

Transcription des gènes de protéines plasmatiques dans le foie au cours de l'inflammation aiguë systémique

Jean-Philippe Salier
Philippe Rouet
Fatima Banine
Sophie Claeysens

Au cours de la phase aiguë du syndrome de réponse inflammatoire systémique, la libération de cytokines pro-inflammatoires (notamment l'interleukine-1 [IL-1] et l'IL-6) provoque d'importantes modifications de synthèses protéiques dans le foie. Les régulations sont essentiellement de type transcriptionnel et impliquent plusieurs familles de facteurs nucléaires. Certains d'entre eux gouvernent avant tout l'expression spécifique des gènes dans le tissu hépatique (facteurs HNF et certains facteurs des familles C/EBP et STAT). D'autres sont les principaux médiateurs nucléaires des voies de régulation déclenchées par l'IL-1 (certains facteurs C/EBP) ou l'IL-6 (certains facteurs STAT, récepteur des glucocorticoïdes). On commence à connaître les mécanismes moléculaires qui règlent positivement et négativement la transcription des gènes de protéines plasmatiques : combinatoires de sites et facteurs sur un gène ; synergie ou antagonisme de fixation de facteurs sur un ou des sites ; synergie d'activation d'un gène par plusieurs facteurs.

ADRESSES

J.P. Salier: directeur de recherche à l'Inserm.
 P. Rouet: chargé de recherche à l'Inserm.
 F. Banine: boursière de la Ligue contre le Cancer. Inserm U. 78 et Institut fédératif de recherches multidisciplinaires sur les peptides, BP 73, 76233 Bois-Guillaume Cedex. France.
 S. Claeysens: maître de conférence et praticien hospitalier au CHU de Rouen. Groupe de biochimie et physiopathologie digestive et nutritionnelle et Institut fédératif de recherches multidisciplinaires sur les peptides, Faculté de médecine-pharmacie de Rouen, France.

L'inflammation aiguë systémique est une réaction de défense de l'organisme à des agressions aussi variées qu'une infection bactérienne, un choc hémorragique, une nécrose tissulaire ou un traumatisme chirurgical. La cascade d'événements adaptatifs qui s'ensuit, quasiment indépendante de la variabilité des causes, constitue la phase aiguë de la réaction inflammatoire. Outre une série de phénomènes bien connus (fièvre, hyperleucocytose, sécrétion de prostaglandines, d'ACTH

et de cortisol), cette phase aiguë comporte, notamment, la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur nécrosant des tumeurs (TNF α), les interleukines 1 α et β (IL-1 α et β) et l'IL-6. Ces cytokines sont libérées par les macrophages, les cellules endothéliales vasculaires et les fibroblastes et agissent par l'intermédiaire de récepteurs sur des organes cibles. Le foie est un des organes cibles essentiels de la réponse inflammatoire aiguë systémique : sous l'action des cytokines pro-inflammatoires, la bio-

RÉFÉRENCES

1. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994; 15: 74-80.
 2. Stee DM, Whitehead, AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 1994; 15: 81-8.
 3. Rouet P, Raguenez G, Tronche F, Mfou'ou V, Salier JP. Hierarchy and positive/negative interplays of the hepatocyte nuclear factors HNF-1, -3 and -4 in the liver-specific enhancer for the human α -1-microglobulin/bikunin precursor. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 395-404.
 4. Nishio Y, Isshiki, H, Kishimoto T, Akira S. A nuclear factor for Interleukin-6 expression (NF-IL6) and the glucocorticoid receptor synergistically activate transcription of the rat α 1-acid glycoprotein gene via direct protein-protein interaction *Mol Cell Biol* 1993; 13: 1854-62.
 5. Lee YM, Miao LH, Chang CJ, Lee SC. Transcriptional induction of the α -1 acid glycoprotein (AGP) gene by synergistic interaction of two alternative activator forms of AGP/enhancer-binding protein (C/EBP β) and NF- κ B or Nopp140. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4257-63.
 6. Ramji DP, Cortese R, Ciliberto G. Regulation of C-reactive protein, haptoglobin and hemopexin gene expression. In: Mackiewicz A, Kushner I, Baumann H, eds. *Acute phase proteins. Molecular biology, biochemistry, and clinical applications*. Boca Raton: CRC Press, 1993: 365-95.
 7. Fey GH, Hocke GM, Wilson DR, Ripberger JA, Juan TSC, Cui MZ, Darlington GJ. Cytokines and the acute phase response of the liver. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, eds. *The liver: biology and pathobiology*, 3rd ed. New York: Raven Press, 1994: 113-43.
 8. Li SP, Goldman ND. Regulation of human C-reactive protein gene expression by two synergistic IL-6 responsive elements. *Biochemistry* 1996; 35: 9060-8.
 9. Alam T, An MR, Mifflin RC, Hsieh CC, Ge X, Papaconstantinou J. Trans-activation of the alpha-1-acid glycoprotein gene acute phase responsive element by multiple isoforms of C/EBP and glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1993; 268: 15681-8.
- synthèse de nombreuses protéines hépatiques est modifiée. Ces dernières sont dites protéines de la phase aiguë de l'inflammation (ou *acute phase proteins* ou APP). Toutefois, dans le cadre de cette revue, notre propos sera restreint au cadre plus étroit des APP libérées dans le plasma sanguin. Les nombreuses APP plasmatiques fournissent des marqueurs classiques de la phase aiguë [1, 2]. En effet, certaines de ces APP présentent – que ce soit très précocement, c'est-à-dire dans les premières heures de la réponse inflammatoire, ou plus tardivement, vers 24-48 heures – une concentration plasmatique augmentée fortement (jusqu'à 100 ou 1000 fois) ou modérément (2 fois ou plus) et sont dénommées alors APP « positives ». D'autres APP, moins nombreuses, présentent une concentration diminuée (2 à 5 fois) et sont dites « négatives ». Le retour de l'organisme à l'homéostasie s'accompagne d'une normalisation des taux des APP plasmatiques. Notre propos n'est pas de donner ici une liste exhaustive de ces très nombreuses APP qui comprennent, entre autres, des inhibiteurs de protéases, des protéines de la coagulation, des transporteurs, des protéines du complément et bien d'autres protéines aux fonctions encore inconnues [1, 2]. Parmi les classifications possibles des protéines hépatiques de la phase aiguë, celle la plus généralement adoptée désormais distingue deux types, I et II. Les APP de type I sont celles dont la biosynthèse est contrôlée par le TNF α et l'IL-1, agissant seuls ou en association avec l'IL-6. Les APP de type II sont sous la dépendance de l'IL-6, agissant seule ou en combinaison avec les glucocorticoïdes [1, 2]. Il est bien établi que les changements quantitatifs d'APP observés au cours de la phase aiguë ont pour cause majeure une modification de l'activité transcriptionnelle des gènes correspondants. Le propos de cette revue est de présenter au cas par cas ces mécanismes de régulation transcriptionnelle, en nous limitant à ceux dans lesquels la participation de plusieurs facteurs de transcription a été élucidée de façon détaillée et convaincante. Sans aborder ici les voies complexes de transduction du signal intrahépatocytaire qui vont des récepteurs de surface des cytokines pro-inflammatoires jusqu'aux facteurs nucléaires, nous nous placerons directement dans la situation où des facteurs de transcription actifs et porteurs d'un domaine de transactivation sont prêts à se fixer sur une zone régulatrice d'un gène. Après une présentation des facteurs plus particulièrement impliqués dans la phase aiguë nous détaillerons comment les interactions de ces facteurs, qu'elles soient synergiques ou antagonistes, peuvent aboutir à une augmentation ou à une diminution d'expression des gènes. Ainsi va se présenter toute une série de « mini-drames de la transcription » où la variété des scénarios ne le cède en rien à la complexité de chacun d'eux.

