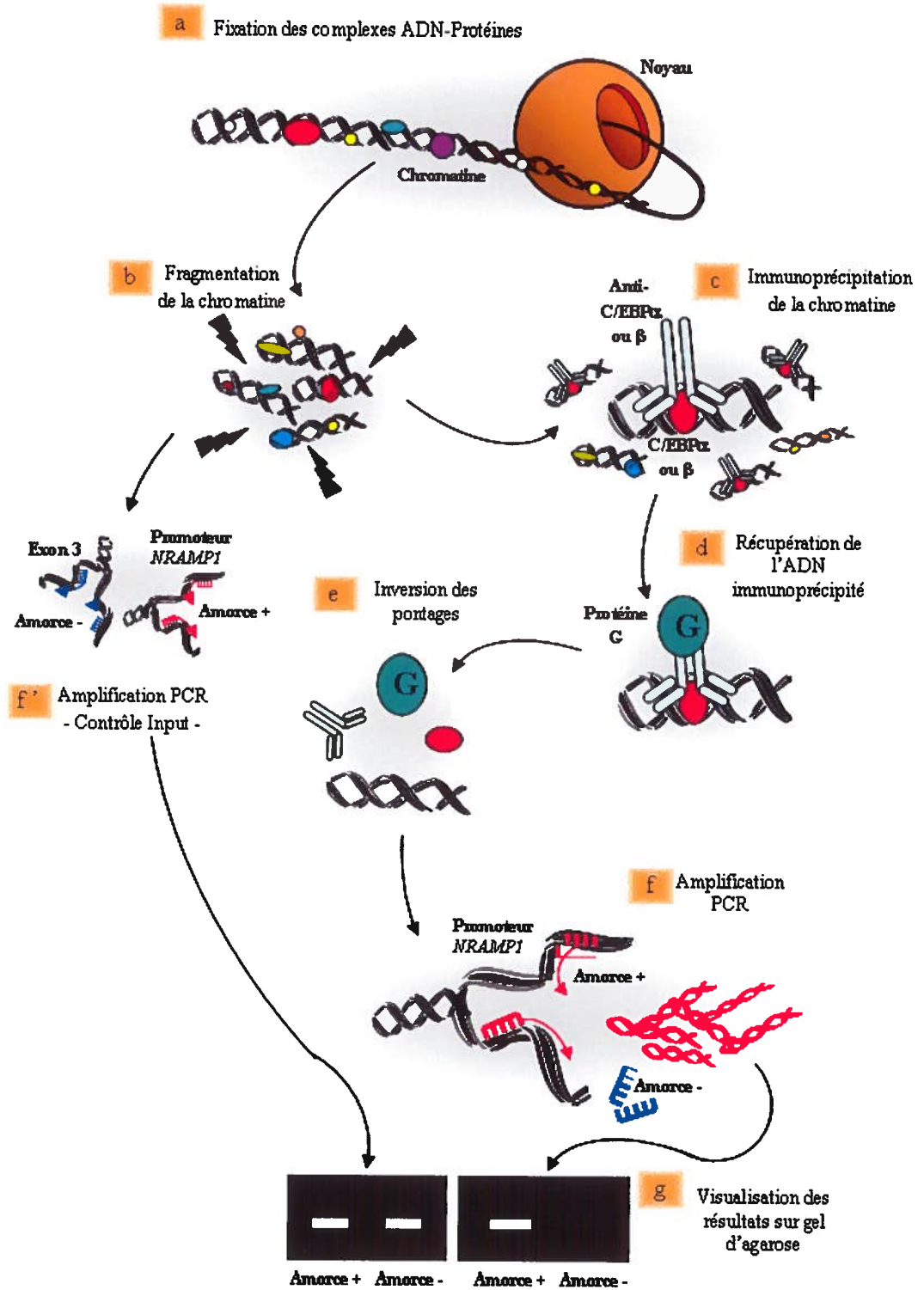


Figure 16. Principe de l'immunoprécipitation de la chromatine.

(Explications dans le paragraphe 2.7)

Tableau 2. Oligonucléotides ou amorces utilisés en retard sur gel ou en PCR.

E14	5' - tga acc gaa tgt tga tgt <u>aag</u> agg cag ggc -3'
E14M1	5' - tga acc gaa <u>cta gct</u> tgt aag agg cag ggc -3'
E14M2	5' - tga acc gaa tgt <u>tga cag tca</u> agg cag ggc -3'
E14M3	5' - tga acc gaa tgt <u>tga</u> tgt <u>aag cta gtc</u> ggc -3'
E14M1A	5' - tga acc gaa <u>cta</u> tga tgt aag agg cag ggc -3'
E14M1B	5' - tga acc gaa cta <u>gct</u> tgt aag agg cag ggc -3'
E14M2A	5' - tga acc gaa cta tga <u>cag</u> aag agg cag ggc -3'
E14M2B	5' - tga acc gaa cta tga tgt <u>tca</u> agg cag ggc -3'
E14M1M	5' - tga acc gaa cta tga tgt aag <u>cta</u> cag ggc -3'
E10	5' - cac agg gca ggc tgg gag ggg aac aaa ggt -3'
E10M0	5' - cac agg gca <u>cta gca</u> gag ggg aac aaa ggt -3'
RVP3	5' - cta gca aaa tag gct gtc cc -3'
LucIR	5' - ctc tcc agc ggt tcc atc ttc -3'
LucIR2	5' - cca cac ctc ccc ctg aac ct -3'

Chapitre 3

Résultats

3.1. Caractérisation *in vitro* de l'attachement des facteurs C/EBP et Sp1 dans la région basale du promoteur *NRAMP1*

3.1.1. Analyse de l'attachement *in vitro* des facteurs C/EBP sur le site E14

Nous savons que le site E14 est fixé *in vitro* par un facteur de transcription et que cette liaison est spécifique puisque le retard sur gel de l'ODNdb E14* est déplacé par compétition avec des ODNdb E14. Parmi les trois ODNdb mutés sur 6 bases, E14M3 est celui qui compétitionne le plus avec la sonde E14* (**Fig. 17B**). Or, contrairement aux mutations E14M1 et E14M2, la mutation E14M3 ne recouvre pas le site prédit de fixation des facteurs C/EBP (Friedman 2002) (**Fig. 17A**).

Par conséquent, afin de déterminer l'identité des facteurs de transcription qui se fixent sur le site E14 et démontrer qu'il s'agit des facteurs C/EBP, une expérience de retard sur gel a été réalisée. La sonde E14* a été mise en compétition avec un excès d'ODNdb non marqués, ou possédant une séquence mutée ou non correspondant au site consensus d'attachement des facteurs C/EBP (**C/EBP, C/EBPmt**). Nous avons ainsi pu vérifier l'affinité du facteur C/EBP potentiel envers le site E14.

De même, les facteurs CDP semblent avoir une influence sur l'activité transcriptionnelle du promoteur *NRAMP1* puisque des co-transfections transitoires avec le facteur CDP p110, qui a perdu son domaine d'inhibition, augmentent la transcription du gène *NRAMP1* (**Fig. 10**). Par conséquent, comme ces facteurs se fixent à l'ADN sur des motifs "5'-CCAAT-3'" (Friedman 2002), compétitionnant ainsi avec d'autres facteurs comme les C/EBP, nous avons aussi testé leur fixation sur le site E14. Pour cela, les sondes E14* ont aussi été mises en compétition avec un excès d'ODNdb non marqués, possédant une séquence mutée ou non correspondant au site d'attachement des facteurs CDP (**CDP, CDPmt**).

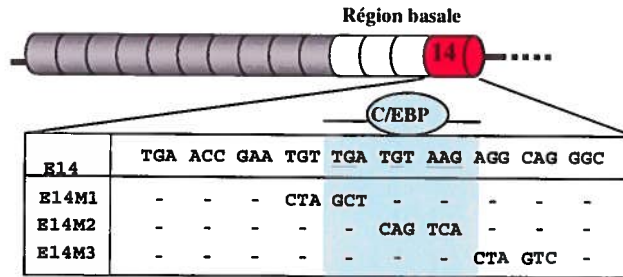
L'expérience montre que les ODNdb C/EBP compétitionnent fortement avec les sondes E14* puisque celles-ci, n'étant plus fixées par les facteurs C/EBP, migrent au bas du gel. Par contre, aucune compétition n'a lieu avec les ODNdb C/EBP mutés puisque l'on observe à nouveau un retard de migration de la sonde E14* sur le gel (**Fig. 17B**).

Par contre, aucune compétition n'est observée entre la sonde E14* et les ODNdb CDPWT ou CDPMT en excès, ce qui signifie que le facteur CDP ne se fixe pas sur le promoteur *NRAMP1* au niveau du site E14 (Fig. 17B).

Le site E14 peut donc être fixé *in vitro* par les facteurs de transcription C/EBP.

Des retards de migration de la sonde E14*, moins importants que celui observé avec les facteurs C/EBP, peuvent être visibles sur le gel. Ces retards de migration pourraient représenter des interactions spécifiques du site E14 avec une ou plusieurs protéines nucléaires, autres que les facteurs C/EBP. Cependant, l'analyse de ces interactions n'a pas été entreprise dans cette étude.

A



Site prédit de fixation des facteurs C/EBP :
(Friedman, 2002)

TTN NGN AAT
G G

B

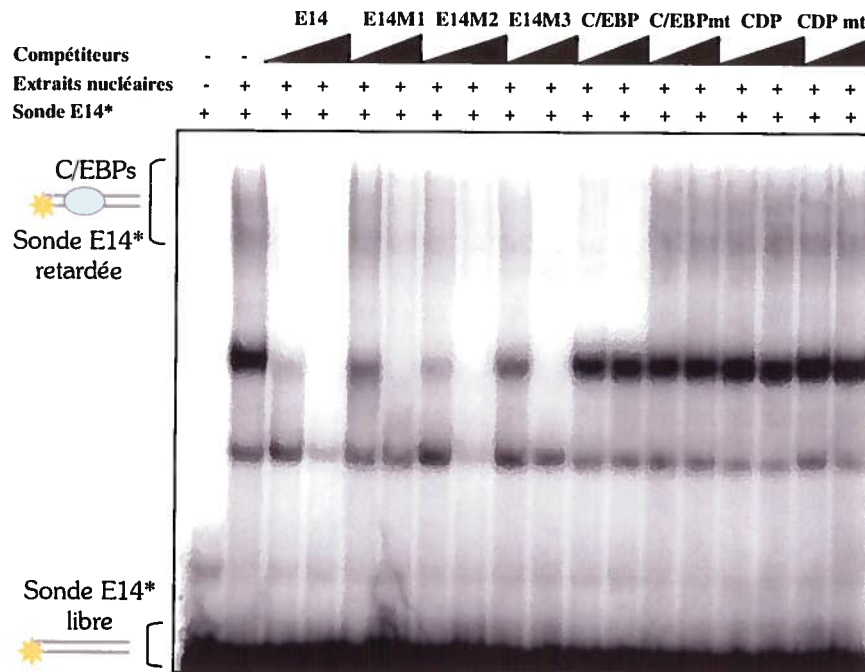


Figure 17. Analyse de l'attachement *in vitro* des facteurs C/EBP sur le site E14.

(A) Mutations de 6 bases sur le site E14 au niveau de la séquence consensus de liaison des facteurs C/EBP (bases surlignées) (B) EMSA utilisant un oligonucléotide double brin, radio marqué, centré sur l'élément cis E14 (E14*) et des extraits nucléaires provenant de cellules HL-60 traitées avec du KH et de l'IFN γ . Un excès d'ODNdb non marqués, de type sauvage (E14) ou muté (E14M1 à 3), ou des oligos appâts de type sauvage ou muté (C/EBP, C/EBP mt, CDP ou CDPmt) sont utilisés en compétition pour caractériser les bandes spécifiques.

3.1.2. Identification des isoformes de la famille C/EBP se fixant *in vitro* sur le site E14

La famille C/EBP comprend plusieurs isoformes (C/EBP α , β (ou NF-IL-6), γ , δ , ϵ et CHOP/GADD153) qui sont exprimés à des stades de différenciation cellulaire différents. Lors de la différenciation des progéniteurs myéloïdes en monocytes/macrophages, ce sont les isoformes C/EBP α et β qui sont le plus exprimés dans la cellule (Valledor, Borrás *et al.* 1998). Les facteurs C/EBP α , β et ϵ ont été testés en co-transfections transitoires avec le promoteur *NRAMP1* dans les cellules non myéloïdes 293T. Les résultats montrent que ces 3 membres de la famille C/EBP peuvent activer le promoteur basal du gène *NRAMP1* (Fig. 10).

Nous avons donc testé l'attachement *in vitro* des deux isoformes C/EBP α et β sur le site E14 par la technique de super retard sur gel. Cette technique permet, par l'ajout d'anticorps spécifiques, de confirmer l'identité des protéines dans le complexe retardé sur gel. Nous avons donc mis la sonde E14* en présence d'extraits nucléaires provenant de cellules HL-60 traitées avec du KH et de l'IFN- γ et en présence d'anticorps anti-C/EBP α et β et en utilisant comme témoin un anticorps anti-IgG de lapin (Fig. 18A).

Premièrement, les résultats nous permettent de confirmer l'hypothèse que les facteurs C/EBP se fixent *in vitro* sur le site E14 puisqu'on observe un super retard sur le gel de la sonde E14* en présence de ces deux anticorps anti-C/EBP. Deuxièmement, on peut remarquer une plus forte intensité de la bande retardée avec l'anticorps anti-C/EBP β qu'avec l'anticorps anti-C/EBP α , indépendamment de la quantité d'anticorps utilisée.

Le gène *NRAMP1* s'exprime aussi dans les granulocytes (Cellier, Govoni *et al.* 1994). Nous avons donc testé l'attachement de ces isoformes sur le site E14 en utilisant des extraits nucléaires provenant de cellules HL-60 traitées avec du DMSO, permettant de différencier ces progéniteurs myéloïdes en granulocytes. On peut observer sur le gel, que le retard de migration le plus important de la sonde E14* est engendré encore une fois par l'anticorps anti-C/EBP β (Fig. 18B).

Le site E14 de la région basale du promoteur *NRAMP1* peut donc être fixé *in vitro* par les facteurs C/EBP β et α .

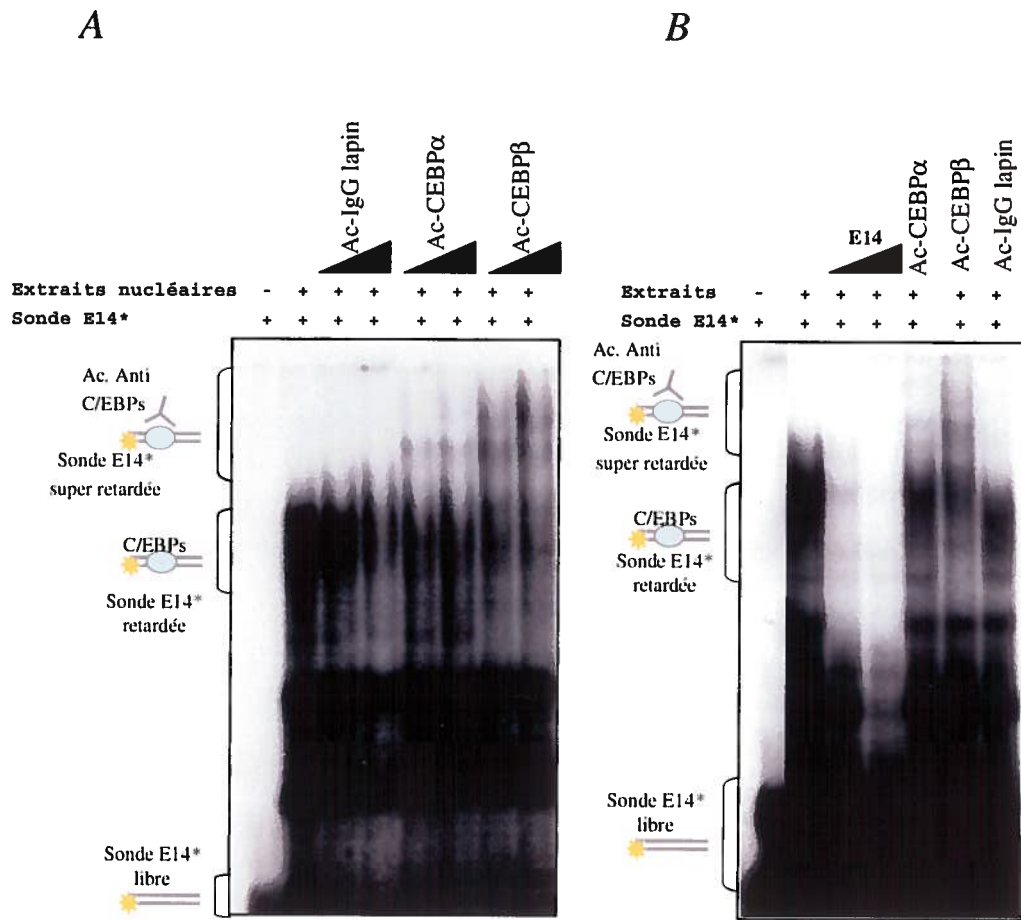


Figure 18. Identification des facteurs se fixant sur le site E14.

