

RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES CODANT POUR LE COLLAGÈNE DE TYPE I

par

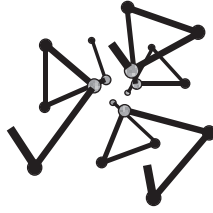
J. ROSSERT^{*,**}, G. BRIDEAU^{*}, C. TERRAZ^{*} ET V. LEJARD^{*}

Les collagènes représentent environ 30 p. 100 des protéines de l'organisme humain. Ce sont des molécules structurales de la matrice extracellulaire qui comportent un ou plusieurs domaine(s) ayant une structure en triple hélice, c'est-à-dire formé(s) de trois chaînes polypeptidiques enroulées les unes autour des autres [1]. Pour que ceci soit possible, un amino-acide sur trois doit être une glycine dans chacune des trois chaînes polypeptidiques (structure primaire de type Gly-X-Y) et chaque polypeptide doit avoir une structure hélicoïdale, de façon à ce que les glycines (qui sont les plus petits des amino-acides) soient toutes situées au centre de la triple hélice (fig. 1A). Dans un tiers des cas environ, X est une proline et Y une hydroxyproline, la présence d'hydroxyproline étant essentielle pour stabiliser la triple hélice et étant tout à fait caractéristique des molécules de collagène. À ce jour, 27 collagènes différents ont été décrits, numérotés de I à XXVII. Ces collagènes ont pu être groupés en plusieurs familles, en fonction avant tout de leur structure et/ou de leur fonction. Le collagène de type I appartient à la famille des collagènes fibrillaires, qui comprend aussi les collagènes de type II, III, V et XI. Cette famille est caractérisée par le fait que chaque molécule forme une longue triple hélice ininterrompue et que, dans l'espace extracellulaire, les molécules homologues s'organisent en fibrilles, qui sont formées de molécules parallèles les unes aux autres et régulièrement espacées (fig. 1B). Une des propriétés essentielles de ces fibrilles est leur résistance extrêmement importante à la tension.

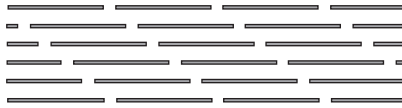
Chaque molécule de collagène de type I est constituée de deux chaînes $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$. Il y a donc deux gènes codant pour le collagène de type I : *COL1A1* (ou *COL1a1* chez la souris), qui code pour la chaîne $\alpha 1$, et *COL1A2* (ou *COL1a2* chez la souris), qui code pour la chaîne $\alpha 2$. Ces deux gènes sont situés

* INSERM U489, Université Pierre et Marie Curie. ** Service de néphrologie B, hôpital Tenon (AP-HP), Paris.

(A)



(B)



(C)

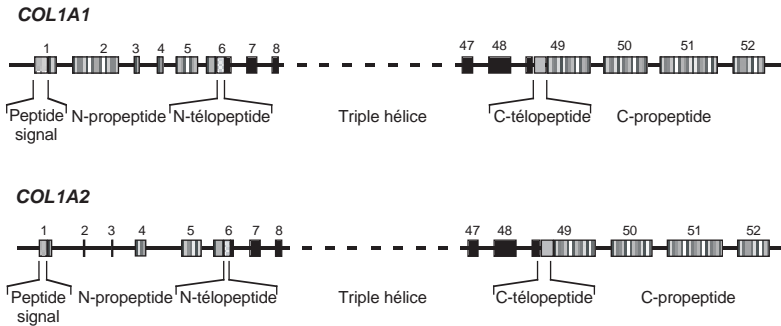


FIG. 1. — Représentation schématique (A) de la triple hélice de collagène ; (B) des fibrilles de collagène I et (C) des gènes codant pour les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I. En (A), les résidus glycyli qui sont situés au centre de la triple hélice sont schématisés en gris. En (B), chaque barre représente une molécule de collagène I.

sur deux chromosomes différents, mais ils ont une structure très semblable, qui est également très proche de la structure des autres gènes codant pour des collagènes fibrillaires (fig. 1C) [2]. Une fois synthétisée, chaque chaîne polypeptidique va subir des hydroxylations et des glycosylations, alors que les C-propeptides de deux chaînes $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$ s'associent et que la triple hélice se forme comme on fermerait une fermeture Éclair [3]. Les molécules de collagène I s'associent alors à une molécule chaperone spécifique, Hsp47, au sein du réticulum endoplasmique, ce qui stabilise les triples hélices. Les molécules de collagène I sont ensuite transportées dans des vésicules de Golgi et sécrétées dans l'espace extracellulaire sous

forme de procollagène. Les propeptides N et C terminaux sont rapidement clivés par des protéases spécifiques et les molécules de collagène mature s'assemblent pour former des fibrilles. À ces fibrilles de collagène I vont s'associer des fibrilles de collagène V, qui participent à la régulation de la taille des fibrilles de collagène de type I, ainsi que des molécules de collagènes XII et XIV. Les fibrilles de collagène de type I peuvent elles-mêmes s'assembler pour former des fibres composées de fibrilles parallèles les unes aux autres, comme dans les tendons, ou former des réseaux complexes de fibrilles enchevêtrées, comme dans la peau.

Si, au cours de la vie embryonnaire, le collagène de type I est synthétisé à relativement fort niveau, cette synthèse se ralentit beaucoup après la naissance et, chez l'adulte, il semble que le renouvellement des fibrilles de collagène I soit extrêmement lent. Il suffit donc probablement d'un discret excès de synthèse du collagène de type I pour induire l'apparition progressive d'une maladie fibrosante, ce qui implique que la régulation de la synthèse du collagène de type I, qui est avant tout une régulation transcriptionnelle, doit être extrêmement précise.

RÉGULATION DE L'EXPRESSION TISSU-SPÉCIFIQUE DES GÈNES CODANT POUR LE COLLAGÈNE I

Le collagène de type I, bien qu'il soit présent dans la quasi-totalité des organes, n'est synthétisé que par un nombre limité de cellules, avant tout les fibroblastes, les ostéoblastes et les odontoblastes. L'analyse de l'expression tissu-spécifique des gènes correspondants, si elle n'a pas encore permis d'identifier les mécanismes moléculaires responsables de la différenciation des cellules mésenchymateuses en fibroblastes, a cependant permis de bien mettre en avant l'hétérogénéité structurale des fibroblastes. Nous envisagerons d'abord la régulation de l'expression des gènes codant pour le collagène de type I dans les ostéoblastes puis la régulation de l'expression de ces gènes dans les fibroblastes.

Régulation de l'expression des gènes codant pour le collagène de type I dans les ostéoblastes

Très peu de choses sont connues quant à la régulation de l'expression du gène codant pour la chaîne $\alpha 2$ du collagène de type I dans les ostéoblastes. Nous nous concentrerons donc sur la chaîne $\alpha 1$.