Des personnages issus de grandes familles

En situation physiologique, l'expression préférentielle d'un gène dans l'hépatocyte adulte est sous le contrôle de l'un et/ou l'autre de plusieurs facteurs nucléaires HNF (pour *hepatocyte nuclear factors*) abondants dans le foie. Quatre familles distinctes HNF-1, HNF-3, HNF-4 et HNF-6 sont décrites à ce jour et leurs représentants majeurs sont mentionnés dans le *Tableau IA*. Dans ce même *Tableau IA* sont inclus d'autres facteurs nucléaires apparentés aux familles C/EBP (*CCAAT-enhancer binding protein*) ou STAT (*signal transducer and activator of transcription*) et participant également à la transcription constitutive de gènes dans l'hépatocyte. Qu'il s'agisse des protéines HNF, C/EBP ou STAT, notons que le petit nombre des facteurs mentionnés ici reflète mal l'importance des familles auxquelles ils appartiennent et dont les membres ne sont certainement pas encore tous connus. C'est ainsi que la famille HNF-3 comporte déjà une vingtaine de protéines! Les deux familles C/EBP et STAT n'ont pris toute leur importance que lorsqu'il a été réalisé qu'elles comportent, en particulier, des facteurs intervenant dans la réponse de phase aiguë. En effet, selon que la voie de transduction du signal est activée par l'IL-1 ou l'IL-6, trois ensembles de facteurs nucléaires hépatiques ont été impliqués en priorité dans la modula-

Tableau I
PRINCIPAUX FACTEURS NUCLAIRES DE L'HÉPATOCTE DIFFÉRENCIÉ

A. Facteurs constitutifs					
Facteur	Famille ou superfamille	Effet des cytokines ¹	Dimérise avec	Domaine de dimérisation	Domaine de liaison à l'ADN
HNF-1 α)		lui-même et -1 β	spécifique de HNF1 α et β	hélice/boucle/hélice
HNF-1 β) POU/homéo ²		lui-même et -1 α		
HNF-3 α)	IL-1 : - (T)	-	-	hélice/boucle/hélice + 2 « ailes »
HNF-3 β) Forkhead ³	IL-1 : - (T)			
HNF-3 γ)				
HNF-4) Récepteurs nucléaires orphelins		lui-même	positionné par les doigts	2 doigts de Zn
COUP-TF ⁴)		lui-même	de Zn	
HNF-6	HNF-6		?	?	homéodomaine double
C/EBP α) C/EBP	IL-1 : - (T)	C/EBP α , β , γ , δ	Leu ZIP ¹¹	région basique de Leu ZIP
DBP) PAR ⁵		lui-même		
STAT5	STAT		lui-même	domaine SH2 ¹² + P-tyrosine	spécifique des STAT
B. Facteurs inductibles					
C/EBP β ⁶) C/EBP	IL-1 : + (T,P)) C/EBP α , β , γ , $\alpha\delta$	Leu ZIP ¹¹	région basique de Leu ZIP
C/EBP δ)	IL-1/IL-6 : + (T))		
p50) NF- κ B)	p65 ⁷	domaine NRD ⁸	pas d'hélice α mais boucles autour de l'ADN
p65)) TNF/IL-1 : + (I)	p50		
STAT1 α) STAT)	lui-même et STAT3 α ¹³	domaine SH2 ¹² + P-tyrosine	spécifique des STAT
STAT3 α ⁹)) IL-6 : + (P)	lui-même et STAT1 α ¹³		
Récepteur des glucocorticoïdes (récepteur nucléaire)		IL-6 : + (T)	lui-même	entre les doigts de Zn	2 doigts de Zn
c-Jun		IL-1/IL-6 : + (T)	lui-même et c-Fos ¹⁰	Leu ZIP	région basique de Leu ZIP

¹ Activité du facteur de transcription diminuée (-) ou augmentée (+) par transcription (T) de son gène, par phosphorylation (P) de la protéine ou par relargage d'un inhibiteur (I).

² Les protéines de la famille POU/homéo possèdent une homéoboîte atypique et un domaine POU.

³ La famille Forkhead, du nom de l'homologue de HNF3 chez la drosophile, compte aujourd'hui une vingtaine de membres.

⁴ Également appelé ARP-1.

⁵ La famille PAR comprend des facteurs soumis au cycle nyctéméral, impliqué dans l'apoptose.

⁶ Également appelé NF-IL6, IL6-DBP ou LAP.

⁷ Facteur NF- κ B = p50 + p65.

⁸ NRD = domaine homologue des facteurs NF- κ B/Rel/Dorsal.

⁹ Également appelé APRF.

¹⁰ Facteur AP-1 = c-Jun + c-Fos. La formation d'AP-1 est favorisée par rapport à l'homodimérisation c-Jun/c-Jun. L'homodimère c-Fos/c-Fos n'existe pas.

¹¹ Leu ZIP: leucine zipper.

¹² SH2: Src homology 2.

¹³ STAT: signal transducer and activator of transcription.