Super retard sur gel utilisant un oligonucléotide double brin, radio marqué, centré sur l'élément cis E14 (E14*) et des extraits nucléaires provenant de cellules HL-60 traitées avec du KH et de l'IFN γ (**A**) ou avec du DMSO (**B**) et en présence d'anticorps anti-C/EBP α et β et en utilisant comme contrôle un anticorps anti-IgG de lapin.

3.1.3. Définition du site d'attachement des facteurs C/EBP sur le site E14

Du fait qu'une mutation de 6 bases est peu précise, nous avons créé des ODNdb mutés sur 3 bases au lieu de 6, **E14M1A**, **E14M1B**, **E14M2A**, **E14M2B** et **E14M1M**. Afin d'étudier les points de contacts possibles entre E14 et les facteurs C/EBP, les mutations sur ces ODNdb entourent encore une fois le site consensus d'attachement des facteurs C/EBP mais ciblent plus précisément les bases qui pourraient être nécessaires à cette interaction. Seul l'ODNdb muté E14M1M possède des mutations en dehors de ce site consensus prédit (**Fig. 19A**).

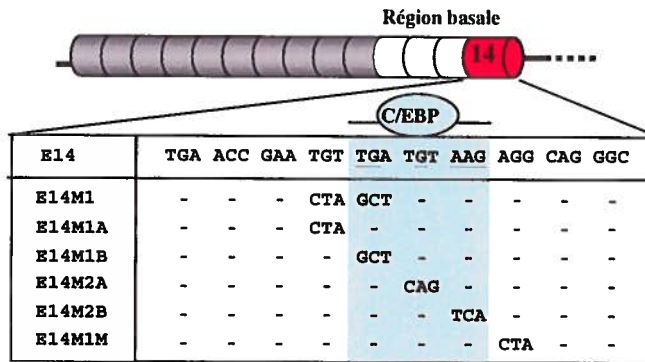
Nous avons mis les sondes E14* en compétition avec ces ODNdb mutés sur 3 bases. On observe sur le gel que les ODNdb mutés qui compétitionnent le moins sont **E14M1B**, **E14M2A** et **E14M2B**, ce qui signifie que les facteurs C/EBP ne pouvant pas se fixer sur ces ODNdb à cause de leurs mutations, se sont fixés sur la sonde E14* (**Fig. 19B**).

Les bases qui semblent donc être nécessaires à l'attachement des facteurs C/EBP sur le site E14 (bases en gras) correspondent parfaitement aux bases prédites pour le site consensus d'attachement de ces facteurs (bases soulignées) (Friedman 2002) :

Site E14 : 5'- TGA ACC GAA TGT **TGA TGT AAG** AGG CAG GGC – 3'.

Des mutations de 2 bases ont aussi été réalisées sur le site E14, cependant, des difficultés liées à la différenciation des cellules HL-60 et à l'obtention de bons extraits nucléaires n'ont pas permis de reproduire une figure de bonne qualité. Tout de même, l'ODNdb qui semblait compétitionner le moins avec la sonde E14* recouvrait encore une fois le site consensus des facteurs C/EBP (Résultats non présentés).

A



Site prédit de fixation des facteurs C/EBP : TTN NGN AAT
(Friedman, 2002) G G

B

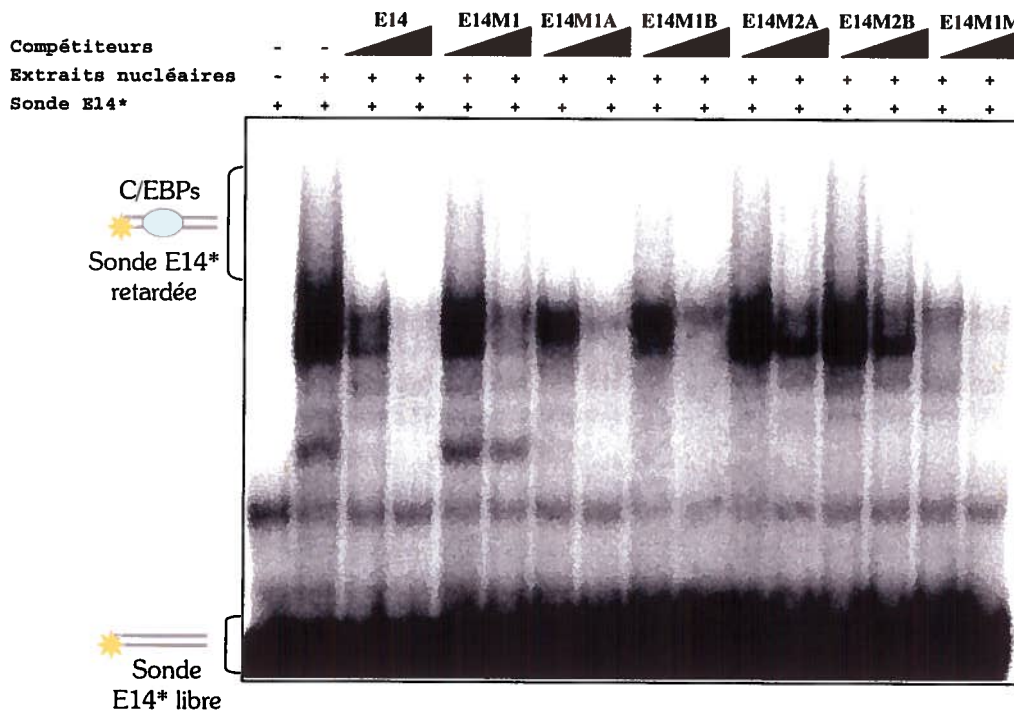


Figure 19. Caractérisation des bases nécessaires à l'attachement des facteurs C/EBP sur le site E14.

(A) Mutations de 3 bases réalisées sur le site E14 du promoteur *NRAMP1* au niveau de la séquence consensus de fixation des facteurs C/EBP (bases surlignées). (B) EMSA utilisant un ODNdb, radio marqué, centré sur l'élément cis E14 (E14*) et des extraits nucléaires provenant de cellules HL-60 traitées avec du KH et de l'IFN γ . Un excès d'ODNdb non marqués, de type sauvage (E14) ou muté (E14M1 et E14M1A à M) a été utilisé en compétition pour délimiter les points de contacts possibles entre l'ADN et les protéines.

3.1.4. Définition du site d'attachement du facteur Sp1 sur le site E10

Dans la région myéloïde du promoteur *NRAMP1*, il a été démontré que le site E10 est fixé *in vitro* par le facteur Sp1. En effet, un excès d'ODNdb possédant un site consensus pour Sp1 est suffisant pour déplacer le facteur lié à E10 et supprimer le retard sur gel. L'interaction du site E10 avec le facteur Sp1 a aussi été confirmée *in vitro* par super retard sur gel puisque que ce complexe est déplacé par un anticorps anti-Sp1 (Richer E., Thèse de doctorat, 2005). Le site E10 est requis pour l'activation de l'expression du gène *NRAMP1* lors de la différenciation myéloïde mais n'est pas nécessaire à l'expression basale de ce gène dans les cellules myéloïdes ou non. En effet, une mutation de 6 bases sur le site E10 du promoteur *NRAMP1* (E10M0) n'a que peu d'effet dans les cellules non myéloïdes 293T alors que des transfectants stables HL-60 portant cette mutation E10M0 montrent une perte de l'activation du promoteur *NRAMP1* lors de leur différenciation myéloïde vers les voies monocytaires induites par la VD ou granulocytaires induites par le DMSO (**Fig. 9A et B**).

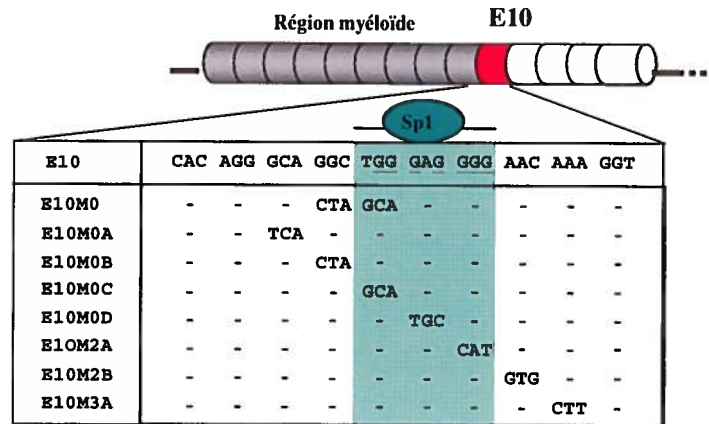
La définition *in vitro* du site d'attachement du facteur Sp1 sur le site E10 était aussi un objectif de mon projet. Par conséquent, afin d'étudier les bases essentielles à l'interaction entre E10 et le facteur Sp1, des mutations recouvrant le site E10M0 et les bases GC adjacentes ont été réalisées, puisque nous savons que le facteur de transcription Sp1 se fixe et agit via ces boîtes GC (Suske 1999). Nous avons donc créé des ODNdb mutés sur 3 bases au lieu de 6, **E10M0A**, **E10M0B**, **E10M0C**, **E10M0D**, **E10M2A**, **E10M2B** et **E10M3A** (**Fig. 20A**).

La liaison spécifique du facteur Sp1 est confirmée par la compétition de la sonde E10* avec l'ODNdb E10 en excès et par l'absence de compétition résultant de la mutation E10M0. Nous avons mis les sondes E10* en compétition avec les ODNdb mutés sur 3 bases. On observe sur le gel que les ODNdb mutés qui compétitionnent le moins sont **E10M0C**, **E10M0D** et **E10M2A**. La liaison du facteur Sp1 sur ces 3 ODNdb a été empêchée par les mutations de 3 bases réalisées sur ceux-ci (**Fig. 20B**).

Les bases qui semblent donc être nécessaires à l'attachement du facteur Sp1 sur le site E10 (bases en gras) recouvrent des éléments riches en GC, ce qui confirme et précise le site d'attachement du facteur Sp1:

Site E10 : 5'- CAC AGG GCA GGC **TGG GAG GGG** AAC AAA GGT - 3'.

A



B

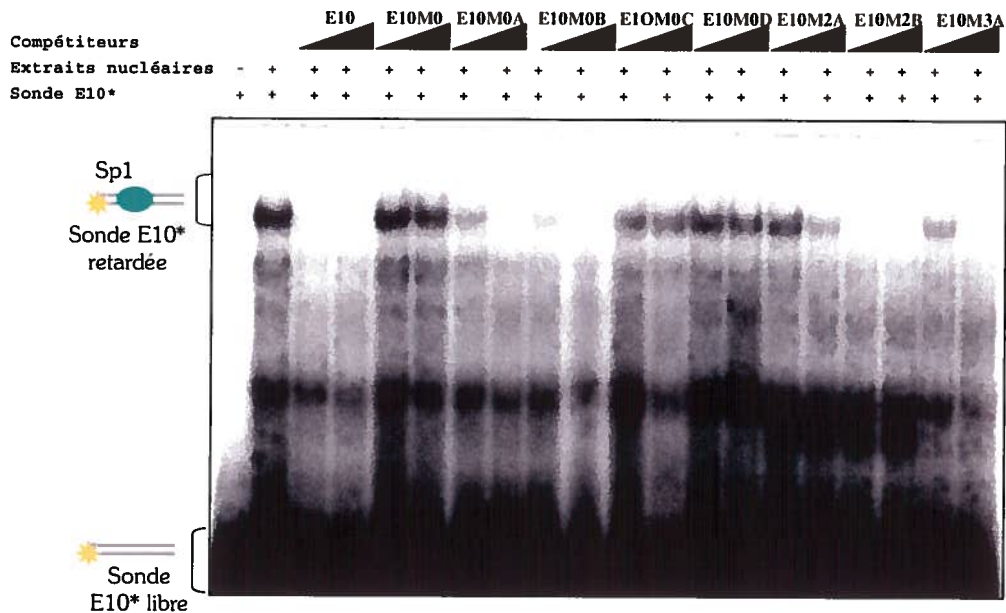


Figure 20. Caractérisation des bases nécessaires à l'attachement des facteurs Sp1 sur le site E10.

(A) Mutations de 3 bases réalisées sur le site E10 du promoteur *NRAMP1* au niveau de la séquence consensus pour les facteurs Sp1 (bases surlignées). (B) EMSA utilisant un ODNdb, radio marqué, centré sur l'élément cis E10 (E10*) et des extraits nucléaires provenant de cellules HL-60 traitées avec du KH et de l'IFN γ . Un excès d'ODNdb non marqué, de type sauvage (E10) ou muté (E10M0 et E10M0A à E10M3) sont utilisés en compétition pour délimiter les points de contacts possibles entre l'ADN et les protéines.

3.2. Rôle du site E14 dans la régulation transcriptionnelle du promoteur *NRAMP1*

Les facteurs C/EBP ont un rôle essentiel dans la régulation de l'expression de gènes myéloïdes (Rosmarin, Yang *et al.* 2005) et nous avons confirmé *in vitro* la fixation des facteurs nucléaires C/EBP α et β dans les cellules HL-60 différenciées sur le site E14 de la région basale du promoteur *NRAMP1*. Par conséquent, il est nécessaire de déterminer si le site E14 est un élément cis-activateur essentiel pour la régulation transcriptionnelle du gène *NRAMP1*.

3.2.1. Effet de la mutation E14M1 dans les cellules non myéloïdes

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de la mutation E14M1 sur la régulation transcriptionnelle du gène *NRAMP1* dans des cellules non myéloïdes, les cellules 293T de rein embryonnaire humain. Bien que le gène *NRAMP1* ne s'exprime que dans les cellules myéloïdes, nous avons tout d'abord analysé cette mutation dans les cellules 293T pour deux raisons.

Premièrement, les cellules HL-60, utilisées comme modèle myéloïde, sont très difficiles à transfecter de façon transitoire ou stable. Deuxièmement, il a été démontré que la région gouvernant la transcription basale du gène *NRAMP1* (de -263 à +1pb) est active indépendamment du type cellulaire testé et de la présence ou non d'inducteurs (Roig, Richer *et al.* 2002). C'est pourquoi, il était plus pratique dans un premier temps d'étudier les impacts de la mutation E14M1 sur l'activité du promoteur *NRAMP1* dans les cellules 293T. Troisièmement, bien que le site E10 soit requis pour l'activation de l'expression du gène *NRAMP1* lors de la différenciation myéloïde, il n'est pas nécessaire à l'expression basale de ce gène dans les cellules myéloïdes ou non (Fig. 9A).

Nous voulions donc déterminer si le site E14 était requis pour l'activité transcriptionnelle basale du gène *NRAMP1*.

A partir des analyses *in vitro* de l'effet des mutations sur le site E14, nous avons observé que parmi les 3 mutations de 6 bases E14M1, E14M2 et E14M3, c'était la mutation E14M1 qui inhibait le moins l'attachement des facteurs C/EBP sur ce site (Fig. 17). Nous avons donc reproduit la mutation E14M1 sur le promoteur *NRAMP1* par mutagenèse dirigée et nous l'avons cloné dans un vecteur d'expression. Des co-transfections transitoires de ces constructions du promoteur *NRAMP1*, de type sauvage (pGL3 NR1L) ou mutées sur le site E14 (pGL3 NR1L E14M1) ont été effectuées dans les cellules 293T avec des plasmides exprimant les facteurs de transcription C/EBP α ou Sp1 ou les deux ensemble.

Alors que la mutation E10M0 n'a pas d'effet significatif sur l'expression du gène *NRAMP1* dans la lignée 293T, hormis dans les cellules co-transfectées avec le facteur Sp1, la mutation E14M1, par contre, a démontré un impact majeur sur l'activité transcriptionnelle basale du gène. En effet, la mutation E14M1 abolit complètement l'expression du gène *NRAMP1*, même lorsque le vecteur pGL3 NR1L E14M1 est co-transfecté avec les facteurs Sp1 et C/EBP α , qui pourtant, activent fortement la transcription du gène *NRAMP1* de type sauvage (Fig. 21).

Les résultats nous indiquent donc, d'une part, que le site E14 dans la région proximale du gène *NRAMP1* est essentiel à l'expression basale de ce gène dans les cellules non myéloïdes. D'autre part, que l'effet majeur de la mutation E14M1 sur l'expression du gène *NRAMP1* pourrait être dû au fait que cette mutation empêche la fixation des facteurs C/EBP sur le site E14.

Le site E14 est donc indispensable à l'expression du promoteur *NRAMP1* dans les cellules non myéloïdes transfectées transitoirement. Nous avons donc vérifié ensuite si la mutation E14M1 avait un effet aussi majeur dans les cellules myéloïdes HL-60, où le gène *NRAMP1* est spécifiquement exprimé.

