

50376
1992

63383

50376
1992
99

99 Université des Sciences et Technologies
de Lille
U.F.R. de Biologie

Année 1992

N° d'ordre : 907

Thèse

PRESENTÉE A L'UNIVERSITÉ DE LILLE I
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

**Docteur en Sciences
de la vie et de la santé**

option biochimie, biologie cellulaire et moléculaire

PAR

Dominique MANECHEZ

**MECANISME D'ACTION DES
RETINOIDES**

**Différenciation cellulaire et induction
de la transglutaminase de tissu**



PRESENTÉE LE 16 AVRIL 1992 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

JURY

Président : Professeur A. Verbert
Rapporteurs : Professeur M. Porchet
Docteur J.P. Hénichart
Examineurs : Docteur D. Evain-Brion
Professeur M. Dautrevaux
Professeur P. Formstecher



Notre vie est un voyage

Dans l'hiver et dans la nuit

Nous cherchons notre passage

Dans le ciel où rien ne luit.

Chanson des Gardes Suisses (1793).
Préface au "Voyage au bout de la nuit"
de Louis-Ferdinand Céline.

A ma femme, Carole.

A mes enfants, Simon et Thomas.

Je remercie Monsieur le Professeur André Verbert d'avoir accepté la présidence de cette thèse. Je garde le souvenir d'une rencontre dans un lycée à Roubaix où vous aviez été convié à l'occasion d'une journée d'orientation professionnelle.

Je remercie Monsieur le Professeur Maurice Porchet d'avoir immédiatement accepté de juger ce travail qui, pour une grande part, est centré sur la Biologie Cellulaire.

Je remercie le Docteur Jean-Pierre Hénichart d'avoir aussi accepté de juger ce travail dont une partie a été effectuée en collaboration avec deux membres de son équipe, Jean-François Gossens et William Bourguet. Cette collaboration qui, je l'espère, donnera des fruits, a été, dans tous les cas, très amicale et conforme à l'esprit d'équipe qui devrait animer tout laboratoire de recherche. Je serai très heureux, si l'occasion se présentait, de travailler de nouveau avec vous.

Je remercie le Docteur Danièle Evain-Brion d'avoir accepté de se déplacer pour faire partie de ce jury. Les rétinoïdes constituent votre domaine de prédilection et vous aurez, sans nul doute, quelques questions à me poser. Je tenterai d'y répondre avec le plus de rigueur possible.

Je remercie Monsieur le Professeur Michel Dautrevaux de m'avoir accueilli dans son laboratoire pendant toute la durée de cette thèse et de m'avoir permis de "goûter" à la recherche ce qui, pour moi, était un plaisir et un privilège.

Je remercie le Professeur Pierre Formstecher de participer également au jury de cette thèse. Tout le monde te doit quelque chose au laboratoire et j'en fais partie. Tu as non seulement été à l'origine de mon travail mais tu m'as aussi aidé à "décoller" de la "paillasse" et à voir les choses de plus haut. Tes conseils me seront à coup sûr très utiles dans la suite de ma carrière.

Je remercie tous les membres du laboratoire qui ont contribué de près ou de loin à ce travail et plus particulièrement Emmanuelle Dislaire et Pascaline Toulouse pour leur assistance technique, William Bourguet pour la synthèse des rétinoïdes utilisés dans notre étude, Claude Richard pour la correction du manuscrit et Sylvie Tournay pour la dactylographie des références bibliographiques.

Je remercie, enfin, Nouredine Tbarka pour la collaboration étroite et l'amitié qui nous a unis pendant toute cette thèse et qui a rendu possible la réalisation d'une partie de ce travail qui, j'en suis sûr, sera récompensé.

Ce travail effectué dans le laboratoire de Biochimie Structurale de la faculté de Médecine de Lille (Professeur M.Dautrevaux) sous la direction du Professeur P.Formstecher a fait l'objet des communications suivantes.

Goossens, J.F., Manechez, D., Pommery, N., Formstecher, P., and Hénichart, J.P.(1992).

Vip potentiates retinoic acid effect on morphological differentiation and tissue transglutaminase activity in human neuroblastoma cells.

Europ.J.Cell Biol.(short communication) (soumise).

Manechez, D., Bourguet, W., Bernier, J.L., Hénichart, J.P., Formstecher, P., and Dautrevaux, M.

Effects of retinobenzoic acids on tissue transglutaminase expression in human promyelocytic leukemia cells HL-60 and neuroblastoma cells SK-N-SH.

Congrès international sur " transglutaminases and cross-linking", Cannes, 1990.
(communication orale).

Bourguet, W., Manechez, D., Bernier, J.L., Hénichart, J.P., Formstecher, P., and Dautrevaux, M.

Induction différentielle de la différenciation et de la transglutaminase de tissu par l'acide rétinoïque et les acides rétinobenzoïques dans les cellules de leucémie à promyélocytes HL-60 et de neuroblastome humain SK-N-SH.

Journées franco-belges de Pharmacochimie, Lille, 1991.

Manechez, D., Tbarka, N., Danze, P.M., Onraed, B., Formstecher, P., et Dautrevaux, M.

Régulation négative par la dexaméthasone de l'expression de la transglutaminase de tissu dans les cellules de leucémie à promyélocytes HL-60.

Journées franco-belges de pharmacochimie, Lille, 1991.

Résumé

Les rétinoïdes sont déjà utilisés en thérapeutique notamment en dermatologie. Mais c'est leur utilisation potentielle en tant qu'anti-cancéreux qui suscite actuellement un intérêt grandissant parmi les chercheurs et les cliniciens. Pour la recherche et le développement de ces produits, il est indispensable au préalable de bien connaître leur mécanisme d'action qui semble impliquer principalement des récepteurs, récemment clonés et séquencés.

Dans cette perspective, des modèles cellulaires ont été mis en place. La différenciation cellulaire et l'expression d'un enzyme, la transglutaminase de tissu induites par l'acide rétinoïque ont été les deux réponses étudiées.

La démonstration par la méthodologie anti-sens du rôle des récepteurs dans l'induction de ces réponses a d'abord été tentée mais sans succès pour des raisons peut-être méthodologiques mais aussi peut-être physiologiques.

Des analogues de l'acide rétinoïque, des acides rétinobenzoïques, ont été ensuite synthétisés et testés sur ces modèles. Une différence de mécanisme d'action a alors été observée entre ces dérivés et l'acide rétinoïque sur la réponse transglutaminase de tissu. Des résultats préliminaires indiquent que c'est la protéine kinase C qui semble être à l'origine de cette différence. En effet, elle serait impliquée, pour une grande part, dans l'expression de l'enzyme induite par l'acide rétinoïque. Par conséquent, d'autres voies de transduction en dehors de celles impliquant les récepteurs, semblent jouer un rôle dans certains effets biologiques de l'acide rétinoïque.

Enfin, les rétinoïdes interagissent avec d'autres molécules au niveau de certaines réponses biologiques. C'est le cas des glucocorticoïdes qui répriment l'induction par les rétinoïdes de la transglutaminase de tissu. Cette répression s'exerce de façon précoce, à des concentrations très faibles de l'ordre de la nanomole et via le récepteur des glucocorticoïdes. Ces arguments indirects font penser à une régulation négative d'ordre transcriptionnel. En outre, d'autres lignées cellulaires possédant le récepteur des glucocorticoïdes n'expriment pas cette inhibition. Cette réponse différentielle est peut-être en relation avec un contrôle transcriptionnel différent.

Ces quelques résultats permettent ainsi d'atteindre partiellement l'objectif qui était "d'avancer" un peu plus dans la compréhension du mécanisme d'action des rétinoïdes.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION	4
1. Acide rétinoïque et rétinoïdes. Effets biologiques. Relation structure-activité. Mécanisme d'action.	7
1.1 Développement. Classification.	7
1.2 Effets biologiques. Méthodes d'étude.	14
1.3 Relation structure-activité.	20
- Modification du noyau cyclohexényl.	21
- Modification de la chaîne latérale.	21
- Modification du groupement terminal polaire.	22
- Modification simultanée du noyau cyclohexényl, de la chaîne latérale et du groupement terminal polaire.	22
- conclusion.	25
1.4 Mécanisme d'action.	26
- Récepteurs de l'acide rétinoïque.	29
. Structure.	30
. Distribution.	31
. Activité de liaison.	32
. Eléments oligonucléotidiques de réponse à l'acide rétinoïque.	34
. Caractère fonctionnel du récepteur.	36
- Autres systèmes (protéine kinases).	38
1.5 Conclusion	41

2. Acide rétinoïque et différenciation cellulaire.	43
2.1 Généralités.	43
2.2 Les modèles cellulaires.	50
- Lignée cellulaire myéloblastique et promyélocytaire HL-60.	50
. sensibilité.	56
. spécificité.	57
. précision.	57
. fiabilité.	58
. facilité d'exécution et coût.	59
. rapport avec la physiologie.	59
. rapport avec la pathologie.	60
. rapport avec les objectifs thérapeutiques.	61
- Autre lignée cellulaire : neuroblastome humain SK-N-SH.	61
3. Acide rétinoïque et transglutaminase de tissu.	66
- Réactions enzymatiques.	67
- Classification.	70
- Propriétés physico-chimiques et enzymatiques. Structure.	72
- Distribution.	76
- Régulation.	78
- Rôle.	87
4. Conclusion.	86

RESULTATS ET DISCUSSION	88
1. Présentation des modèles pharmacologiques.	92
- Effets de l'acide rétinoïque sur la différenciation cellulaire.	92
- Effet de l'acide rétinoïque sur l'expression de la transglutaminase de tissu.	102
2. Récepteurs de l'acide rétinoïque : relais des réponses physiologiques à l'acide rétinoïque ? L'approche anti-sens.	108
- Principe.	108
- Les oligodésoxynucléotides anti-sens.	111
. choix de la séquence.	111
. choix du type d'oligomère anti-sens.	112
. choix du système.	114
- Résultats personnels.	115
- Discussion.	125
3. Acide rétinoïque et rétinoïdes : mécanisme d'action identique ?	130
- Résultats personnels.	130
. Effets sur la différenciation cellulaire et la toxicité aigüe.	132
. Effets sur l'expression de la transglutaminase de tissu.	133
- Discussion.	140
- Conclusion.	146
4. Transglutaminase de tissu et interaction entre acide rétinoïque et dexaméthasone ("cross-talk").	147
- Résultats personnels.	147
- Discussion.	157

CONCLUSION	171
APPENDICE TECHNIQUE	175
BIBLIOGRAPHIE	207
Liste des illustrations et tableaux	228

ABREVIATIONS

ADN = Acide DésoxyRibonucléique

ADNc = ADN complémentaire

Am80, Am580 = acides rétinobenzoïques de la série Amide

AMPc = Adenosine MonoPhosphate Cyclique

AR = Acide Rétinoïque

ARN = Acide RiboNucléique

ARNm = ARM messenger

ARNr = ARN ribosomal

ATFs ("Activating Transcription Factors") = facteurs de transcription activateurs

CAT = Chloramphénicol Acétyl Transférase

CD367 ("Compound" 367) = TTAB ("TetrahydroTetramethylAnthracenylBenzoic acid") =
acide tétrahydratétraméthylantracénylbenzoïque

CE50 = concentration efficace 50 %

Ch55, Ch30 = acides rétinobenzoïques de la série Chalcone

CL50 = concentration létale 50 %

CL100 = concentration létale 100 %

CLHP = Chromatographie Liquide Haute Performance

CME = concentration minimale efficace

CMR ("ChyloMicrons Remnants") = chylomicrons restants

CM = ChyloMicrons

CRABP ("Cytoplasmic Retinoic acid Binding Protein") = protéine cytoplasmique liant l'acide
rétinoïque

CRBP ("Cytoplasmic Retinol Binding Protein") = protéine sérique liant l'acide rétinol

CRE ("AMPc Responsive Element") = élément de réponse à l'AMPc

CREB ("AMPc Responsive Element Binding protein") = protéine liant l'élément de réponse à
l'AMPc

DAG = DiAcylGlycerol

DMBA = 7,12-DiMéthylBenzAnthracène

DXM = dexaméthasone

ED50 ("Efficient Dose 50 percent") = dose efficace 50 %

EGF ("Epidermal Growth Factor") = hormone de croissance épidermique

ER ("Estrogen Receptor") = récepteur des estrogènes

GRP ("Gastrin Releasing peptide") = peptide stimulant la sécrétion de gastrine

GR ("Glucocorticoid Receptor") = récepteur des glucocorticoïdes

GTP = Guanosine-Tri-Phosphate

HEL ("Human Erythroleukemia") = érythroleucémie humaine

HL60 ("Human Leukemia") = leucémie humaine à promyélocytes

HRE ("Hormone Responsive Element") = élément de réponse aux hormones

IP3 = InositoltriPhosphate

Kd = constante de dissociation à l'équilibre (M/l)

NBT = NitroBleu de Tétrazolium

ODN = oligodésoxynucléotides

PKA = Protéine Kinase A

PKC = Protéine Kinase C

RAR ("Retinoic Acid Receptor") = récepteur de l'acide rétinoïque

RARE ("Retinoic Acid Responsive Element") = élément de réponse à l'acide rétinoïque

RBP ("Retinol Binding Protein") = protéine sérique liant le rétinol

RE = "Retinyl Esters"

ROH = Rétinol

RSBP1 et RSBP2 ("Retinoic acid Specific Binding Protein") = protéines liant l'acide rétinoïque de façon spécifique

RXR = un récepteur de l'acide rétinoïque différent des autres récepteurs (RARs)

TGF ("Tumor Growth Factor") = facteur de croissance tumorale

TG = TransGlutaminase

TMMP ("TriMethylMethoxyPhenyl") = dérivé 4'-méthoxy-2,3,6-triméthylphényl de l'acide

TNF ("tumor necrosis factor") = facteur de nécrose tumorale

TPA = 12-O-TétradécanoylPhorbol-13-Acétate

TRH ("Thyroid Releasing Hormone") = hormone hypothalamique stimulant la sécrétion de TSH hypophysaire.

TSH ("Thyroid Stimulating Hormone") = hormone hypophysaire stimulant la sécrétion d'hormone thyroïdienne.

TTNN ("TetrahydroTetramethylNaphtalenylNaphtalenic acid") = acide tétrahydrotétraméthyl-naphtalénylnaphtalénique

TTNPB ("TetrahydroTetraNaphtalenylPropenylBenzoic acid") = acide tétrahydrotétraméthyl-naphtalénylpropénylbenzoïque

TTR = TransThyRétine

VIP ("vasoactive intestinal peptide") = peptide vasoactif intestinal

INTRODUCTION

L'acide rétinoïque, métabolite actif de la vitamine A, présente de nombreux effets biologiques. Il présente, parmi ceux-ci, des effets sur la peau qui ont été exploités dans le traitement de certaines dermatoses. Ainsi, l'acide rétinoïque 13-cis et l'étrétinate sont les deux rétinoïdes actuellement utilisés respectivement dans le traitement de l'acné et du psoriasis.

Toutefois, ce sont surtout ses effets sur la prolifération et la différenciation cellulaire qui ont le plus attiré l'attention des chercheurs. En effet, ces deux propriétés présentent un intérêt certain dans le traitement des processus néoplasiques.