RÉFÉRENCES

10. Brasier AR, Ron D, Tate JE, Habener JF. A family of constitutive C/EBP-like DNA binding proteins attenuate the IL-1 alpha induced, NF- κ B mediated trans-activation of the angiotensinogen gene acute-phase response element. *EMBO J* 1990; 9: 3933-44.
11. Li X, Liao WSL. Cooperative effects of C/EBP-like and NF- κ B-like binding sites on rat serum amyloid A gene expression in liver cells. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 4765-72.
12. Lu SY, Rodriguez M, Liao WSL. YY1 represses rat serum amyloid A gene transcription and is antagonized by NF- κ B during acute-phase response. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 6253-63.
13. Ray A, Hannink M, Ray BK. Concerted participation of NF- κ B and C/EBP heteromer in lipopolysaccharide induction of serum amyloid A gene expression in liver. *J Biol Chem* 1995; 270: 7365-74.
14. Betts JC, Cheshire JK, Akira S, Kishimoto T, Woo P. The role of NF- κ B and NF-IL6 transactivating factors in the synergistic activation of human serum Amyloid-A gene expression by interleukin-1 and interleukin-6. *J Biol Chem* 1993; 268: 25624-31.
15. Dalmon J, Laurent M, Courtois G. The human beta-fibrinogen promoter contains a hepatocyte nuclear factor 1-dependent Interleukin-6-responsive element. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 1183-93.
16. Ripperger JA, Fritz S, Richter K, Hocke GM, Lottspeich F, Fey GH. Transcription factors Stat3 and Stat5b are present in rat liver nuclei late in an acute phase response and bind interleukin-6 response elements. *J Biol Chem* 1995; 270: 29998-30006.
17. Chen HM, Liao WSL. Differential acute-phase response of rat kininogen genes involves type I and type II interleukin-6 response elements. *J Biol Chem* 1993; 268: 25311-9.
- tion transcriptionnelle des gènes de la phase aiguë. Il s'agit, d'une part, de facteurs de la famille C/EBP et du facteur NF- κ B (*nuclear factor for κ gene B site*), qui permettent l'aboutissement du signal IL-1. Il s'agit, d'autre part, de facteurs de la famille STAT qui permettent l'aboutissement du signal IL-6. Le *Tableau IB* résume quelques caractéristiques de ces facteurs et d'autres qui, nous le verrons, ont été également impliqués dans la régulation transcriptionnelle d'au moins une APP. Si l'on conçoit que les protéines HNF, intervenant dans un contexte physiologique, ne nécessitent pas de modulation d'activité dans l'hépatocyte différencié, il en est tout autrement de NF- κ B, ou de certains facteurs C/EBP ou STAT, dont la présence et/ou l'activité doivent se limiter à la période de phase aiguë. Ces facteurs nécessitent donc des étapes d'induction par les cytokines pro-inflammatoires, étapes qui peuvent se placer à un niveau transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel (*Tableau IB*) et dont la variété et la complexité sortent du cadre de la présente revue.

Un lieu de rendez-vous, et les liaisons qui s'ensuivent

Il est désormais bien admis que l'expression préférentielle ou exclusive d'un gène dans l'hépatocyte différencié n'est pas due à la présence d'un (ou plusieurs) facteur de transcription qui serait présent dans le seul tissu hépatique mais qu'elle résulte de l'effet de plusieurs facteurs, tous indispensables et tous présents dans l'hépatocyte (ainsi que dans divers autres organes ou tissus dont la liste varie d'un facteur de transcription à l'autre). Ainsi, c'est par cette présence simultanée de plusieurs facteurs HNF que de nombreuses équipes, dont la nôtre [3], ont expliqué l'expression exclusive hépatique d'un gène d'APP. De façon générale, la transcription hépatique des gènes est le plus souvent sous la dépendance d'une combinaison de facteurs parmi ceux indiqués dans le *Tableau IA*.

Comme nous le verrons, un autre niveau essentiel du contrôle de la transcription de gènes d'APP résulte de la possible, voire nécessaire, dimé-

risation de certains facteurs de transcription. Si des homo- ou hétérodimères fonctionnels, tels HNF-1/HNF-1 ou p50/p65 (NF- κ B), sont connus de longue date (*Tableau I*), en revanche l'observation d'hétérodimérisations inhabituelles par liaison entre protéines issues de familles différentes, tels C/EBP et p50, C/EBP et p65, C/EBP et le récepteur des glucocorticoïdes (GR) ou c-Jun et Stat3 β [4, 5] est récente, inattendue et probablement annonciatrice d'autres alliances.

Enfin, il reste à indiquer un autre niveau d'interactions entre facteurs nucléaires, que ceux-ci proviennent d'une seule famille ou de plusieurs. Ces interactions peuvent avoir lieu, soit au moment de la fixation des facteurs sur la séquence nucléotidique cible (ou « site »), soit postérieurement, lors de l'activation transcriptionnelle. L'antagonisme de fixation correspond au fait que la fixation simultanée de deux facteurs est empêchée par encombrement stérique, en particulier dans le cas où les sites respectifs sont contigus ou chevauchants. De façon moins évidente, une synergie de fixation a lieu lorsque l'arrivée simultanée de deux facteurs sur deux sites voisins favorise la fixation de l'un (au moins) de ces facteurs qui, pour des raisons de faible affinité pour sa cible, ne pourrait se fixer en l'absence de l'autre. Toutefois, dans ce modèle, les modifications physiques impliquées, tant en ce qui concerne les protéines que l'ADN, ne sont généralement pas précisées. Enfin, une synergie d'activation entre facteurs correspond à une transcription dont le niveau, en présence de deux facteurs, est très supérieur à la somme des activités transcriptionnelles produites par chacun d'eux, sans toutefois que, là non plus, soient clairement compris les phénomènes physiques impliqués.

Positives de type I: NF- κ B prend le dessus

A l'heure actuelle, les mécanismes régulateurs de transcription des gènes de quatre APP de type I ont été analysés en détail au cours de la réponse inflammatoire aiguë chez l'homme ou les rongeurs. Ces APP sont la CRP (*C-reactive protein*), l'angiotensinogène (AGT), la protéine amyloïde A