L'analyse de souris transgéniques exprimant un gène rapporteur sous le contrôle de différents segments du promoteur proximal du gène (humain, de souris ou de rat) codant pour la chaîne $\alpha 1$ du collagène I a montré que 2,3 kb de ce promoteur proximal sont suffisants pour induire une expression à haut niveau du gène rapporteur spécifiquement dans les cellules ostéoblastiques [4-6]. Récemment, ces résultats ont d'ailleurs été reproduits en croisant des souris *ROSA 26 reporter* (R26R) avec des souris exprimant le gène *Cre* sous le contrôle des 2,3 kb du promoteur proximal de *COL1a1* [7]. Deux éléments *cis*-régulateurs qui jouent un rôle clef dans la régulation de l'expression de *COL1a1* dans les ostéoblastes ont été identifiés au sein de cette séquence de 2,3 kb. Le premier est un segment de 117 pb, situé environ 1,6 kb en amont du site d'initiation de la transcription [8]. Il lie un facteur de transcription en

doigts de zinc appelé osterix, qui joue un rôle clef dans la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes [9], ainsi qu'un autre facteur de transcription spécifique des ostéoblastes qui n'a pas encore été identifié [8]. Le second élément *cis* est un segment court situé à environ - 1,3 kb et qui lie le facteur de transcription Runx2/Cbfa1 [10]. Il est probable que ces deux éléments coopèrent entre eux pour induire l'expression du gène codant pour de la chaîne $\alpha 1$ du collagène I spécifiquement dans les ostéoblastes. Cependant, en transgénèse, la multimérisation de l'un des deux éléments compense l'absence de l'autre et permet l'expression du gène rapporteur *lacZ* ou *luciférase* spécifiquement dans les ostéoblastes.

Régulation de l'expression des gènes codant pour le collagène de type I dans les fibroblastes

L'analyse des éléments *cis*-activateurs régulant l'expression des gènes codant pour le collagène de type I dans les fibroblastes a permis d'illustrer de façon très démonstrative l'hétérogénéité de cette population cellulaire.

Si l'on considère *COL1a1*, l'analyse de souris transgéniques a montré que le segment de promoteur compris entre - 2,3 kb et - 3,2 kb contient deux éléments *cis*-activateurs, situés à environ 500 pb l'un de l'autre, qui coopèrent pour induire l'expression du gène rapporteur *lacZ* spécifiquement dans les fibroblastes tendineux au cours du développement embryonnaire [11]. L'identification des facteurs *trans* qui se lient à chacun de ces deux éléments *cis* et qui sont présents sélectivement dans les fibroblastes tendineux est en cours.

Si l'on considère maintenant le gène codant pour la chaîne $\alpha 2$ du collagène I, l'étude du promoteur de *COL1a2* à l'aide d'expériences de transgénèse a permis de renforcer de façon très importante la notion d'hétérogénéité moléculaire des fibroblastes. Au sein de ce promoteur, un élément situé entre - 13,5 et - 19,5 kb et appelé *far-upstream enhancer* contient trois sites hypersensibles à la DNase I (appelés HS3, HS4 et HS5) [12]. Lorsque ce segment de 6 kb est cloné en amont des 350 pb du promoteur proximal de *COL1a2*, il induit, au cours du développement embryonnaire, une expression à haut niveau des gènes rapporteurs *lacZ* et *luciférase* dans la quasi-totalité des cellules fibroblastiques de souris transgéniques (à l'exception des fibroblastes tendineux différenciés), mais pas dans les ostéoblastes des os longs [12]. Par contre, la délétion d'un segment de 400 pb situé en amont de HS4 inhibe plus ou moins totalement l'expression du gène rapporteur *lacZ* dans les cellules fibroblastiques présentes au sein des aponévroses, des muscles striés et de la plupart des organes [13]. De même, la délétion de HS3 inhibe l'expression de *lacZ* dans les cellules fibroblastiques, à l'exception des fibroblastes situés au niveau des tendons, des aponévroses et des muscles des membres [13]. En particulier, les cellules fibroblastiques situées au sein des organes ne sont pas colorées par X-gal. Enfin, la délétion de HS4 inhibe l'expression de *lacZ* dans toutes les cellules fibroblastiques, à l'exception des fibroblastes des tendons et des aponévroses de la queue [13].

Mode d'action des éléments tissu-spécifiques

L'analyse des sites hypersensibles à la DNase I au sein des promoteurs de *COL1A1*, de *COL1a1* et de *COL1a2* et des expériences d'empreinte *in vivo* ont clairement mis en évidence des différences importantes dans la structure chroma-

tinienne des gènes codant pour le collagène de type I entre les cellules qui synthétisent ou non du collagène de type I. Ainsi, des expériences d'empreinte *in vivo* ont montré qu'un facteur de transcription ubiquitaire comme CBF/NF-Y ne peut se fixer au promoteur proximal de *COL1a1* ou *COL1a2* que dans des cellules où les gènes codant pour le collagène de type I sont activement transcrits [14]. De même, les sites hypersensibles à la DNase I situés au sein du *far-upstream enhancer* de *COL1a2* (cf. supra) ne sont présents que dans les cellules ou les tissus qui synthétisent du collagène de type I [12]. De plus, la comparaison des résultats obtenus lors d'expériences de transfection transitoire, de transfection stable et de transgénèse ont montré que la modulation de la structure de la chromatine joue un rôle clef dans la régulation de l'expression des gènes codant pour le collagène de type I puisque seules les expériences de transfection stable reproduisent les résultats obtenus en transgénèse (Rossert et coll., observations non publiées). Il est donc probable que la modification de la structure chromatinienne joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes codant pour le collagène de type I.

EXPRESSION BASALE DES GÈNES CODANT POUR LE COLLAGÈNE DE TYPE I

Une des caractéristiques des gènes codant pour le collagène de type I, et en particulier du gène codant pour la chaîne $\alpha 1$, est la très forte activité de leurs promoteurs proximaux, dans des expériences de transfection transitoire. Ces promoteurs contiennent plusieurs sites de fixation pour des facteurs de transcription de la famille Sp1 et des expériences de transfection effectuées avec des oligonucléotides antisens ou leurre ont montré que, effectivement, Sp1 joue un rôle important à la fois dans l'expression de constructions contenant le promoteur proximal de *COL1a1* ou *COL1a2* cloné en amont d'un gène rapporteur et dans l'expression « basale » de *COL1a2* [15]. Ainsi, par exemple, la transfection de fibroblastes NIH/3T3 avec un vecteur d'expression antisens correspondant à Sp1 inhibe l'expression de *COL1a2* de plus de 70 p. 100. Les résultats d'études génétiques récentes suggèrent qu'un site Sp1 situé au sein du premier intron de *COL1A1* intervient également dans la régulation du niveau d'expression de ce gène par les ostéoblastes [16]. En effet, il existe un polymorphisme fréquent dans le premier intron de *COL1A1* (polymorphisme G/T en position + 1 242), au sein d'un site de liaison pour Sp1, et les femmes hétérozygotes G/T ou homozygotes T/T ont, d'une part une densité osseuse plus faible et d'autre part, un risque accru de développer une ostéoporose sévère quand on les compare à des femmes homozygotes G/G.