A

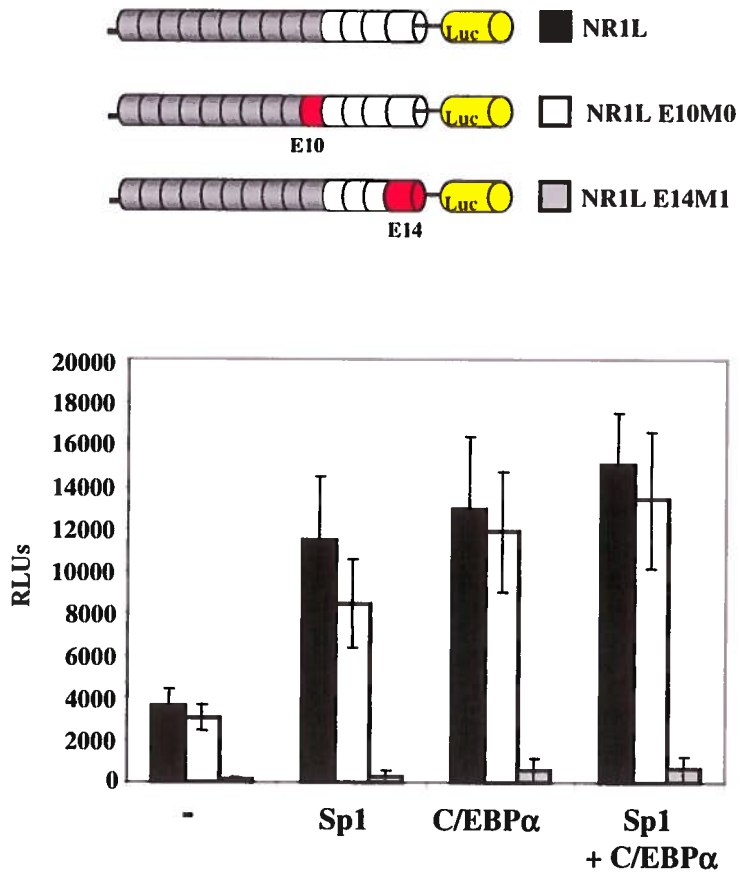


Figure 21. Effet de la mutation E14M1 sur la réulation transcriptionnelle du promoteur *NRAMP1* dans les cellules non myéloïdes 293T.

Co-transfections transitoires de cellules 293T avec 3 constructions du promoteur (type sauvage-NR1L, muté-NR1L E10M0 (muté sur le site E10), ou muté-NR1L E14M1 (muté sur le site E14) et des plasmides exprimant les facteurs de transcription Sp1 et C/EBP α .

3.2.2. Effet de la mutation E14M1 dans les cellules myéloïdes

Il est important de confirmer le rôle crucial du site E14 dans un contexte myéloïde étant donné que le gène *NRAMP1* se trouve spécifiquement régulé dans ce type de cellule (Cellier, Govoni *et al.* 1994). Pour cela, nous avons réalisé des transfections stables du promoteur *NRAMP1* muté sur le site E14 dans les cellules myéloïdes HL-60.

Parmi les clones stables mutés obtenus, nous en avons choisi 4, **SrL E14M1-1 à 4**. Pour déterminer l'impact de la mutation E14M1 sur l'expression du gène *NRAMP1* dans les cellules myéloïdes, l'induction de la luciférase avec 4 clones a été déterminée.

L'activité transcriptionnelle basale du promoteur *NRAMP1* dans les cellules myéloïdes a été déterminée grâce au clone HSRL-5 provenant de la transfection stable des cellules HL-60 avec le plasmide SrL (vecteur qui contient le promoteur *NRAMP1* de type sauvage) (Roig, Richer *et al.* 2002).

Alors que le clone HSRL-5 génère une activité basale du gène *NRAMP1* dans les cellules HL-60, aucune expression de ce gène n'a été détectée dans les 4 clones mutés sélectionnés (**SrL E14M1-1 à 4**) (**Fig. 22A**).

La présence du promoteur *NRAMP1* a été vérifiée par analyse de l'ADN génomique de ces clones par amplification PCR d'un fragment de 817 pb avec les amorces Rvp3 et LucIR (**Fig. 22B 2**). L'amplification de ce fragment a été observée dans les deux clones E14M1-2 et E14M1-4, comme pour la PCR contrôle sur le plasmide SrL qui contient le promoteur de type sauvage.

De même, la présence du gène complet de la luciférase a été vérifiée par amplification PCR d'un fragment de 1815 pb avec les amorces LucIR et LucIR2, comme observé avec la PCR contrôle du plasmide SrL (**Fig. 22B 1**). Le gène de la luciférase a été amplifié dans les deux clones.

L'intégration de la construction comprenant le promoteur *NRAMP1* couplé à la luciférase dans les cellules HL-60 a donc été réussie pour les clones E14M1-2 et E14M1-4. L'absence d'activité de la luciférase dans ces deux clones est par conséquent directement liée à la mutation sur le site E14. Cependant, les cellules HL-60 sont des cellules myéloïdes immatures et le gène *NRAMP1* s'exprime dans ces cellules que lorsque celles-ci entament leur différenciation myéloïde en monocytes/macrophages ou en granulocytes. Jusqu'à présent les expériences réalisées ont démontré un effet de la mutation E14M1 sur l'activité transcriptionnelle basale du gène *NRAMP1*. Il convient maintenant de déterminer l'importance du site E14 lors de l'activation transcriptionnelle du gène *NRAMP1* au cours de la différenciation myéloïde, stade où le gène s'exprime fortement.

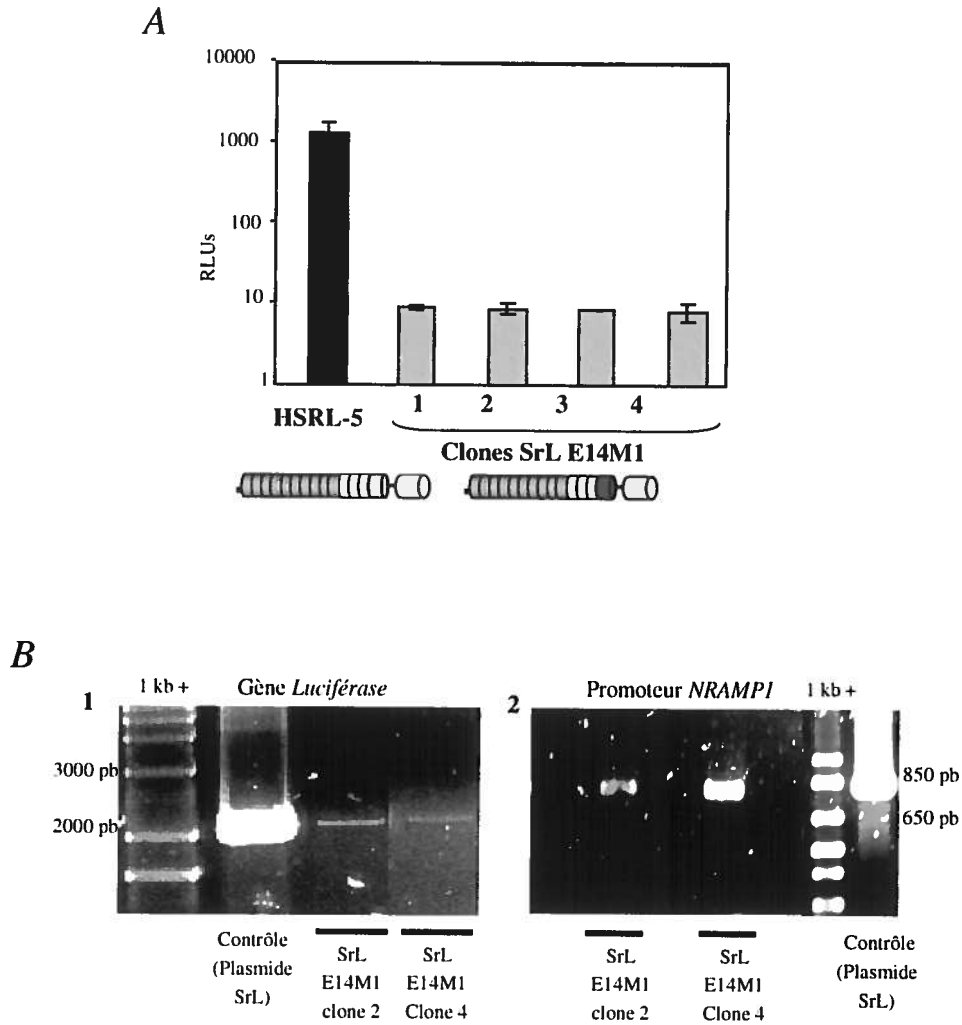


Figure 22. Effet de la mutation E14M1 sur l'expression du gène *NRAMP1* dans les cellules myéloïdes HL-60.

(A) Des clones HL-60 obtenus par transfection stable avec les constructions du promoteur de type sauvage (HSRL-5) ou muté sur le site E14 (E14M1 clones 1 à 4) ont été utilisés pour mesurer l'activité du promoteur (en RLUs) dans des cellules myéloïdes non traitées. (B) Analyse par électrophorèse de la PCR réalisée pour vérifier la présence, (1) du gène complet de la luciférase et (2) du promoteur *NRAMP1* muté, dans les clones stables E14M1-2 et 4.

3.2.3. Effet de la mutation E14M1 au cours de la différenciation myéloïde des cellules HL-60

Afin de confirmer les conséquences de la mutation E14M1 sur l'expression du gène *NRAMP1* au cours de la différenciation myéloïde des cellules HL-60, nous avons induit une différenciation myéloïde des clones stables mutés obtenus en les traitant pendant 4 jours avec du KH, un analogue de la VD, ou du DMSO. Seul les deux clones E14M1-2 et E14M1-4 ont été testés en différenciation puisque la présence du promoteur *NRAMP1* couplé à la luciférase a été vérifiée dans ces clones et qu'ils doivent correspondre à des points d'intégration différents dans le génome.

La différenciation du clone stable HSRL-5, qui contient le promoteur de type sauvage, nous a permis de reproduire l'effet majeur des deux agents différenciateurs sur l'expression du gène *NRAMP1* (Roig, Richer *et al.* 2002). En effet, alors que ce gène montre une activité transcriptionnelle basale dans le clone HSRL-5 non traité, cette activité est par contre très fortement augmentée après différenciation de ce clone en monocytes/macrophages avec le KH (activité multipliée par 10) et en granulocyte avec le DMSO (activité multipliée par 100) (**Fig. 23**).

Cette forte induction de l'expression du gène *NRAMP1* remarquée avec le clone stable HSRL-5 lors de sa différenciation myéloïde, n'est cependant pas observée avec les clones stables mutés E14M1-2 et E14M1-4 qui ont pourtant été différenciés avec les même composés.

La mutation E14M1 entraîne donc des conséquences majeures sur l'expression du promoteur *NRAMP1* dans tous les types cellulaires testés (non myéloïdes, myéloïdes). Ces conséquences sont également observables au cours de la différenciation des cellules myéloïdes. Le site E14 dans la région proximale du promoteur *NRAMP1* est par conséquent un élément essentiel permettant l'induction de ce promoteur et une activité basale est nécessaire pour l'expression myéloïde de ce gène.

Nous avons donc démontré, *in vitro*, la fixation des facteurs C/EBP α et β sur le site E14 du promoteur *NRAMP1* et, *in vivo*, le rôle de ces facteurs dans l'activation transcriptionnelle de ce gène, de même que l'importance du site E14 dans cette activation basale. Cependant, ces résultats ont été obtenus à la suite de transfections transitoires ou stables, en utilisant des cellules qui ont été modifiées volontairement. Il est donc essentiel de confirmer ces résultats dans un contexte cellulaire normal, c'est-à-dire de démontrer que les facteurs C/EBP α et β se fixent bien sur le promoteur *NRAMP1* endogène.

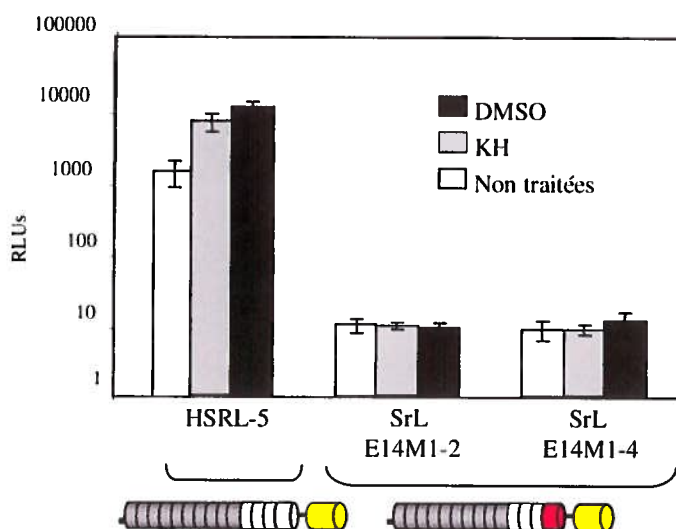


Figure 23. Effet de la mutation E14M1 sur l'expression du gène *NRAMP1* au cours de la différenciation myéloïde des cellules HL-60.

Des clones HL-60 obtenus par transfection stable avec les constructions du promoteur de type sauvage (HSRL-5) ou muté sur le site E14 (E14M1-2 et E14M1-4) ont été utilisés pour mesurer l'activité du promoteur (en RLUs) dans des cellules myéloïdes HL-60 traitées pendant 4 jours avec du KH ou du DMSO.

3.3. Caractérisation *in vivo* de l'attachement des facteurs C/EBP α et β sur le promoteur *NRAMP1* endogène dans les cellules myéloïdes

Les facteurs C/EBP α et β semblent avoir un rôle activateur dans la régulation transcriptionnelle du gène *NRAMP1* en se fixant, *in vitro*, sur le site E14. L'attachement de ces deux facteurs sur le promoteur *NRAMP1* doit maintenant être confirmée *in vivo* dans les cellules myéloïdes puisque le gène *NRAMP1* s'exprime uniquement dans ce type de cellule (Cellier, Govoni *et al.* 1994). La technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) peut nous confirmer les résultats observés *in vitro*. Cette technique fournit une idée précise de l'activité d'attachement d'une protéine sur l'ADN à un stade déterminé de la différenciation cellulaire. Elle permet ainsi de mieux comprendre le rôle d'un facteur donné dans la régulation transcriptionnelle d'un gène.

Pour vérifier que les facteurs de transcription C/EBP α et β se fixent sur le promoteur *NRAMP1* endogène et déterminer à quel moment de la différenciation myéloïde cette interaction a lieu, nous avons réalisé des ChIP dans les cellules HL-60.

Pour déterminer la cinétique de fixation des facteurs C/EBP α et β sur le promoteur *NRAMP1* au cours de la différenciation myéloïde, des ChIP sur les cellules HL-60 ont été réalisés à des temps précis de la différenciation : au début (cellule non différenciées « ND »), à 24h et à 48h. Pour cela, nous avons traité ou non les cellules HL-60 avec du EB 1089, un analogue de la VD, pendant 24h et 48h. Des ChIP dans les premiers jours de la différenciation ont été effectués de façon à déterminer si les facteurs C/EBP interviennent dans les étapes précoces de la régulation du gène *NRAMP1*, l'ARNm du gène *NRAMP1* étant détecté après 24h de différenciation par le EB 1089 (Roig, Richer *et al.* 2002).

Les résultats obtenus nous permettent, tout d'abord, de confirmer que le promoteur proximal *NRAMP1* endogène peut fixer les facteurs C/EBP α et β .

Dans les cellules HL-60 non différenciées (ND), le promoteur *NRAMP1* semble être fixé par les facteurs C/EBP α mais pas ou très faiblement par l'isoforme C/EBP β (Fig. 24A).

Par contre l'induction de la différenciation myéloïde par le EB 1089, modifie l'attachement de ces facteurs sur le promoteur *NRAMP1*. En effet, le facteur C/EBP α ne se fixe plus après 24h de différenciation alors que le facteur C/EBP β commence à s'attacher au promoteur et l'intensité de cette liaison augmente très fortement au cours de la maturation des cellules HL-60 en monocytes/macrophages.

Pour vérifier que l'attachement des facteurs C/EBP a bien lieu sur le promoteur *NRAMP1* et non sur un promoteur à proximité du gène *NRAMP1*, nous avons réalisé une amplification PCR de l'exon 3 du gène *NRAMP1* qui se trouve à 1839 pb de l'ATG du promoteur. La PCR a été réalisée avec des amorces spécifiques (amorces -) qui amplifient un fragment de 216 pb dans cet exon. Aucune amplification de l'ADN immunoprécipité par les anticorps anti-C/EBP dans les 3 conditions n'a été observée avec les amorces - (**Fig. 24A**). Cette absence d'amplification signifie donc que la liaison des C/EBP a bien lieu sur le promoteur *NRAMP1* et non sur un autre promoteur à proximité.

Nous avons aussi vérifié la taille des fragments d'ADN obtenus avant et après sonication (**Fig. 24B 1 et 2**). Nous avons confirmé que la taille des fragments d'ADN qui ont été immunoprécipités par les anticorps anti-C/EBP, se situait entre 100 et 500 pb. Les résultats positifs observés signifient donc que l'interaction des facteurs C/EBP a bien lieu sur le promoteur *NRAMP1*.