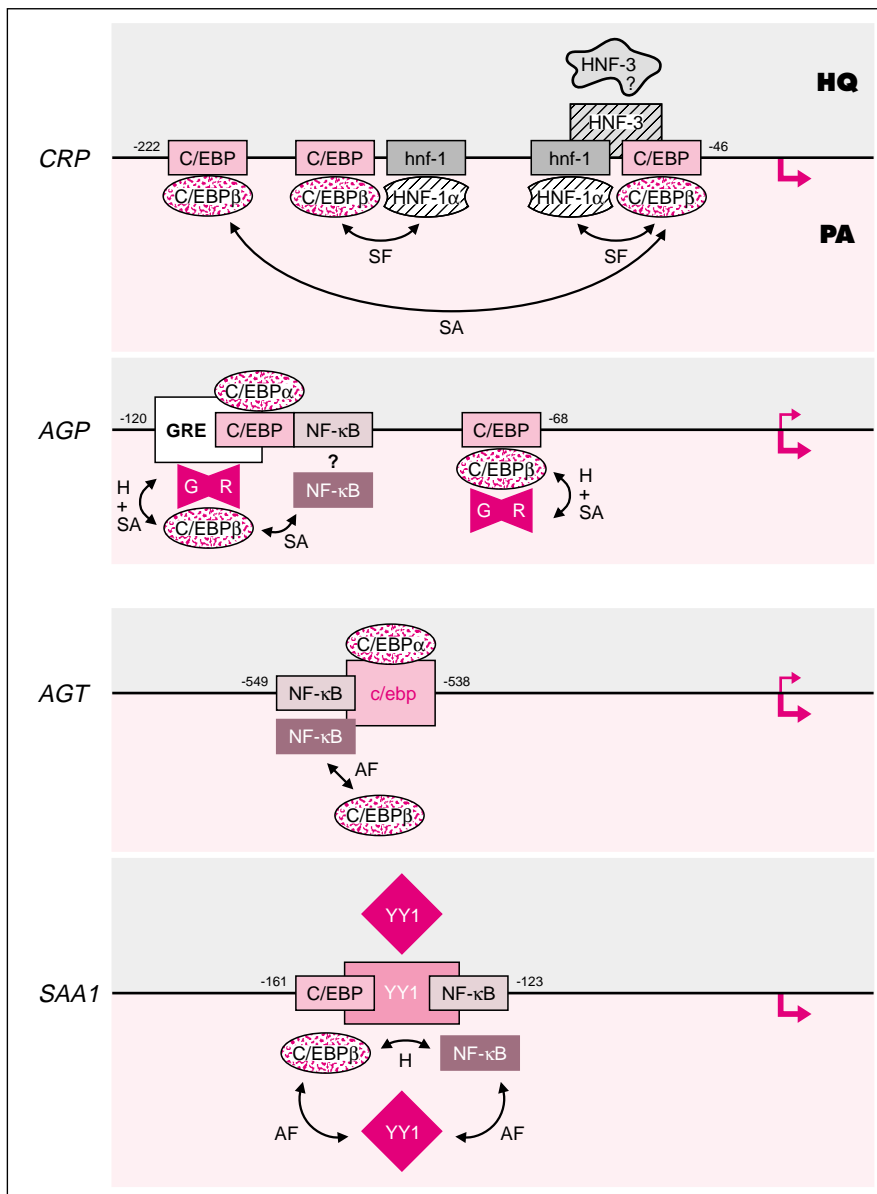


Figure 1. **Régulation transcriptionnelle de gènes d'APP positives de type I.** L'ADN génomique est représenté par une ligne continue. Le point de départ de la transcription est symbolisé par une flèche rouge coudée dont l'épaisseur est fonction du niveau de transcription du gène (absence de flèche : gène silencieux). Les sites régulateurs de chaque gène sont représentés par un rectangle identifié par un nom de famille de facteurs (les sites de faible affinité sont indiqués par le nom de famille écrit en minuscules). Les facteurs nucléaires sont symbolisés par une forme arbitraire (une forme différente par famille), qui n'est pas fonction de la présence d'un éventuel multimère. Les arrangements de facteurs dans l'hépatocyte quiescent (HQ) sont représentés au-dessus de chaque gène tandis que ceux observés au cours de la phase aiguë (PA) sont représentés au-dessous. H, hétérodimérisation inhabituelle entre facteurs de familles différentes ; AF, antagonisme de fixation ; SF : synergie de fixation ; SA : synergie d'activation. Lorsque la présence d'un facteur sur son site est douteuse, un ? sépare l'un de l'autre. Chaque gène est identifié en abrégé : CRP, protéine C-réactive ; AGP, α 1-glycoprotéine acide ; AGT, angiotensinogène ; SAA1, sérum amyloïde A. Gène AGP : sur les deux sites adjacents C/EBP et NF- κ B les interactions de facteurs GR et C/EBP β , d'une part, et NF- κ B et C/EBP β , d'autre part, doivent être envisagées comme des événements séparés, l'interaction simultanée des trois facteurs n'ayant pas été démontrée.

sérique (SAA) et l'orosomucoïde ou α 1-glycoprotéine acide (AGP) (figure 1). Les gènes CRP, SAA et AGP, quasi silencieux en situation physiologique, sont très fortement induits au cours de la phase aiguë (ARNm hépatiques $\times 10$ -100) alors qu'AGT ne l'est que modérément ($\times 4$ -5).

• Gène CRP humain

La région de réponse à l'IL-1 et l'IL-6 comprend un site C/EBP en 5' ainsi

que deux domaines constitués chacun d'un site HNF-1 de faible affinité et d'un site C/EBP. Le domaine le plus en aval comporte également un site HNF-3 chevauchant le site HNF-1. Dans l'hépatocyte quiescent, ce site HNF-3 fixe un facteur non identifié (famille HNF-3?) à effet inhibiteur de transcription. Au sein de chaque domaine, les deux sites HNF-1 et C/EBP sont indispensables à la réponse aux cytokines et leur espacement conditionne cette

réponse. Ce résultat suggère une synergie de fixation par laquelle C/EBP β stabiliserait la fixation de HNF-1 [6, 7] peut-être par complexation favorable de ce dernier avec un co-facteur [8]. En outre, le site C/EBP en 5' des deux domaines et le site C/EBP du domaine aval montrent une synergie d'activation sous l'effet de l'IL-6 [8]. Ainsi, deux niveaux de synergie pourraient expliquer la très forte transcription de ce gène au cours de l'inflammation aiguë.