Le contraste entre l'activité transcriptionnelle forte des promoteurs proximaux des gènes codant pour le collagène I et la faible synthèse de collagène I à l'état de base chez l'adulte suggère que des mécanismes inhibiteurs très puissants régulent l'expression de ces gènes, empêchant ainsi qu'il n'y ait en permanence une production importante de collagène de type I. Récemment, à l'aide d'expériences de transgénèse et de transfection, nous avons identifié un élément *cis*-répresseur de 123 pb, localisé environ 14 kb en amont du site d'initiation de la transcription de *COL1a1* [17]. Cet élément, que nous avons appelé COIN-1 (pour *Collagen INhibitor-1*), consiste en un motif de 41 pb répété trois fois, chacun des motifs contenant une séquence CACCTG, connue sous le nom de boîte E2. L'effet répresseur de COIN-1

est dû à la liaison d'un facteur de transcription, nommé δ EF1, qui est exprimé dans toutes les structures dérivées du mésoderme et qui est particulier par le fait qu'il possède deux sites de liaison à l'ADN. Le rôle de δ EF1 dans la régulation de l'expression des gènes codant pour le collagène I est illustré par le fait que la sur-expression de δ EF1 dans des cellules ostéoblastiques induit une diminution très marquée de l'expression de *COL1a1* [17]. Ce facteur de transcription pourrait donc jouer un rôle important dans la régulation de l'expression basale des gènes codant pour le collagène I.

RÉGULATION DU NIVEAU DE SYNTHÈSE DU COLLAGÈNE DE TYPE I

Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur la régulation de la synthèse de collagène de type I par les fibroblastes.

Transforming growth factor β (TGF- β)

Le TGF- β est sans aucun doute le plus connu des facteurs profibrosants. Chez les mammifères, la famille du TGF- β comprend trois membres, le TGF- β 1, le TGF- β 2 et le TGF- β 3, qui ont des patrons d'expression différents et des rôles différents *in vivo*, mais des actions biologiques similaires *in vitro*. Ces protéines sont sécrétées par de nombreuses cellules, y compris les macrophages, les lymphocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, et certaines cellules rénales comme les cellules mésangiales, les cellules tubulaires proximales et les cellules du canal collecteur. Parmi les stimuli qui augmentent la synthèse de TGF- β figurent le PDGF, l'angiotensine II, les produits de peroxydation lipidique et l'hypoxie et il est probable que tout ou partie de leurs effets profibrosants soient dus à une production accrue de TGF- β .

Le TGF- β est sécrété sous forme de pro-TGF- β , inactif. Après clivage du pro-peptide (encore appelé LAP, pour *TGF- β Latency Associated Peptide*), celui-ci s'associe de manière non covalente avec le TGF- β mature, le rendant inactif. Un autre peptide, appelé LTBP (pour *Latent TGF- β Binding Protein*), s'associe alors au complexe précédent, l'ensemble formant le TGF- β latent [18]. LTBP permet la liaison du TGF- β latent aux protéines de la matrice extracellulaire, ce qui fait que le TGF- β latent peut être considéré comme une forme de stockage locale du TGF- β . Les mécanismes permettant la dissociation du TGF- β actif de LTBP et LAP, bien qu'essentiels, sont encore assez mal connus. La thrombospondine 1 (TSP-1), la plasmine, les MMP-2 et 9 et l'intégrine β_6 sont capables d'activer le TGF- β *in vitro*, mais TSP-1 est le seul activateur dont le rôle ait été clairement montré *in vivo*, grâce à l'analyse de souris invalidées [19]. Il s'agit d'une glycoprotéine matricellulaire trimérique qui est présente en grande quantité dans les plaquettes mais qui est aussi produite par d'autres cellules comme les macrophages, les fibroblastes, les cellules mésangiales et certaines cellules tubulaires [20]. La TSP-1 active le TGF- β latent en se liant au LAP, ce qui modifie sa conformation et induit la libération du TGF- β actif [21]. Par ailleurs, la TSP-1 a des propriétés anti-angiogéniques, probablement médiées par des interactions avec le FGF basique, le

VEGF ou avec des molécules de surface comme CD36 ou certaines intégrines [20]. Il est à noter que l'angiotensine II induit la production de TSP-1 alors qu'à l'inverse l'oxyde nitrique l'inhibe.

Le TGF- β est susceptible d'augmenter la production de la plupart des composants de la matrice extracellulaire, et notamment de collagène de type I, par les fibroblastes. Il agit avant tout en augmentant la transcription des gènes correspondants, mais également en augmentant la stabilité des ARN messagers. Par ailleurs, le TGF- β est chimiotactique pour les fibroblastes, il stimule leur prolifération, il inhibe la synthèse de collagénases et augmente la synthèse des inhibiteurs des métalloprotéases que sont les TIMPs (pour *Tissue Inhibitors of MétalloProtéases*) et le PAI-1 (pour *Plasminogen Activator Inhibitor 1*). Ses effets sur la production de matrice extracellulaire par les cellules fibroblastiques ont pu être confirmés *in vivo* dans plusieurs modèles. Ainsi, par exemple, l'injection sous-cutanée de TGF- β à des souriceaux nouveau-nés augmente la synthèse de collagène de type I par les fibroblastes cutanés et induit la formation d'un tissu fibreux [22]. Ainsi encore, des souris transgéniques surexprimant le TGF- β 1 actif sous le contrôle du promoteur de l'albumine développent une fibrose hépatique et, pour celles qui expriment le transgène au plus fort niveau, une fibrose interstitielle rénale et des lésions de glomérulosclérose [23]. À l'inverse, on peut, en inhibant les effets du TGF- β , inhiber l'accumulation de matrice extracellulaire dans différents modèles de maladies fibrosantes.