Pour vérifier que la dynamique de fixation des facteurs C/EBP sur le promoteur *NRAMP1* a bien lieu au cours de la différenciation myéloïde des cellules HL-60, nous avons examiné l'expression du récepteur CD14, marqueur de la différenciation myéloïde des cellules HL-60 (Li, Wang *et al.* 2002). On peut observer que ce marqueur, qui n'est pas exprimé dans les cellules HL-60 non différenciées, est présent après 48h de traitement avec le EB 1089 (**Fig. 24C**). Le traitement des cellules HL-60 avec l'agent différenciateur EB 1089 a donc permis à ces cellules d'entamer leur maturation en monocytes/macrophages. Plusieurs contrôles négatifs ont été utilisés pour déceler tout signal non spécifique dans ces échantillons de cytométrie (témoin isotypique, contrôle cellules seules ou FITC seul) (**Fig. 24C**).

Nous pouvons de cette façon confirmer que l'interaction des facteurs C/EBP avec le promoteur *NRAMP1* a bien lieu au cours de la différenciation myéloïde.

Le promoteur *NRAMP1* endogène est donc régulé par certains isoformes de la famille des C/EBP au cours de la différenciation myéloïde. L'interaction de ces facteurs avec le promoteur paraît spécifique d'un stade de maturation donné des cellules HL-60. En effet, la liaison des facteurs C/EBP α sur le promoteur *NRAMP1* ne semble avoir lieu que dans les cellules immatures alors que l'interaction avec les C/EBP β ne commence et ne persiste que lors de la différenciation myéloïde des cellules HL-60.

La manière dont le changement de fixation du facteur C/EBP α par l'isoforme C/EBP β sur le promoteur *NRAMP1* gouvernerait l'induction transcriptionnelle de celui-ci reste pour l'instant inconnue. La collaboration des C/EBP avec d'autres facteurs, comme Sp1, pourrait en être la cause.

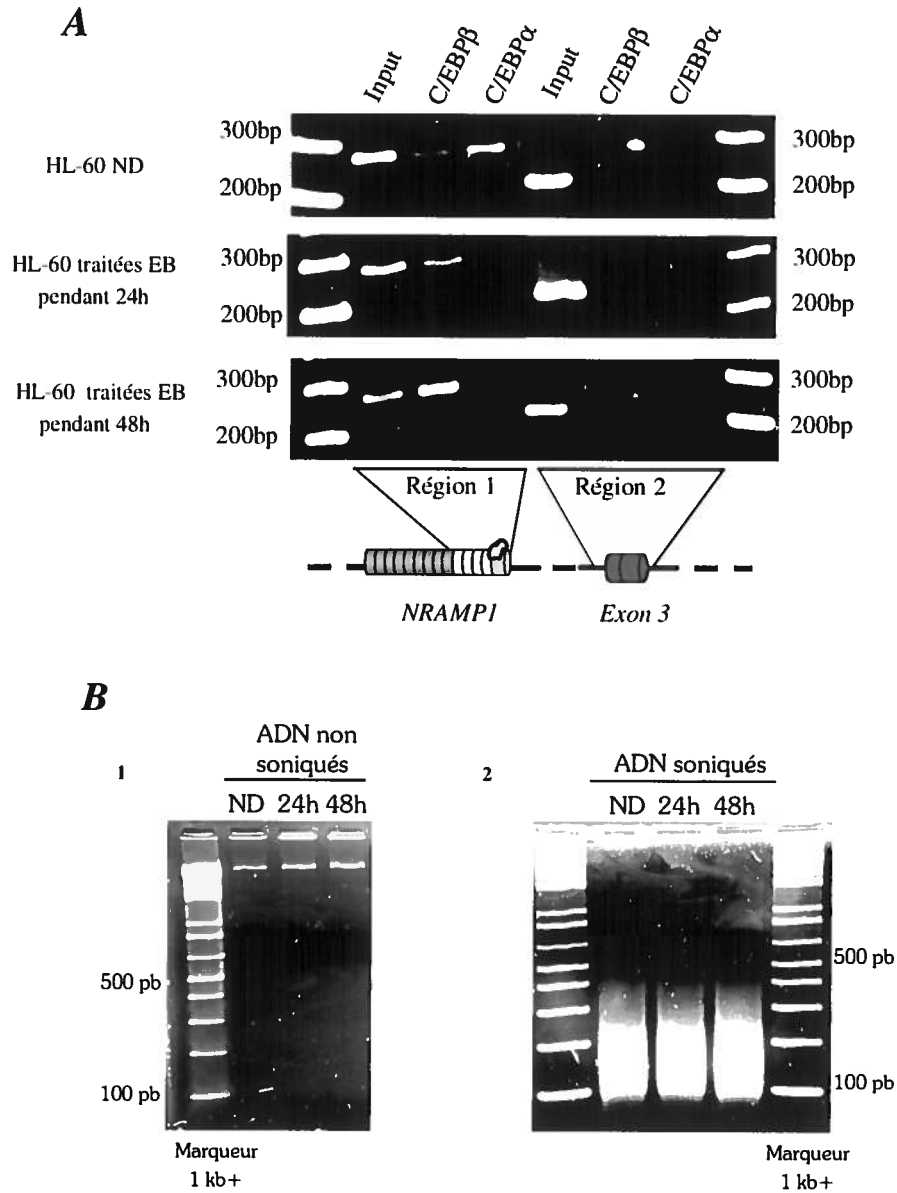
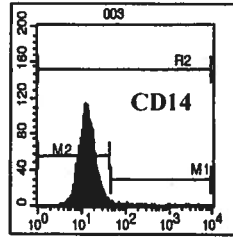


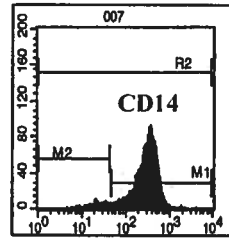
Figure 24. Caractérisation de l'attachement des facteurs C/EBP α et β sur le promoteur *NRAMP1* endogène au cours de la différenciation myéloïde des cellules HL-60.

(A) Immunoprécipitation de la chromatine du promoteur *NRAMP1* dans les cellules HL-60 différenciées ou non (ND) avec du EB 1089 pendant 24h ou 48h, avec les anticorps anti-C/EBP β et α . La région 1 qui comprend la région basale du promoteur *NRAMP1* a été amplifiée grâce aux amorces + et la région 2 qui comprend l'exon 3 a été amplifiée par les amorces -. (B) Analyse par migration sur gel de l'ADN non soniqué (1) ou soniqué (2) pour chaque condition de différenciation. (C) Expression du marqueur de différenciation CD14 dans les cellules HL-60 traitées ou non avec du EB pendant 48h.

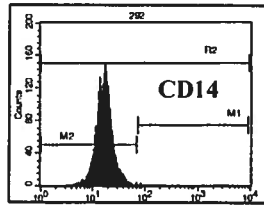
C



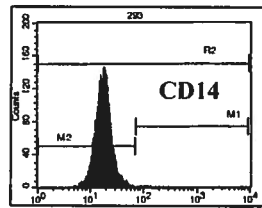
HL-60
non traitées



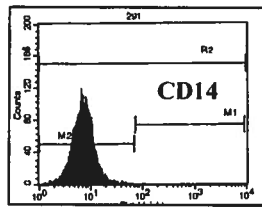
HL-60
traitées EB (48h)



Contrôle
FITC



Contrôle
Isotype



Contrôle HL-60
seules

Chapitre 4

Discussion

Le gène *NRAMP1* humain est exprimé seulement dans les phagocytes matures. Sa protéine est localisée dans la membrane de vacuoles cytoplasmiques de phagocytes au repos et suite à une phagocytose la protéine est recrutée au phagosome naissant. La protéine *NRAMP1* contribue à la résistance de l'hôte contre les pathogènes intracellulaires (Govoni et Gros 1998). Cependant, des polymorphismes des régions en 5' et 3' du gène pourraient prédisposer à une sensibilité pour des maladies dans certaines régions endémiques (Blackwell, Barton *et al.* 1995; Soborg, Andersen *et al.* 2002).

Le gène *NRAMP1* ne s'exprime que lors de la différenciation terminale de progéniteurs myéloïdes en macrophages ou granulocytes chez l'homme comme chez la souris (Cellier, Shustik *et al.* 1997). Comme le contrôle de l'expression des gènes ayant une spécificité d'expression restreinte se fait en partie au niveau de la transcription, il est essentiel de déterminer les éléments cis-régulateurs et les facteurs trans impliqués dans la régulation du gène *NRAMP1* durant la myélopoïèse. L'identification des mécanismes moléculaires responsables de l'expression spécifique de ce gène permettra ainsi de mieux comprendre son rôle dans la réponse immunitaire.

Au laboratoire la lignée HL-60 est utilisée comme modèle cellulaire myéloïde pour l'étude du gène *NRAMP1*. Il a été démontré que lors de la différenciation de cette lignée soit en monocytes/macrophages induite par la VD, soit en PMN induite par le DMSO, l'expression de la protéine *NRAMP1* corrèle avec l'activation du promoteur (Canonne-Hergaux, Calafat *et al.* 2002; Roig, Richer *et al.* 2002).

Sur le promoteur *NRAMP1*, une région de 263 pb en amont de l'ATG permet une activité basale du gène et l'addition de 325 pb en amont de cette région est nécessaire et suffisante pour conférer une activité transcriptionnelle spécifiquement myéloïde. Le promoteur *NRAMP1* est donc divisé en deux régions, désignée « basale » et « myéloïde » (Roig, Richer *et al.* 2002). 14 régions liant potentiellement des protéines ont été identifiées sur le promoteur et nommées de E1 à E14 (Thèse E. Richer, 2005).

Des études précédentes ont permis la caractérisation d'éléments cis-activateurs dans la région myéloïde du promoteur *NRAMP1*. Le site E10, fixé par le facteur Sp1 est requis pour activer l'expression du gène *NRAMP1* lors de la différenciation

myéloïde mais n'est pas essentiel à l'expression basale du promoteur *NRAMP1* dans les cellules non myéloïdes (**Fig. 9**) (Richer E., Thèse de doctorat, 2005).

Les résultats présentés dans cette étude portent principalement sur l'analyse d'un élément cis-activateur dans la région basale du promoteur *NRAMP1*, le site E14.

• **Les facteurs C/EBP α et β se fixent *in vitro* sur le site E14 dans la région basale du promoteur *NRAMP1***

Dans la recherche de facteurs de transcription pouvant contribuer à l'activité basale du promoteur *NRAMP1*, la participation des facteurs C/EBP a été testée.

Des co-transfections transitoires dans les cellules non myéloïdes 293T ont démontré une régulation possible de la région basale du promoteur *NRAMP1* par les facteurs C/EBP et CDP (**Fig. 10**). L'analyse de la région basale du promoteur *NRAMP1* avec des logiciels de prédiction de liaison de facteurs de transcription a permis d'émettre l'existence potentielle de plusieurs sites de fixation pour les facteurs C/EBP, dont le site E14 qui recouvre le site d'initiation de la transcription (+1) (**Fig. 11**). Des études, *in vitro*, de retard sur gel ont démontré qu'une sonde, radio marquée, centrée sur l'élément E14 est retardée spécifiquement par un complexe protéique de haut poids moléculaire lorsqu'elle est mise en présence d'extraits nucléaires provenant de cellules HL-60 différenciées par la VD. Des mutations de 6 bases recouvrant le site prédit d'attachement des facteurs C/EBP (Friedman 2002) ont été réalisées pour déterminer s'il pourrait s'agir des facteurs qui se fixent spécifiquement sur le site E14 (**Fig. 17A**). Seul l'ODNdb E14M3 compétitionne avec la sonde E14* (**Fig. 17B**). Or, contrairement aux mutations E14M1 et E14M2, la mutation E14M3 ne recouvre pas le site prédit de fixation des facteurs C/EBP.

Les facteurs C/EBP ont un rôle proéminent dans le développement des cellules myéloïdes. Ils sont impliqués dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes myéloïdes comme CD14, marqueur de la différenciation monocyte/macrophage ou encore dans la régulation des récepteurs aux G-CSF, M-CSF et GM-CSF qui sont critiques pour le développement myéloïde (Hohaus, Petrovick *et al.* 1995; Smith, Hohaus *et al.* 1996; Zhang, Hetherington *et al.* 1996; Pan, Hetherington *et al.* 1999).

Le facteur de transcription CDP est aussi un facteur essentiel à la différenciation myéloïde puisqu'il est un des éléments régulateurs majeurs d'un facteur de la famille des C/EBP (Khanna-Gupta, Zibello *et al.* 2001). Ce facteur se fixe à l'ADN sur des motifs "5'-CCAAT-3'" en compétitionnant avec d'autres facteurs activateurs qui possèdent le même site de fixation sur l'ADN comme les C/EBP (Friedman 2002).

Afin de déterminer si le retard sur gel de la sonde E14* correspond à une activité de liaison de facteurs de la famille CEBP, nous avons mis en compétition la sonde E14* avec des ODNdb en excès possédant un site consensus pour les facteurs C/EBP. Les résultats suggèrent que le site E14 est probablement lié par des facteurs du type C/EBP *in vitro* puisqu'un excès de ces ODNdb est suffisant pour déplacer le facteur lié à E14* et abroger le retard sur gel (Fig. 17B). De même, l'absence de compétition de la sonde E14* résultant de la mutation de ces ODNdb en excès au niveau du site consensus des facteurs C/EBP (C/EBPmt) confirme la spécificité de liaison de ces facteurs sur le site E14.

Des co-transfections transitoires dans les cellules 293T avaient mis en évidence une activation du promoteur *NRAMP1* avec le facteur CDP/Cux p110, qui a perdu son domaine d'inhibition (Truscott, Raynal *et al.* 2004), démontrant la capacité de ce facteur de se lier et de réguler le promoteur. C'est pourquoi, nous avons aussi testé l'attachement *in vitro* du facteur CDP sur le site E14. Cependant, aucune compétition n'a été observée en présence d'un excès d'ODNdb possédant un site consensus pour les facteurs CDP signifiant que le site E14 n'est pas le site de la région basale du promoteur qui est fixé par ce facteur.

La famille des facteurs C/EBP comprend plusieurs isoformes qui reconnaissent un site consensus, 5'-T(T/G)NNGNAA(T/G)-3', dans les régions régulatrices de promoteurs cibles (Friedman 2002). Les membres de la famille C/EBP sont exprimés à des stades précis de l'hématopoïèse et possèdent chacun des activités de transactivation différentes. Lors de la différenciation des progéniteurs myéloïdes en monocytes/macrophages, ce sont les isoformes C/EBP α et β qui sont le plus majoritairement exprimés dans la cellule (Valledor, Borrás *et al.* 1998).

C'est pourquoi, nous avons testé la fixation de ces deux isoformes de la famille C/EBP sur le site E14 par une expérience de super retard sur gel utilisant les anticorps anti-C/EBP α et β . Le complexe protéique a été fortement retardé par un anticorps anti-C/EBP β et plus faiblement par un anti-C/EBP α , suggérant que les facteurs C/EBP β et α sont impliqués dans la régulation de l'expression du gène *NRAMP1* lors de la maturation des cellules HL-60 en monocytes/macrophages (**Fig. 18A**). Ces résultats peuvent nous indiquer qu'à ce stade de la différenciation des cellules HL-60 en monocyte/macrophage, le facteur C/EBP β peut être en plus grande abondance par rapport au facteur C/EBP α dans les extraits nucléaires, ce qui explique que le site E14 est fixé en majorité par les facteur C/EBP β . Une plus forte abondance des facteurs C/EBP β dans les extraits nucléaires provenant de cellules HL-60 différenciées par le DMSO pourrait aussi expliquer le super retard sur gel de la sonde E14* observé avec l'anticorps anti-C/EBP β dans les granulocytes (**Fig. 18B**).

Pour cibler plus précisément les bases nécessaires à l'interaction des facteurs C/EBP sur le site E14, des mutations plus restreintes de 3 bases puis de 2 bases ont été réalisées sur le site E14 (**Fig. 19A**). Les bases mutées ont été choisies de façon à recouvrir le site consensus de fixation des facteurs C/EBP (Friedman 2002). L'analyse, *in vitro*, de ces constructions mutées a permis de démontrer que les bases qui semblent être impliquées dans l'attachement des facteurs C/EBP sur le site E14 correspondent parfaitement aux bases prédites pour le site d'attachement de ces facteurs sur le promoteur *NRAMP1* (**Fig. 19B**).

La définition du site de fixation du facteur Sp1 sur le site E10 de la région myéloïde par des mutations plus restreintes a aussi permis d'identifier plus précisément les bases nécessaires à cette interaction (**Fig. 20A**). Le facteur Sp1 se fixe sur les promoteurs au niveau de boîte GC (Suske 1999). Or, le site E10 fixant Sp1 (Richer E., Thèse de doctorat, 2005) est riche en cytosine et les bases mutées qui abolissent la liaison de Sp1 au site E10 sont au cœur de cet élément riche en GC (**Fig. 20B**).

La mutation progressive de ces bases impliquées dans l'attachement des facteurs C/EBP sur le site E14 pourra à terme permettre la définition précise des bases essentielles à cette interaction. L'effet délétère sur l'activation transcriptionnelle du

promoteur *NRAMP1*, d'une mutation ponctuelle sur le site de fixation des facteurs C/EBP, pourra être vérifié ensuite par des transfections stables dans les cellules myéloïdes.