RÉFÉRENCES

18. Simar-Blanchet AE, Paul C, Mercier L, Le Cam A. Regulation of expression of the rat serine protease inhibitor 2.3 gene by glucocorticoids and interleukin-6. A complex and unusual interplay between positive and negative cis-acting elements. *Eur J Biochem* 1996; 236: 638-48.
19. Kordula T, Ripperger J, Morella KK, Travis J, Baumann H. Two separate signal transducer and activator of transcription proteins regulate transcription of the serine proteinase inhibitor-3 gene in hepatic cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 6752-7.
20. Qian XB, Samadani U, Porcella A, Costa RH. Decreased expression of hepatocyte nuclear factor 3 alpha during the acute-phase response influences transthyretin gene transcription. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1364-76.
21. Pajovic S, Jones VE, Prowse KR, Berger FG, Baumann H. Species-specific changes in regulatory elements of mouse haptoglobin genes. *J Biol Chem* 1994; 269: 2215-24.
22. Kinoshita S, Akira S, Kishimoto T. A member of the C/EBP family, NF-IL6 β , forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1473-6.
23. An MR, Hsieh CC, Reisner PD, Rabek JP, Scott SG, Kuninger DT, Papaconstantinou J. Evidence for posttranscriptional regulation of C/EBP α and C/EBP β isoform expression during the lipopolysaccharide-mediated acute-phase response. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 2295-2306.
24. Darnell JE Jr. Reflections on STAT3, STAT5, and STAT6 as fat STATs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6221-4.
- **Gène AGP de rongeur (rat/souris)**
Deux sites C/EBP amont et aval sont localisés de part et d'autre d'un site NF- κ B. Dans l'hépatocyte quiescent, le site C/EBP amont fixe le facteur naturellement actif en situation physiologique, c'est-à-dire C/EBP α . Pendant la phase aiguë, C/EBP α est remplacé par C/EBP β (Tableau 1). De plus, le site C/EBP amont recouvre un site de réponse aux glucocorticoïdes (GRE). En dépit de l'antagonisme de fixation potentiel de C/EBP β et de GR sur les deux sites chevauchants C/EBP et GRE, une synergie d'activation du gène AGP par les facteurs C/EBP β et GR est observée. Le mécanisme minimal proposé consiste en une activation par fixation d'hétérodimères C/EBP β /GR sur le GRE et sur le site C/EBP aval [4, 9]. En outre, une synergie d'activation entre NF- κ B et un variant de C/EBP β a été mise en évidence sans toutefois que la fonctionnalité du site NF- κ B ait été clairement établie [5]. Le modèle présenté dans la figure 1 est une synthèse de résultats obtenus chez le rat et la souris. Il convient donc de préciser que le remplacement de C/EBP α par C/EBP β sur le gène AGP au cours de la phase aiguë n'a été montré que chez la souris [9] et que le site C/EBP aval n'a été étudié que chez le rat [4]. Enfin, soulignons que l'importance de toute cette région dans la réponse du gène AGP aux cytokines pro-inflammatoires a été relativisée: chez des souris transgéniques possédant le gène AGP de rat, ce transgène ne semble pouvoir répondre à une inflammation expérimentale que s'il a conservé un élément régulateur situé à -5kb.
- **Gène AGT de rat**
Deux sites chevauchants NF- κ B et C/EBP règlent AGT. En situation physiologique, ce gène est activé par C/EBP α fixé avec une faible affinité sur son site tandis que NF- κ B, complexé à un inhibiteur et séquestré dans le cytoplasme, n'intervient pas. Sous l'effet du signal IL-1, NF- κ B libéré de son inhibiteur adopte une localisation intra-nucléaire, entre en compétition avec C/EBP β (antagonisme de fixation) et l'emporte en raison d'une affinité pour sa cible plus forte que celle de C/EBP β pour la sienne. De plus, dans le contexte du gène AGT, NF- κ B est un plus fort transactivateur que C/EBP α et sa fixation provoque donc finalement une augmentation de transcription [10]. On notera qu'une association physique entre C/EBP et NF- κ B a pu être exclue dans ce cas, à l'opposé de ce qui se passe *ci-dessous* avec le gène SAA.
- **Gène SAA1 de rongeur (rat/lapin)**
La régulation transcriptionnelle de ce gène fait appel à un facteur dénommé YingYang1 (YY1), non mentionné jusqu'ici, et dont le nom souligne sa capacité d'être activateur ou inhibiteur de transcription, selon le gène considéré. En situation physiologique, le gène SAA1 est réprimé par YY1 fixé sur son site. Deux sites NF- κ B et C/EBP chevauchent chacun une extrémité du site YY1 et sont impliqués dans la régulation de SAA1 par l'IL-1. En effet, au cours de la phase aiguë, NF- κ B et C/EBP β (et plus tard C/EBP δ) se combinent en un hétérodimère inhabituel qui entre en compétition (antagonisme de fixation) avec YY1 et, en fonction des affinités relatives facteur/site, se fixe sur les sites C/EBP et NF- κ B au détriment de YY1. La perte d'un répresseur transcriptionnel et le gain d'un hétérodimère activateur aboutissent à une forte transcription du gène SAA1. Le modèle présenté dans la figure 1 se veut une synthèse de travaux effectués, d'une part chez le rat [11, 12], d'autre part chez le lapin [13]. Il convient donc de préciser que l'association physique entre C/EBP et NF- κ B, démontrée chez le lapin, n'a pas été recherchée chez le rat et que la présence de la protéine YY1 sur SAA1, prouvée chez le rat, n'a pas été évoquée chez le lapin. Enfin, ce modèle semble devoir s'appliquer également à la régulation du gène SAA2 humain pour laquelle l'influence d'un domaine YY1 reste toutefois à évaluer [14].
- En conclusion, lors de la transcription de gènes d'APP de type I au cours de la phase aiguë, C/EBP β joue certes systématiquement un rôle. Mais surtout, l'intervention de NF- κ B - naguère considérée comme une curiosité limitée à un ou deux gènes - s'avère un événement fréquent aboutissant, par des voies très diverses, à une augmentation de transcription.

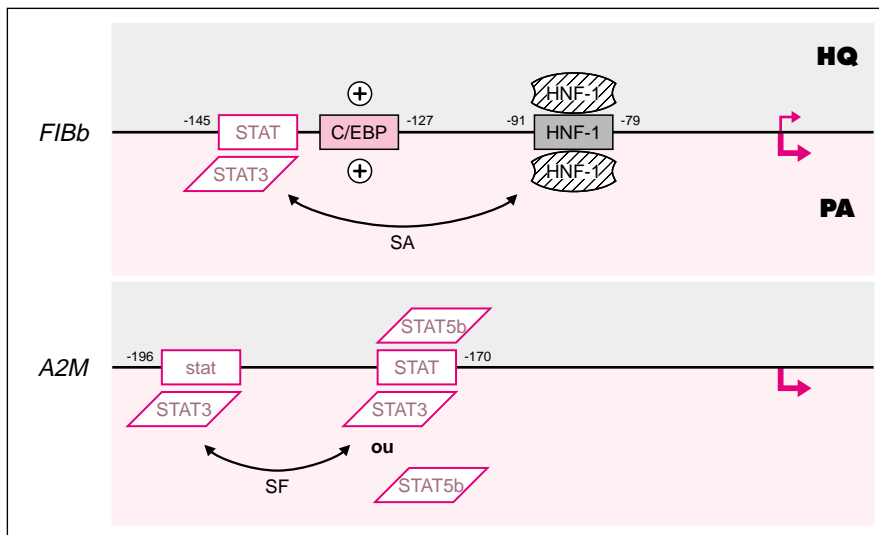


Figure 2. **Régulation transcriptionnelle de gènes d'APP positives de type II.** Symbolique générale : voir figure 1. Lorsqu'un complexe (site/facteur) participe à la transcription de façon identique dans l'hépatocyte quiescent ou au cours de la réponse inflammatoire, le facteur correspondant n'est pas représenté et l'effet positif ou négatif de ce complexe est simplement rappelé par les symboles + ou -. Chaque gène est identifié en abrégé : FIBb, chaîne β du fibrinogène ; A2M, α 2-macroglobuline.