Les mécanismes intracellulaires qui sont responsables des effets du TGF- β sont beaucoup mieux compris depuis l'identification des protéines Smad, qui relaient tout ou partie des effets intracellulaires du TGF- β (fig. 2) [24]. De plus, un élément de réponse au TGF- β (appelé CyRC ou TbRE) a été clairement identifié au sein du promoteur proximal de *COL1A2* et étudié en détail [3]. Après clivage du LAP et du LTBP, le TGF- β actif se fixe sur le récepteur de type II, qui est un récepteur constitutivement actif de type sérine-thréonine kinase. Le récepteur de type II couplé au TGF- β s'hétérodimérise alors avec un autre récepteur de type sérine-thréonine kinase, le récepteur de type I, et l'active en phosphorylant son domaine juxtamembranaire. Le récepteur de type I actif se lie alors aux R-Smads que sont Smad2 et Smad3. Après phosphorylation, Smad2/3 s'associe avec une protéine appartenant au groupe des Co-Smads, Smad4, pour former un complexe qui est ensuite importé dans le noyau, ce qui permet la liaison de Smad 2/3 à l'élément de réponse au TGF- β de *COL1A2*. La transactivation de *COL1A2* par les protéines Smad nécessite leur interaction avec le facteur de transcription en doigt de zinc Sp1, qui se lie également à l'élément de réponse au TGF- β , et avec les co-activateurs CBP/p300. Le rôle d'API a également été évoqué, mais il reste très controversé. CBP/p300 ne lie pas directement l'ADN mais se lie à de multiples facteurs de transcription et active la transcription à la fois en interagissant avec des composants de la machinerie transcriptionnelle de base et en induisant la phosphorylation d'histones, ce qui favorise l'ouverture de la chromatine [25].

Au cours de ces dernières années, une protéine extracellulaire appelée CTGF/CCN2 (pour *Connective Tissue Growth Factor* et pour *Connective tissue growth factor, Cysteine-rich 61, Nephroblastoma overexpressed 2*) a été l'objet d'un intérêt croissant, car elle semble relayer une partie des effets profibrosants du TGF- β . Il s'agit d'une protéine de 38 kDa, riche en cystéine, dont la production est augmentée par le TGF- β , alors qu'elle est inhibée par le TNF- α ou l'oxyde nitrique [26]. *In vitro*, le CTGF a un effet prolifératif et chimiotactique sur les fibroblastes et il

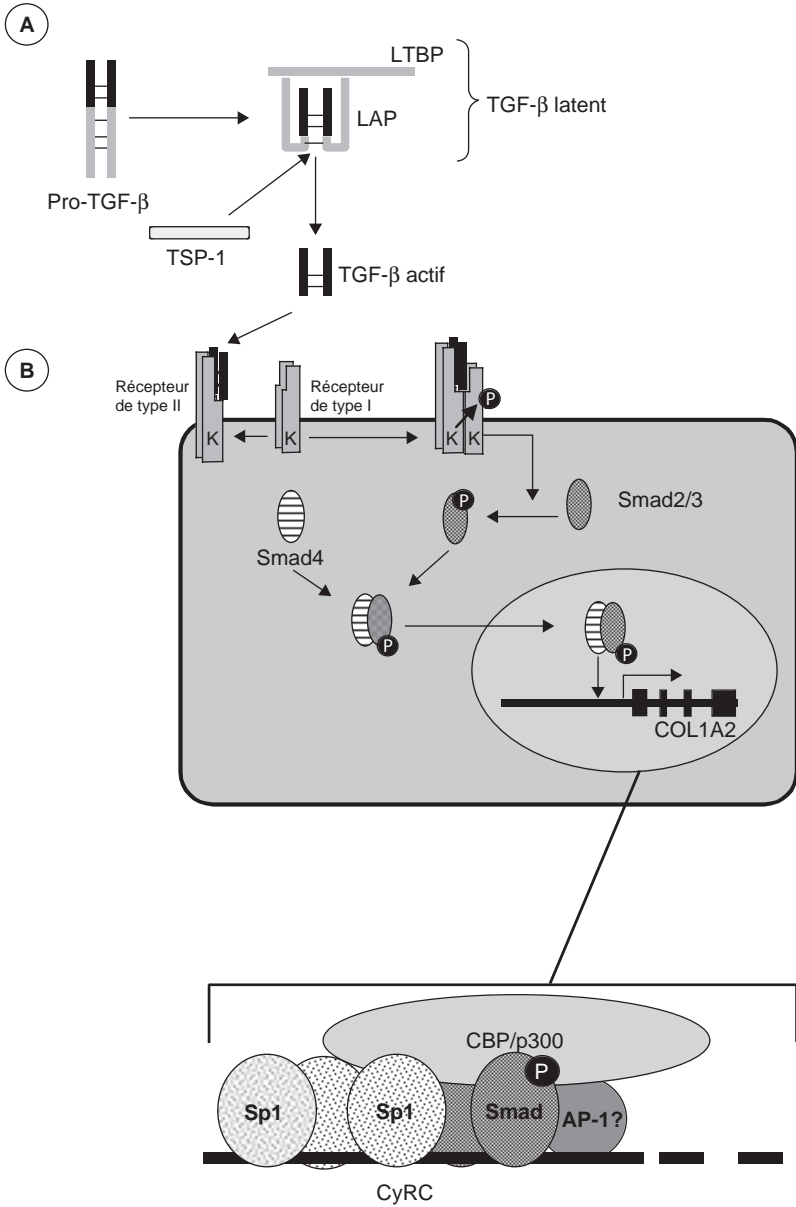


FIG. 2. — Représentation schématique (A) des mécanismes d’activation du TGF-β ; et (B) des mécanismes d’activation de la transcription de COL1A2 sous l’influence du TGF-β. Voir texte pour détails.

stimule la synthèse des principaux composants de la matrice extracellulaire, dont le collagène de type I [27]. *In vivo*, la présence d’une quantité accrue d’ARN messager codant pour le CTGF a été mise en évidence dans divers modèles expérimentaux caractérisés par une accumulation de matrice extracellulaire et chez

l'homme au cours de l'évolution de maladies fibrosantes notamment rénales [28]. Le mode d'action du CTGF reste mystérieux puisque le récepteur du CTGF n'a jusqu'alors pas été identifié, même si l'on sait qu'une partie de ses effets sont médiés par sa liaison à l'intégrine β_3 , et que les voies de signalisation du CTGF sont encore très mal connues. La régulation de la synthèse du CTGF par le TGF- β semble être transcriptionnelle et un élément de réponse au TGF- β appelé TGF- β RE, a été identifié au sein du promoteur de *CTGF* [29]. Cette séquence est capable de lier spécifiquement les complexes Smad3-Smad4 et l'étude de la régulation de CTGF dans un modèle de sclérodémie montre que la voie des Smads est effectivement nécessaire à l'induction du CTGF par le TGF- β [29]. Il faut cependant remarquer que l'expression constitutive de CTGF observée chez les patients atteints de sclérodémie est indépendante de la voie des Smads, même si elle dépend de facteurs capables de se lier au TGF- β RE [30].