• *Les facteurs C/EBP α et β se fixent in vivo dans la région basale du promoteur NRAMP1 au cours de la différenciation myéloïde des cellules HL-60*

Une immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) avec des anticorps anti-C/EBP α et β a permis de démontrer l'attachement différentiel des facteurs C/EBP α et β sur le promoteur endogène *NRAMP1* à différents stades de la différenciation myéloïde des cellules HL-60 en monocyte/macrophage par la VD. Dans les progéniteurs myéloïdes immatures, l'expression des facteurs C/EBP α est élevée mais diminue au cours de la granulopoïèse (Yamanaka, Lekstrom-Himes *et al.* 1998). Le facteur C/EBP β est préférentiellement exprimé au cours de la maturation des progéniteurs myéloïdes en macrophage (Natsuka, Akira *et al.* 1992) et l'expression de ce facteur est essentielle à la différenciation de la lignée cellulaire HL-60 induite par la VD (Ji et Studzinski 2004).

Nous avons démontré que dans les cellules HL-60 immatures, le promoteur *NRAMP1* est fixé par le facteur C/EBP α . Par contre, lorsque les cellules HL-60 entament leur maturation en monocyte/macrophage, le promoteur *NRAMP1* n'est plus fixé par le facteur C/EBP α mais par le facteur C/EBP β . La fixation du facteur C/EBP β , visible après 24h de différenciation des cellules HL-60 par la VD, est fortement augmentée après 48h de différenciation (**Fig. 24A**).

La localisation approximative du site de fixation des facteurs C/EBP sur le promoteur *NRAMP1*, basée sur la taille de l'ADN soniqué (**Fig. 24B2**) et l'absence d'amplification de l'exon 3 qui se situe à 1.8 kb de l'ATG de *NRAMP1* (**Fig. 24A**), est compatible avec la position du site E14.

Une immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps anti-IgG a aussi été réalisée sur les cellules HL-60 ND ou traitées pendant 24h ou 48h avec de la VD, pour démontrer la spécificité de reconnaissance des anticorps anti-C/EBP utilisés. Les résultats de ce CHIP n'ont cependant pas été présentés à cause d'une contamination potentielle des échantillons témoins « IgG » dans les conditions « ND » et « 48h ». Un problème de différenciation des cellules HL-60 n'a pas permis par la suite de reproduire ce résultat avec le contrôle IgG. Des CHIP antérieurs avec ce contrôle IgG ont été réalisés et n'ont démontré aucune amplification avec les amorces + (Annexe 1). Cependant, aucune expérience avec l'ensemble des résultats n'a pu être produite.

Tout de même, l'intérêt du résultat réside dans le fait que les taux de C/EBP α et β varient au cours de la différenciation myéloïde. Ces résultats confirment d'ailleurs ceux observés *in vitro* dans les expériences de super retard sur gel où, dans les extraits provenant de cellules HL-60 différenciées par la VD, ce sont les facteurs C/EBP β qui sont le plus majoritairement fixés sur le site E14.

Pour vérifier que la fixation des facteurs C/EBP α et β a bien lieu sur le site E14 du promoteur *NRAMP1*, un CHIP avec des clones stables mutés ou non sur ce site (mutation E14M1) pourra être réalisé en utilisant les mêmes amorces pour l'amplification PCR que celles choisies dans cette expérience. L'absence de fixation des facteurs C/EBP α et β sur le promoteur muté aurait démontré l'importance du site E14 dans la fixation de ces facteurs. Cependant, la difficulté de la mise au point de la technique du CHIP et les problèmes de différenciation des cellules HL-60 rencontrés n'ont pas permis la réalisation de cet objectif.

• **Le site E14 dans la région basale est crucial pour l'expression du gène *NRAMP1***

Pour étudier le rôle des facteurs C/EBP sur l'activité transcriptionnelle du promoteur *NRAMP1*, des co-transfections transitoires dans les cellules non myéloïdes 293T ont été réalisées avec le facteur C/EBP α et le promoteur *NRAMP1*. La présence des facteurs C/EBP α permet une forte activation de l'expression du gène *NRAMP1* qui est aussi importante si les facteurs Sp1 sont aussi co-transfectés avec le promoteur

NRAMP1 complet (NR1L). Par contre, aucune activité luciférase n'est détectée en transfectant le promoteur muté sur le site E14 (mutation E14M1) même lorsque celui-ci est co-transfecté avec les facteurs C/EBP α et Sp1 (Fig. 21). Contrairement à la mutation E10M0 dont l'effet délétère sur l'activité du promoteur dans les cellules non myéloïdes n'est détecté que dans les co-transfections avec le facteur Sp1, la mutation E14M1 entraîne des conséquences dramatiques sur l'expression basale du gène *NRAMP1*. Le site E14 est donc un élément cis-activateur essentiel à l'expression du promoteur *NRAMP1*.

Des transfectants stables contenant le promoteur *NRAMP1* muté sur le site E14 (mutation E14M1) ont été réalisés dans les cellules myéloïdes HL-60. Aucune expression du gène *NRAMP1* n'a été détectée dans ces clones stables mutés (Fig. 22A) alors qu'une expression basale de ce gène est observée dans les clones stables HSRL-5 contenant le promoteur de type sauvage ou dans les clones stables contenant la mutation E10M0 (Fig. 9).

L'expression de l'ARNm du gène *NRAMP1* lors de la différenciation terminale monocyttaire des HL-60, induite par la VD, de même que la différenciation granulocytaire de ces cellules, induite par le DMSO, a été préalablement démontrée (Cellier, Shustik *et al.* 1997). Les résultats observés montrent d'ailleurs une forte expression du gène *NRAMP1* après différenciation du clone stable HSRL-5 en monocyte ou en granulocyte (Roig, Richer *et al.* 2002) (Fig. 23). Les clones stables mutés E14M1-2 et E14M1-4, traités avec les mêmes agents différenciateurs, ne manifestent cependant aucune activité de la luciférase, suggérant que le gène *NRAMP1* n'a pas pu être exprimé dans ces clones mutés lors de leur différenciation myéloïde. L'intégrité complète du promoteur *NRAMP1* couplé à la luciférase a été vérifiée, par une amplification PCR avec des amorces spécifiques du promoteur *NRAMP1* et du gène de la luciférase, pour confirmer que les résultats observés sont uniquement la conséquence de la mutation E14M1 (Fig. 22B). Le site d'insertion et la position chromosomique du promoteur *NRAMP1* muté sur le site E14 dans les cellules HL-60 pourraient aussi influencer l'expression des clones stables obtenus et être une conséquence de la perte d'activité de la luciférase observée. Cependant, plusieurs clones stables mutés (> 5, seulement 4 sont représentés) ont été obtenus et aucune activité du promoteur n'a été détectée dans ces clones, suggérant que la mutation du

site E14 est seule responsable de cette perte d'activité du promoteur *NRAMP1* dans ces cellules.

Les membres de la famille C/EBP forment soit des hétérodimères, soit des homodimères qui possèdent des activités de transactivation différentes (Rosmarin, Yang *et al.* 2005). Les facteurs C/EBP α et β sont connus pour activer de nombreux gènes myéloïdes (Pan, Hetherington *et al.* 1999; Khanna-Gupta, Zibello *et al.* 2003). L'analyse de la régulation du promoteur *NRAMP1* endogène par ChIP, nous a révélé l'identité des membres de la famille C/EBP qui se fixent sur ce promoteur et le stade de la différenciation myéloïde dans lequel cette interaction a eu lieu. Les résultats suggèrent que les isoformes C/EBP α et β se fixeraient sous forme d'homodimères sur le promoteur *NRAMP1* pour activer l'expression de ce gène dans les cellules myéloïdes.

• *Coopération de Sp1 et de C/EBP α et β pour l'activation de l'expression du gène NRAMP1*

Il a été démontré que la région basale du promoteur *NRAMP1* permet à elle seule l'expression de ce gène dans les cellules non myéloïdes. Cependant, pour être activé dans les cellule myéloïdes, le gène *NRAMP1* a besoin des éléments cis-régulateurs présents dans la région myéloïde, comme le site E10 qui est fixé par les facteurs Sp1 (Richer E., Thèse de doctorat, 2005). Les facteurs C/EBP peuvent agir de concert avec une combinaison de facteurs de transcription, comme le facteur Sp1, pour recruter le complexe d'initiation de la transcription (Clarke et Gordon 1998).

Les résultats obtenus jusqu'à présent démontrent que le promoteur *NRAMP1* est lié par les facteurs C/EBP α et β au cours de la différenciation myéloïde. Le facteur Sp1 interagit aussi avec le promoteur *NRAMP1*, au niveau de la région distale, pour activer l'expression de ce gène. Les C/EBP peuvent interagir avec le facteur Sp1 dans les cellules myéloïdes. La coopération de Sp1 et C/EBP α est nécessaire pour une expression spécifique des gènes codant pour la lactoferrine et le CD11c au cours de la différenciation myéloïde (Lopez-Rodriguez, Botella *et al.* 1997; Khanna-Gupta,

Zibello *et al.* 2000). L'expression du gène *CYP2D5* dans les cellules HepG2 est aussi dépendante de la collaboration des facteurs Sp1 et C/EBP β (Lee, Yano *et al.* 1994).

Une activité basale du gène *NRAMP1* est observée lors de la co-transfection des facteurs C/EBP α , β et ϵ avec l'une ou l'autre des constructions du promoteur (NR1S ou NR1L) dans les cellules non myéloïdes 293T. Cette activité est cependant fortement augmentée lorsque le facteur Sp1 est ajouté aux co-transfections des facteurs C/EBP α ou β avec le promoteur *NRAMP1* complet (**Fig. 10**). Les facteurs C/EBP α et β sont donc capables d'induire une transcription basale du gène *NRAMP1* mais une coopération de ces facteurs avec Sp1 est nécessaire pour activer l'expression de ce gène.

• *Mécanisme hypothétique de régulation transcriptionnelle du promoteur NRAMP1 lors de la différenciation myéloïde.*

L'activation d'un gène est un processus qui se déroule sur plusieurs étapes mettant en jeu des facteurs de transcription qui reconnaissent spécifiquement des séquences régulatrices sur le promoteur.

Bien que les promoteurs myéloïdes ne possèdent pas de boîte TATA, l'efficacité et la spécificité avec lesquelles ces promoteurs sont reconnus dépendent de petites séquences d'ADN, dans le promoteur proximal, en amont du site d'initiation de la transcription. Ces séquences cis-régulatrices sont reconnues par des facteurs trans-activateurs ou inductibles (Mitchell et Tjian 1989). C'est le cas par exemple des boîtes "CCAAT" qui sont reconnues par différents facteurs, dont les facteurs de la famille C/EBP. Ces différents facteurs ont la capacité d'interagir entre eux permettant ainsi le recrutement du complexe d'initiation de la transcription composé des TBP, des TAF et des GTF (Tenen, Hromas *et al.* 1997; Clarke et Gordon 1998; Fisher et Scott 1998). Le facteur C/EBP α peut interagir physiquement avec les TBP et activer le recrutement des autres composants du complexe de la transcription (Nerlov et Ziff 1995). Les facteurs C/EBP forment avec les facteurs généraux de la transcription et l'ARN

polymérase II un complexe au niveau du site d'initiation de la transcription et déterminent ainsi le site de démarrage principal et la transcription basale du gène.

Les séquences cis-régulatrices "GGGCGG", aussi nommées boîtes GC, sont reconnues par les membres de la famille Sp. Ces facteurs ont une expression ubiquitaire et ils ont pour rôle d'augmenter l'efficacité de la transcription des gènes contenant ces boîtes GC dans leurs promoteurs. Le facteur Sp1 a été impliqué dans la transcription de plusieurs gènes cellulaires dont les gènes myéloïdes (Chen, Pahl *et al.* 1993; Suske 1999; Koga, Suico *et al.* 2005). Il a été démontré que l'activation de la transcription par le facteur Sp1 nécessite la présence de co-activateurs (Naar, Ryu *et al.* 1998). Le complexe multi protéique TFIID composé des facteurs TBP et TAF, sert de cible directe et de co-facteur essentiel pour le facteur Sp1. Dans ce complexe, il a été démontré que la protéine TAF130 interagit avec le domaine d'activation riche en glutamine du facteur Sp1 et c'est par cette interaction que le facteur Sp1 peut transactiver l'expression du gène cible (Tanese, Saluja *et al.* 1996). D'autres co-facteurs requis pour l'activation transcriptionnelle par Sp1 ont été identifiés, comme le complexe CRSP (Co-facteur requis pour Sp1) (Ryu et Tjian 1999; Ryu, Zhou *et al.* 1999). Ce complexe agit en synergie avec les facteurs associés aux TBP pour promouvoir une activation efficace par le facteur Sp1. L'existence d'un complexe appelé médiateur qui fait le lien entre l'activateur et la machinerie basale, dans le processus de régulation de la transcription est un concept assez récent. Son rôle commence à être défini mais les mécanismes restent encore inconnus.

Avec ces données de la littérature et celles obtenues dans cette étude, nous pouvons suggérer certains éléments d'un mécanisme de régulation hypothétique pour guider les études futures de l'expression du gène *NRAMP1* dans les cellules myéloïdes matures (schéma **Fig. 25**). Ce mécanisme ne présente que le rôle hypothétique des facteurs Sp1 et C/EBP, cependant, la régulation du gène *NRAMP1* met en jeu d'autres facteurs de transcription essentiels dont l'identité et le rôle doivent encore être étudiés.

1. Dans les progéniteurs myéloïdes, le facteur C/EBP α est fixé sur le promoteur *NRAMP1* (avec une forte probabilité sur le site E14) empêchant l'expression du gène. La manière dont le facteur C/EBP α réprime l'expression du gène *NRAMP1* dans les cellules immatures reste inconnue. Le facteur C/EBP α peut agir comme un régulateur négatif via son propre domaine d'inhibition (Nerlov et Ziff 1994) ou en formant des

hétérodimères sur des éléments cis-activateurs avec un autre partenaire qui possède des propriétés inhibitrices. La fixation potentielle du facteur CDP dans la région basale du promoteur *NRAMP1* pourrait aussi être responsable d'une inhibition de l'expression du gène *NRAMP1* dans les cellules non myéloïdes comme observé dans les co-transfections du facteur CDP/Cux p110 avec le promoteur *NRAMP1* dans les cellules 293T (**Fig. 10**) et comme dans le cas de la régulation du gène de la Lactoferrine (Khanna-Gupta, Zibello *et al.* 2003).

2. Lors de la différenciation myéloïde, le facteur C/EBP α est régulé à la baisse et le facteur C/EBP β , qui est fortement exprimé à ce stade, se fixe sur le promoteur *NRAMP1* à la place de l'isoforme C/EBP α .

3. La fixation des C/EBP β sur le promoteur *NRAMP1* et leurs interactions avec les facteurs associés aux TBP pourraient faciliter le recrutement des autres composants du complexe d'initiation de la transcription, pour permettre une expression basale du gène *NRAMP1*.

4. Le facteur Sp1 est recruté sur le site E10 dans la région myéloïde du promoteur *NRAMP1*.

L'intervention du facteur Sp1 à cette étape de la régulation du gène *NRAMP1* n'est qu'une hypothèse qui doit être confirmée *in vivo* par immunoprécipitation de la chromatine dans les cellules HL-60.

5. La fixation du facteur Sp1 sur le promoteur *NRAMP1* permet de stimuler l'expression du gène *NRAMP1* via une interaction multi modulaire de ce facteur avec le complexe médiateur (identité de ce complexe médiateur à définir).

Plusieurs gènes sont régulés par les facteurs C/EBP au cours de la différenciation monocyttaire ou granulocytaire, incluant ceux qui codent pour les cytokines inflammatoires IL-6, IL-1 β et TNF- α (Akira, Hirano *et al.* 1990; Shirakawa, Saito *et al.* 1993; Wedel, Sulski *et al.* 1996). Les C/EBP régulent aussi les gènes codant pour les protéines aux fonctions lytiques des macrophages et des granulocytes comme l'oxyde nitrique synthase inductible (Lowenstein, Alley *et al.* 1993), l'élastase (Oelgeschlager, Nuchprayoon *et al.* 1996) ou le lysozyme (Goethe et Loc 1994). Des

études rapportent que l'expression des facteurs C/EBP β et δ est fortement régulée à la hausse après un stimulus inflammatoire comme le LPS ou certaines cytokines (IL-6, TNF- α) (Akira et Kishimoto 1997). Le facteur C/EBP α est par contre régulé à la baisse dans ces mêmes conditions inflammatoires (Alam, An *et al.* 1992). L'implication des facteurs C/EBP α et β dans la régulation du gène *NRAMP1* pourrait donc contribuer à la régulation de ce gène dans les cellules myéloïdes lors d'une infection bactérienne.