Le cancer fait actuellement l'objet de recherches approfondies en particulier dans le domaine de la chimiothérapie. En effet, la chimiothérapie actuelle présente des effets secondaires majeurs liés à une absence de sélectivité entre cellules malignes et cellules saines. Aussi, il serait intéressant de disposer d'un traitement plus sélectif qui n'atteindrait que les cellules malignes. Une voie d'un tel traitement pourrait être une action directe sur la prolifération ou la différenciation des cellules malignes. Une orientation actuellement très prometteuse cherche à induire une différenciation terminale des cellules malignes. L'acide rétinoïque est actuellement un des seuls agents capable d'induire un tel effet et a été récemment utilisé avec succès dans le traitement d'une leucémie, la leucémie aigüe à promyélocytes. Il constitue un premier exemple de traitement différenciateur ayant donné un pourcentage élevé de rémissions complètes. Malheureusement, des rechutes ont été observées en moyenne 8 mois après le début du traitement avec la réapparition d'une hyperleucocytose grave ce qui justifie la poursuite des recherches dans ce domaine.

Deux voies de recherche existent actuellement : la compréhension du mécanisme de la cancérisation et du mécanisme d'action de l'acide rétinoïque et d'une façon plus large des rétinoïdes.

Dans le premier cas, une avancée majeure a été la découverte dans la leucémie aigüe à promyélocytes d'un remaniement du gène codant pour le récepteur alpha de l'acide

rétinoïque aboutissant à un récepteur hybride. Celui-ci joue probablement un rôle dans le maintien des cellules à l'état non différencié. Toutefois, la relation entre cette anomalie et l'induction de la différenciation cellulaire par l'acide rétinoïque n'est pas claire.

Dans le second cas, le clonage et le séquençage des récepteurs de l'acide rétinoïque a constitué une date historique dans la compréhension du mécanisme d'action des rétinoïdes. Avant cette date, les études de relation structure-activité étaient les seules à apporter quelques éléments indirects à la compréhension de ce mécanisme. Après cette date, la recherche s'est focalisée sur ces récepteurs qui ont été en outre utilisés pour l'élaboration de modèles cellulaires artificiels très utiles pour la pharmacochimie des rétinoïdes.

En ce qui nous concerne et compte tenu de toutes ces données, nous avons trouvé plus intéressant d'étudier les rétinoïdes et leurs effets dans des modèles naturels, en particulier des modèles de différenciation cellulaire plus en rapport avec l'objectif thérapeutique qui est de rechercher des produits différenciateurs avec un index thérapeutique satisfaisant.

En outre, toujours en rapport avec l'objectif précédent, il nous a paru nécessaire de bien comprendre le mécanisme d'action de ces produits. Toutefois pour étudier ce mécanisme d'action, il faut disposer d'une réponse moins complexe que la différenciation cellulaire et qui constitue une cible primaire pour l'acide rétinoïque. C'est pour cette raison que nous avons choisi comme autre modèle, la régulation par l'acide rétinoïque de l'expression de la transglutaminase (TG) de tissu.

Aussi, après les rétinoïdes, les deux réponses cellulaires que sont la différenciation et l'expression de la TG de tissu feront l'objet d'une revue de la littérature.

1. Acide rétinoïque et rétinoïdes. Effets biologiques. Relation structure-activité. Mécanisme d'action.

1.1 Développement. Classification.

En 1913, McCollum et Davis rapportent l'existence dans certains aliments d'une substance essentielle, liposoluble, capable de promouvoir la croissance chez le rat. Celle-ci est appelée "fat soluble A" puis vitamine A. Depuis, les principales étapes ont été la détermination de la structure chimique du bêta-carotène (Karrer et coll., 1930) et du rétinol (Karrer et coll., 1931), la cristallisation du rétinol (Holmes et Corb, 1937), l'identification du chromophore du pigment visuel, le rétinaldéhyde (Wald et coll., 1934, Morton et coll., 1944) et la synthèse chimique du rétinol et de l'acide rétinoïque (Arens et Van Dorp, 1946; Isler et coll., 1947). Par la suite, de nombreuses études portèrent sur le métabolisme et la physiologie de rétinoïdes ainsi que sur le développement de méthodes d'analyse permettant l'étude des rétinoïdes et de méthodes de synthèse pour la production commerciale de ces produits. Plus de 1500 produits ont été synthétisés par le groupe Hoffman La Roche entre 1968 et 1983 (Bollag et Hartmann, 1983).

La définition chimique des rétinoïdes selon laquelle les rétinoïdes sont "des substances dérivant d'un composé monocyclique contenant cinq double liaisons carbone-carbone et un groupement fonctionnel à l'extrémité de la portion acyclique" a laissé la place à une définition pharmacologique plus large selon laquelle les rétinoïdes sont "des substances qui agissent sur des réponses

spécifiques en se liant à un ou des récepteurs de l'acide rétinoïque". Toutefois, cette définition doit être revue de nouveau car il semble que les rétinoïdes agiraient aussi selon d'autres mécanismes n'impliquant pas les récepteurs de l'acide rétinoïque.

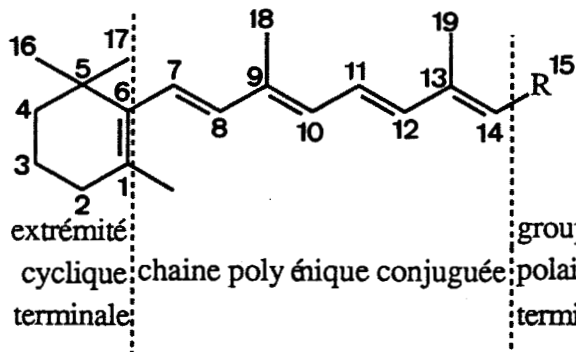
Les rétinoïdes naturels sont représentés par le rétinol, le rétinol et surtout l'acide rétinoïque (figure 1) qui est la molécule active dans la plupart des systèmes biologiques. Leur structure chimique correspond à la définition chimique citée précédemment.

A partir de ces substances naturelles et de l'acide rétinoïque, trois générations de rétinoïdes se sont succédées. La première génération résulte de la modification de l'extrémité polaire de la molécule par des groupements fonctionnels variés et de la chaîne polyénique (longueur, position des double liaisons, position et nombre des substituants méthylés). De cette recherche est apparu le premier rétinoïde à pouvoir être utilisé en thérapeutique, l'acide rétinoïque 13-cis (figure 1) ou isotrétinoïne commercialisé sous le nom de Roaccutane et indiqué dans le traitement de l'acné.

La deuxième génération provient du remplacement de l'extrémité cyclique par un ou plusieurs cycles ou hétérocycles comportant des substitutions diverses. Les produits les plus actifs sont ceux comportant un cycle benzène substitué par des groupements de type méthylés ou méthoxy comme le dérivé éthylester de l'analogue paraméthoxytriméthyl phényl de l'acide rétinoïque (TMMP) (figure 1) qui est le deuxième produit à avoir été commercialisé, l'étrétinate ou Tigason utilisé dans le traitement du psoriasis.

La troisième génération résulte de l'incorporation de cycle dans la chaîne intermédiaire. Cette modification a donné naissance à une nouvelle famille de rétinoïdes, les arotinoïdes (Loeliger et coll., 1980) dont font partie les acides rétinoïques. L'acide tétrahydrotrétraméthylnaphtalénylpropénylbenzoïque

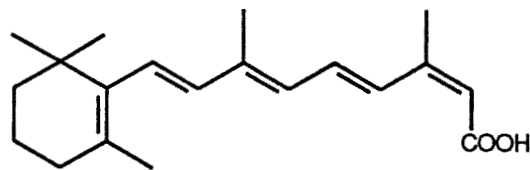
(TTNPB) synthétisé par Loeliger et coll. (1979) et le composé hexatriène synthétisé par Dawson et coll. (1981) (figure 2) ont été les premiers représentants de la famille des acides rétinobenzoïques où le noyau aromatique est situé à l'extrémité de la chaîne polyénique et porte le groupement carboxylique. Une propriété chimique remarquable de cette nouvelle classe de rétinoïdes est une stabilité relativement élevée comparée aux rétinoïdes classiques. Toutefois dans les solutions diluées de ces composés, il existe encore une isomérisation sous l'action de la lumière pour donner un mélange contenant des quantités à peu près égales d'isomères trans et cis, l'isomère trans étant l'isomère actif. Parmi les acides rétinobenzoïques, un certain nombre de molécules ont été synthétisées avec des modifications de la chaîne intermédiaire, les plus actifs étant ceux qui présentent une structure de type amide ou chalcone comme respectivement l'Am80 et le Ch55 (figure 3) (Kagechika et coll., 1988; Kagechika et coll., 1989). Toutefois, cette chaîne intermédiaire n'est pas indispensable puisqu'elle a été supprimée dans des molécules récentes, très actives, comportant des groupements naphthaléniques comme l'acide tétrahydrotétraméthyl-naphtalényl-naphtalénique (ou TTNN) (figure 2) ou encore l'acide tétrahydrotétraméthyl-anthracénylbenzoïque (ou TTAB ou CD367) (figure 3) (Cavey et coll., 1990).



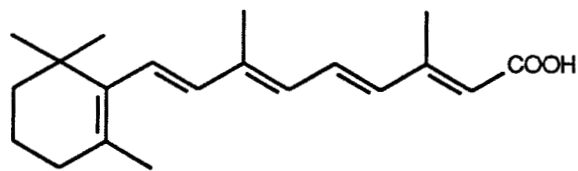
R = CH₂OH rétinol

R = CHO rétinol

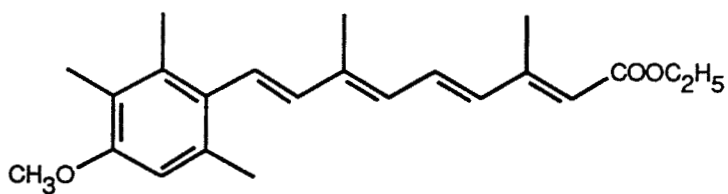
R = COOH acide rétinoïque



acide rétinoïque 13 cis (Isotrétinoïne)

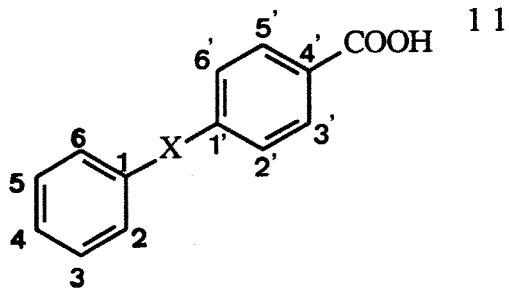


acide rétinoïque 13 trans (Trétinoïne)



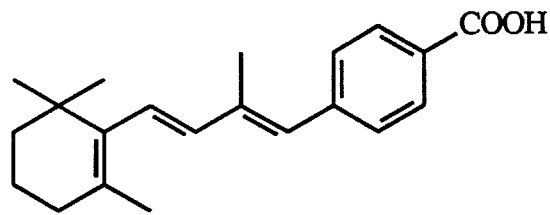
Etrétinate

Figure 1. Rétinoïdes naturels et synthétiques de 1ère et 2ème génération.

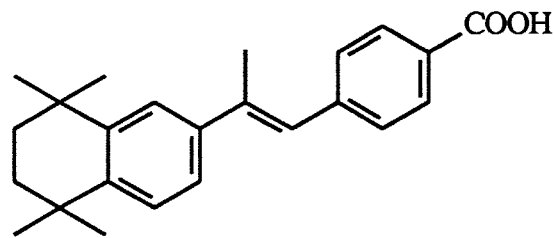


X : CONH
 NHCO
 SO₂NH
 N=N
 COCH=CH
 CR=CH
 CH₂CH₂

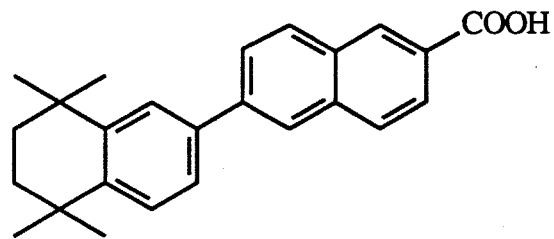
Acides rétinoïques



Dérivé trans-aryltrène de l'acide rétinoïque

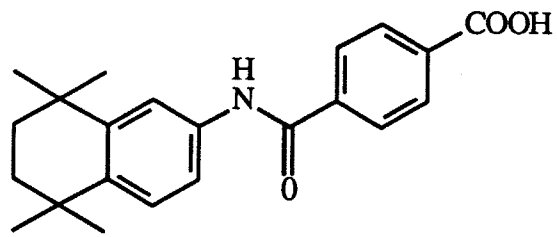


TTNPB

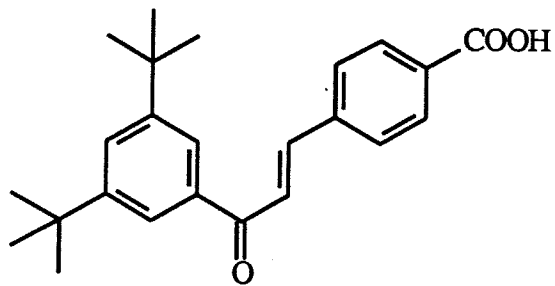


TTNN (acide rétinoïde naphthoïque)

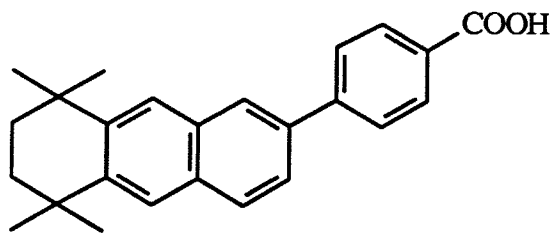
Figure 2. Rétinoïdes synthétiques de 3ème génération.



Am 80 (amide)



Ch 55 (chalcone)



CD 367 (dérivé anthracényle)

Figure 3. Rétinoïdes synthétiques de 3ème génération.

Il est sûr que le développement d'analogues de l'acide rétinoïque où le cycle, la chaîne intermédiaire et le groupement polaire terminal ont été modifiés comme les dérivés benzoïques et naphthoïques, a ouvert le champ au développement d'une chimie entièrement nouvelle et à des produits sans structure polyène, ni isomérisation cis-trans et avec une stabilité élevée vis à vis de la lumière et de l'oxydation.

1.2 Effets biologiques. Méthodes d'étude.

L'acide rétinoïque a de nombreux effets biologiques et ceci ne facilite pas la compréhension de son mécanisme d'action. Ses effets principaux sont représentés par l'inhibition de la prolifération cellulaire et la stimulation de la différenciation cellulaire (Lotan et coll., 1980). Ces effets sont corrélés à de nombreux autres effets plus spécifiques exercés par l'acide rétinoïque, comme par exemple l'inhibition de l'ornithine décarboxylase et la diminution de polyamines (Jetten et coll., 1985). Des oncogènes comme *c-myc* ont aussi une expression modifiée par l'acide rétinoïque associée à l'induction de la différenciation par exemple des cellules de leucémie myéloblastique et promyélocytaire humaine HL-60 (Wickström et coll., 1988, Holt et coll., 1988). Le récepteur de l'hormone de croissance épidermique (EGF) impliqué dans la prolifération cellulaire est également régulé par l'acide rétinoïque. De la même façon, les taux des protéines telles que la kératine ou encore la fibronectine, jouant un rôle dans les phénomènes de différenciation cellulaire, sont modifiés. Associées également au processus de croissance cellulaire, des glycoprotéines membranaires sont aussi le siège de modifications suite à l'action de l'acide rétinoïque. Enfin, l'acide rétinoïque modifie également l'activité des TG, inhibe la TG épidermique qui est un marqueur de la différenciation des kératinocytes (Lichti et coll., 1985) et stimule la TG de tissu (Davies et coll., 1985) en corrélation inverse avec l'état de prolifération cellulaire (Birckbichler et coll., 1977).