Interféron γ (IFN- γ)

L'IFN- γ est une cytokine produite à la fois par les lymphocytes T auxiliaires de type Th1 et par les cellules NK. Elle joue un rôle essentiel dans les réponses immunes innées ou acquises et elle inhibe également la production de matrice extracellulaire. En effet, *in vitro*, l'IFN- γ diminue à la fois la prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène de type I par ces cellules et, *in vivo*, il diminue la synthèse des composants de la matrice extracellulaire, et notamment du collagène de type I, dans plusieurs modèles [3]. Ainsi, par exemple, l'IFN- γ diminue la fibrose cutanée induite par une blessure ou par l'insertion d'un corps étranger et il protège de la fibrose hépatique induite par un toxique ou par *Schistosoma mansoni* ou de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. Il faut cependant noter que l'effet protecteur de l'IFN- γ pourrait être en partie indirect, lié à une diminution de la production de TGF- β et, pour la fibrose hépatique, à une inhibition de la transdifférenciation des cellules étoilées en myofibroblastes.

L'effet de l'IFN- γ sur la production de collagène I est dû à une diminution de la stabilité des ARN messagers correspondants, mais également et surtout à une inhibition de la transcription des gènes codant pour le collagène de type I [31]. Les mécanismes médiant cette inhibition de la transcription ont été récemment élucidés (fig. 3). La plupart des effets transcriptionnels activateurs de l'IFN- γ sont médiés par la voie Jak1/Stat1 ; la phosphorylation de Stat1 sur un résidu tyrosine induisant la formation d'homodimères qui sont transloqués dans le noyau et activent la transcription en se fixant à des éléments de réponse à l'IFN- γ appelés GAS (pour *γ -activated sites*) et en liant les protéines coactivatrices que sont CBP/p300. Parmi les gènes régulés par l'IFN- γ figure celui codant pour CIITA (pour *major histocompatibility Class II Trans-Activator*). CIITA est un coactivateur qui interagit avec les facteurs de transcription RFX, CREB et CBF/NF-Y et avec CBP/p300 et joue un rôle clef dans l'activation des gènes codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II [32]. Il semble que les effets inhibiteurs de l'IFN- γ sur la transcription d'un certain nombre de gènes, dont ceux codant pour le collagène I, passent par une déplétion relative en CBP/p300 [33]. Dans ce modèle, la liaison de CBP/p300 à Stat1 γ et/ou à CIITA diminue la quantité de protéines disponibles pour activer d'autres gènes dépendant de CBP/p300, et notamment les gènes codant pour le collagène de type I. Cette titration de CBP/p300, qui constitue un mécanisme original de répression, rendrait compte aussi

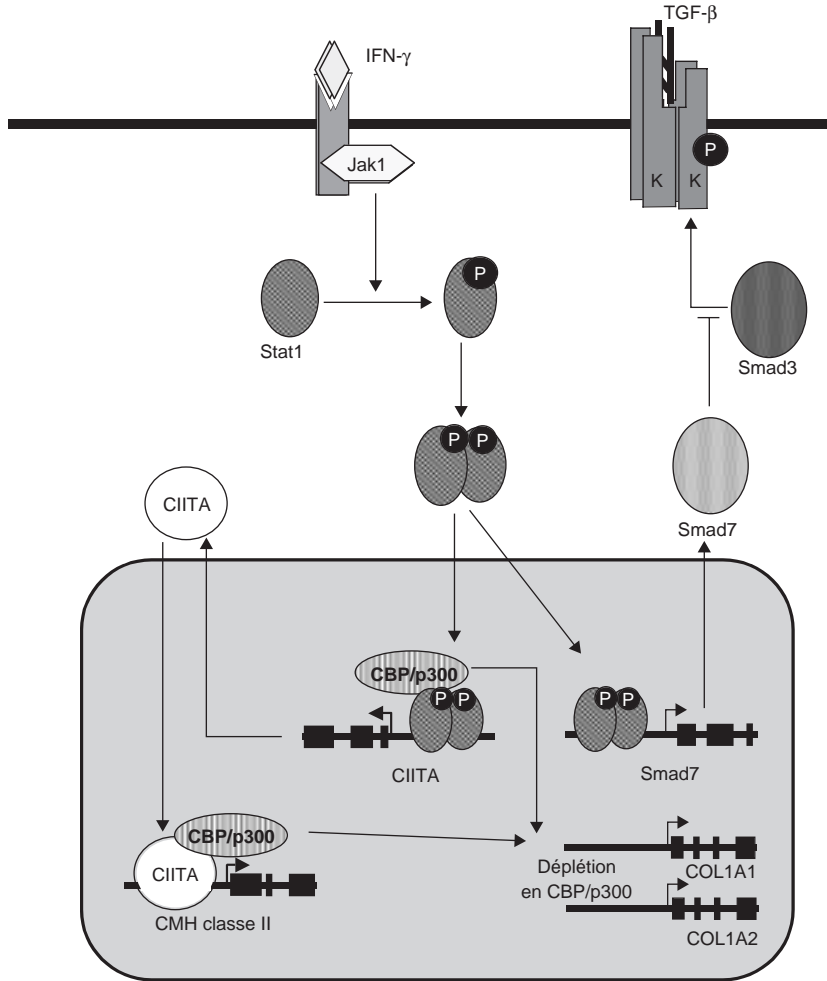


FIG. 3. — Représentation schématique des mécanismes par lesquels l'IFN- γ inhibe la transcription des gènes codant pour le collagène I. Voir texte pour détails.

bien de l'inhibition de la transcription « constitutive » des gènes codant pour le collagène de type I que de l'inhibition des effets du TGF- β . Par ailleurs, l'IFN- γ , par l'intermédiaire de la voie Jak1/Stat1, augmente l'expression de la protéine inhibitrice Smad7 qui se lie au récepteur de type I du TGF- β et inhibe la phosphorylation de Smad3 (figure 3) [34].

Tumor necrosis factor α (TNF- α)

Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée avant tout par les macrophages activés. Il stimule la prolifération des fibroblastes mais inhibe la production de collagène de type I, comme cela a été montré *in vitro* et *in vivo* dans des modèles

de fibrose cutanée ou hépatique [3]. De plus, il augmente la production de collagénases interstitielles (MMP-1 et MMP-13), et donc la dégradation des molécules de collagène de type I.