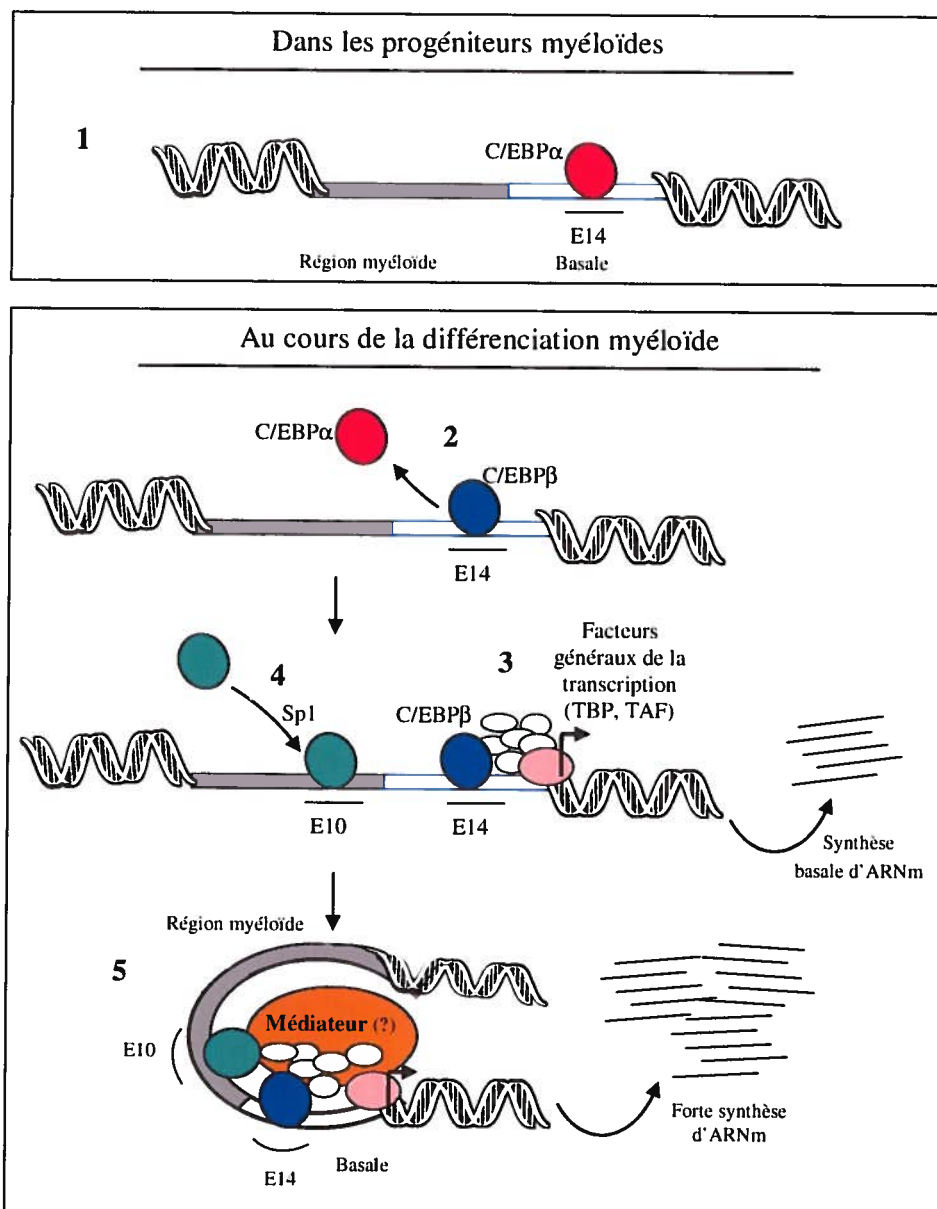


Figure 25. Mécanisme hypothétique de la régulation transcriptionnelle du promoteur *NRAMP1* lors de la différenciation myéloïde.

(Explications p110-111)

Conclusion et perspectives

Cette étude avait pour but d'identifier des éléments cis-activateurs dans la région basale du promoteur *NRAMP1* nécessaires pour la régulation du promoteur *NRAMP1* au cours de la différenciation myéloïde. Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence certains mécanismes de cette régulation : 1). Le site E14 est crucial pour l'expression du gène *NRAMP1* dans les cellules myéloïdes et non myéloïdes. 2). Les facteurs C/EBP α et β se fixent au site E14. 3). Il est possible que les facteurs C/EBP α se fixent sur le promoteur *NRAMP1* dans les cellules immatures, et les C/EBP β au cours de la différenciation myéloïde.

Ces résultats conduisent à penser que la coopération des facteurs Sp1 et C/EBP requiert les régions basale et myéloïde et stimule l'activation du promoteur *NRAMP1*. Une co-immunoprécipitation de la chromatine avec les deux anticorps anti-C/EBP α ou β et anti-Sp1, dans les cellules HL-60 différenciées ou non par la VD, pourrait démontrer cette hypothèse.

La régulation du promoteur *NRAMP1* par les facteurs C/EBP et Sp1 doit être vérifiée ultimement dans des cellules normales du sang (monocytes, macrophages). De même, il serait intéressant de déterminer si la régulation du promoteur *NRAMP1* au cours de la maturation des cellules HL-60 vers le type granulocytaire fait intervenir d'autres facteurs de transcription que ceux identifiés dans cette étude. Pour cela, les mêmes techniques que celles décrites dans cette étude pourront être utilisées avec le modèle des cellules HL-60 traitées au DMSO. La définition *in vivo* d'autres éléments actifs en *cis* sur le promoteur *NRAMP1* ainsi que l'identification des facteurs de transcription recrutés sera nécessaire.

D'autres études seraient nécessaires pour révéler le mécanisme de régulation responsable de l'expression spécifique du gène *NRAMP1* lors de la différenciation myéloïde. Il sera donc nécessaire de déterminer ultérieurement quels sont les facteurs qui permettent au promoteur d'être accessible, au cours de la différenciation myéloïde, aux composant du complexe d'initiation de la transcription. Dans quelques cas, la méthylation de l'ADN au niveau d'un simple dinucléotide CpG peut être suffisant

pour contrôler l'expression d'un gène, comme le cas du gène p53 (Pogribny, Pogribna *et al.* 2000). La régulation du gène *NRAMP1* est-elle contrôlée par de forts facteurs suppresseurs, dans lequel la méthylation de l'ADN joue un rôle majeur ? Les facteurs Sp1 se fixent sur des séquences "GGGCGG" qui peuvent être la cible d'une méthylation. L'inhibition de la fixation des facteurs Sp1 par la méthylation de leur site d'attachement est responsable de l'inactivation de certains gènes, comme *T1α* et *p21*. A l'inverse, la déméthylation de ces séquences régulatrices à un stade cellulaire précis permet l'expression spécifique de ces gènes (Cao, Jean *et al.* 2000; Zhu, Srinivasan *et al.* 2003).

Dans un premier temps, il sera donc nécessaire de déterminer la cinétique de fixation du facteur Sp1 sur le promoteur *NRAMP1* pour mieux comprendre son rôle dans la régulation de ce gène. Pour cela, une immunoprécipitation de la chromatine avec des anticorps contre le facteur Sp1 devra être réalisée dans les cellules HL-60 immatures et au cours de la maturation myéloïde de celles-ci. Les premiers essais se sont avérés négatifs et devront être repris. Cependant, des tests avec des oligonucléotides antisens contre le facteur Sp1 ont été réalisés dans les cellules HL-60 différenciées par la VD (**Annexe 2**). Les résultats montrent seulement une inhibition partielle de l'expression du gène *NRAMP1* au cours de la différenciation myéloïde, par l'antisens anti-Sp1 utilisé. Le rôle du facteur Sp1 dans la régulation myéloïde de l'expression du gène *NRAMP1* pourrait s'expliquer par le biais d'interactions avec d'autres facteurs dont l'activité est régulée au cours de la différenciation myéloïde. C'est pourquoi, l'inaccessibilité du facteur Sp1 sur le promoteur *NRAMP1* pour les anticorps anti-Sp1 testés, du à l'interaction de Sp1 avec d'autres facteurs de transcription, pourrait expliquer les résultats négatifs obtenus en ChIP jusqu'à présent.

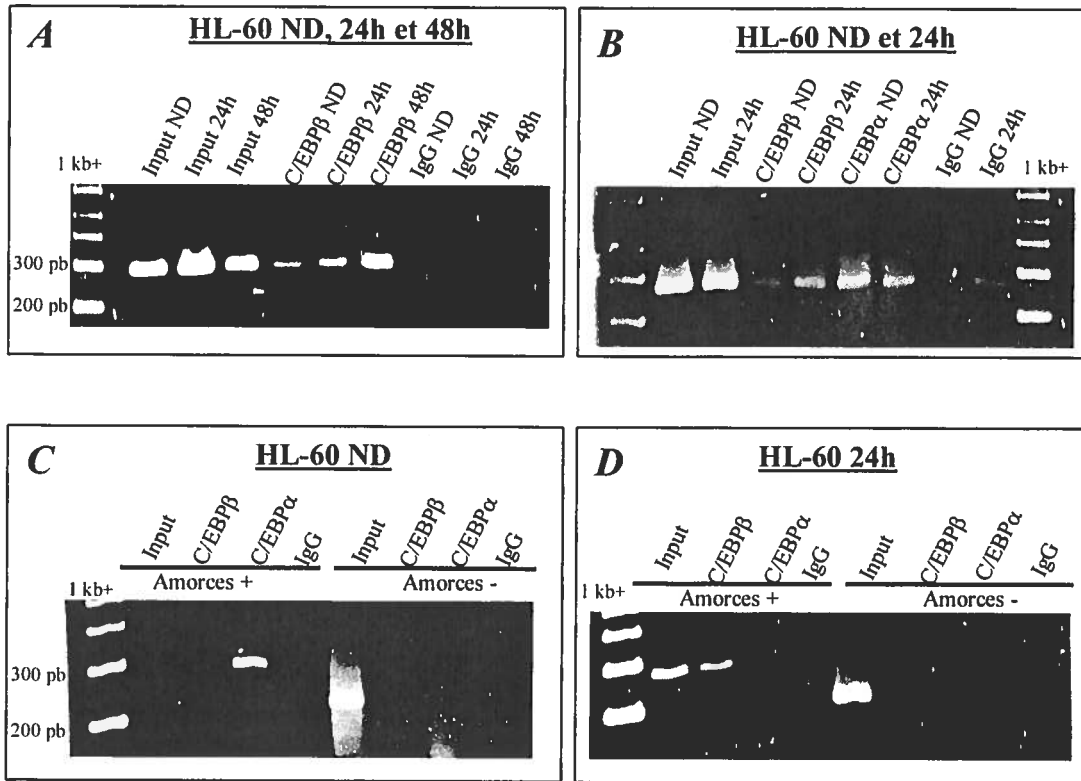
Dans un deuxième temps, des expériences de co-transfections du promoteur *NRAMP1*, méthylé ou non, avec les facteurs Sp1 pourraient répondre à l'hypothèse du rôle de la méthylation dans la régulation transcriptionnelle de ce promoteur. Il a été démontré que la méthylation de l'ADN peut réprimer l'activité du facteur de transcription Sp1 en recrutant la protéine MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2), protéine qui possède la faculté de se lier aux ilots CpG méthylés jouant un rôle important dans l'extinction de l'expression génique (Kudo 1998). La vérification de l'attachement de la protéine MeCP2 sur le promoteur *NRAMP1* par

immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) dans les cellules HL-60 immatures ou différenciées par la VD pourrait être envisagée par la suite.

A plus long terme, une analyse des polymorphismes du promoteur sera requise pour adresser leurs rôles dans l'expression du gène *NRAMP1* au cours de la différenciation myéloïde. Comme pour le cas du gène humain *MSH6*, des polymorphismes du promoteur proche du site de fixation Sp1 pourraient être responsable d'une inactivation du gène *NRAMP1* (Gazzoli et Kolodner 2003). La régulation du gène *NRAMP1* au cours de la différenciation myéloïde étant finement contrôlée, une simple inhibition de la fixation de certains facteurs sur le promoteur *NRAMP1* pourrait inhiber l'expression de ce gène et par conséquent empêcher la synthèse de cette protéine. La caractérisation des mécanismes de régulation du gène *NRAMP1* et l'implication de ces polymorphismes dans le phénomène de susceptibilité/résistance à certaines maladies pourront alors permettre l'identification de mécanismes de défense clés de l'hôte. Ces mécanismes pourront ensuite être utilisés comme nouvelles cibles thérapeutiques d'intervention dans ces maladies infectieuses ou auto-immunes.

Annexes

Annexe 1

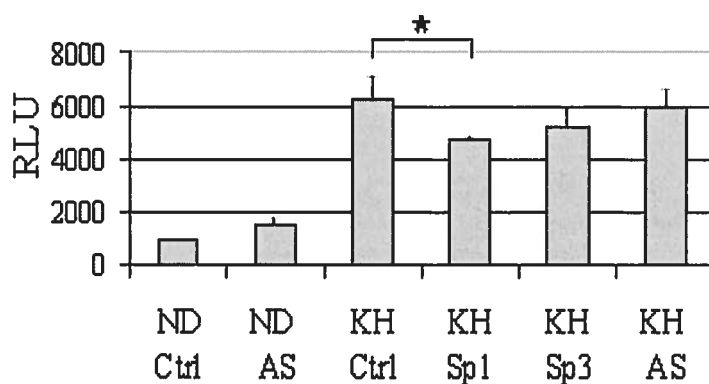


Immunoprécipitations de la chromatine des facteurs C/EBP α et β sur le promoteur *NRAMP1* endogène au cours de la différenciation myéloïde des cellules HL60.

Immunoprécipitations de la chromatine des facteurs C/EBP α et β sur le promoteur *NRAMP1* dans les cellules HL-60 non différenciées (ND) (A) (B) (C), différenciées avec EB 1089 pendant 24h (A) (B) (D) ou 48h (A), avec les anticorps anti-C/EBP β et α et IgG.

L'amplification par PCR des ChIP (A) et (B) a été réalisée avec l'amorce + uniquement. Les ChIP (C) et (D) ont été amplifiés avec les amorces + et -.

Annexe 2



Analyse de l'activation transcriptionnelle du promoteur *NRAMP1* après inhibition de l'expression du facteur Sp1 par des oligonucléotides antisens.

Des oligonucléotides antisens dirigés contre Sp1, Sp3 ou non fonctionnels (AS) ont été incubés pendant 24h dans les clones HSRL-5 (clones stables contenant le promoteur *NRAMP1* complet (NR1L) couplé à la luciférase), qui ont été précédemment différenciés pendant 3 jours avec du KH 1060, un analogue de la VD. L'intensité de la luciférase a été mesurée par un luminomètre. L'astérisque indique une différence significative entre les échantillons dans un test T de Student ($P < 0.05$). (Expérience réalisée par Carole Campion et figure produite par E. Richer).

Références bibliographiques

- Abe, E., C. Miyaura, *et al.* (1981). "Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(8): 4990-4.
- Abel, L., F. O. Sanchez, *et al.* (1998). "Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene." J Infect Dis **177**(1): 133-45.
- Akira, S., T. Hirano, *et al.* (1990). "Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF)." Faseb J **4**(11): 2860-7.
- Akira, S. et T. Kishimoto (1997). "NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation." Adv Immunol **65**: 1-46.
- Alam, T., M. R. An, *et al.* (1992). "Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response." J Biol Chem **267**(8): 5021-4.
- Alter-Koltunoff, M., S. Ehrlich, *et al.* (2003). "Nramp1-mediated innate resistance to intraphagosomal pathogens is regulated by IRF-8, PU.1, and Miz-1." J Biol Chem **278**(45): 44025-32.
- An, Y. C., F. M. Feng, *et al.* (2006). "[Study on the association of INT4 and 3'UTR polymorphism of natural-resistance-associated macrophage protein 1 gene with susceptibility to pulmonary tuberculosis]." Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi **27**(1): 37-40.
- Andrews, N. C. (1999). "The iron transporter DMT1." Int J Biochem Cell Biol **31**(10): 991-4.
- Andrews, N. C. (2000). "Iron metabolism: iron deficiency and iron overload." Annu Rev Genomics Hum Genet **1**: 75-98.
- Bellamy, R., C. Ruwende, *et al.* (1999). "Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene." J Infect Dis **179**(3): 721-4.
- Bellamy, R., C. Ruwende, *et al.* (1998). "Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans." N Engl J Med **338**(10): 640-4.
- Birmie, G. D. (1988). "The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation." Br J Cancer Suppl **9**: 41-5.
- Bjerregaard, M. D., J. Jurlander, *et al.* (2003). "The in vivo profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow." Blood **101**(11): 4322-32.
- Blackwell, J. M., C. H. Barton, *et al.* (1995). "Genomic organization and sequence of the human NRAMP gene: identification and mapping of a promoter region polymorphism." Mol Med **1**(2): 194-205.
- Blackwell, J. M., G. F. Black, *et al.* (1999). "Roles of Nramp1, HLA, and a gene(s) in allelic association with IL-4, in determining T helper subset differentiation." Microbes Infect **1**(1): 95-102.
- Blackwell, J. M. et S. Searle (1999). "Genetic regulation of macrophage activation: understanding the function of Nramp1 (=Ity/Lsh/Bcg)." Immunol Lett **65**(1-2): 73-80.
- Blackwell, J. M., S. Searle, *et al.* (2003). "Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: continuation of the Ity/Lsh/Bcg/Nramp1/Slc11a1 gene story." Immunol Lett **85**(2): 197-203.
- Bouillon, R., G. Eelen, *et al.* (2006). "Vitamin D and cancer." J Steroid Biochem Mol Biol **102**(1-5): 156-62.
- Bouillon, R., W. H. Okamura, *et al.* (1995). "Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system." Endocr Rev **16**(2): 200-57.