C'est sur ces effets de l'acide rétinoïque sur la prolifération et la différenciation cellulaire que sont basées presque toutes les méthodes d'études biologiques *in vivo* et *in vitro* (culture d'organes, culture cellulaire et système acellulaires) (tableau I). Ces méthodes constituent des outils importants pour le développement pratique de

Tableau I. Modèles in vitro et in vivo utilisés pour l'étude des rétinoïdes.
(tableau adapté de Roberts, 1984).

Rétinoïdes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Acide rétinoïque tout-trans	+	+++	+++	+++	++	++++	++++	+++	+++
Acide 13-cis rétinoïque	+/-	+++	+++	?	+	?	++++	+	+++
Etrétinate	++	+	+/-	++	0	+	++	0	?
TTNPB	++++	?	++++	?	++++	?	++++	++++	++++
TTNPB Ester	++++	?	++++	?	++++	?	?	?	0
Ch55	?	?	?	?	?	?	?	?	++++
CD367	?	?	?	?	?	?	?	++++	?

1 Régression des papillomes in vivo.

2 Inhibition de l'ornithine décarboxylase in vivo.

3 Suppression de la kératinisation en culture d'organe de trachée.

4 Toxicité cartilagineuse en culture d'organe.

5 Toxicité osseuse en culture d'organe.

6 Augmentation de l'ARN en culture de cellules épidermiques.

7 Inhibition de la croissance des cellules de mélanome en culture.

8 Induction de la différenciation des cellules F9 de tératocarcinome de souris.

9 Induction de la différenciation des cellules de leucémie myéloblastique et promyélocytaire humaine HL-60.

nouveaux rétinoïdes en particulier en informant le chimiste organicien de synthèse par exemple qu'entre deux rétinoïdes, une différence aussi faible qu'une configuration cis-trans autour d'une double-liaison ou que la position d'un groupement carboxylique (ortho-, méta- ou para-) peut suffire à générer des activités différentes. En outre, ces méthodes permettent l'étude du mécanisme d'action de ces produits dans la différenciation cellulaire et l'expression de réponses spécifiques. Les modèles les plus intéressants et surtout les plus utiles, décrits maintenant, sont ceux qui permettent de générer suffisamment de données à partir desquelles des courbes dose-réponse peuvent être construites.

Bien que les méthodes *in vitro* utilisant la culture cellulaire soient les plus employées, les méthodes *in vivo* restent encore d'une importance majeure car elles constituent, avant l'étape clinique, des modèles pharmacologiques se rapprochant le plus de la pathologie, cible thérapeutique des produits testés et permettent seules, à ce stade, les études pharmacocinétiques.

De nombreuses méthodes ont été développées comme celles basées sur l'étude de la croissance chez le rat où des acides rétinoïques comme le TTNPB sont très actifs (Loeliger et coll., 1980), sur l'étude du stockage hépatique, sur la suppression de la kératinisation et de la cornification des cellules épithéliales vaginales ou encore la suppression de la différenciation sébacée chez le hamster. Mais parmi toutes ces méthodes, c'est la méthode basée sur l'étude des effets sur le développement initial, la croissance et la progression néoplasique des papillomes de la peau de souris, initié par le 7,12-diméthylbenzanthracène (DMBA) et promu par le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA), qui a été de loin la plus utilisée et dont les initiateurs furent Berenblum et Shubik (1947). Ce test a été particulièrement utilisé dans les laboratoires Roche à Bâle, en Suisse.

(Bollag et coll., 1974) et a été à l'origine du développement clinique de l'analogue éthylester du 4- méthoxy, 2,3,6 triméthylphényl de l'acide rétinoïque (étrétinate) qui, avec le 1'acide rétinoïque 13-cis, est un des seuls rétinoïdes utilisés en thérapeutique. Il faut noter, par contre, la très faible activité de l'acide rétinoïque 13-cis (Bollag et coll., 1979), pourtant actif dans d'autres systèmes, qui montre, dans le cas du test du papillome, un exemple frappant de la défaillance d'un test (faux-négatif) à détecter un rétinoïde utile expérimentalement et surtout cliniquement. Par contre, les acides rétinobenzoïques comme le TTNPB sont 1000 fois plus actifs que l'acide rétinoïque tout-trans dans ce système. Les inconvénients de ce système sont surtout représentés par le coût et le temps nécessaires pour l'obtention des résultats. Une méthode alternative a été développée par la suite, basée sur le blocage par les rétinoïdes de l'induction de l'ornithine décarboxylase induite par le TPA (Verma et coll., 1978), bien corrélée avec le test du papillome et où l'acide rétinoïque 13-cis, directement appliqué à la peau, s'est montré aussi actif que l'acide rétinoïque tout-trans.

Mais ce sont surtout les méthodes *in vitro* basées sur la culture d'organe et la culture cellulaire qui ont été utilisées.

La suppression de la kératinisation et de l'induction de la métaplasie muqueuse dans la peau d'embryon de poulet (Fell et mellanby, 1953) est historiquement importante car c'était la première fois où l'on montrait des effets directs des rétinoïdes sur la différenciation cellulaire sans intervention des systèmes endocrines ou autres systèmes effecteurs.

L'inversion des modifications induites par des carcinogènes sur les glandes prostatiques de souris (Lasnitzki et coll., 1955) est également importante sur le plan historique car ces résultats ont fourni la première démonstration claire *in vitro* que

les rétinoïdes peuvent supprimer directement les modifications cellulaires pré-néoplasiques induites par les carcinogènes.

A côté d'autres méthodes basées sur la suppression ou l'inversion d'effets d'agents carcinogènes ou promoteurs, c'est l'inversion de la kératinisation dans la trachée de hamster déficient en rétinoïde qui a été un des tests les plus utilisés en raison de son extrême sensibilité (1 pmol/l), de sa précision et de sa facilité d'exécution (Sporn et coll., 1975). Ce test mesure une induction physiologique de la différenciation cellulaire dans un système sans sérum déplété en rétinoïde endogène. En outre, ce système est adéquat à l'étude de la relation de la structure-activité car la réponse biologique sur la différenciation cellulaire est une réponse de type tout-ou-rien (présence ou absence de granulations de kératohyaline). Ainsi, 35 000 trachées de hamster ont été manipulées pendant 10 ans et ont permis de définir une gamme importante de relations structure-activité pour les rétinoïdes synthétiques. Le TTNPB, en particulier, s'est révélé très actif sur ce modèle. Toutefois il faut signaler que tous les acides rétinobenzoïques n'ont pas présenté cette même activité.

Enfin, les méthodes basées sur l'étude de la toxicité osseuse et cartilagineuse des rétinoïdes en culture d'organes ont révélé une toxicité des acides carboxyliques et, notamment, des acides rétinobenzoïques comme le TTNPB, très supérieure (160 fois) à celle de l'acide rétinoïque tout-trans (Roberts et coll., 1984b).

Les études en culture d'organe ont comme inconvénient, entre autres, de s'adresser à une population cellulaire hétérogène ce qui rend difficile les études du mécanisme moléculaire d'action des rétinoïdes contrairement aux méthodes utilisant la culture cellulaire.

La culture cellulaire a permis d'explorer le rôle des rétinoïdes dans des cellules d'origines diverses et de ne pas se limiter aux cellules épithéliales comme la culture

d'organes. Elle s'est adressée tout particulièrement aux cellules mésenchymateuses tout simplement parce que la culture de ces cellules est plus facile que celle des cellules épithéliales. Les rétinoïdes présentent un nombre important d'effets sur une large variété de cellules isolées (Lotan et coll., 1980). Des effets sur la synthèse de l'ADN, de l'ARN, de protéines, de glycoprotéines, de glycosaminoglycanes, de protéoglycanes, de glycolipides et de mélanine, des effets sur l'induction d'enzymes et de leur activité, des effets sur la structure de la membrane et sur sa fonction, des effets sur la prolifération et la différenciation cellulaire et en particulier la suppression de la transformation maligne des cellules pré-néoplasiques, l'induction de la différenciation terminale et l'inhibition de la prolifération de cellules néoplasiques (Lotan et coll., 1980).

Les modèles utilisés ont été ceux de l'augmentation par les rétinoïdes de l'ARN et de l'ADN dans des cellules épidermiques de souris nouveau-né BALB/C (Sporn et coll., 1975, 1976), l'inhibition de la croissance des cellules de mélanome de souris (lignées B16 et S91) (Lotan et coll., 1977, 1978), la suppression de la transformation néoplasique des fibroblastes de souris, l'induction de l'adhésion de fibroblastes de souris transformés (Adamo et coll., 1979) mais surtout l'induction de la différenciation terminale des cellules de tératocarcinome humain F9 (Strickland et coll., 1978) et des cellules de leucémie aigüe myéloblastique et promyélocytaire humaine HL-60 (Shudo et coll., 1985).

Ce dernier modèle a été choisi dans notre étude concernant les effets des acides rétinoïques pour différentes raisons exposées plus loin. Brièvement, il est sensible (10 pmol/l), précis (reproductible, dose-dépendant et quantitatif par l'utilisation du test de réduction au nitrobleu de tétrazolium), particulièrement sensible aux acides rétinoïques (Shudo et coll., 1985), la facilité d'exécution (réponse en moins d'une semaine, ne nécessitant pas de compétence particulière), le coût faible par rapport aux méthodes *in vivo*, en rapport avec la physiologie

(étude sur une réponse physiologique, la différenciation cellulaire), en rapport avec la pathologie (cancer et plus particulièrement modèle pharmacologique de la leucémie aigüe promyélocytaire) en rapport avec les objectifs fixés, thérapeutique (rétinoïdes en tant qu'agent différenciant anti-cancéreux et plus particulièrement anti-leucémique) et plus fondamental (compréhension du mécanisme moléculaire d'action des rétinoïdes). Il faut signaler que les acides rétinoïques diminuent comme l'acide rétinoïque l'expression de c-myc dans les cellules HL-60 (Hashimoto et coll, 1987) qui est étroitement corrélée à la différenciation cellulaire (Yokohama et coll., 1987; Holt et coll., 1988; Wickström et coll., 1988).

1.3 Relation structure-activité.

Le problème de savoir si la structure chimique des rétinoïdes est traduisible en terme de fonction biologique est fondamental pour la compréhension de tous les aspects de l'action cellulaire des rétinoïdes. En effet, l'existence d'une relation structure-activité est en faveur d'un mécanisme commun sous-tendant des réponses très différentes rencontrées dans de nombreux types de cellules très différentes et contribue à la compréhension de ce mécanisme. En outre, la connaissance d'éléments de relation structure-activité permet d'orienter les recherches vers des axes pouvant mener à la découverte de nouvelles molécules avec un meilleur indice thérapeutique.

La relation structure-activité des rétinoïdes résulte de l'étude de nombreuses modifications de la structure de l'acide rétinoïque ayant porté successivement sur le noyau cyclohexényl, la chaîne intermédiaire, le groupement terminal polaire et simultanément, sur les trois parties de la molécule.

le noyau cyclohexényl

On a longtemps cru qu'une modification du noyau cyclohexényl entraînerait une perte importante de l'activité. Un des premiers rétinoïdes ayant permis de réfuter ce concept fut l'acide rétinoïque alpha (Isler et coll., 1971) dans laquelle une double liaison est déplacée de la position 5, 6 (acide rétinoïque tout-trans) à la position 4, 5. Bien que l'acide rétinoïque alpha soit légèrement moins actif que son homologue bêta dans la plupart des systèmes, il reste un rétinoïde puissant. Un certain nombre de métabolites avec des substitutions diverses sur le noyau sont actifs (McKenzie et coll., 1978; Rosenberger et coll., 1982; Hänni et coll., 1979; Wertz et coll., 1979). Le remplacement du cycle hexényl par un cycle aromatique ou un hétérocycle (furyl, thiényl ou pyridyl) sans substitutions aboutit à des produits inactifs et avec substitutions comme le TMMP (Mayer et coll., 1978, Bollag et coll., 1980) à des composés actifs. Toutefois, il faut signaler que le TMMP est actif dans le test du papillome de souris *in vivo* mais inactif dans les tests *in vitro* pour des raisons probablement pharmacocinétiques.

la chaîne latérale

La plupart des modifications de la chaîne latérale de l'acide rétinoïque tout-trans entraînent une perte d'activité. Ces modifications comprennent la désaturation des positions 7 et 8, la saturation des double-liaisons en position 7 et 8, 9 et 10, 11 et 12, 13 et 14, le raccourcissement ou l'allongement de la chaîne latérale. Mais une avancée majeure dans la synthèse a été l'insertion d'un noyau aromatique dans la portion terminale de la chaîne latérale pour donner l'analogue trans-aryl-triène de l'acide rétinoïque synthétisé par Dawson et coll. (1981) (figure 2). Ce rétinoïde a

conduit au développement d'analogues acides rétinoïques extrêmement actifs comme le TTNPB (Loeliger et coll., 1980).

modification du groupement terminal polaire

Le résultat essentiel résultant des modifications du groupement polaire terminal est que les analogues contenant une fonction carboxylique terminale libre sont invariablement les plus actifs dans les systèmes de tests *in vitro* (Roberts et coll., 1984). Ceci est particulièrement frappant dans des systèmes de culture cellulaire tels que les cellules F9 et les cellules HL-60 dans lesquels l'acide rétinoïque et les acides rétinoïques sont très actifs (Strickland et coll., 1983; Shudo et coll., 1985) alors que le rétinol, le rétinylacétate ou le rétinolaldehyde ont peu ou pas d'activité. De la même façon, les dérivés carboxamides sont moins actifs que les analogues carboxyliques, voire inactifs dans les systèmes F9 et HL-60. L'absence d'activité de ces produits est probablement liée à l'absence dans ces cellules de matériel enzymatique nécessaire à la conversion métabolique en dérivé carboxylique libre actif (Frolik et coll., 1981). Ceci n'est pas le cas des systèmes *in vivo* ou de certains modèles cellulaires où par exemple des esters comme l'étrétinate (figure 1) sont actifs, des estérases hydrolysant ces esters.

En outre, la position de la fonction carboxylique en para de la chaîne intermédiaire dans la structure des acides rétinoïques est aussi un élément indispensable à l'activité.

modification simultanée du noyau cyclohexényl, de la chaîne latérale et du groupement polaire terminale

Les dérivés acides benzoïques et en particulier le dérivé di-tertbutylchalcone Ch55 (Shudo et coll., 1985, Kagechika et coll., 1989), utilisé dans notre étude et les

dérivés naphthoïques comme l'acide tétrahydrotétraméthylantracénylbenzoïque (CD367) (Cavey et coll., 1990) sont très actifs. Leur conception s'est développée à partir du chef de file des acides rétinobenzoïques, le TTNPB (Loeliger et coll., 1980) qui présente tous les éléments de relation structure-activité des acides rétinobenzoïques suivants : la présence d'un cycle apolaire substitué, d'une chaîne intermédiaire de type polyénique et une structure de type acide benzoïque portant un groupement carboxylique en para de la chaîne latérale. Différentes modifications au niveau de la chaîne intermédiaire ont conduit à la synthèse d'un certain nombre de molécules dont les plus actives sont représentées par les analogues amide (Am80, Am580) et surtout chalcone (Ch30, Ch55) (Kagechika et coll., 1988, Kagechika et coll., 1989). Des travaux ayant impliqué ces derniers, utilisés dans notre laboratoire, ont fourni quelques éléments de relation structure-activité (Shudo et coll., 1985, Kagechika et coll., 1989). L'activité est ainsi augmentée par :

1. La présence de groupements alkyles de taille assez volumineuse de type isopropyl ou mieux de type tert-butyl en position 2 et 4.
2. Un connecteur de type chalcone qui, avec les connecteurs de type amide et polyénique, offre à ce type de molécule un élément en faveur de l'activité.
3. Un groupement carboxylique en 4' libre qui ne supporte aucune modification, comme, par exemple, une estérification ou une amidification, un remplacement par un alkyl, un halogène, un hydroxyalkyl ou un bioisostère (sulfonique ou amidine), un déplacement par exemple en position 3'.
4. Une certaine distance à respecter entre les groupements hydrophobes et le groupement carboxylique.
5. En outre, la chaîne intermédiaire n'est pas essentielle puisqu'elle peut

être supprimée comme dans le TTNN synthétisé par Dawson et coll. (1983) et le CD367 plus récent (Cavey et coll., 1990) qui se sont révélés être des molécules extrêmement actives. Ces molécules ne présentent donc plus de structure de nature polyénique ni d'ailleurs d'isomérisation cis-trans et comportent, en outre, des modifications de l'extrémité apolaire avec la présence de cycles volumineux très hydrophobes de type naphthalényl ou encore anthracényl.