Des expériences *in vitro* ont montré que le TNF- α inhibait l'expression « constitutive » des gènes codant pour le collagène de type I et qu'il s'opposait également aux effets activateurs du TGF- β sur la transcription de ces gènes (fig. 4) [3]. Par ailleurs, l'analyse du promoteur proximal de *COL1A2* a montré que le TNF- α et le TGF- β agissaient sur une même séquence *cis* appelée CyRC (pour *CY*tokine *R*esponsive *C*omplex), située entre -330 et -235 pb [35]. Récemment, l'étude de

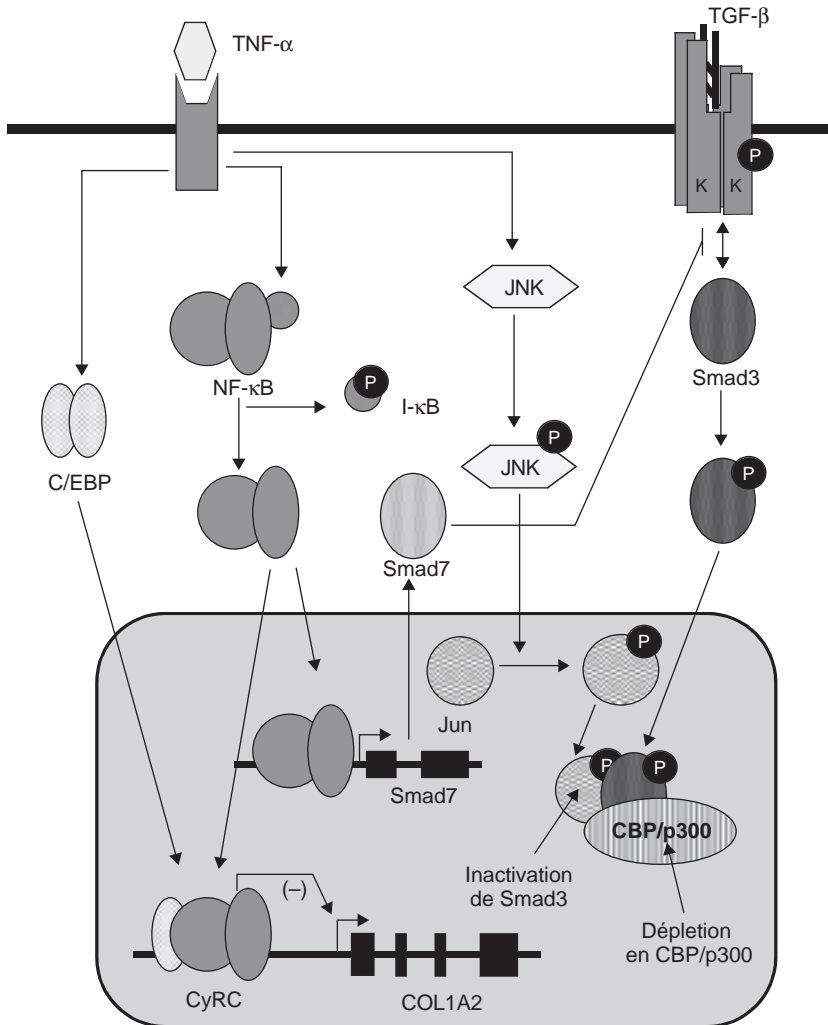


FIG. 4. — Représentation schématique des mécanismes par lesquels le TNF- α inhibe la transcription des gènes codant pour le collagène I. Voir texte pour détails.

CyRC a montré que le TNF- α induisait la liaison de facteurs de transcription appartenant à la famille C/EBP (pour *CCAAT/Enhancer-Binding Proteins*) et du facteur de transcription NF- κ B et que ceux-ci étaient responsables de l'inhibition de la transcription de *COL1A2* [36, 37]. La liaison de ces protéines inhiberait la transcription en empêchant la liaison de Sp1, et peut-être d'autres facteurs de transcription, à CyRC. Une partie des effets inhibiteurs du TNF- α sur la transcription de *COL1A1* semble également médiée par C/EBP, mais des expériences faites avec des souris transgéniques ont montré que différents éléments *cis* sont responsables des effets inhibiteurs du TNF- α en fonction des tissus [38-40]. Les effets opposés du TNF- α et du TGF- β sur la transcription des gènes codant pour le collagène I sont également liés à des interactions entre des protéines du complexe AP-1 comme c-jun, phosphorylées par JNK (pour c-jun N-terminal associated kinase) sous l'action du TNF- α , et Smad3 [41]. Il en résulte la formation de complexes protéiques Jun-Smad3 qui empêchent la liaison de Smad3 à l'ADN et qui lient CBP/p300, entraînent une déplétion relative en protéines CBP/p300. De plus, NF- κ B peut également induire la synthèse de Smad7 et s'opposer ainsi aux effets du TGF- β [42]. Enfin, en plus de ses effets directs sur la transcription, le TNF- α augmente la production de prostaglandine E2 (PGE2) par les fibroblastes, ce qui pourrait participer également à l'inhibition de la production des composants de la matrice extracellulaire.

Interleukine 1 (IL-1)

L'IL-1 est une cytokine pro-inflammatoire qui, comme le TNF- α , est sécrétée principalement par les macrophages activés, mais aussi par certaines cellules épithéliales. *In vitro*, comme le TNF- α , l'IL-1 stimule la prolifération des fibroblastes, inhibe la production de matrice extracellulaire et augmente la production de collagénases interstitielles (MMP-1 et MMP-13). Il est probable que l'action inhibitrice de l'IL-1 sur la production de collagène de type I est due avant tout à une stimulation de la production de PGE2. En effet, alors que *in vitro* l'IL-1 diminue constamment la production de collagène I par les fibroblastes, l'addition d'un inhibiteur de la cyclo-oxygénase au milieu de culture abolit partiellement ou totalement cet effet inhibiteur [43]. Dans certains cas, on observe même une augmentation de la production de collagène de type I. Les mécanismes rendant compte de l'effet direct de l'IL-1 sur la transcription des gènes codant pour le collagène de type I restent très mal compris, mais on peut cependant noter que, comme pour le TNF- α , une partie des effets transcriptionnels de l'IL-1 sont médiés par NF- κ B et par C/EBP β et δ .

Prostaglandine E2 (PGE2)

La PGE2 est synthétisée par de nombreuses cellules et notamment par les cellules endothéliales, les macrophages et les fibroblastes ; sa production par les fibroblastes étant augmentée par l'IL-1 et par le TNF- α . La PGE2 diminue la synthèse de collagène de type I par les fibroblastes en inhibant la transcription des gènes correspondants. De plus, la PGE2 inhibe la prolifération des fibroblastes et augmente la production de métalloprotéases. La plupart des effets de la PGE2 sont dus à une augmentation des taux d'AMPC intracellulaire, et c'est le cas par exemple

de l'inhibition de la prolifération des fibroblastes. Néanmoins, les effets de la PGE2 sur la transcription des gènes codant pour le collagène I semblent dépendants de la protéine kinase C [44].