Positives de type II : de l'utilité des STAT.

Les mécanismes régulateurs de transcription des gènes de deux APP de type II ont été analysés en détail au cours de la réponse inflammatoire aiguë. Ces APP sont la chaîne β du fibrinogène (FIBb) et l' α 2-macroglobuline (A2M) (figure 2). Le gène FIBb est induit modérément au cours de la phase aiguë (chez l'homme comme chez le rat). Le gène A2M, silencieux en situation physiologique, est très fortement transcrit au cours de la réponse inflammatoire chez le rat (mais pas chez l'homme) avec une cinétique plus tardive que celle des autres gènes de type II.

• Gène FIBb humain

Deux sites contigus STAT et C/EBP sont situés en 5' d'un site HNF-1 de forte affinité, proche du point de départ de la transcription. Le site C/EBP participe à l'expression hépatique constitutive du gène et ne semble pas impliqué dans les modifications transcriptionnelles au cours de la phase aiguë. Le site HNF-1 participe, lui aussi, à l'expression constitutive. Lors de la réponse du gène à l'IL-6, le site HNF-1 et le site STAT

sont tous deux indispensables. Toutefois, *in vitro* une délétion du site HNF-1 combinée à un rapprochement du site STAT vers le point de départ de la transcription conserve la capacité de réponse du gène à l'IL-6. Il a été proposé que le site HNF-1 ait un rôle de relais, et plus précisément de stabilisateur du complexe de démarrage transcriptionnel sur lequel agirait STAT3, sans que puisse être précisée la nature des phénomènes physiques impliqués dans la stabilisation [15]. Ce mécanisme transcriptionnel du gène FIBb, par son caractère à la fois inductible (*via* un élément de réponse aux cytokines) et relativement spécifique de tissu (*via* HNF-1), n'est pas sans analogies avec celui proposé pour le gène CRP (voir plus haut), la différence intrinsèque d'affinité des sites HNF-1 sur ces deux gènes pouvant expliquer que CRP, mais pas FIBb, soit silencieux en situation physiologique.

• Gène A2M de rat

Deux sites STAT voisins sont présents sur ce gène. Le facteur STAT3 montre une forte affinité pour le site en 3' et une faible affinité pour celui en 5'. Toutefois, une synergie de fixa-

tion de facteurs sur les deux sites permet à chacun d'eux de participer à la transactivation du gène au cours de la phase aiguë [7]. Au moins en ce qui concerne le site en 3', les facteurs impliqués se sont révélés être non seulement STAT3 mais aussi STAT5b : l'homodimère STAT5b, déjà présent et actif dans l'hépatocyte quiescent, persiste pendant la phase aiguë au cours de laquelle apparaît STAT3, chacune de ces deux protéines pouvant se fixer sur le site STAT en 3' (celui en 5' n'a pas été étudié dans ce contexte) [16]. L'effet synergique de l'IL-6 et des glucocorticoïdes sur la transcription du gène A2M reste pour l'instant non expliqué [7].

De façon plus générale, une tendance actuelle concernant les gènes d'APP de type II est l'observation qu'un nombre croissant de protéines STAT interviennent simultanément dans la transcription, le gène A2M présenté ici n'étant pas le seul exemple connu d'une telle situation.

Rencontre du troisième type ?

Classer les APP comme appartenant au type I ou au type II en fonction de voies de régulation passant respectivement par C/EBP et NF- κ B ou par STAT est une simplification qui a ses limites. En effet, un gène peut faire appel simultanément à ces deux familles de facteurs nucléaires, comme l'illustrent les exemples que sont le kininogène T1 (TIK) et le *serine protease inhibitor 2.3* (SPI2.3), deux protéines classées dans le type II, présentes chez le rat et sans équivalents connus chez l'homme. Les gènes TIK et SPI2.3, quasi silencieux en situation physiologique, sont très fortement transcrits au cours de la réponse inflammatoire (figure 3).

• Gène TIK de rat

Deux sites STAT encadrent un site C/EBP. Le site C/EBP est essentiel à la transcription du gène dans l'hépatocyte quiescent et aussi au cours de la phase aiguë. Dans ce dernier cas, il a été montré que C/EBP δ , et non pas C/EBP β , est responsable de la régulation positive du gène *via* ce site C/EBP. Les deux sites STAT sont également impliqués dans la modulation du gène par l'IL-6 et les effets relatifs

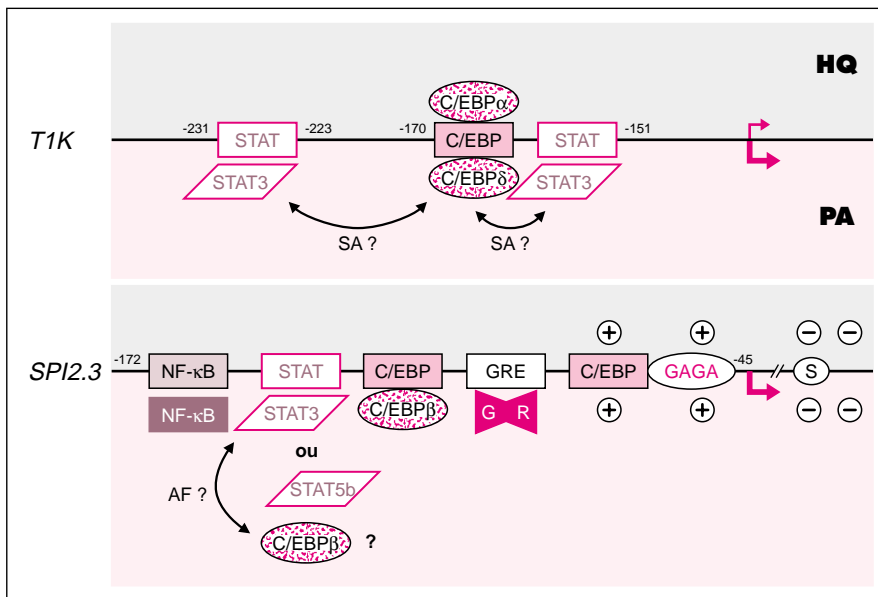


Figure 3. **Régulation transcriptionnelle de gènes d'APP positives, simultanément par des facteurs des familles C/EBP, NF-κB et STAT.** Symbolique générale : voir figures 1 et 2. Chaque gène est identifié en abrégé : T1K, kininogène T1 ; SPI2.3, sérine protéase inhibiteur 3. Un élément répresseur de transcription S (silencer) actif dans l'hépatocyte quiescent est indiqué.

des trois sites C/EBP et STAT suggèrent une synergie de l'ensemble [17]. Enfin, bien que le gène *T1K* réponde de façon additive à l'IL-6 et à la dexaméthasone, le ou les éléments et facteurs responsables de l'activation par les glucocorticoïdes ne sont pas encore caractérisés.