L'étude cristallographique de certains acides rétinoïques a été réalisée et a montré que les dimensions des formes biologiquement actives de ces molécules étaient pour la plupart identiques à celle de l'acide rétinoïque tout-trans (Strickland et coll., 1983) et la superposition des deux types de structure montrent des correspondances entre les groupes, comme par exemple entre, d'une part les groupements alkyles volumineux de type isopropyl ou mieux de type tert-butyl en position 2 et 4 des dérivés chalcone comme le Ch55, le noyau tétrahydrotétraméthyl-naphthalényl des dérivés stilbène comme le TTNPB ou encore le groupement hydrophobe aliphatique des dérivés amides comme l'Am80, et d'autre part le groupement diméthyl de l'acide rétinoïque.

conclusion

En résumé, la relation structure-activité concernant notamment les acides rétinoïques comporte les éléments suivants : la présence de substituants alkyles de taille moyenne de type isopropyl ou tert-butyl en position méta sur le cycle à l'extrémité apolaire de la molécule, un groupement carboxylique libre en position para d'un noyau aromatique à l'extrémité polaire de la molécule, une distance précise entre les groupements alkyles et le groupe carboxylique des deux moitiés importantes de la structure, une chaîne intermédiaire qui peut varier voire être absente (Dawson et coll., 1983; Kagechika et coll., 1988; 1989).

1.4 Mécanisme d'action (figure 4).

La vitamine A provient essentiellement des caroténoïdes (bêta-carotène) (végétaux) et de dérivés esters (RE) (tissus animaux).

Ces derniers sont convertis en rétinol (ROH) dans la lumière intestinale avant absorption par les entérocytes. Dans ceux-ci, le rétinol réagit avec des longues chaînes d'acides gras pour former des dérivés esters qui sont ensuite incorporés dans les chylomicrons (CM). Les chylomicrons sont excrétés dans la lymphe puis dans la circulation générale avant d'être captés par la cellule parenchymateuse hépatique sous une forme modifiée (CMR). Il faut signaler que ces derniers peuvent être également captés directement par les cellules cibles au niveau d'un récepteur de lipoprotéines sans passage par le foie.

Après hydrolyse de la forme estérifiée, le rétinol gagne le réticulum endoplasmique de la cellule parenchymateuse hépatique où il forme un complexe avec une protéine liante, la RBP ("retinol binding protein"). Ce complexe est, d'une part capté par les cellules stellaires du foie qui transforme le rétinol en dérivés esters pour le stockage, d'autre part excrété dans le plasma où il se lie transitoirement à la transthyrétine (TTR).

Le complexe RBP-ROH est ensuite capté par les cellules cibles au niveau d'un récepteur membranaire.

Dans la cellule, le rétinol se lie ensuite à une protéine intra-cellulaire, la CRBP ("cytoplasmic retinol binding protein"). Toutefois, la majeure partie est oxydée en acide rétinoïque (AR).

L'acide rétinoïque se lie aussi à une protéine intra-cellulaire, la CRABP ("cytoplasmic retinoic acid binding protein"). Cette protéine contrôlerait le taux d'acide rétinoïque libre actif. Elle présente en outre un taux d'expression variable selon les tissus et les types cellulaires. Elle aurait, par conséquent, un rôle

fondamental dans la morphogénèse, l'acide rétinoïque ayant été décrit comme morphogène primaire. La CRABP serait aussi une navette intra-cellulaire qui amènerait ensuite le ligand au noyau.

Après dissociation du complexe CRABP-AR dans le noyau, l'acide rétinoïque libre se lierait alors à une protéine nucléaire qui a été assimilée au récepteur de l'acide rétinoïque (RAR).

Ce récepteur appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires (Evans, 1988) : il agirait donc comme un facteur de transcription se liant à une séquence nucléique spécifique de l'ADN appelée Élément de Réponse à l'Acide Rétinoïque (RARE) qui régulerait l'expression de gènes cibles jouant un rôle dans les effets biologiques de l'acide rétinoïque.

Enfin, en dehors des récepteurs, d'autres systèmes serviraient aussi de relais à certains effets biologiques de l'acide rétinoïque comme par exemple ceux qui impliquent les protéines kinases (PK).

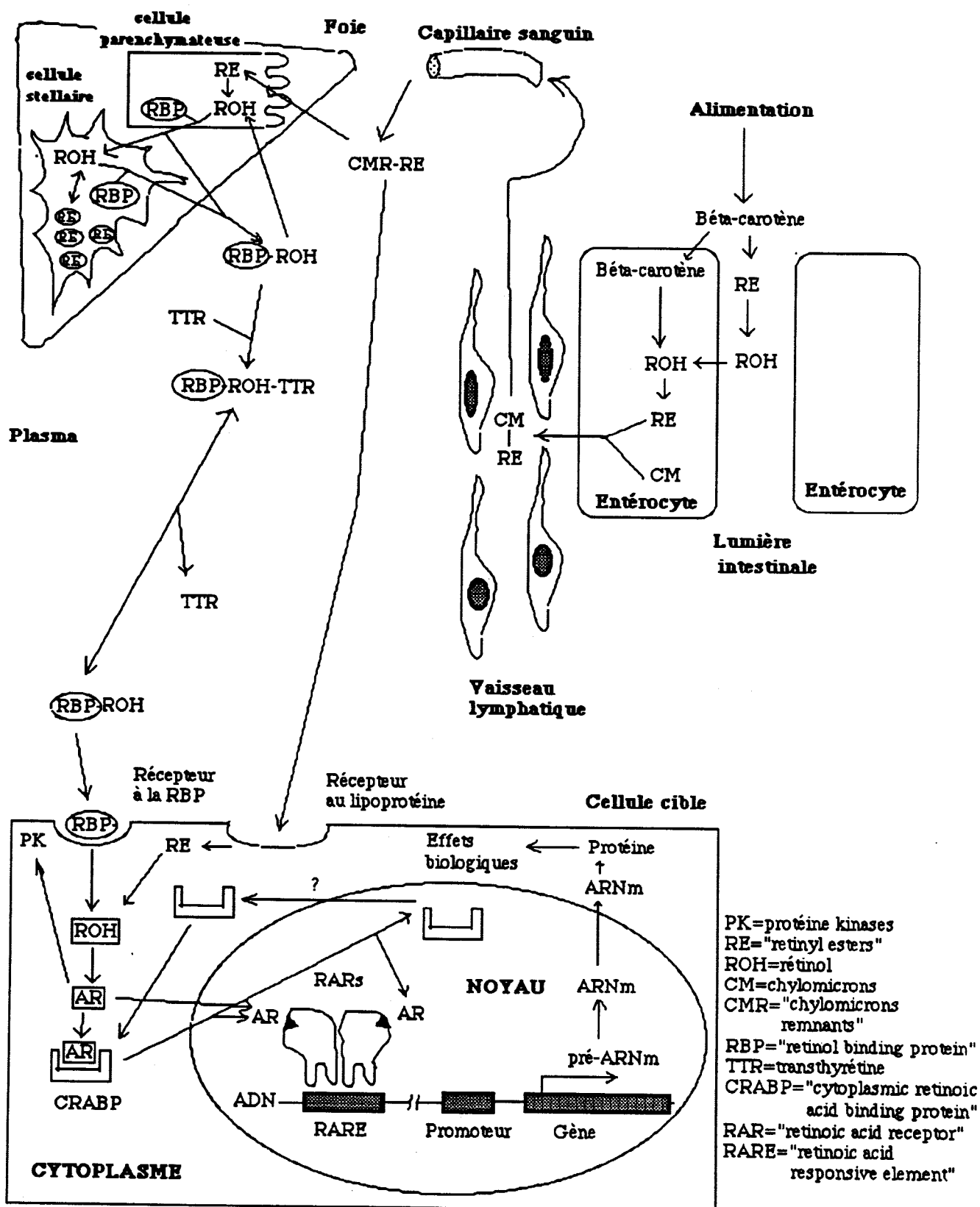


Figure 4. Métabolisme et mécanisme d'action de l'acide rétinol (AR).

Récepteurs de l'acide rétinoïque.

C'est à partir de travaux concernant les récepteurs stéroïdiens qu'ont été découverts les récepteurs de l'acide rétinoïque. La structure des récepteurs stéroïdiens se divise en plusieurs régions (A,B,C,D,E et F).

La région C (domaine de liaison à l'ADN) des récepteurs stéroïdiens est l'une des régions les mieux conservées. Aussi, ce sont des oligonucléotides complémentaires de la séquence d'acides nucléiques codant pour cette région qui ont été synthétisés et utilisés pour cribler des banques d'ADN complémentaires humains. Parmi les séquences sélectionnées par ce criblage, une séquence codait pour une protéine qui avait la particularité de lier l'acide rétinoïque avec une forte affinité correspondant à celle que l'on mesure habituellement entre un ligand et son récepteur. Il a été montré ensuite que cette protéine présentait des domaines du même type que ceux décrits dans le cas des récepteurs stéroïdiens et qu'elle se comportait comme un récepteur fonctionnel. En effet, des récepteurs chimériques comportant les domaines de liaison à l'ADN des récepteurs des glucocorticoïdes ou des estrogènes avec conservation du domaine de liaison à l'acide rétinoïque ont été construits et se sont révélés capables, en présence d'acide rétinoïque, d'activer la transcription du gène reporter chloramphénicol acétyltransférase (CAT). C'est ainsi que l'on a mis en évidence le premier récepteur de l'acide rétinoïque (RAR). D'autres récepteurs ont ensuite été décrits. Actuellement, quatre types de récepteurs de l'acide rétinoïque ont été détectés : RAR alpha (Giguère et coll.,1987; Petkovich et coll.,1987; Zelent et coll.,1989; Brand et coll.,1990), RAR bêta (Dejean et coll., 1986; de Thé et coll., 1987; Brand et coll., 1988; Benbrook et coll., 1988; Zelent et coll., 1989), RAR gamma (Krust et coll., 1989; Zelent et coll., 1989; Ragsdale et coll., 1989) et RXR (Mangelsdorf et coll., 1990).

Structure

Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont donc, à l'image des récepteurs stéroïdiens, organisés en régions ou domaines. Il existe une homologie très élevée au niveau de la région C (domaine de liaison à l'ADN) des RARs alpha, bêta et gamma (94 à 97 %) et de la région E (domaine de liaison au ligand) (84 à 90%). Bien que de faibles différences existent au niveau de cette région E, elles pourraient toutefois expliquer la sélectivité de différents rétinoïdes vis à vis des trois types de récepteurs. Enfin, les différences majeures se situent au niveau des extrémités N- et C- terminales (régions A/B et F) (Giguère et coll., 1987; de Thé et coll., 1987; Zelent et coll., 1989). Ces régions, pour un même récepteur, sont en outre le siège de variations relatives à un épissage alternatif ou à une transcription impliquant des promoteurs différents (Kastner et coll., 1990; Giguère et coll., 1990) et responsables d'un polymorphisme générant plusieurs isoformes. Ces RARs présentent aussi une certaine homologie au niveau de la région C avec les autres récepteurs stéroïdiens : les récepteurs de l'hormone thyroïdienne (62%), des estrogènes (59%), des glucocorticoïdes (42%) et de la progestérone (45%). Les différences apparaissent tout naturellement au niveau de la région E (Giguère et coll., 1987; de Thé et coll., 1987; Zelent et coll., 1989). Enfin, de façon surprenante, le récepteur RXRalpha présente peu d'homologie avec les autres RARs au niveau de la région C (61%) et surtout la région E (27%) (Mangelsdorf et coll., 1990). Cette différence au niveau de la région E expliquerait que RXR ait plus d'affinité pour l'acide rétinoïque et moins pour ses analogues contrairement à RARalpha. Des isoformes de RXR ont également été détectées.

Distribution

Le RAR alpha est présent dans de très nombreux tissus (Rees et coll., 1989) mais plus particulièrement dans les cellules myéloïdes comme les cellules de leucémie aigüe myéloblastique et promyélocytaire HL-60 (Gallagher et coll., 1989; Largman et coll., 1989; Hashimoto et coll., 1989; Wang et coll., 1989), les cellules d'érythroleucémie HEL (Largman et coll., 1989) et dans la lignée de cellules de carcinome embryonnaire P19 (Song et coll., 1989) qui ont la particularité de se différencier en cellules gliales et neuronales sous l'action de l'acide rétinoïque.

Le RAR bêta est ubiquitaire mais semble toutefois absent dans quelques tissus issus d'organes comme les reins, les muscles de la paroi abdominale, les testicules ou le duodénum de l'intestin grêle (Rees et coll., 1989). Comme le RAR alpha, il est aussi présent dans les cellules myéloïdes (Largman et coll., 1989) et les cellules de la lignée P19 (Song et coll., 1989). Il est également retrouvé dans le cerveau (Rees et coll., 1989).

Le RAR gamma est spécifique du tissu cutané et cartilagineux (Zelent et coll., 1989; Krust et coll., 1989; Ragsdale et coll., 1989; Kastner et coll., 1990).

Ces récepteurs et leurs isoformes semblent également être distribués de façon spécifique au cours du développement (Dollé et coll., 1989; Dollé et coll., 1990; Ruberte et coll., 1990; Ruberte et coll., 1991).

Enfin, le récepteur RXR apparaît être aussi un récepteur ubiquitaire mais est présent de façon prédominante dans le foie et les reins (Mangelsdorf et coll., 1990).

Activité de liaison

La méthode la plus classique pour étudier un récepteur est d'examiner l'interaction d'un ligand avec ce récepteur. Toutefois, dans le cas de l'acide rétinoïque, de nombreuses difficultés sont apparues en relation avec le manque de spécificité de ce ligand dans les tissus naturels.

Aussi, l'activité de liaison de l'acide rétinoïque aux récepteurs RAR alpha et RAR bêta recombinants a été étudiée sur des récepteurs entiers exprimés de façon transitoire dans des modèles artificiels comme les cellules de rein de singe Cos-1 transfectées et sur des récepteurs limités à leur domaine de liaison au ligand dans des bactéries transformées type *Escherichia Coli* (Crettaz et coll., 1990). L'acide rétinoïque présente une affinité similaire pour les récepteurs RAR alpha et RAR bêta avec une constante de dissociation (Kd) pour RAR alpha, de 6.1 nM et 6.2 nM et pour RAR bêta, 7.6 nM et 8 nM dans respectivement les cellules Cos-1 et *Escherichia coli*. Ces études ont, en outre, montré que le groupement carboxylique libre terminal de l'acide rétinoïque est essentiel pour la liaison aux récepteurs. Ces modèles d'étude de l'activité de liaison utilisant des récepteurs recombinants exprimés en grande quantité pallient ainsi les insuffisances des tissus naturels où ces récepteurs sont présents en quantité trop faible. Des rétinoïdes de synthèse marqués, plus stables, présentant une faible liaison non spécifique, ne se liant pas à la CRABP et affichant une meilleure affinité pour les récepteurs, ont aussi été utilisés pour l'étude de l'activité de liaison. C'est le cas de l'Am80 tritié, un acide rétinoïque de type amide qui est, en outre, déplacé des récepteurs recombinants par un autre acide rétinoïque de type chalcone, le Ch55,

dans des cellules d'adénocarcinome utérin HeLa S3 transfectées (Hashimoto et coll., 1990).