Autres facteurs modulant la synthèse de collagène I par les fibroblastes

L'interleukine 4 (IL-4) est une cytokine sécrétée par les lymphocytes T auxiliaires de type Th2. *In vitro*, l'IL-4 augmente la production de collagène de type I par les fibroblastes et cet effet est dû à la fois à une augmentation de la transcription des gènes correspondants et à une augmentation de la stabilité des ARN messagers [3].

L'interleukine 10 (IL-10) est une cytokine sécrétée avant tout par les monocytes/macrophages et par les lymphocytes T auxiliaires de type Th2. *In vitro*, elle inhibe la production de collagène de type I par les fibroblastes cutanés en inhibant la transcription [3].

L'oncostatine M, qui est produite avant tout par les lymphocytes T activés et par les macrophages, est mitogène pour les fibroblastes et augmente la production de collagène I. L'effet de l'oncostatine M sur la synthèse du collagène I est transcriptionnel et un élément de réponse a été identifié au sein du promoteur de *COL1A2* [3].

Les effets délétères des **corticoïdes** sur la trophicité cutanée ou la résistance des tendons sont bien connus et illustrent l'inhibition de la production de matrice extracellulaire que peuvent induire les corticoïdes. *In vitro*, les corticoïdes inhibent la synthèse de collagène de type I et III par les fibroblastes en inhibant la transcription des gènes correspondants, en diminuant la stabilité des ARN messagers et en inhibant l'activité d'enzymes impliqués dans les modifications post-traductionnelles des molécules de collagène I comme les prolyl-hydroxylases [3]. Une partie des effets des corticoïdes pourrait également être médiée par une diminution de la sécrétion de TGF- β . Il faut noter que, contrairement à ce qui est observé avec les fibroblastes, les corticoïdes sont capables, *in vitro* mais aussi *in vivo*, d'augmenter la production de collagène par les cellules musculaires lisses des parois vasculaires.

In vivo, les effets de l'**acide rétinolique** sur la production de collagène de type I sont complexes. L'acide rétinolique peut antagoniser certains effets des corticoïdes sur la production de matrice extracellulaire et, par exemple, il prévient l'atrophie cutanée induite par les corticoïdes. À l'inverse l'acide rétinolique diminue la taille des cicatrices chéloïdes, ce qui suggère une inhibition de la production de matrice extracellulaire. *In vitro*, l'acide trans-rétinolique inhibe la synthèse de collagène de type I par les fibroblastes. Cet effet est dû à une inhibition de la transcription des gènes correspondants et, en transfection transitoire, l'acide rétinolique inhibe l'expression de constructions contenant le promoteur proximal de *COL1A1* et de *COL1A2*.

In vitro, les **produits de peroxydation lipidique** stimulent la synthèse de collagène de type I. Cet effet est médié par une augmentation de la transcription et peut-être aussi par une augmentation de la stabilité des ARN messagers. Ils agiraient à la fois en modulant la fixation des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 aux promoteurs proximaux des gènes codant pour le collagène de type I et en augmentant la synthèse de TGF- β [45].

L'effet essentiel des facteurs de croissance sur les fibroblastes est d'induire une prolifération de ces cellules. Néanmoins certains d'entre eux peuvent également moduler la synthèse de collagène [3]. L'*insulin growth factor 1 (IGF1)* stimule la prolifération des fibroblastes et augmente la production de collagène de type I par ces cellules. À l'inverse, l'*epidermal growth factor (EGF)* inhibe la production de collagène et augmente la production de collagénases. Cet effet est secondaire, au moins en partie, à une modulation de la transcription des gènes correspondants. De même, le *fibroblast growth factor basique (bFGF)* inhibe la transcription des gènes codant pour le collagène de type I.

CONCLUSION

En conclusion, l'analyse de la régulation des gènes codant pour le collagène de type I a permis de montrer que, à l'échelon moléculaire, il existe une grande hétérogénéité des cellules qui synthétisent la matrice extracellulaire. Il est donc possible d'envisager, dans l'avenir, l'utilisation de thérapeutiques ciblées modulant la production de collagène spécifiquement dans certaines populations cellulaires. De plus, la meilleure connaissance des mécanismes moléculaires responsables de la régulation de la production de collagène par les cytokines pro- ou anti-inflammatoires permet aussi d'envisager le développement de nouvelles molécules permettant de moduler la production de matrice extracellulaire en réponse à une agression.

BIBLIOGRAPHIE

1. VAN DER REST M, GARRONE R. Collagen family of proteins. *FASEB J*, 1991, **5**, 2814-2823.
2. VUORIO E, DE CROMBRUGGHE B. The family of collagen genes. *Annu Rev Biochem*, 1990, **59**, 837-872.
3. ROSSERT J, DE CROMBRUGGHE B. Structure, synthesis, and regulation of type I collagen, in Bilezikian J, Raisz L, Rodan G (eds) : *Principles of bone biology*, San Diego, Academic Press, 2001, pp. 189-210.
4. ROSSERT J, EBERSPAECHER H, DE CROMBRUGGHE B. Separate cis-acting DNA elements of the mouse pro-alpha1 (I) collagen promoter direct expression of reporter genes to different type I collagen-producing cells in transgenic mice. *J Cell Biol*, 1995, **129**, 1421-1432.
5. PAVLIN D, LICHTLER AC, BEDALOV A et al. Differential utilization of regulatory domains within the alpha1 (I) collagen promoter in osseous and fibroblastic cells. *J Cell Biol*, 1992, **116**, 227-236.
6. LISKA DJ, REED MJ, SAGE EH et al. Cell-specific expression of alpha1 (I) collagen-hGH minigenes in transgenic mice. *J Cell Biol*, 1994, **125**, 695-704.
7. DACQUIN R, STARBUCK M, SCHINKE T et al. Mouse alpha1 (I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast. *Dev Dyn*, 2002, **224**, 245-251.
8. ROSSERT JA, CHEN SS, EBERSPAECHER H et al. Identification of a minimal sequence of the mouse pro-alpha1 (I) collagen promoter that confers high-level osteoblast expression in transgenic mice and that binds a protein selectively present in osteoblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**, 1027-1031.
9. NAKASHIMA K, ZHOU X, KUNKEL G et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 2002, **108**, 17-29.
10. KERN B, SHEN J, STARBUCK M et al. *Cbfa1* contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J Biol Chem*, 2001, **276**, 7101-7107.