• Gène *SPI2.3* de rat

Ce gène comporte un élément activateur proximal fort dénommé GAGA. Dans l'hépatocyte quiescent, les effets positifs de ce site et d'un site C/EBP adjacent sont annulés par la présence – en aval du point de départ de la transcription – d'un élément répresseur (*silencer*), l'équilibre final aboutissant à un gène silencieux. Pendant la phase aiguë, sous l'effet des glucocorticoïdes et de l'IL-6 (mais pas de l'IL-1), 4 autres sites NF-κB, STAT, C/EBP et GRE en 5' des précédents interviennent dans la transcription avec une efficacité variable, la résultante étant une somme d'activations transcriptionnelles (et peut-être de synergies) qui dépasse l'effet du répresseur aval [18]. L'intérêt du promoteur du gène *SPI2.3* en tant qu'exemple de l'utilisation simultanée des facteurs NF-κB, C/EBP, STAT et GR – c'est-à-dire la quasi-totalité des facteurs

nucléaires connus pour être particulièrement impliqués dans la réponse des gènes d'APP à la phase aiguë – s'appuie, bien entendu, sur la certitude que chaque complexe site/facteur est correctement identifié et actif. Il est clair que dans ce gène le site STAT fixe STAT3 [18, 19] et aussi STAT5b [19]. Par ailleurs, le fait que les deux sites C/EBP participent à une régulation positive et que NF-κB se fixe sur sa cible sont des événements vérifiés *in vitro* [18], mais qui, pour autant, restent non orthodoxes puisque contrôlés par l'IL-6. En fait, il a été proposé qu'à une étape tardive de la phase aiguë où le taux de STAT3 diminue, C/EBPβ ait un effet négatif par fixation sur le site STAT (antagonisme de fixation avec STAT3) [19]. Cette hypothèse a le mérite d'expliquer pourquoi le gène *SPI2.3* ne répond *apparemment* pas à l'IL-1 considérée seule : l'effet de l'IL-1 pourrait consister en une fixation de C/EBPβ sur le site STAT ce qui, en l'absence d'IL-6 et donc de STAT3, serait sans incidence sur la transcription.

Les limitations techniques inhérentes aux études de promoteurs et nos connaissances encore très fragmentaires de la voie des STAT expliquent peut-être que les auteurs des études

ci-dessus n'aient pas proposé la participation parallèle de deux voies d'activation distinctes, IL-1 et C/EBP d'une part, IL-6 et STAT d'autre part, dans la régulation de certains APP. Toutefois, si ces deux voies co-existaient, ne devrait-on pas alors considérer que certains APP sont de type I + II, autrement dit de « type III » ?

Les négatives : discrétion et élégance

Les mécanismes régulateurs qui aboutissent à une diminution de transcription des gènes d'APP négatives ont été jusqu'alors trop peu étudiés. En particulier, les modifications transcriptionnelles du gène de l'albumine au cours de la phase aiguë restent à décrypter alors que, d'une part, l'albumine est quantitativement la principale protéine plasmatique et une APP négative majeure, et que, d'autre part, les très nombreuses études de la transcription du gène de l'albumine ont largement participé à l'élaboration des concepts actuels concernant la transcription hépatique en général. Ainsi, une seule régulation – notable par l'élégance du mécanisme proposé – mérite d'être détaillée. Elle concerne la transthyrétine (TTR ; anciennement « préalbumine ») dont l'ARNm est approximativement réduit de moitié dans l'hépatocyte au cours de la phase aiguë de l'inflammation.

L'expression hépatique constitutive du gène *TTR* humain (figure 4) nécessite plusieurs sites HNF-1, HNF-3 et HNF-4, dont la plupart ne seront pas évoqués plus avant. Un site HNF-3 de forte affinité chevauche un site AP-1. Rappelons que le facteur nucléaire AP-1 correspond à l'hétérodimère c-Jun/c-Fos (Tableau IB) et que ce facteur n'est présent qu'en très faibles quantités dans l'hépatocyte quiescent. En situation physiologique, l'affinité élevée de HNF-3α pour le site HNF-3 et les concentrations relatives de HNF-3α et AP-1 favorisent la fixation de HNF-3α au détriment d'AP-1 (antagonisme de fixation). Au cours de la phase aiguë, d'une part la concentration de HNF-3α diminue (Tableau IA) et d'autre part la synthèse de c-Jun, mais pas celle de c-Fos, augmente (Tableau IB), cela favorisant l'apparition d'homodimères c-Jun/c-Jun. La protéine c-Jun/c-Jun

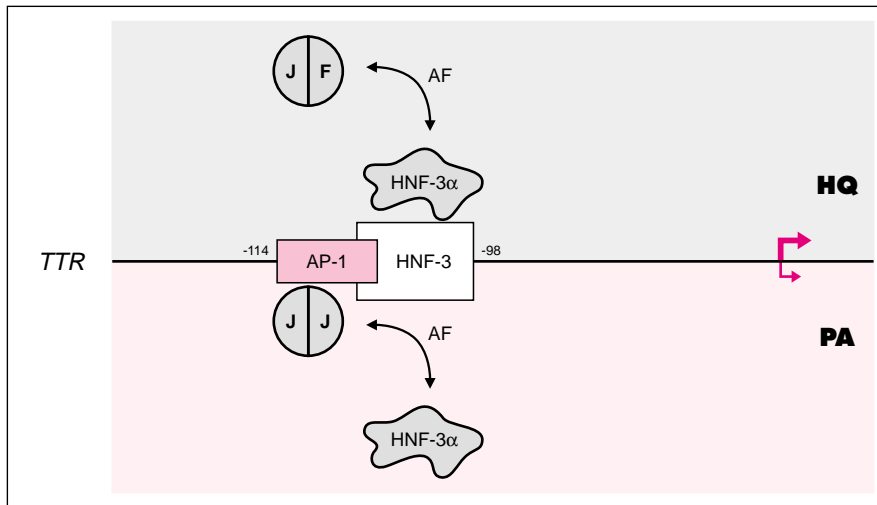


Figure 4. **Régulation transcriptionnelle d'un gène d'APP négative.** Symbolique générale : voir figure 1. Le facteur nucléaire AP-1 est représenté par l'assemblage de deux demi-sphères J (c-Jun) et F (c-Fos). TTR : gène de la transthyréline.

est apte à se fixer sur le site AP-1, tout comme c-Jun/c-Fos, mais montre un pouvoir transactivateur faible. Finalement, dans le noyau, l'équilibre molaire est modifié en faveur de c-Jun/c-Jun et en défaveur d'HNF-3α (antagonisme de fixation). Le déplacement d'un fort transactivateur (HNF-3α) de son site par un faible transactivateur (c-Jun/c-Jun) sur un site voisin aboutit à une chute d'activité transcriptionnelle [20].