L'étude de l'activité de liaison et la caractérisation des récepteurs ont aussi été entreprises à partir d'extraits nucléaires de tissus et de cellules naturelles utilisant l'acide rétinoïque et des rétinoïdes de synthèse marqués et des techniques de chromatographie sur colonne haute performance. Ces études ont été effectuées sur des cellules dépourvues de CRABP comme les cellules HL-60 (Jetten et coll., 1987; Hashimoto et coll., 1988). Ainsi, les cellules HL-60 contiennent entre 500 et 1400 sites de liaison de l'acide rétinoïque pour lequel a été mesuré un Kd compris entre 0.1 nM et 1 nM (Collins et coll., 1990; Hashimoto et coll., 1988; Hashimoto et coll., 1989; Nervi et coll., 1989). En outre, deux protéines nommées RSBP1 et RSBP2 ("retinoic acid specific binding protein") caractérisées dans les cellules HL-60 semblent correspondre respectivement aux RAR alpha et RAR bêta (Hashimoto et coll., 1989) car ils présentent les mêmes profils d'élution en CLHP et des immunoréactivités identiques en présence des anticorps anti-peptide RAR alpha et RAR bêta développés par Gaub et coll. (1989).

Éléments oligonucléotidiques de réponse à l'acide rétinoïque (tableau II)

Les stéroïdes régulent l'expression d'un certain nombre de gènes de façon transcriptionnelle via la liaison de leur récepteur à des séquences spécifiques situées dans la région du promoteur de ces gènes cibles et qui sont appelées Éléments de Réponse aux Hormones (HRE) (Beato et coll., 1989; Evans et coll., 1988).

Umesono et coll. (1988) et Graupner et coll.(1989) ont été les premiers à montrer que les récepteurs RAR alpha et RAR bêta traduits *in vitro* sont capables de se lier à des séquences oligonucléotidiques avec une forte affinité, indépendamment de la présence du ligand. Il s'agit des séquences correspondant aux éléments de réponse à l'hormone thyroïdienne (TRE) (Glass et coll., 1987). Toutefois, avec une plus grande signification biologique, les récepteurs de l'acide rétinoïque se lient à des séquences qui semblent être d'authentiques éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) identifiés pour la première fois en amont du site d'initiation de la transcription du gène du RAR bêta humain (de Thé et coll., 1990). Depuis, ces séquences ont été retrouvées dans les régions promotrices d'un certain nombre de gènes régulés par l'acide rétinoïque.

Tableau II. Comparaison des éléments de réponse liant l'ADN dans les séquences répétées directes et palindromiques (adapté d'après de Luca, 1991).

A. Eléments de réponse palindromiques.

1. <u>GGTACA</u> xxx <u>TGTTCT</u>	GRE (Evans, 1988)
2. <u>AGGTCA</u> xxx <u>TGACCT</u>	ERE (Evans, 1988)
3. <u>AGGTCA</u> <u>TGACCT</u>	TREp et RARE (Umesono, 1988)
4. C <u>AGGG</u> AC <u>GTGACCGCA</u>	rGH, TRE, ET RARE (Umesono, 1988)
5. <u>GGTCA</u> C <u>TCACC</u>	hOST site AP-1, VDRE, ET RARE (Schüle, 1990)
6. <u>TTGACCCCA</u> GCTG <u>AGGTCA</u> AGT	cLys - 2301/-2323, TRE (Banahmad, 1990)

B. Répétitions directes.

1. <u>GGTCA</u> CGA <u>GGTCA</u>	mSPP-1	VDRE (Noda, 1990)
2. <u>GGGTGA</u> ATG <u>AGGACA</u>	rOST	VDRE (Demay, 1990)
3. <u>GGGTGA</u> ACG <u>GGGGCA</u>	hOST	VDRE (Ozono, 1990)
4. <u>AGGTCA</u> AGG <u>AGGTCA</u>	DR3	VDRE (Umesono, 1991)
5. <u>AGGTGA</u> CAGG <u>AGGACA</u>	rMHC	TRE (Izumo, 1988)
6. <u>AGGTGA</u> CAGG <u>AGGACA</u>	hMHC	TRE (Flink, 1990)
7. <u>GGGTTA</u> GGGG <u>AGGACA</u>	rME	TRE (Petty, 1990)
8. <u>GGGTCA</u> TTTC <u>AGGTCC</u>	MLV-LTR	TRE (Sap, 1989)
9. AA <u>GGGAGA</u> GT <u>GGGTCA</u>	mbétaTSH	TRE (Wood, 1989)
10. <u>GGCCA</u> GCTG <u>AGGTTA</u>	rS14	TRE (Zilz, 1990)
11. <u>AGGTCA</u> CAGG <u>AGGTCA</u>	DR4	TRE (Umesono, 1991)
12. <u>GGTCA</u> CCGAA <u>AGTCA</u>	mRARbéta	RARE (Sucov, 1990)
13. <u>GGTCA</u> CCGAA <u>AGTCA</u>	hRARbéta	RARE (de The, 1990)
14. <u>AGGTCA</u> CTGAC <u>AGG CA</u>	mCP-H	RARE (Munos-Canoes, 1990)
15. <u>GGGTCA</u> TTCAG <u>AGTCA</u>	hADH-3	RARE (Duester, 1991)
16. <u>AGGTCA</u> CCAGG <u>AGGTCA</u>	DR5	RARE (Umesono, 1991)

C. Autres éléments de réponse.

1. -477 CCAGAC <u>AGGTTGACC</u> - -CTTTTTCTA <u>AGGGCTTAACC</u> -TAGCTCACCTC-432	mLamb1	RARE (Vasios, 1989)
2. -451 <u>TGACCTTTGGC</u> - -GTGGGA-434	rPEPCK	RARE (Lucas, 1991)
3. -639 GCTGTCA C <u>AGGTCA</u> C <u>AGGTCA</u> C <u>AGGTCA</u> C <u>AGTTCA</u> -605	rCRBP II	RXRE (Mangelsdorf, 1991)

GRE ("Glucocorticoid Responsive Element") = élément de réponse aux glucocorticoïdes

ERE ("oEstrogen Responsive Element") = élément de réponse aux estrogènes

TREp ("Thyroid hormone Reponsive Element") = élément de réponse aux hormones thyroïdiennes

RARE ("Retinoic Acid Responsive Element") = élément de réponse à l'acide rétinoïque

rGH ("rat Growth Hormone") = promoteur du gène de l'hormone de croissance du rat

hOST ("human OSTeocalcin") = promoteur du gène de l'ostéocalcine humaine

AP-1 = élément de réponse pour le complexe c-jun-c-fos

VDRE ("VitaminD Responsive Element") = élément de réponse à la 1,25 dihydroxyvitamine D3

mSPP1 ("mouse oSteoPontin Promoter") = promoteur du gène de l'ostéopontine de souris contenant VDRE

rOST ("rat OSTeocalcin") = promoteur du gène de l'ostéocalcine de rat contenant VDRE

DR3 motif répété direct de synthèse séparé par trois nucléotides contenant VDRE

rMHC ("rat Myosin Heavy Chain") = promoteur du gène de la chaîne lourde alpha de la myosine cardiaque de rat contenant TRE

hMHC ("human Myosin Heavy Chain") = promoteur du gène de la chaîne lourde alpha de la myosine cardiaque humaine contenant TRE

rME ("rat Malic Enzyme") = promoteur du gène de l'enzyme "malic" de rat contenant TRE

MLV-LTR = promoteur contenant TRE

mbétaTSH ("mouse beta Thyroid Stimulating Hormone") = promoteur du gène de l'hormone de souris stimulant la thyroïde contenant TRE

rS14 promoteur du gène S14 de rat contenant TRE

DR4 motif répété direct de synthèse séparé par quatre nucléotides contenant TRE

mRARbéta ("mouse Retinoic Acid Receptor") = promoteur du gène du récepteur de l'acide rétinoïque béta de souris contenant RARE

hRARbéta promoteur du gène du récepteur de l'acide rétinoïque béta humain contenant RARE

mCP-H ("mouse ComPlement facor H") = promoteur du gène du facteur de complément H de souris contenant RARE

hADH-3 ("human AcoholDshydrogenase 3") = promoteur du gène de l'alcool déshydrogénase humaine contenant RARE

DR5 motif répété direct de synthèse séparé par cinq nucléotides contenant RARE

mLamb1 promoteur du gène de la laminine B1 contenant RARE

rPEPCK ("rat PhosphoEnolPyruvateCarboxyKinase") = promoteur du gène de la phosphoénolpyruvate carboxypeptidase contenant RARE

rCRBP II ("rat Cellular Retinol Binding Protein II") = promoteur du gène de la protéine liant le rétinoïde cellulaire de rat de type II contenant RXRE

Caractère fonctionnel du récepteur

L'activité transcriptionnelle, en présence d'acide rétinoïque, des récepteurs RAR alpha et RAR bêta recombinants et chimériques (la région C des RARs étant substituée par celle du récepteur des glucocorticoïdes (GR) ou celle du récepteur des estrogènes (ER)) a été démontrée pour la première fois sur l'expression d'un gène CAT couplé à un promoteur comportant un GRE ou un ERE dans des cellules de rein de singe CV-1 ou des cellules d'adénocarcinome utérin HeLa. La mesure de doses efficaces 50 % (ED50) donne des valeurs comprises entre 0.6 nM et 10 nM (Giguère et coll., 1987; Petkovich et coll., 1987; Brand et coll., 1988; Benbrook et coll., 1988). L'activité transcriptionnelle des récepteurs entiers alpha et bêta recombinants ou endogènes a aussi été démontrée sur l'expression de CAT couplé à des éléments de réponses de type TRE qui lieraient ces récepteurs, ou mieux de type RARE issus des promoteurs de gènes décrits précédemment comme ceux par exemple de la laminine B1 (Vasios et coll., 1989; Vasios et coll., 1991), du RAR bêta (de Thé et coll., 1990), de l'ostéocalcine (Schüle et coll., 1990) et de l'alcool deshydrogénase. (Duester et coll., 1991). Ce sont aussi ces modèles qui ont permis de montrer l'activité transcriptionnelle du chef de file des acides rétinoïques, le TTNPB ("tétrahydrotétraméthylnaphtalenypropenylbenzoic acid") via le récepteur RAR alpha (Mangelsdorf et coll., 1990).

L'utilisation des gènes reporters HRE-CAT a permis de montrer que les différents récepteurs étaient fonctionnels mais sur une réponse artificielle. Il est donc fondamental de savoir si ces récepteurs sont directement impliqués dans des réponses physiologiques.

Cope et coll. (1989) ont été les premiers à montrer le rôle direct d'un récepteur de l'acide rétinoïque dans une réponse physiologique. Il s'agissait, en l'occurrence, du RAR alpha dans le pouvoir clonogénique et l'induction de la phosphatase alcaline

dans les kératinocytes malins SCC-25. La méthode d'étude était basée sur l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens anti-ARN messenger du RAR alpha visant à diminuer les taux de récepteurs dans la cellule par blocage de la traduction. Ces auteurs ont ainsi montré une corrélation étroite entre la diminution du taux de RAR alpha et celle des réponses physiologiques.

En utilisant une autre méthodologie, Collins et coll. (1990) ont démontré le rôle direct du récepteur RAR alpha dans la différenciation des cellules HL-60 en granulocytes terminaux induite par l'acide rétinoïque. En effet, un sous-clone HL-60 relativement résistant à l'induction de la différenciation par l'acide rétinoïque a été développé. L'introduction dans ce sous-clone d'une seule copie du récepteur RAR alpha a suffi pour restaurer la sensibilité de ces cellules à l'acide rétinoïque.

L'implication des récepteurs RAR alpha et RAR bêta a été démontrée dans d'autres réponses comme par exemple l'induction de la TG de tissu (Denning et coll., 1991). En effet, l'augmentation du taux de ces récepteurs, transfectés dans les cellules de trachée de rat 2C5 est corrélée avec une induction accrue de la TG de tissu par l'acide rétinoïque. En outre, la diminution du taux de ces récepteurs par l'utilisation de vecteur RAR anti-sens est aussi corrélée avec une induction réduite de l'enzyme. Ces quelques exemples utilisant des méthodologies différentes montrent l'implication directe des récepteurs de l'acide rétinoïque dans des réponses cellulaires physiologiques.

Autres systèmes (figure 5).

A côté des récepteurs, d'autres systèmes seraient également impliqués dans les effets biologiques de l'acide rétinoïque.

Il s'agirait entre autres de systèmes couplés à des récepteurs de la membrane plasmique provoquant l'augmentation d'un second messenger tel que l'Adenosine Monophosphate Cyclique (AMPc), le DiAcylGlycérol (DAG), l'InositoltriPhosphate (IP3), le calcium ionisé, ...etc . Ces second messagers, à leur tour, activent des enzymes phosphorylantes, les protéine kinases qui sont impliquées dans la phosphorylation et à l'activation de protéines liant l'ADN. Deux des voies de transduction d'une importance majeure dans le contrôle de la transcription de gènes sont celles qui conduisent à l'activation de la Protéine Kinase A dépendante de l'AMPc (PKA) (Roesler, 1988) et de la Protéine Kinase C dépendante du diacylglycérol (PKC) (Nishizuka, 1984).

Des éléments de réponse localisés dans les régions du promoteur du gène régulé sont des sites de liaisons pour des protéines phosphorylées activatrices de la transcription qui appartiennent à une classe récente de facteurs de transcription, les protéines "leucine-zipper" (Landschultz, 1988; Vinson, 1989). Des éléments de réponse ont été identifiés pour l'AMPc (CRE) la première fois dans le gène de la somatostatine de rat (Montminy, 1986) et pour l'ester de phorbol, un autre substrat de la PKC (site AP-1) (Deutsch, 1988). Deux classes de protéines se liant à ces éléments de réponses, ont été identifiées, les protéines AP-1/Jun-Fos/Fra sur TRE et CREB/ATFs sur CRE (Deutsch, 1988; Curran, 1988).

L'AMPc potentialise les effets induits par d'autres agents. C'est, en particulier, le cas de l'induction de la différenciation et de la TG de tissu par l'acide rétinoïque dans la lignée cellulaire de leucémie humaine à promyélocytes HL-60 (Olsson et coll., 1982; Davies, 1985). En outre, au cours de la différenciation induite par l'acide rétinoïque des cellules HL-60 mais aussi d'autres cellules comme celles de carcinome embryonnaire de souris F9, un certain nombre de modifications ont été observées et en particulier une augmentation de l'activité et de la distribution de la PKA (Olsson et coll., 1982; Fontana et coll., 1984, Plet et coll., 1982) ainsi que de la PKC (Makowske et coll., 1988).

La PKC semble également être impliquée dans la différenciation des cellules HL-60 vers la voie monocytes/macrophages induite par les esters de phorbol (TPA) puisque cette différenciation est inhibée par la 1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-méthylpipérazine ou H7, un inhibiteur de la PKC (Matsui, 1986). Enfin il est très important de signaler que cet effet de l'acide rétinoïque sur l'activité de ces protéine kinases n'est pas simplement théorique mais peut avoir des applications concrètes dans des pathologies où un déficit en protéine kinases a été observé comme dans le psoriasis qui constitue actuellement une des indications dans laquelle les rétinoïdes sont utilisés en pratique (Evain-Brion et coll., 1986).