11. TERRAZ C, BRIDEAU G, RONCO P et al. A combination of cis-acting elements is required to activate the pro-alpha1 (I) collagen promoter in tendon fibroblasts of transgenic mice. *J Biol Chem*, 2002, **277**, 19019-19026.
12. BOU-GHARIOS G, GARRETT L-A, ROSSERT J et al. A potent far-upstream enhancer in the mouse pro-alpha2 (I) collagen gene regulates expression of reporter genes in transgenic mice. *J Cell Biol*, 1996, **134**, 1333-1344.
13. DE VAL S, PONTICOS M, ANTONIV TT et al. Identification of the key regions within the mouse pro-alpha 2 (I) collagen gene far-upstream enhancer. *J Biol Chem*, 2002, **277**, 9286-9292.
14. CHEN SS, RUTESHOUSER EC, MAITY SN et al. Cell-specific in vivo DNA-protein interactions at the proximal promoters of the pro alpha 1 (I) and the pro alpha2 (I) collagen genes. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**, 3261-3268.
15. VERRECCHIA F, ROSSERT J, MAUVIEL A. Blocking Sp1 transcription factor broadly inhibits extracellular matrix gene expression in vitro and in vivo : implications for the treatment of tissue fibrosis. *J Invest dermatol*, 2001, **116**, 755-763.
16. GRANT SF, REID DM, BLAKE G et al. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat Genet*, 1996, **14**, 203-205.
17. TERRAZ C, TOMAN D, RONCO P et al. Delta EF1 binds to a far-upstream sequence of the mouse pro-alpha1 (I) collagen gene and represses its expression in osteoblasts. *J Biol Chem*, 2001, **276**, 37011-37019.
18. LAWRENCE DA. Latent-TGF-beta : an overview. *Mol Cell Biochem*, 2001, **219**, 163-170.
19. CRAWFORD SE, STELLMACH V, MURPHY-ULLRICH JE et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*, 1998, **93**, 1159-1170.
20. BORNSTEIN P. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest*, 2001, **107**, 929-934.
21. RIBEIRO SM, POCZATEK M, SCHULTZ-CHERRY S et al. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, 1999, **274**, 13586-13593.
22. ROBERTS AB, SPORN MB, ASSOIAN RK et al. Transforming growth factor type β : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**, 4167-4171.
23. SANDERSON N, FACTOR V, NAGY P et al. Hepatic expression of mature transforming growth factor β 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**, 2572-2576.
24. MASSAGUE J, WOTTON D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*, 2000, **19**, 1745-1754.
25. VO N, GOODMAN RH. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem*, 2001, **276**, 13505-13508.
26. OEMAR BS, LUSCHER TF. Connective tissue growth factor. Friend or foe ? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**, 1483-1489.
27. FRAZIER K, WILLIAMS S, KOTHAPALLI D et al. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol*, 1996, **107**, 404-411.
28. GOLDSCHMEDING R, ATEN J, ITO Y et al. Connective tissue growth factor : just another factor in renal fibrosis ? *Nephrol Dial Transplant*, 2000, **15**, 296-299.
29. ABRAHAM DJ, SHIWEN X, BLACK CM et al. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *J Biol Chem*, 2000, **275**, 15220-15225.
30. HOLMES A, ABRAHAM DJ, SA S et al. CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem*, 2001, **276**, 10594-10601.
31. CZAJA MJ, WEINER FR, EGHBALI M et al. Differential effects of gamma-interferon on collagen and fibronectin gene expression. *J Biol Chem*, 1987, **262**, 13348-13351.
32. ZHU XS, LINHOFF MW, LI G et al. Transcriptional scaffold : CIITA interacts with NF-Y, RFX, and CREB to cause stereospecific regulation of the class II major histocompatibility complex promoter. *Mol Cell Biol*, 2000, **20**, 6051-6061.

33. ZHU XS, TING JP. A 36-amino-acid region of CIITA is an effective inhibitor of CBP : novel mechanism of gamma interferon-mediated suppression of collagen alpha (2) (I) and other promoters. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**, 7078-7088.
34. ULLOA L, DOODY J, MASSAGUE J. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature*, 1999, **397**, 710-713.
35. INAGAKI Y., TRUTER S, TANAKA S et al. Overlapping pathways mediate the opposing actions of tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta on alpha2 (I) collagen gene transcription. *J Biol Chem*, 1995, **270**, 3353-3358.
36. GREENWEL P, TANAKA S, PENKOV D et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits type I collagen synthesis through repressive CCAAT/enhancer-binding proteins. *Mol Cell Biol*, 2000, **20**, 912-918.
37. KOUBA DJ, CHUNG KY, NISHIYAMA T et al. Nuclear factor-kappa B mediates TNF-alpha inhibitory effect on alpha 2 (I) collagen (COL1A2) gene transcription in human dermal fibroblasts. *J Immunol*, 1999, **162**, 4226-4234.
38. IRABURU MJ, DOMINGUEZ-ROSALES JA, FONTANA L et al. Tumor necrosis factor alpha down-regulates expression of the alpha1 (I) collagen gene in rat hepatic stellate cells through a p20C/EBPbeta- and C/EBPdelta-dependent mechanism. *Hepatology*, 2000, **31**, 1086-1093.
39. BUCK M, HOUGLUM K, CHOJKIER M. Tumor necrosis factor-alpha inhibits collagen alpha1 (I) gene expression and wound healing in a murine model of cachexia. *Am J Pathol*, 1996, **149**, 195-204.
40. HOUGLUM K, BUCK M, KIM DJ et al. TNF-alpha inhibits liver collagen-alpha 1 (I) gene expression through a tissue-specific regulatory region. *Am J Physiol*, 1998, **274**, G840-G847.
41. VERRECCHIA F, TACHEAU C, WAGNER EF et al. A central role for the Jun-N-terminal kinase pathway in mediating the antagonistic activity of pro-inflammatory cytokines against transforming growth factor-beta-driven Smad3/4 specific gene expression. *J Biol Chem*, 2002, in press.
42. BITZER M, VON GERSDORFF G, LIANG D et al. A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev*, 2000, **14**, 187-197.
43. DUNCAN MR, BERNAM B. Differential regulation of collagen, glycosaminoglycan, fibronectin, and collagenase activity production in cultured human adult dermal fibroblasts by interleukin 1-alpha and beta and tumor necrosis factor-alpha and beta. *J Invest Dermatol*, 1989, **92**, 699-706.
44. FALL PM, BREAUULT D, RAISZ LG. Inhibition of collagen synthesis by prostaglandins in the immortalized rat osteoblastic cell line Py1a : Structure-activity relations and signal transduction mechanisms. *J Bone Miner Res*, 1994, **9**, 1935-1943.
45. GARCIA-RUIZ I, DE LA TORRE P, DIAZ T et al. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen alpha 1(I) gene expression in cultured hepatic stellate cells. *J Biol Chem*, 2002, **277**, 30551-30558.