Quand l'homme s'écarte du rat

Certaines APP sont positives ou négatives dans certaines espèces seulement. C'est ainsi que, chez le rat, l'A2M – un inhibiteur de protéases à large spectre d'action – est une APP positive majeure alors qu'en situation physiologique sa concentration plasmatique est quasiment nulle. Chez l'homme, en revanche, le taux physiologique d'A2M est élevé mais ne fluctue pas au cours de la phase aiguë. Et l'on doit donc s'interroger sur les raisons qui pourraient aboutir à une transcription très différente d'un gène homologue dans deux espèces. Cette question, souvent soulevée pour le gène *A2M*, n'est toujours pas résolue puisque dans ce gène les deux sites STAT de forte et faible affinité qui, en présence d'IL-6, fixent STAT3 par coopération (figure 2) sont présentes chez l'homme comme chez le rat. A l'inverse, des

régulations transcriptionnelles très différentes d'une espèce à l'autre peuvent aboutir à un résultat convergent en terme de biosynthèse d'APP. Un exemple extrême est représenté par le gène de l'haptoglobine dont les éléments de réponse aux cytokines pro-inflammatoires ont significativement évolué entre l'homme et le rat et, plus remarquablement, entre plusieurs espèces de souris. En dépit de ces divergences, l'haptoglobine demeure une APP positive chez toutes les espèces considérées [21].

Ces observations posent le problème de la signification fonctionnelle des changements quantitatifs de certaines APP. Une APP déterminée a-t-elle, en dépit de fluctuations plasmatiques variables selon les espèces, une fonction significative au cours de la phase aiguë et, si oui, une redondance fonctionnelle de certaines APP compense-t-elle une biosynthèse inadaptée de l'une d'entre elles dans une espèce déterminée? La réponse à cette question est, dans certains cas au moins, positive [1, 7]. Mais, au-delà, il nous semble particulièrement intéressant de rechercher les fonctions des APP dont la biosynthèse est réglée à l'identique dans différentes espèces.

Des complexes aux inhibitions

Il est clair que les cascades d'événements transcriptionnels proposées ici

n'ont que la valeur des méthodes mises en œuvre pour les évaluer. Les mécanismes présentés résultent le plus souvent de l'étude d'éléments régulateurs sortis de leur contexte génique naturel et doivent donc être pris comme des modèles *a minima* qui n'ont pu considérer l'éventuelle intervention d'autres éléments *cis* très distants. A ce défaut classique s'ajoute une deuxième simplification fréquente qui consiste à prendre trop peu en compte l'association préférentielle des sous-unités de certains hétérodimères au pouvoir transactivateur particulièrement marqué [5, 22]. Enfin, un troisième niveau de simplification, et peut-être le plus drastique, découle de la variabilité des facteurs transcriptionnels issus d'un même gène. Seul le cas de facteurs doués d'un pouvoir transactivateur a été envisagé jusqu'ici. Pourtant, des épissages alternatifs ou des traductions à points de départ multiples peuvent aboutir à une série de protéines nucléaires dont certaines sont dépourvues, par exemple, de domaine transactivateur. De telles protéines sont cependant aptes à hétérodimériser avec un autre facteur, le complexe occupant finalement un site sur un gène sans pouvoir transactiver efficacement ce dernier. Ainsi, des protéines dépourvues de domaine transactivateur peuvent-elles, par leur simple présence dans le noyau, aboutir à une inhibition de transcription. L'exemple historique de protéines activatrices et inhibitrices codées simultanément par le gène *C/EBPβ* a été récemment banalisé par la découverte d'une multitude d'autres isoformes issues des gènes *C/EBPα*, β et γ [5, 23]. Pour d'autres facteurs, tel STAT3, le nombre d'isoformes activatrices ou inhibitrices est également en train de croître. Ainsi, la régulation transcriptionnelle des gènes d'APP dépend-elle étroitement d'un équilibre encore mal connu entre les nombreuses variantes d'un nombre limité de facteurs de transcription. Cet équilibre est de nature dynamique puisque sujet à des modifications (rapport molaire des activateurs et des inhibiteurs) liées à l'état quiescent ou stimulé de l'hépatocyte. Malgré de telles limites, les études présentées ici s'avèrent précieuses hors même du contexte inflamma-

toire car elles proposent des mécanismes qui affinent et font évoluer nos concepts généraux des régulations transcriptionnelles dans l'hépatocyte. Toutefois, James Darnell Jr, l'un des découvreurs des facteurs STAT, soulignait tout récemment le besoin de poursuivre l'étude des éléments en *cis* « sur des douzaines de gènes activables » avant de pouvoir apprécier en détail le fonctionnement des protéines STAT placées dans des contextes nucléotidiques très variés [24]. Il ne fait nulle doute que cette recommandation s'applique directement à l'ensemble des gènes d'APP et doit être étendue à leurs autres éléments en *cis*, cibles des autres familles de facteurs transcriptionnels ■

TIRÉS À PART

J.P. Salier.

Summary

Transcription of plasma proteins genes in liver during the acute phase of a systemic inflammation

In the acute phase of a systemic inflammatory response, the so-called proinflammatory cytokines (interleukin-1 [IL-1]; IL-6) trigger significant changes in protein syntheses in liver. The hepatocyte is a source for most plasma proteins. Among the latter, many display a transient, up- (positive proteins) or down-regulated (negative proteins) synthesis during the acute phase. These regulations take place mostly at a transcriptional level and involve several families of nuclear factors. Some factors are primarily responsible for a basal and specific gene expression in liver (*i.e.* HNF factors and some factors of the C/EBP and STAT families). Other nuclear factors are mediators for the IL-1- (*i.e.* some factors of C/EBP family) or IL-6-regulated pathways (some factors of STAT family; glucocorticoid receptor). This paper reviews our knowledge of the molecular events (binding sites and factors in a given gene; synergism or antagonism between factors for gene binding; synergism in gene activation) that regulate the transcription of some genes coding for positive or negative plasma proteins. The equal importance of the NF- κ B and C/EBP factors in the IL-1-driven gene response, the growing number of STAT factors involved in the IL-6-driven one as well as, in some instances, the simultaneous involvement of both sets of IL-1- or IL-6-associated factors are outlined.