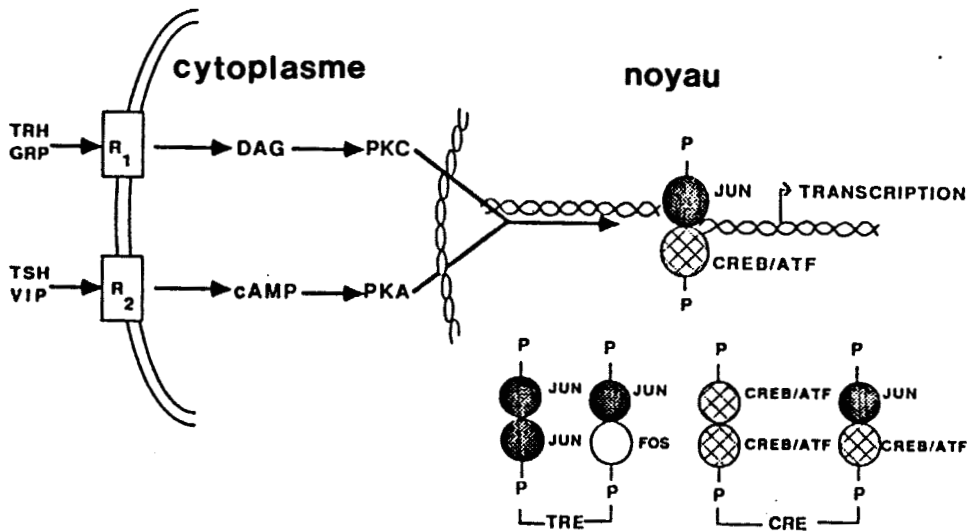


Figure 5. Schéma montrant les voies de transduction couplées à des récepteurs de surface cellulaire impliquées dans l'activation de facteurs appartenant à la superfamille des facteurs de transcription nucléaires. Les hormones peptidiques, par exemple, TRH, le peptide libérant la gastrine (GRP), TSH, le peptide intestinal vasoactif (VIP) interagissent avec des récepteurs couplés soit au système DAG/PKC soit au système AMPc/PKA. Les protéine kinases phosphorylent les membres CREB/ATF, Jun/AP-1 et Fos/Fra appartenant à la famille des protéines se liant à l'ADN, cette phosphorylation modifiant l'affinité et/ou l'activation transcriptionnelle. Les homodimères et les hétérodimères associant ces différents membres présentent une sélectivité quant à leur liaison aux éléments de réponses CRE ou TRE (d'après Habener, 1990).

Conclusion

Avant la découverte des récepteurs de l'acide rétinoïque, de nombreux travaux ont été effectués sur l'étude de la relation structure-activité des rétinoïdes car seules ces études donnaient des informations sur le mécanisme d'action de l'acide rétinoïque. Ensuite, le clonage et le séquençage des récepteurs ont ouvert une nouvelle ère dans la recherche concernant ces molécules.

Il semble de plus en plus probable actuellement qu'en dehors des récepteurs, des systèmes mettant en jeu des protéine kinases et peut-être d'autres protéines subissant un processus de rétinoylation soient impliqués dans le mécanisme d'action de l'acide rétinoïque et des rétinoïdes.

La complexité du mécanisme d'action de l'acide rétinoïque est encore aggravée lorsque l'on prend aussi en compte la présence d'interactions entre l'acide rétinoïque et d'autres molécules. C'est ainsi par exemple qu'un certain nombre d'interactions entre l'acide rétinoïque et les glucocorticoïdes ont été déjà décrites sur plusieurs réponses cellulaires (Violette, 1989; Goldman, 1985; Takenaga, 1982; Ng, 1989; McGuire, 1988; Roberts, 1984; Oberg, 1989; Rush, 1991).

L'étude de ce mécanisme d'action est donc d'un intérêt fondamental et justifie que l'on s'y intéresse. Mais pour aborder une telle question, il faut disposer de modèles cellulaires avec des réponses régulées par l'acide rétinoïque. Parmi les nombreux effets biologiques de l'acide rétinoïque, l'induction de la différenciation cellulaire est une des réponses les plus intéressantes. L'induction d'un enzyme, la TG de tissu est une autre réponse, plus originale qui aurait en outre l'avantage d'être

une réponse primaire. Ces deux réponses cellulaires ont fait l'objet d'un certain nombre de travaux que nous allons présenter maintenant.

2. Acide rétinoïque et différenciation cellulaire.

2.1 Généralités.

Le développement de la plupart des mammifères peut être, dans un ordre chronologique, décomposé en plusieurs étapes : la fécondation, le clivage de l'oeuf fécondé, la gastrulation, la différenciation cellulaire et la croissance de l'embryon, la croissance du nouveau-né et le maintien et la régénération des cellules corporelles et le vieillissement programmé de l'animal (le bagage génétique de chaque espèce contiendrait l'information codée relative à l'espérance de vie). En outre, il existe deux aspects importants dans la croissance et le développement de l'embryon dans l'organogénèse et la morphogénèse : d'une part, la différenciation des cellules et le développement de tissus spécialisés, d'autre part la formation d'un modèle avec le contrôle de la croissance cellulaire, balance entre la prolifération et l'apoptose cellulaire, afin que la dimension et la forme des structures corporelles se développent correctement en faisant appel notamment à la notion d'information de position.

Au début, des interactions cellulaires déclenchent la détermination et la différenciation des cellules en tissus et organes. Les tissus adultes alors différenciés vont exprimer des protéines spécifiques qui, au cours de l'organogénèse, augmentent graduellement en quantité et en variété. Les mécanismes qui sous-tendent cette différenciation cellulaire se basent sur des phénomènes d'activation et d'inactivation de gènes. En effet, la différenciation d'une cellule déterminée est liée à l'expression sélective de gènes dont les produits d'expression permettent à la cellule d'exprimer un phénotype distinct. Les mécanismes moléculaires de la différenciation cellulaire seraient liés à des changements dans la transcription, dans la stabilisation de l'ARN messager

(ARNm) et dans la traduction. Dans les trois systèmes, une induction séquentielle des produits géniques conduirait l'organisme vers les étapes successives de la différenciation cellulaire et du développement.

La synthèse de protéines spécifiques d'un tissu constitue un aspect de la différenciation cellulaire mais les cellules sont également sensibles à des instructions de développement qui contrôlent la taille et la forme de nombreuses parties de l'animal. Ces informations dépendraient de la régulation de la croissance cellulaire en plus de la spécialisation cellulaire. L'inhibition ou la stimulation de la croissance cellulaire est déterminante pour assurer une morphogénèse appropriée. Une information de position est donc fournie aux cellules pour qu'elles puissent évoluer dans le sens de cette morphogénèse adéquate. Un exemple type est le développement d'un membre chez l'embryon de poulet. Trois à quatre jours après la fécondation, des groupes de cellules constituent les bourgeons des membres à l'origine des pattes et des ailes de l'animal. Les types de cellules sont identiques et pourtant donneront, après différenciation en cellules plus spécialisées de type cartilagineux, musculaire ou osseux, des structures aussi différentes qu'une patte ou une aile, une information de position ayant déjà auparavant été fournie à ces cellules. Cette information de position serait en relation avec un gradient d'une ou plusieurs substances diffusibles d'une extrémité à l'autre du membre. L'acide rétinoïque serait l'une de ces substances considérées comme morphogène primaire (Slack et coll., 1987). En effet, l'acide rétinoïque serait impliqué non seulement dans la différenciation cellulaire (Lotan et coll., 1980; Sporn et coll., 1983) mais aussi dans la morphogénèse. L'acide rétinoïque serait un morphogène primaire contrôlant la différenciation des digitations de l'aile du poulet pour certains (Thaller et coll., 1987; Eichele et coll., 1989) mais pas pour d'autres

(Noji et coll., 1991). Il aurait également un rôle dans le développement du système nerveux central (Wagner et coll., 1990; Durston et coll., 1989).

Les effets de l'acide rétinoïque sur la différenciation cellulaire ont surtout été étudiés sur des modèles *in vitro* basés sur la culture d'organes ou la culture cellulaire.

L'acide rétinoïque exerce une action puissante sur la différenciation cellulaire de nombreux types différents d'épithélia analysée en culture d'organes. Les deux premières expériences furent celles de Fell et Mellanby (1953) montrant que l'acide rétinoïque pouvait modifier l'épithélium kératinisé de la peau en épithélium muco-sécrétant et constitué de cellules ciliés et celle de Lasnitzki (1955) montrant que le phénotype malin de la glande prostatique de souris traitée par le carcinogène 3-méthylcholanthrène disparaissait et était remplacé par le phénotype normal après traitement par les rétinoïdes.

L'acide rétinoïque a également des effets sur la différenciation des cellules en culture. Ceci offre la possibilité d'étudier le mécanisme moléculaire d'action de l'acide rétinoïque en particulier dans la différenciation cellulaire. En outre, l'utilisation de la culture cellulaire permet de ne pas être seulement limité aux cellules épithéliales, comme la culture d'organes, mais de s'intéresser aussi à d'autres types cellulaires. Enfin, elle permet l'étude de ces substances sur des cellules normales mais surtout sur des cellules néoplasiques ce qui est fort intéressant compte tenu de leur potentiel anti-cancéreux.

L'acide rétinoïque a des effets inducteurs ou inhibiteurs sur la différenciation des cellules normales d'origine épithéliale comme les kératinocytes (Yuspa et coll., 1974, 1981, 1982), d'origine mésenchymateuse comme les chondrocytes (Hassel et coll., 1978; Takigawa et coll., 1980), les adipocytes

(Sato et coll., 1980) et les cellules hématopoïétiques (Douer et coll., 1982) (figure 6).

Mais, ce sont surtout les effets de l'acide rétinoïque sur la différenciation de cellules néoplasiques qui ont été étudiés. Les cellules néoplasiques de type épithélial (carcinome de trachée, des voies urinaires, du poumon ou cervical), de type mésenchymateux (leucémie myéloïde, chondrocarcinome, cellules L) et de type ectodermique primitif (carcinome embryonnaire) répondent au traitement par les rétinoïdes (Sporn et coll., 1984).

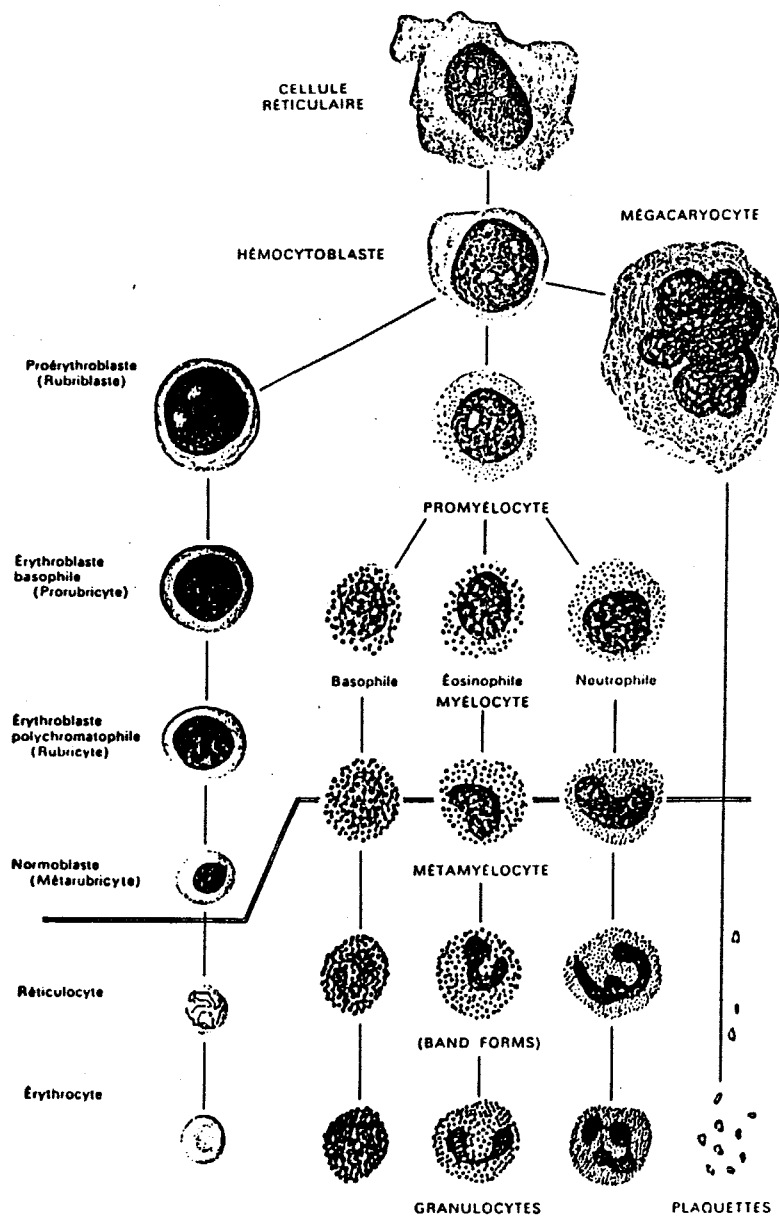


Figure 6. Différenciation des cellules hématopoïétiques. Le double trait sépare les cellules que l'on trouve dans la moelle osseuse des cellules adultes situées en-dessous du trait et que l'on voit normalement dans le sang périphérique.

Pour la plupart des cellules néoplasiques, l'inhibition de leur croissance par l'acide rétinoïque est due à un blocage ou un retard de la progression des cellules dans le cycle cellulaire ou à l'induction de la différenciation ou de la maturation de ces cellules (Sachs et coll., 1978; Sachs et coll., 1980). Un des plus fascinants exemples de la capacité de l'acide rétinoïque à induire la différenciation cellulaire est représenté par l'effet des rétinoïdes à des concentrations physiologiques (1 nM) sur les taux de l'activateur du plasminogène, marqueur de différenciation, dans les cellules de carcinome embryonnaire F9 (Strickland et coll., 1978; Segal et coll., 1979; Rizzino et coll., 1980). L'induction de la différenciation cellulaire a également été observée *in vivo* (Speers et coll., 1982).

Un autre exemple est représenté par l'effet de l'acide rétinoïque sur la différenciation des cellules de leucémie myéloblastique et promyélocytaire humaine HL-60 (Breitman et coll., 1980) (cf chapitre HL-60, page 50). Toutefois, il faut signaler que d'autres lignées de cellules myéloïdes ne répondent pas à l'acide rétinoïque comme les cellules KG-1 (Sporn et coll., 1984). L'acide rétinoïque induit aussi la différenciation d'autres cellules hématopoïétiques comme les cellules d'érythroleucémie comme les cellules de la lignée humaine HEL (Suedhoff et coll., 1990), cette différenciation étant mesurée par une augmentation du contenu en hémoglobine.

D'autres cellules néoplasiques en culture répondent à l'acide rétinoïque comme les cellules de neuroblastome humain (Sidell et coll., 1982), de mélanome (Lotan et coll., 1981) ou encore de trachée de rat (Marchok et coll., 1978).

Un certain nombre de modifications apparaissent au cours de la différenciation cellulaire induite par l'acide rétinoïque.