- Boyer, E., I. Bergevin, *et al.* (2002). "Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *Infect Immun* **70**(11): 6032-42.
- Bradley, D. J. (1979). "Regulation of *Leishmania* populations within the host. IV. Parasite and host cell kinetics studied by radioisotope labelling." *Acta Trop* **36**(2): 171-9.
- Breitman, T. R., S. E. Selonick, *et al.* (1980). "Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(5): 2936-40.
- Burge, E. J., D. T. Gauthier, *et al.* (2004). "Mycobacterium-inducible Nramp in striped bass (*Morone saxatilis*)." *Infect Immun* **72**(3): 1626-36.
- Buu, N., F. Sanchez, *et al.* (2000). "The Bcg host-resistance gene." *Clin Infect Dis* **31** Suppl 3: S81-5.
- Canonne-Hergaux, F., J. Calafat, *et al.* (2002). "Expression and subcellular localization of NRAMP1 in human neutrophil granules." *Blood* **100**(1): 268-75.
- Canonne-Hergaux, F., S. Gruenheid, *et al.* (1999). "Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron." *Blood* **93**(12): 4406-17.
- Cao, Y. X., J. C. Jean, *et al.* (2000). "Cytosine methylation of an Sp1 site contributes to organ-specific and cell-specific regulation of expression of the lung epithelial gene t1alpha." *Biochem J* **350** Pt 3: 883-90.
- Carlberg, C. et T. W. Dunlop (2006). "The impact of chromatin organization of vitamin D target genes." *Anticancer Res* **26**(4A): 2637-45.
- Cellier, M., G. Govoni, *et al.* (1994). "Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression." *J Exp Med* **180**(5): 1741-52.
- Cellier, M., G. Prive, *et al.* (1995). "Nramp defines a family of membrane proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(22): 10089-93.
- Cellier, M., C. Shustik, *et al.* (1997). "Expression of the human NRAMP1 gene in professional primary phagocytes: studies in blood cells and in HL-60 promyelocytic leukemia." *J Leukoc Biol* **61**(1): 96-105.
- Cellier, M. F., I. Bergevin, *et al.* (2001). "Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters." *Trends Genet* **17**(7): 365-70.
- Cellier, M. F., C. P., *et al.* (2007, sous presse). "Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense." *Microbes & Infection*
- Cellier, M. F., C. P., *et al.* (sous presse). "Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense." *Microbes & Infection*
- Chang, H. H., P. Y. Oh, *et al.* (2006). "Multistable and multistep dynamics in neutrophil differentiation." *BMC Cell Biol* **7**: 11.
- Chen, H. M., H. L. Pahl, *et al.* (1993). "The Sp1 transcription factor binds the CD11b promoter specifically in myeloid cells in vivo and is essential for myeloid-specific promoter activity." *J Biol Chem* **268**(11): 8230-9.
- Cheng, H. T., J. Y. Chen, *et al.* (2006). "Functional role of VDR in the activation of p27Kip1 by the VDR/Sp1 complex." *J Cell Biochem* **98**(6): 1450-6.
- Clarke, S. et S. Gordon (1998). "Myeloid-specific gene expression." *J Leukoc Biol* **63**(2): 153-68.
- Cohen, A. J., L. Lassova, *et al.* (2006). "Retinoids directly activate the collagen X promoter in prehypertrophic chondrocytes through a distal retinoic acid response element." *J Cell Biochem* **99**(1): 269-78.

- Collins, S. J., R. C. Gallo, *et al.* (1977). "Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture." Nature **270**(5635): 347-9.
- Collins, S. J., F. W. Ruscetti, *et al.* (1978). "Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(5): 2458-62.
- Collins, S. J., F. W. Ruscetti, *et al.* (1979). "Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide." J Exp Med **149**(4): 969-74.
- Courey, A. J. et R. Tjian (1988). "Analysis of Sp1 *in vivo* reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif." Cell **55**(5): 887-98.
- Curie, C., J. M. Alonso, *et al.* (2000). "Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport." Biochem J **347** Pt 3: 749-55.
- D'Souza, J., P. Y. Cheah, *et al.* (1999). "Functional complementation of the malvolio mutation in the taste pathway of *Drosophila melanogaster* by the human natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp-1)." J Exp Biol **202**(Pt 14): 1909-15.
- Dalton, W. T., Jr., M. J. Ahearn, *et al.* (1988). "HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3." Blood **71**(1): 242-7.
- De Ambrosis, A., I. Casciano, *et al.* (2006). "An interferon-sensitive response element is involved in constitutive caspase-8 gene expression in neuroblastoma cells." Int J Cancer.
- de Chastellier, C., C. Frehel, *et al.* (1993). "Implication of phagosome-lysosome fusion in restriction of *Mycobacterium avium* growth in bone marrow macrophages from genetically resistant mice." Infect Immun **61**(9): 3775-84.
- De Voss, J. J., K. Rutter, *et al.* (1999). "Iron acquisition and metabolism by mycobacteria." J Bacteriol **181**(15): 4443-51.
- DeLuca, H. F. et C. Zierold (1998). "Mechanisms and functions of vitamin D." Nutr Rev **56**(2 Pt 2): S4-10; discussion S 54-75.
- Dey, R. et S. C. Datta (1994). "Leishmanial glycosomes contain superoxide dismutase." Biochem J **301** (Pt 2): 317-9.
- Dubaniewicz, A., S. E. Jamieson, *et al.* (2005). "Association between SLC11A1 (formerly NRAMP1) and the risk of sarcoidosis in Poland." Eur J Hum Genet **13**(7): 829-34.
- Espinal, M. A. (2003). "The global situation of MDR-TB." Tuberculosis (Edinb) **83**(1-3): 44-51.
- Fanning, A. (1999). "Tuberculosis: 1. Introduction." Cmaj **160**(6): 837-9.
- Ferreira, F. R., L. R. Goulart, *et al.* (2004). "Susceptibility to leprosy may be conditioned by an interaction between the NRAMP1 promoter polymorphisms and the lepromin response." Int J Lepr Other Mycobact Dis **72**(4): 457-67.
- Fisher, R. C., M. C. Olson, *et al.* (1998). "Normal myeloid development requires both the glutamine-rich transactivation domain and the PEST region of transcription factor PU.1 but not the potent acidic transactivation domain." Mol Cell Biol **18**(7): 4347-57.
- Fisher, R. C. et E. W. Scott (1998). "Role of PU.1 in hematopoiesis." Stem Cells **16**(1): 25-37.
- Fleet, J. C. (1998). "Identification of Nramp2 as an iron transport protein: another piece of the intestinal iron absorption puzzle." Nutr Rev **56**(3): 88-9.

- Fleming, M. D. et N. C. Andrews (1998). "Mammalian iron transport: an unexpected link between metal homeostasis and host defense." J Lab Clin Med 132(6): 464-8.
- Fleming, M. D., C. C. Trenor, 3rd, *et al.* (1997). "Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene." Nat Genet 16(4): 383-6.
- Forbes, J. R. et P. Gros (2001). "Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions." Trends Microbiol 9(8): 397-403.
- Forbes, J. R. et P. Gros (2003). "Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane." Blood 102(5): 1884-92.
- Frehel, C., F. Canonne-Hergaux, *et al.* (2002). "Effect of Nramp1 on bacterial replication and on maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in bone marrow-derived mouse macrophages." Cell Microbiol 4(8): 541-56.
- Friedman, A. D. (2002). "Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development." Oncogene 21(21): 3377-90.
- Friedman, A. D. (2002). "Transcriptional regulation of myelopoiesis." Int J Hematol 75(5): 466-72.
- Gazzoli, I. et R. D. Kolodner (2003). "Regulation of the human MSH6 gene by the Sp1 transcription factor and alteration of promoter activity and expression by polymorphisms." Mol Cell Biol 23(22): 7992-8007.
- Goethe, R. et P. V. Loc (1994). "The far upstream chicken lysozyme enhancer at -6.1 kilobase, by interacting with NF-M, mediates lipopolysaccharide-induced expression of the chicken lysozyme gene in chicken myelomonocytic cells." J Biol Chem 269(49): 31302-9.
- Gomes, M. S. et R. Appelberg (1998). "Evidence for a link between iron metabolism and Nramp1 gene function in innate resistance against Mycobacterium avium." Immunology 95(2): 165-8.
- Govoni, G., F. Canonne-Hergaux, *et al.* (1999). "Functional expression of Nramp1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7." Infect Immun 67(5): 2225-32.
- Govoni, G., S. Gauthier, *et al.* (1997). "Cell-specific and inducible Nramp1 gene expression in mouse macrophages in vitro and in vivo." J Leukoc Biol 62(2): 277-86.
- Govoni, G. et P. Gros (1998). "Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections." Inflamm Res 47(7): 277-84.
- Govoni, G., S. Vidal, *et al.* (1995). "Genomic structure, promoter sequence, and induction of expression of the mouse Nramp1 gene in macrophages." Genomics 27(1): 9-19.
- Govoni, G., S. Vidal, *et al.* (1996). "The Bcg/Ity/Lsh locus: genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the Nramp1 Gly169 allele." Infect Immun 64(8): 2923-9.
- Grabe, N. (2002). "AliBaba2: context specific identification of transcription factor binding sites." In Silico Biol 2(1): S1-15.
- Greaves, D. R. et S. Gordon (2002). "Macrophage-specific gene expression: current paradigms and future challenges." Int J Hematol 76(1): 6-15.
- Greenwood, C. M., T. M. Fujiwara, *et al.* (2000). "Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family." Am J Hum Genet 67(2): 405-16.

- Gros, P., E. Skamene, *et al.* (1981). "Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice." J Immunol **127**(6): 2417-21.
- Gruenheid, S., M. Cellier, *et al.* (1995). "Identification and characterization of a second mouse Nramp gene." Genomics **25**(2): 514-25.
- Gruenheid, S., E. Pinner, *et al.* (1997). "Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome." J Exp Med **185**(4): 717-30.
- Gunshin, H., Y. Fujiwara, *et al.* (2005). "Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver." J Clin Invest **115**(5): 1258-66.
- Gunshin, H., B. Mackenzie, *et al.* (1997). "Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter." Nature **388**(6641): 482-8.
- Hackam, D. J., O. D. Rotstein, *et al.* (1998). "Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification." J Exp Med **188**(2): 351-64.
- Hayes, C. E., F. E. Nashold, *et al.* (2003). "The immunological functions of the vitamin D endocrine system." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **49**(2): 277-300.
- He, H. et N. Lehming (2003). "Global effects of histone modifications." Brief Funct Genomic Proteomic **2**(3): 234-43.
- Hentze, M. W., M. U. Muckenthaler, *et al.* (2004). "Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism." Cell **117**(3): 285-97.
- Hewison, M., D. Zehnder, *et al.* (2004). "Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 alpha-hydroxylase." Mol Cell Endocrinol **215**(1-2): 31-8.
- Hill, A. V. (1998). "The immunogenetics of human infectious diseases." Annu Rev Immunol **16**: 593-617.
- Hohaus, S., M. S. Petrovick, *et al.* (1995). "PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene." Mol Cell Biol **15**(10): 5830-45.
- Holick, M. F. (1988). "Skin: site of the synthesis of vitamin D and a target tissue for the active form, 1,25-dihydroxyvitamin D3." Ann N Y Acad Sci **548**: 14-26.
- Huang, Y. C., J. Y. Chen, *et al.* (2004). "Vitamin D3 receptor/Sp1 complex is required for the induction of p27Kip1 expression by vitamin D3." Oncogene **23**(28): 4856-61.
- Jaaskelainen, T., S. Ryhanen, *et al.* (2000). "Mechanism of action of superactive vitamin D analogs through regulated receptor degradation." J Cell Biochem **76**(4): 548-58.
- Jabado, N., F. Canonne-Hergaux, *et al.* (2002). "Iron transporter Nramp2/DMT-1 is associated with the membrane of phagosomes in macrophages and Sertoli cells." Blood **100**(7): 2617-22.
- Jabado, N., A. Jankowski, *et al.* (2000). "Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane." J Exp Med **192**(9): 1237-48.
- Jamieson, S. E., J. K. White, *et al.* (2005). "Candidate gene association study of solute carrier family 11a members 1 (SLC11A1) and 2 (SLC11A2) genes in Alzheimer's disease." Neurosci Lett **374**(2): 124-8.
- Jenuwein, T. et C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." Science **293**(5532): 1074-80.
- Ji, Y. et G. P. Studzinski (2004). "Retinoblastoma protein and CCAAT/enhancer-binding protein beta are required for 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced monocytic differentiation of HL60 cells." Cancer Res **64**(1): 370-7.

- Jones, G., S. A. Strugnell, *et al.* (1998). "Current understanding of the molecular actions of vitamin D." Physiol Rev **78**(4): 1193-231.
- Jurado, R. L. (1997). "Iron, infections, and anemia of inflammation." Clin Infect Dis **25**(4): 888-95.
- Kaufmann, S. H. (2001). "How can immunology contribute to the control of tuberculosis?" Nat Rev Immunol **1**(1): 20-30.
- Kel, A. E., E. Gossling, *et al.* (2003). "MATCH: A tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences." Nucleic Acids Res **31**(13): 3576-9.
- Khanna-Gupta, A., T. Zibello, *et al.* (2000). "Sp1 and C/EBP are necessary to activate the lactoferrin gene promoter during myeloid differentiation." Blood **95**(12): 3734-41.
- Khanna-Gupta, A., T. Zibello, *et al.* (2003). "Chromatin immunoprecipitation (ChIP) studies indicate a role for CCAAT enhancer binding proteins alpha and epsilon (C/EBP alpha and C/EBP epsilon) and CDP/cut in myeloid maturation-induced lactoferrin gene expression." Blood **101**(9): 3460-8.
- Khanna-Gupta, A., T. Zibello, *et al.* (2001). "C/EBP epsilon mediates myeloid differentiation and is regulated by the CCAAT displacement protein (CDP/cut)." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(14): 8000-5.
- Kishi, F., Y. Tanizawa, *et al.* (1996). "Structural analysis of human natural resistance-associated macrophage protein 1 promoter." Mol Immunol **33**(3): 265-8.
- Knutson, M. et M. Wessling-Resnick (2003). "Iron metabolism in the reticuloendothelial system." Crit Rev Biochem Mol Biol **38**(1): 61-88.
- Koeffler, H. P., M. Bar-Eli, *et al.* (1981). "Phorbol ester effect on differentiation of human myeloid leukemia cell lines blocked at different stages of maturation." Cancer Res **41**(3): 919-26.
- Koga, T., M. A. Suico, *et al.* (2005). "Sp1-dependent regulation of Myeloid Elf-1 like factor in human epithelial cells." FEBS Lett **579**(13): 2811-6.
- Kramnik, I. et V. Boyartchuk (2002). "Immunity to intracellular pathogens as a complex genetic trait." Curr Opin Microbiol **5**(1): 111-7.
- Kudo, S. (1998). "Methyl-CpG-binding protein MeCP2 represses Sp1-activated transcription of the human leukosialin gene when the promoter is methylated." Mol Cell Biol **18**(9): 5492-9.
- Lam-Yuk-Tseung, S., C. Camaschella, *et al.* (2006). "A novel R416C mutation in human DMT1 (SLC11A2) displays pleiotropic effects on function and causes microcytic anemia and hepatic iron overload." Blood Cells Mol Dis **36**(3): 347-54.
- Lam-Yuk-Tseung, S., M. Mathieu, *et al.* (2005). "Functional characterization of the E399D DMT1/NRAMP2/SLC11A2 protein produced by an exon 12 mutation in a patient with microcytic anemia and iron overload." Blood Cells Mol Dis **35**(2): 212-6.
- Lam-Yuk-Tseung, S., V. Picard, *et al.* (2006). "Identification of a tyrosine-based motif (YGSI) in the amino terminus of Nramp1 (Slc11a1) that is important for lysosomal targeting." J Biol Chem **281**(42): 31677-88.
- Lang, T., E. Prina, *et al.* (1997). "Nramp1 transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on antigen processing and presentation." Infect Immun **65**(2): 380-6.
- Lee, Y. H., M. Yano, *et al.* (1994). "A novel cis-acting element controlling the rat CYP2D5 gene and requiring cooperativity between C/EBP beta and an Sp1 factor." Mol Cell Biol **14**(2): 1383-94.