La différenciation cellulaire est liée à la suppression ou à l'activation de l'expression de nombreux gènes. Parmi ces gènes, celui dont la régulation au cours de la différenciation cellulaire semble être un phénomène général dans les cellules néoplasiques est l'oncogène c-myc dont les taux d'ARNm varient dans plusieurs types cellulaires comme les cellules d'érythroleucémie (Lachman et coll., 1984), les cellules de tératocarcinome humain F9 (Dean et coll., 1986) ou encore les cellules de leucémie myéloblastique et promyélocytaire HL-60 (Collins et coll., 1987). Cette corrélation étroite entre les taux intracellulaires de c-myc et la différenciation cellulaire suggère que cette protéine est très probablement impliquée dans le contrôle d'expression de gènes ayant un rôle dans la différenciation cellulaire. D'autres modifications de l'expression d'un certain nombre de gènes au cours de la différenciation cellulaire ont été mises en évidence en particulier dans la lignée cellulaire HL-60.

2.2 Les modèles cellulaires.

Lignée de cellules myéloblastiques et promyélocyaires HL-60

Il existe quelques modèles de différenciation cellulaire induite par l'acide rétinoïque. Le modèle HL-60 est un modèle classique de référence pour des études pharmacologiques et fondamentales. Le modèle du neuroblastome humain est un modèle par contre plus original permettant l'étude de la différenciation cellulaire dans le système nerveux central, domaine peu étudié mais actuellement en plein développement, notamment aux Etats-Unis.

Certaines des propriétés des cellules HL-60 ont fait de cette lignée cellulaire un modèle attrayant pour les études de différenciation en général. Mais, malgré le nombre impressionnant de publications (plus de 700) dont a fait l'objet cette lignée, les événements moléculaires sous-tendant et les mécanismes contrôlant la différenciation des cellules myéloïdes restent encore obscurs.

La lignée de cellules en suspension HL-60 fut établie à partir d'un prélèvement sanguin effectué sur une patiente qui présentait une leucémie myéloïde aigüe (Collins et coll., 1977). Cette leucémie fut d'abord diagnostiquée comme étant une leucémie aigüe à promyélocytes mais une récente évaluation des échantillons originaux de la patiente a montré qu'il s'agissait en fait d'une leucémie myéloblastique aigüe avec différenciation (Dalton et coll., 1988).

Les cellules HL-60 présentent un temps de doublement compris entre 20 h et 45 h selon le sous-clone utilisé. La lignée est composée de 90 à 95 % de cellules du type myéloblaste/promyélocyte. Les autres cellules ont une

morphologie ressemblant à celle de cellules myéloïdes plus matures (principalement des métamyélocytes et des myélocytes).

Les cellules HL-60 ont pour principale caractéristique de présenter une surexpression de l'oncogène *c-myc* due à l'amplification du gène (Collins et Groudine, 1982) qui permet le maintien de la lignée cellulaire à l'état non différencié.

Une autre caractéristique de cette lignée cellulaire est l'absence de CRABP (Douer et coll., 1982; Jetten et coll., 1987; Hashimoto et coll., 1988) et de récepteurs membranaires à la RBP (Davies et coll., 1985) qui sont présents par contre dans d'autres types de cellules où ils facilitent la pénétration de l'acide rétinoïque.

Par contre, les récepteurs de l'acide rétinoïque sont présents et représentés par les récepteurs RAR alpha et RAR bêta (Hashimoto et coll., 1989). Le RAR alpha semble prédominant au niveau de l'ARN messenger par rapport au RAR bêta mais par contre minoritaire au niveau protéique (Hashimoto et coll., 1989).

La propriété des cellules HL-60 qui a probablement suscité le plus d'intérêt est leur capacité à se différencier *in vitro* (90 %) en cellules de type granulocytes ou de type monocytes/macrophages selon l'agent inducteur (Fontana et coll., 1981). Les cellules HL-60 se différencient sur le plan morphologique mais aussi fonctionnel (acquisition de la capacité à réduire le nitrobleu de tétrazolium (NBT), un marqueur de différenciation cellulaire, témoin de la propriété de phagocytose) en granulocytes neutrophiles matures sous l'action de divers composés comme l'actinomycine D, le butyrate de sodium, l'hypoxanthine, le diméthylsulfoxyde et l'hexaméthylène bisacétamide (Collins et coll., 1978; Collins et coll., 1980). Il faut signaler que l'acide rétinoïque induit la différenciation pour des concentrations beaucoup plus faibles

que les autres composés comme le butyrate de sodium (0.5 mM) et le diméthylsulfoxyde (160 mM). En outre, elles peuvent se différencier en monocytes/macrophages sous l'action d'ester de phorbol ou de la 1,25 dihydroxyvitamine D3 (Rovera et coll., 1979, Tanaka et coll., 1983). Une différenciation en granulocytes éosinophiles a été aussi décrite, par exemple lorsque les cellules sont cultivées en milieu alcalin (Fischkoff et coll., 1984).

Les modifications morphologiques et fonctionnelles observées au cours de la différenciation des cellules HL-60 sont liées à des modifications qualitatives et quantitatives importantes des taux de nombreux ARNm.

Citons, parmi ceux-ci, l'ARNm de l'oncogène *c-myc*, dont le taux diminue suite à l'initiation de la différenciation, cette diminution étant due à une régulation négative de la transcription (Bentley et coll., 1986; Eick et coll., 1986; Siebenlist et coll., 1988). Il semble évident, maintenant, que la protéine *c-myc* est impliquée dans le contrôle d'expression de gènes ayant un rôle dans la différenciation cellulaire. Ainsi, des expériences utilisant la méthodologie anti-sens montrent qu'une diminution du taux d'expression de la protéine *c-myc* favorise la différenciation des cellules HL-60 via la voie granulocytaire (Yokohama et coll., 1987; Holt et coll., 1988; Wickström et coll., 1988). Le récepteur RAR alpha semble aussi être impliqué dans la différenciation des cellules HL-60 induite par l'acide rétinoïque (Collins et coll., 1990) ainsi que d'autres substances comme les gangliosides (Kitagawa et coll., 1989).

D'autres protéines voient leur taux diminuer au cours de la différenciation des cellules HL-60 vers la voie granulocytaire comme les enzymes de la voie de la 5-lipooxygénase (Goerig et coll., 1988) ou qui augmentent comme la cytidine désaminase (Guidez et coll., 1991), la NAD-glycohydrolase (Hemmi et coll., 1982), la protéine kinase C (Makowske et coll., 1988) ou

encore la protéine kinase A (Olsson et coll., 1982; Fontana et coll., 1984). Quant à la TG de tissu, son taux augmente parallèlement à la différenciation cellulaire induite par l'acide rétinoïque mais n'est pas modifié lorsque la différenciation est induite par d'autres agents comme le diméthylsulfoxyde (Davies et coll., 1985), indiquant l'absence de corrélation entre l'expression de cet enzyme et la différenciation cellulaire.

A la différenciation cellulaire induite par l'acide rétinoïque est également associée une augmentation du pH intra-cellulaire, liée à l'action de l'acide rétinoïque sur le système d'échange Na^+/H^+ (Ladoux et coll., 1987).

Enfin, une inhibition de la prolifération est souvent associée à l'induction de la différenciation cellulaire induite par l'acide rétinoïque, la majorité des cellules HL-60 perdant leur potentiel prolifératif en quittant le cycle cellulaire (Gezer et coll., 1988).

Le traitement des cellules HL-60 par l'acide rétinoïque pendant 6 à 8 jours provoque une augmentation progressive du nombre de granulocytes neutrophiles matures, suivie d'une augmentation du nombre de cellules présentant les caractéristiques morphologiques (condensation de la chromatine nucléaire, fragmentation nucléaire, vacuolisation, plissement étendu de la membrane plasmique, présence de corps apoptotiques) de l'apoptose ou mort cellulaire programmée et suivie d'une dégradation de l'ADN en multiples de 200 paires de bases indiquant une activation endonucléasique endogène, caractéristique majeure et précoce de l'apoptose (Martin et coll., 1990) (figure 7). Ce mode de mort cellulaire est également celui des granulocytes neutrophiles du sang périphérique (Savill et coll., 1989). L'apoptose dépend de l'état de différenciation des cellules et affecte uniquement les granulocytes neutrophiles matures qui sont observés en majorité après traitement par l'acide rétinoïque

(Martin et coll., 1990). Toutefois, le rôle direct de l'acide rétinoïque, indépendamment de la différenciation cellulaire, dans la mort cellulaire programmée n'est pas encore clair.

Le modèle HL-60 est un modèle classique de différenciation cellulaire pour étudier les effets de nouveaux rétinoïdes en particulier de la famille des acides rétinoïques.

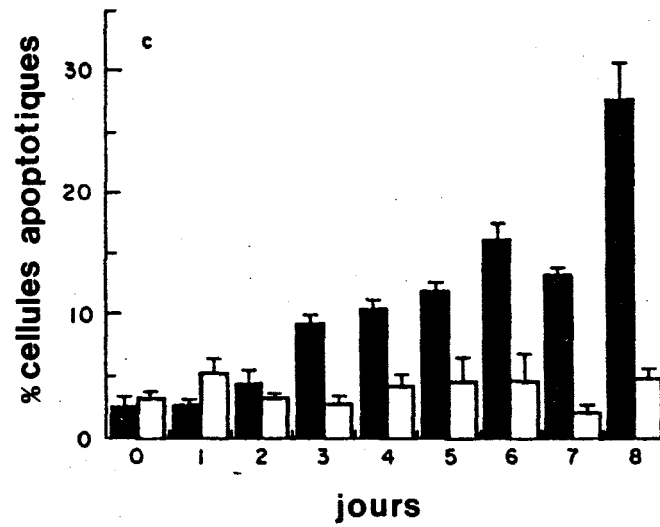


Figure 7. Pourcentage, en fonction du temps, de cellules HL-60 présentant les caractéristiques morphologiques de l'apoptose après traitement par l'acide rétinoïque 1 μ M (barres pleines) ou par le diméthylsulfoxyde 1.25 % (v:v) (barres blanches) (d'après Martin et coll., 1990).

Il existe un grand nombre de méthodes pour mesurer l'activité biologique des rétinoïdes. La considération la plus importante dans le choix de ces méthodes est l'objectif de ces expériences. Dans le cas présent, l'objectif principal est de faire une évaluation de la relation structure-activité intrinsèque des rétinoïdes, pouvant contribuer à la compréhension des mécanismes moléculaires d'action de ces substances. Un objectif secondaire est de développer de nouveaux rétinoïdes pour des perspectives thérapeutiques, objectif faisant partie d'un programme plus pharmacologique. Les tests doivent être sélectionnés en fonction de plusieurs critères : la sensibilité, la spécificité, la précision, la facilité d'exécution, le prix, la fiabilité, le rapport avec la physiologie et la pathologie *in vivo* et le rapport avec les objectifs thérapeutiques. La différenciation des cellules HL-60 utilisant le test quantitatif de réduction du nitrobleu de tétrazolium a été sélectionnée en fonction de ces différents critères.

sensibilité

L'acide rétinoïque et de nombreux rétinoïdes comme les acides rétinobenzoïques de type amide (Am80) ou de type chalcone (Ch55) sont captés efficacement par les cellules HL-60 et induisent leur différenciation fonctionnelle et morphologique en granulocytes matures (Kagechika et coll., 1984; Shudo et coll. 1985; Kagechika et coll., 1985, 1986).

La sensibilité de ce test n'exige que de petites quantités de rétinoïdes. Avec quelques dizaines de microgrammes, il est possible d'obtenir des courbes dose-réponse complètes. Ce test est un des plus sensibles et fournit des réponses biologiques significatives à l'acide rétinoïque et aux acides rétinobenzoïques dans une gamme de concentrations de 0.01 nM à 1 μ M (Shudo et coll., 1985).

spécificité

La spécificité est très importante à prendre en considération car il est essentiel que les réponses positives soient limitées aux structures chimiques qui sont les effecteurs primaires de l'action rétinoïde. La différenciation des cellules HL-60 vers la voie granulocytaire peut être induite par des agents dont la structure chimique ne ressemble pas du tout aux rétinoïdes mais à des concentrations plus élevées de l'ordre du mM. En outre, parmi les rétinoïdes, ce test semble être spécifique des acides carboxyliques puisqu'il donne des réponses hautement positives à ces agents (Shudo et coll., 1985). Par contre, les cellules HL-60 ne répondent pas aux dérivés carboxamides de l'acide rétinoïque alors que ces produits sont très actifs sur le modèle classique de la culture d'organes de trachée (Sporn et coll., 1984). Ceci est probablement dû au fait que les cellules HL-60 ne possèdent pas le matériel enzymatique permettant de convertir la fonction carboxamide en fonction acide carboxylique qui doit être libre pour que le rétinoïde soit actif (Sporn et coll., 1984). De même, le rétinol, le rétinylacétate ou le rétinaldéhyde semblent inactifs sur le modèle HL-60 alors qu'ils le sont dans d'autres modèles comme les cellules épidermiques, les cellules épithéliales de trachée ou encore les cellules de mélanome (Sporn et coll., 1984). Par conséquent, le modèle HL-60 semble être un modèle limité aux rétinoïdes possédant un groupement carboxylique libre comme les acides rétinobenzoïques.

précision

Pour qu'un test soit utile, il faut que les réponses soient mesurées de façon reproductible, quantitative et dose-dépendante. Le test de réduction du nitrobleu

de tétrazolium dans les cellules HL-60 donne des réponses quantitatives et dose-dépendantes (Shudo et coll., 1985). Quant à la reproductibilité, elle dépend du sous-clone d'HL-60 dont on dispose. En effet, une absence d'homogénéité dans les réponses de différenciation cellulaire a été observée dans différents sous-clones de cellules HL-60 à différents agents inducteurs et en particulier à l'acide rétinoïque. Ainsi, 40 % des sous-clones résistent à l'induction de la différenciation cellulaire par l'acide rétinoïque (Birnie et coll., 1988). De nombreuses autres différences qualitatives et quantitatives ont déjà été rapportées (Collins et coll., 1987) et l'explication relative à cette hétérogénéité de réponses n'est pas encore claire.

fiabilité

La fiabilité est en relation avec des considérations de spécificité et de sensibilité. Ainsi, des résultats faux-négatifs, concernant l'activité d'un nouveau rétinoïde, peuvent être obtenus si on néglige l'incapacité d'un système donné d'activer une forme précurseur d'un rétinoïde. C'est le cas de l'exemple cité auparavant concernant les dérivés carboxamides non métabolisés dans les cellules HL-60. Les faux-positifs peuvent être observés si les observations ne sont pas faites dans une portion appropriée de la courbe dose-réponse avec un nombre de concentrations insuffisant et des concentrations trop élevées non physiologiques. L'acide rétinoïque et les acides rétinobenzoïques induisent la différenciation des cellules HL-60 à des concentrations physiologiques dans une gamme comprise entre 0.01 à 1 nM (Shudo et coll. 1985) sachant que les concentrations d'acide rétinoïque dans le sang périphérique ont été estimées de l'ordre de 0.1 à 1 nM (DeRuyter et coll., 1979).

facilité d'exécution et coût

L'introduction de la culture cellulaire a beaucoup simplifié l'exécution des tests. Les résultats peuvent être obtenus en moins d'une semaine avec le modèle HL-60, lignée cellulaire facile à entretenir et ne nécessitant pas de compétence particulière. Après une période d'incubation de 5 à 6 jours, le test de réduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT) est exécuté sans difficulté particulière en moins d'une heure avec toutefois la manipulation d'ester de phorbol qui doit être faite avec beaucoup de précautions compte tenu de son pouvoir cancérigène (Breitman et coll., 1980). L'introduction du dosage de la NAD⁺-glycohydrolase par Hemmi et Breitman (1982) dans les cellules HL-60 a même offert, dans le passé, la possibilité d'obtenir des résultats 24 heures après le début du test. Cependant, ce test est limité aussi aux études d'analogues avec un groupement carboxylique libre.