- Lewis, L. A., T. C. Victor, *et al.* (1996). "Identification of C to T mutation at position -236 bp in the human NRAMP1 gene promoter." *Immunogenetics* **44**(4): 309-11.
- Li, C., Y. Wang, *et al.* (2002). "Expression of toll-like receptors 2 and 4 and CD14 during differentiation of HL-60 cells induced by phorbol 12-myristate 13-acetate and 1 alpha, 25-dihydroxy-vitamin D(3)." *Cell Growth Differ* **13**(1): 27-38.
- Li, H. T., T. T. Zhang, *et al.* (2006). "SLC11A1 (formerly NRAMP1) gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis." *Int J Tuberc Lung Dis* **10**(1): 3-12.
- Li, L., S. He, *et al.* (2004). "Gene regulation by Sp1 and Sp3." *Biochem Cell Biol* **82**(4): 460-71.
- Liu, J., T. M. Fujiwara, *et al.* (1995). "Identification of polymorphisms and sequence variants in the human homologue of the mouse natural resistance-associated macrophage protein gene." *Am J Hum Genet* **56**(4): 845-53.
- Liu, P. T., S. Stenger, *et al.* (2006). "Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response." *Science* **311**(5768): 1770-3.
- Lopez-Rodriguez, C., L. Botella, *et al.* (1997). "CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP) regulate the tissue specific activity of the CD11c integrin gene promoter through functional interactions with Sp1 proteins." *J Biol Chem* **272**(46): 29120-6.
- Lowenstein, C. J., E. W. Alley, *et al.* (1993). "Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(20): 9730-4.
- Maenpaa, P. H., S. Vaisanen, *et al.* (2001). "Vitamin D(3) analogs (MC 1288, KH 1060, EB 1089, GS 1558, and CB 1093): studies on their mechanism of action." *Steroids* **66**(3-5): 223-5.
- Malik, S., L. Abel, *et al.* (2005). "Alleles of the NRAMP1 gene are risk factors for pediatric tuberculosis disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(34): 12183-8.
- Martin-Soudant, N., J. G. Drachman, *et al.* (2000). "CDP/Cut DNA binding activity is down-modulated in granulocytes, macrophages and erythrocytes but remains elevated in differentiating megakaryocytes." *Leukemia* **14**(5): 863-73.
- McCullough, M. L., V. L. Stevens, *et al.* (2007). "Vitamin D pathway gene polymorphisms, diet, and risk of postmenopausal breast cancer: a nested case-control study." *Breast Cancer Res* **9**(1): R9.
- Mitchell, P. J. et R. Tjian (1989). "Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins." *Science* **245**(4916): 371-8.
- Mohamed, H. S., M. E. Ibrahim, *et al.* (2004). "SLC11A1 (formerly NRAMP1) and susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan." *Eur J Hum Genet* **12**(1): 66-74.
- Naar, A. M., S. Ryu, *et al.* (1998). "Cofactor requirements for transcriptional activation by Sp1." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**: 189-99.
- Natsuka, S., S. Akira, *et al.* (1992). "Macrophage differentiation-specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6." *Blood* **79**(2): 460-6.
- Nemeth, E., S. Rivera, *et al.* (2004). "IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin." *J Clin Invest* **113**(9): 1271-6.
- Nemeth, E., E. V. Valore, *et al.* (2003). "Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein." *Blood* **101**(7): 2461-3.

- Nepveu, A. (2001). "Role of the multifunctional CDP/Cut/Cux homeodomain transcription factor in regulating differentiation, cell growth and development." Gene **270**(1-2): 1-15.
- Nerlov, C. et E. B. Ziff (1994). "Three levels of functional interaction determine the activity of CCAAT/enhancer binding protein-alpha on the serum albumin promoter." Genes Dev **8**(3): 350-62.
- Nerlov, C. et E. B. Ziff (1995). "CCAAT/enhancer binding protein-alpha amino acid motifs with dual TBP and TFIIB binding ability co-operate to activate transcription in both yeast and mammalian cells." Embo J **14**(17): 4318-28.
- Nevo, Y. et N. Nelson (2006). "The NRAMP family of metal-ion transporters." Biochim Biophys Acta **1763**(7): 609-20.
- Newburger, P. E., M. E. Chovaniec, *et al.* (1979). "Functional changes in human leukemic cell line HL-60. A model for myeloid differentiation." J Cell Biol **82**(2): 315-22.
- Nirodi, C., J. Hart, *et al.* (2001). "The role of CDP in the negative regulation of CXCL1 gene expression." J Biol Chem **276**(28): 26122-31.
- Norman, A. W. et F. R. Silva (2001). "Structure function studies: identification of vitamin D analogs for the ligand-binding domains of important proteins in the vitamin D-endocrine system." Rev Endocr Metab Disord **2**(2): 229-38.
- Oelgeschlager, M., I. Nuchprayoon, *et al.* (1996). "C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter." Mol Cell Biol **16**(9): 4717-25.
- Oikawa, T., T. Yamada, *et al.* (1999). "The role of Ets family transcription factor PU.1 in hematopoietic cell differentiation, proliferation and apoptosis." Cell Death Differ **6**(7): 599-608.
- Ondkova, S., D. Macejova, *et al.* (2006). "Role of dihydroxyvitamin D(3) and its nuclear receptor in novel directed therapies for cancer." Gen Physiol Biophys **25**(4): 339-53.
- Owen, G. I., J. K. Richer, *et al.* (1998). "Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin- dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300." J Biol Chem **273**(17): 10696-701.
- Pan, Z., C. J. Hetherington, *et al.* (1999). "CCAAT/enhancer-binding protein activates the CD14 promoter and mediates transforming growth factor beta signaling in monocyte development." J Biol Chem **274**(33): 23242-8.
- Peracino, B., C. Wagner, *et al.* (2006). "Function and mechanism of action of Dictyostelium Nramp1 (Slc11a1) in bacterial infection." Traffic **7**(1): 22-38.
- Pereira, R. C., A. M. Delany, *et al.* (2004). "CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (DDIT3) induces osteoblastic cell differentiation." Endocrinology **145**(4): 1952-60.
- Pigeon, C., G. Ilyin, *et al.* (2001). "A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload." J Biol Chem **276**(11): 7811-9.
- Plant, J. et A. A. Glynn (1976). "Genetics of resistance to infection with Salmonella typhimurium in mice." J Infect Dis **133**(1): 72-8.
- Pogribny, I. P., M. Pogribna, *et al.* (2000). "Single-site methylation within the p53 promoter region reduces gene expression in a reporter gene construct: possible in vivo relevance during tumorigenesis." Cancer Res **60**(3): 588-94.
- Portnoy, M. E., X. F. Liu, *et al.* (2000). "Saccharomyces cerevisiae expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters." Mol Cell Biol **20**(21): 7893-902.

- Qureshi, S. T., E. Skamene, *et al.* (1999). "Comparative genomics and host resistance against infectious diseases." Emerg Infect Dis **5**(1): 36-47.
- Raviglione, M. C., D. E. Snider, Jr., *et al.* (1995). "Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic." Jama **273**(3): 220-6.
- Reddy, K. V., K. J. Serio, *et al.* (2003). "5-lipoxygenase-activating protein gene expression. Key role of CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) in constitutive and tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced expression in THP-1 cells." J Biol Chem **278**(16): 13810-8.
- Resendes, K. K. et A. G. Rosmarin (2004). "Sp1 control of gene expression in myeloid cells." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **14**(3): 171-81.
- Richards, F. M., A. Watson, *et al.* (1988). "Investigation of the effects of heat shock and agents which induce a heat shock response on the induction of differentiation of HL-60 cells." Cancer Res **48**(23): 6715-20.
- Richer, E., P. Courville, *et al.* (2003). "Horizontal gene transfer of "prototype" Nramp in bacteria." J Mol Evol **57**(4): 363-76.
- Rockett, K. A., R. Brookes, *et al.* (1998). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of Mycobacterium tuberculosis in a human macrophage-like cell line." Infect Immun **66**(11): 5314-21.
- Roig, E. A., E. Richer, *et al.* (2002). "Regulation of NRAMP1 gene expression by 1alpha,25-dihydroxy-vitamin D(3) in HL-60 phagocytes." J Leukoc Biol **71**(5): 890-904.
- Romero-Gomez, M., M. A. Montes-Cano, *et al.* (2004). "SLC11A1 promoter gene polymorphisms and fibrosis progression in chronic hepatitis C." Gut **53**(3): 446-50.
- Rook, G. A., J. Steele, *et al.* (1986). "Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes." Immunology **57**(1): 159-63.
- Rosmarin, A. G., Z. Yang, *et al.* (2005). "Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis." Exp Hematol **33**(2): 131-43.
- Roy, S., A. Frodsham, *et al.* (1999). "Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type." J Infect Dis **179**(1): 187-91.
- Ryu, S. et R. Tjian (1999). "Purification of transcription cofactor complex CRSP." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7137-42.
- Ryu, S., S. Zhou, *et al.* (1999). "The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1." Nature **397**(6718): 446-50.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, *et al.* (1989). Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanjeevi, C. B., E. N. Miller, *et al.* (2000). "Polymorphism at NRAMP1 and D2S1471 loci associated with juvenile rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**(6): 1397-404.
- Schoneveld, O. J., I. C. Gaemers, *et al.* (2004). "Mechanisms of glucocorticoid signalling." Biochim Biophys Acta **1680**(2): 114-28.
- Searle, S. et J. M. Blackwell (1999). "Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human NRAMP1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility." J Med Genet **36**(4): 295-9.
- Searle, S., N. A. Bright, *et al.* (1998). "Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection." J Cell Sci **111** (Pt 19): 2855-66.

- Shaw, M. A., D. Clayton, *et al.* (1996). "Linkage of rheumatoid arthritis to the candidate gene NRAMP1 on 2q35." *J Med Genet* **33**(8): 672-7.
- Shike, H., X. Lauth, *et al.* (2002). "Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge." *Eur J Biochem* **269**(8): 2232-7.
- Shirakawa, F., K. Saito, *et al.* (1993). "The human prointerleukin 1 beta gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue-specific induction." *Mol Cell Biol* **13**(3): 1332-44.
- Shivdasani, R. A. et S. H. Orkin (1996). "The transcriptional control of hematopoiesis." *Blood* **87**(10): 4025-39.
- Smith, L. T., S. Hohaus, *et al.* (1996). "PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells." *Blood* **88**(4): 1234-47.
- Soborg, C., A. B. Andersen, *et al.* (2002). "Natural resistance-associated macrophage protein 1 polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis." *J Infect Dis* **186**(4): 517-21.
- Soo, S. S., B. Villarreal-Ramos, *et al.* (1998). "Genetic control of immune response to recombinant antigens carried by an attenuated Salmonella typhimurium vaccine strain: Nramp1 influences T-helper subset responses and protection against leishmanial challenge." *Infect Immun* **66**(5): 1910-7.
- Stienstra, Y., T. S. van der Werf, *et al.* (2006). "Susceptibility to Buruli ulcer is associated with the SLC11A1 (NRAMP1) D543N polymorphism." *Genes Immun* **7**(3): 185-9.
- Studzinski, G. P., A. K. Bhandal, *et al.* (1985). "Cell cycle sensitivity of HL-60 cells to the differentiation-inducing effects of 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3." *Cancer Res* **45**(8): 3898-905.
- Studzinski, G. P., A. K. Bhandal, *et al.* (1985). "A system for monocytic differentiation of leukemic cells HL 60 by a short exposure to 1,25-dihydroxycholecalciferol." *Proc Soc Exp Biol Med* **179**(3): 288-95.
- Su, M. A., C. C. Trenor, *et al.* (1998). "The G185R mutation disrupts function of the iron transporter Nramp2." *Blood* **92**(6): 2157-63.
- Suske, G. (1999). "The Sp-family of transcription factors." *Gene* **238**(2): 291-300.
- Tamura, T. et K. Ozato (2002). "ICSBP/IRF-8: its regulatory roles in the development of myeloid cells." *J Interferon Cytokine Res* **22**(1): 145-52.
- Tanese, N., D. Saluja, *et al.* (1996). "Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIID complex: hTAFII130 and hTAFII100." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 13611-6.
- Tenen, D. G., R. Hromas, *et al.* (1997). "Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia." *Blood* **90**(2): 489-519.
- Thomasset, M. (1994). "[Vitamin D and the immune system]." *Pathol Biol (Paris)* **42**(2): 163-72.
- Truscott, M., L. Raynal, *et al.* (2003). "CDP/Cux stimulates transcription from the DNA polymerase alpha gene promoter." *Mol Cell Biol* **23**(8): 3013-28.
- Truscott, M., L. Raynal, *et al.* (2004). "The N-terminal region of the CCAAT displacement protein (CDP)/Cux transcription factor functions as an autoinhibitory domain that modulates DNA binding." *J Biol Chem* **279**(48): 49787-94.
- Tsolis, R. M., A. J. Baumler, *et al.* (1995). "Role of Salmonella typhimurium Mn-superoxide dismutase (SodA) in protection against early killing by J774 macrophages." *Infect Immun* **63**(5): 1739-44.
- Vaisanen, S., S. Ryhanen, *et al.* (1999). "Structure-function studies of new C-20 epimer pairs of vitamin D3 analogs." *Eur J Biochem* **261**(3): 706-13.

- Valdivielso, J. M. et E. Fernandez (2006). "Vitamin D receptor polymorphisms and diseases." Clin Chim Acta **371**(1-2): 1-12.
- Valledor, A. F., F. E. Borrás, *et al.* (1998). "Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation." J Leukoc Biol **63**(4): 405-17.
- Vidal, S., A. M. Belouchi, *et al.* (1995). "Cloning and characterization of a second human NRAMP gene on chromosome 12q13." Mamm Genome **6**(4): 224-30.
- Vidal, S., P. Gros, *et al.* (1995). "Natural resistance to infection with intracellular parasites: molecular genetics identifies Nramp1 as the Bcg/Ity/Lsh locus." J Leukoc Biol **58**(4): 382-90.
- Vidal, S., M. L. Tremblay, *et al.* (1995). "The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene." J Exp Med **182**(3): 655-66.
- Vidal, S. M., D. Malo, *et al.* (1993). "Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg." Cell **73**(3): 469-85.
- Vidal, S. M., E. Pinner, *et al.* (1996). "Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains." J Immunol **157**(8): 3559-68.
- Wedel, A., G. Sulski, *et al.* (1996). "CCAAT/enhancer binding protein is involved in the expression of the tumour necrosis factor gene in human monocytes." Cytokine **8**(5): 335-41.
- White, J. K., A. Stewart, *et al.* (2004). "Incomplete glycosylation and defective intracellular targeting of mutant solute carrier family 11 member 1 (Slc11a1)." Biochem J **382**(Pt 3): 811-9.
- Wietzke, J. A., E. C. Ward, *et al.* (2005). "Regulation of the human vitamin D3 receptor promoter in breast cancer cells is mediated through Sp1 sites." Mol Cell Endocrinol **230**(1-2): 59-68.
- Woolhouse, M. E., J. P. Webster, *et al.* (2002). "Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts." Nat Genet **32**(4): 569-77.
- Yamaji, S., P. Sharp, *et al.* (2004). "Inhibition of iron transport across human intestinal epithelial cells by hepcidin." Blood **104**(7): 2178-80.
- Yamamoto, H. et T. Oikawa (1999). "[Interaction of transcription factor PU. 1 with coactivator CBP]." Tanpakushitsu Kakusan Koso **44**(9): 1389-95.
- Yamanaka, R., G. D. Kim, *et al.* (1997). "CCAAT/enhancer binding protein epsilon is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6462-7.
- Yamanaka, R., J. Lékstrom-Himes, *et al.* (1998). "CCAAT/enhancer binding proteins are critical components of the transcriptional regulation of hematopoiesis (Review)." Int J Mol Med **1**(1): 213-21.
- Zaahl, M. G., K. J. Robson, *et al.* (2004). "Expression of the SLC11A1 (NRAMP1) 5'-(GT)_n repeat: opposite effect in the presence of -237C-->T." Blood Cells Mol Dis **33**(1): 45-50.
- Zasloff, M. (2006). "Fighting infections with vitamin D." Nat Med **12**(4): 388-90.
- Zhang, D. E., C. J. Hetherington, *et al.* (1996). "CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter." Mol Cell Biol **16**(3): 1231-40.
- Zhang, D. E., C. J. Hetherington, *et al.* (1994). "Sp1 is a critical factor for the monocytic specific expression of human CD14." J Biol Chem **269**(15): 11425-34.

- Zhang, D. E., S. Hohaus, *et al.* (1996). "Function of PU.1 (Spi-1), C/EBP, and AML1 in early myelopoiesis: regulation of multiple myeloid CSF receptor promoters." Curr Top Microbiol Immunol **211**: 137-47.
- Zhang, D. E., P. Zhang, *et al.* (1997). "Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 569-74.
- Zhang, W., L. Shao, *et al.* (2005). "Variants of the natural resistance-associated macrophage protein 1 gene (NRAMP1) are associated with severe forms of pulmonary tuberculosis." Clin Infect Dis **40**(9): 1232-6.
- Zhang, Y., R. Lathigra, *et al.* (1991). "Genetic analysis of superoxide dismutase, the 23 kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis." Mol Microbiol **5**(2): 381-91.
- Zhu, W. G., K. Srinivasan, *et al.* (2003). "Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21(Cip1) promoter." Mol Cell Biol **23**(12): 4056-65.
- Richer E. (2005). "Régulation de l'expression du gène *NRAMP1* au cours de la différenciation myéloïde". Thèse de doctorat en Virologie et Immunologie. INRS-Institut Armand-Frappier.