Enfin, le coût des tests utilisant la culture cellulaire et notamment celui du test de réduction du NBT est inférieur à celui d'autres tests *in vitro* comme celui utilisant la culture d'organes de trachée ou *in vivo* comme celui de la régression des papillomes chez la souris (Sporn et coll., 1984).

Rapport avec la physiologie

Bien que les tests sur les cellules HL-60 utilisent des cellules malignes, il a été suggéré qu'à des concentrations physiologiques les rétinoïdes seraient nécessaires à la différenciation des cellules hématopoïétiques normales (Breitman et coll., 1980b). Toutefois, les cellules HL-60 sont des cellules leucémiques et bien qu'elles présentent de nombreuses caractéristiques des myéloblastes et des promyélocytes normaux comme la phagocytose et la

capacité de réduire le nitrobleu de tétrazolium, le chimiotactisme ou encore la présence de récepteurs du complément (Collins et coll., 1978; Collins et coll., 1979; Newberger et coll., 1979), elles diffèrent à plusieurs égards (Parmley et coll., 1987; Greaves et coll., 1986). Par exemple, la capacité des cellules HL-60 qui sont de type myéloblastique et promyélocytaire à se différencier sous l'action des esters de phorbol vers la voie des monocytes/macrophages n'est pas observée dans le cas des myéloblastes et promyélocytes normaux, la différenciation vers cette voie se faisant dans le cas physiologique à partir des cellules précurseurs proches de cellules souches à un stade de différenciation antérieur. Un autre exemple concerne l'existence d'anomalies caryotypiques dans les cellules leucémiques HL-60 non rencontrées dans les cellules normales (Huebner et coll., 1985; Murray et coll., 1983). Ainsi, les résultats obtenus dans la lignée HL-60 ne doivent être extrapolés aux cellules normales qu'avec beaucoup de prudence. Dans tous les cas, il est recommandé de vérifier que les résultats sont également obtenus dans les cellules normales correspondantes.

Rapport avec la pathologie

Le modèle HL-60 mesure une réponse de différenciation de cellules tumorales, observation faite aussi chez les patients présentant une leucémie aigüe promyélocytaire traitée par l'acide rétinoïque tout-trans (Huang et coll., 1988; Chomienne et coll., 1989), qui est donc le premier exemple de traitement différenciateur ayant abouti à un certain nombre de rémissions complètes de la maladie (Huang et coll., 1988; Chomienne et coll., 1989). En outre, il a été montré récemment que le récepteur RAR alpha, localisé sur le chromosome 17q21 (Mattei et coll., 1988), est situé à proximité

de la translocation t(15:17) (de Thé et coll., 1990). Cette translocation est spécifique de la leucémie promyélocytaire et sert au diagnostic de la maladie (Larson et coll., 1984). Cette proximité aboutit à un transcrite hybride PML-RAR alpha (PML = "Promyelocytic Leukemia Locus"). La formation d'hétérodimères inactifs ou une compétition entre le récepteur naturel et le récepteur hybride contribueraient à l'établissement de la leucémie promyélocytaire (de Thé et coll., 1990).

Rapport avec les objectifs thérapeutiques

Le test de réduction du NBT dans les cellules HL-60 est adapté aux études de relation structure-activité des rétinoïdes et en particulier des acides rétinoïques (Shudo et coll., 1985). Il peut contribuer à une meilleure compréhension du mécanisme d'action nécessaire pour un meilleur développement de ces produits. Toutefois, ce test est limité à ces produits et risque de faillir quant à la détection des propriétés pharmacologiques de rétinoïdes dont la structure est dépourvue de groupement carboxylique libre.

Lignée de cellules de neuroblastome humain

Les lignées de cellules de neuroblastome humain constituent un deuxième modèle de différenciation induite par l'acide rétinoïque, mais beaucoup moins connu et utilisé que le modèle HL-60. Toutefois, c'est un modèle fort intéressant pour l'étude du mécanisme d'action des rétinoïdes dans un domaine qui reste encore inexploré, celui du système nerveux central. Par contre, en raison de son caractère non-quantitatif, il se prête mal aux études pharmacologiques.

Biedler et coll. (1973) ont obtenu quatre lignées cellulaires continues dont la lignée cellulaire SK-N-SH à partir de 16 prélèvements biopsiques de moelle osseuse réalisés chez 13 patients présentant un neuroblastome. Le neuroblastome est une tumeur solide de l'enfant composée de cellules dérivées de cellules précurseurs du système nerveux autonome.

La lignée cellulaire SK-N-SH comprend deux types cellulaires distincts (Biedler et coll., 1973). Un type de cellules (de type N) prédominant est représenté par une cellule petite, dense, avec un cytoplasme peu abondant et des prolongements courts mais parfois plus longs dépassant 100 μ m et qui ressemble à un type neuronal. L'autre type de cellule (de type S) est une cellule plus grande et de type épithéloïde ou pseudo-gliale. Les deux sous-types se distinguent aussi sur le plan biochimique (Ciccarone et coll., 1989).

Les cellules SK-N-SH présentent entre autres une activité dopamine bêta-hydroxylase élevée, un enzyme issu du système sympathique et présent dans les cellules de type neuronal (Biedler et coll., 1973). La lignée cellulaire SK-N-SH est une exception parmi les différentes lignées cellulaires de neuroblastome car elle ne possède pas une surexpression de l'oncogène N-myc dont la réduction est corrélée avec la différenciation cellulaire induite par l'acide rétinoïque dans d'autres lignées cellulaires de neuroblastome (Thiele et coll., 1985). Elle contient, par contre, un autre oncogène, N-ras, rencontré dans d'autres lignées cellulaires comme la lignée cellulaire LAN-5. Dans cette dernière lignée, une variation du taux de cet oncogène au cours de la différenciation cellulaire n'a pas été constatée (Abemayor et coll., 1989).

La lignée cellulaire SK-N-SH comme d'autres lignées cellulaires de neuroblastome peut être clonée en lignées cellulaires pures sur le plan phénotypique exprimant des propriétés électriques, morphologiques et enzymatiques identiques (Haffke et coll., 1975; Prasad et coll., 1975) mais aussi des différences notamment sur le plan morphologique (de type S ou de type N comme le clone SK-SY5Y). La TG de tissu est, par exemple, présente exclusivement dans les cellules de type S dans une lignée cellulaire très proche, SK-N-BE (Piacentini et coll., 1991).

La CRABP est présente dans certaines lignées de neuroblastome (LAN-1, LAN-5, MR-32, SK-N-MC et CHP-100) où l'acide rétinoïque a un effet sur la choline acétyltransférase (Haussler et coll., 1983) mais sa présence n'a jamais été mise en évidence dans les cellules SK-N-SH.

Par contre, les différentes cellules de cette lignée cellulaire produisent des peptides comme le VIP ("vasoactive intestinal peptide"), expriment les récepteurs au VIP et répondent au VIP par une augmentation de l'AMPc. Une fonction autocrine ou paracrine a été attribuée au VIP dans cette lignée cellulaire (Müller et coll., 1989).

En 1927, Cushing et Wolbach sont les premiers à rapporter que les neuroblastomes peuvent se différencier spontanément en ganglioneurome bénin. Cette observation a suscité un certain intérêt et a amené un certain nombre de chercheurs à utiliser des lignées cellulaires de neuroblastome humain comme modèle pour l'étude des processus généraux de différenciation cellulaire des tumeurs.

Comme pour les cellules HL-60, l'acide rétinoïque peut induire la différenciation des cellules de neuroblastome à des concentrations très faibles. Mais cet effet est présenté aussi sous l'action d'autres agents comme le facteur

de croissance neuronal (NGF) dans le sous-clone SK-SY5Y de la lignée SK-N-SH (Perez-Polo et coll., 1987), le butyrate de sodium (Prasad et coll., 1975), le diméthylsulfoxyde (Collins et coll., 1978), les esters de phorbol (Pahlman et coll., 1984) et les analogues de l'AMPC ou des agents activant l'adénylcyclase ou inhibant la phosphodiesterase (Prasad et coll., 1975). La différenciation cellulaire induite notamment par l'acide rétinoïque se manifeste par des modifications de la morphologie cellulaire avec un accroissement des axones et dendrites associées à une inhibition de la croissance (Pahlman et coll., 1984).

modifications au cours de la différenciation cellulaire

Il existe de nombreuses modifications pendant la différenciation cellulaire des cellules de neuroblastome mais peu d'entre elles ont été rapportées dans la lignée cellulaire SK-N-SH. Toutefois, une modification a été observée après traitement des cellules SK-N-SH par l'acide rétinoïque pendant 24 à 72 heures : l'augmentation de 3 à 20 fois de l'expression de l'ARN messager de *mdr1* ("multidrug resistance gene") détectée dès la 6^{ème} heure et exprimée exclusivement par les cellules de type N (Bates et coll., 1989). En outre, dans le sous-clone cellulaire SK-SY5Y, une augmentation frappante de l'expression du récepteur au VIP a été observée avec une potentialisation parallèle de la stimulation de l'adénylcyclase par le VIP (Waschek et coll., 1989). Il a été aussi montré que dans la lignée parentale SK-N-SH, l'acide rétinoïque augmente les taux d'AMPC et le VIP stimule l'adénylcyclase (Müller et coll., 1989). Enfin, dans une lignée proche de la lignée SK-N-SH, la lignée SK-N-BE, une augmentation parallèle de la TG de tissu est observée

au cours de la différenciation cellulaire induite par l'acide rétinoïque (Mélino et coll., 1988).

Après induction de leur différenciation par l'acide rétinoïque, les cellules de la lignée de neuroblastome humain SK-N-BE présentent des signes morphologiques caractéristiques de la mort cellulaire programmée ou apoptose, avec une augmentation parallèle de la TG de tissu, enzyme présenté comme marqueur d'apoptose (Piacentini et coll., 1991). Il est en effet impliqué dans la formation de structures constituées par des protéines reliées par des ponts entre des résidus de lysine et de glutamine, structures caractéristiques des corps apoptotiques et de l'action de cet enzyme.

L'effet d'analogues de l'acide rétinoïque sur la différenciation cellulaire des cellules de neuroblastome n'est pas connu. S'il est envisageable d'utiliser ce modèle pour étudier leurs effets sur la différenciation d'un point de vue qualitatif, il est impossible d'établir des courbes dose-réponses compte-tenu du caractère non-quantitatif de la mesure de cette différenciation. Toutefois, c'est un modèle très sensible à l'action de l'acide rétinoïque puisqu'il répond à des concentrations aussi faibles que 1 nM (Sidell et coll., 1982; Sidell et coll., 1983; Sidell, 1986). En outre, une analyse ultrastructurale des cellules de neuroblastome traitées par l'acide rétinoïque montre que les modifications morphologiques sont identiques à celles observées au cours de la différenciation physiologique des neurones, respectant un certain rapport avec la physiologie.

3. AR et TG de tissu (EC 2.3.2.13).

La différenciation cellulaire et la croissance cellulaire, balance entre la prolifération et l'apoptose cellulaire, sont des processus essentiels dans la morphogénèse et le développement. Elles constituent donc une aire d'un grand intérêt pour les chercheurs, à la fois sur le plan clinique et fondamental.

Pour comprendre ces processus, il faut d'abord, identifier les facteurs qui inhibent ou stimulent la croissance ou la différenciation cellulaire. Une fois ces facteurs identifiés, il est possible, ensuite, de caractériser les mécanismes moléculaires de leur action et d'utiliser les informations qui en découlent pour comprendre comment fonctionne la régulation négative ou positive de la croissance et de la différenciation cellulaire.

Ces facteurs forment un complexe interactif comprenant des facteurs autocrines, paracrines et endocrines. Parmi ceux-ci, figurent les hormones stéroïdes et des substances qui leur sont apparentées comme les rétinoïdes.

Les rétinoïdes ont sur la même réponse, dans des cellules ou tissus différents, tantôt des effets inhibiteurs, tantôt des effets stimulateurs. Ainsi, ils inhibent la prolifération des cellules de tératocarcinome F9 et des cellules myéloblastiques et promyélocyaires HL-60 (Strickland et coll., 1978; Breitman et coll., 1980) mais, par contre, ils stimulent la prolifération des kératinocytes (Roberts et coll., 1984). Ils stimulent la différenciation des cellules F9 et HL-60 (Strickland et coll., 1978; Breitman et coll., 1980) mais, par contre, n'ont aucun effet sur la différenciation d'une autre lignée de cellules myéloïdes, les cellules KG-1 (Roberts et coll., 1984). Dans ce travail, nous nous sommes donc intéressés aux bases moléculaires de l'action rétinoïde.

Les rétinoïdes peuvent produire des modifications diverses et irréversibles dans le phénotype d'un certain nombre de cellules, d'où l'hypothèse selon laquelle ils exerceraient leur action en modifiant l'expression de gènes (Sporn et coll., 1983).

De telles modifications reflètent probablement des conséquences précoces ou directes de l'action rétinolde plutôt que des réponses secondaires à la différenciation cellulaire.

Très peu d'exemples d'effets précoces des rétinolides sur l'expression de gènes ont été décrits dans la littérature. Un des seuls à avoir été identifié est celui du gène de la TG de tissu dont l'expression semble être régulée directement au niveau transcriptionnel (Chiocca et coll., 1988; Chiocca et coll., 1989). Par conséquent, l'induction de l'expression de la TG de tissu par les rétinolides a été choisie comme modèle d'étude des bases moléculaires de l'action rétinolde.

Réactions enzymatiques (figure 8).

Les TG constituent un groupe d'enzymes qui catalysent en présence de calcium (celui-ci modifie favorablement la conformation de l'enzyme) une liaison covalente dans une même protéine ou entre deux protéines différentes (Folk et coll., 1980; Lorand et coll., 1984). Ces enzymes reconnaissent, avec un haut degré de spécificité, les résidus de glutamine liés à une protéine. La TG contient dans son site actif une cystéine avec une fonction thiol au travers de laquelle un intermédiaire acyl thioester est formé par une réaction d'échange avec le groupe gamma-carboxamide d'un résidu de glutamine lié à une protéine qui, après régénération de l'enzyme, réagit avec la fonction amine epsilon d'une lysine de la même protéine ou d'une protéine différente.

Le produit de la réaction est constitué, entre autres, par deux protéines liées de façon covalente par un pont isopeptidique epsilon-(gamma-glutaminy)-lysine. Cette réaction est d'un intérêt physiologique considérable puisque ces ponts covalents entre protéines ou dans une protéine sont extraordinairement stables et ne peuvent

être rompus qu'après dégradation totale de la ou des chaînes polypeptidiques. Ainsi, les TG catalysent des liaisons irréversibles entre protéines.

Une deuxième réaction catalysée par les TG est la conjugaison covalente aux protéines de polyamines comme la putrescine ou la cadavérine. Bien que les polyamines liées aux protéines aient été détectées dans des cellules et des tissus et que leur formation soit liée à l'activité de la TG (Mélino et coll., 1988), la signification physiologique de cette réaction n'est pas encore claire.

En outre, il existe un grand nombre d'inhibiteurs de la TG comme l'iodoacétamide, la bléomycine, un dérivé du nitrosourée, les isothiocyanates aliphatiques (Folk et coll., 1980), la méthylamine, l'éthylamine, la dansylcadavérine, la bacitracine, le tolbutamide et le GTP, ce dernier étant caractéristique de la TG de tissu (Dadabay et coll., 1989).

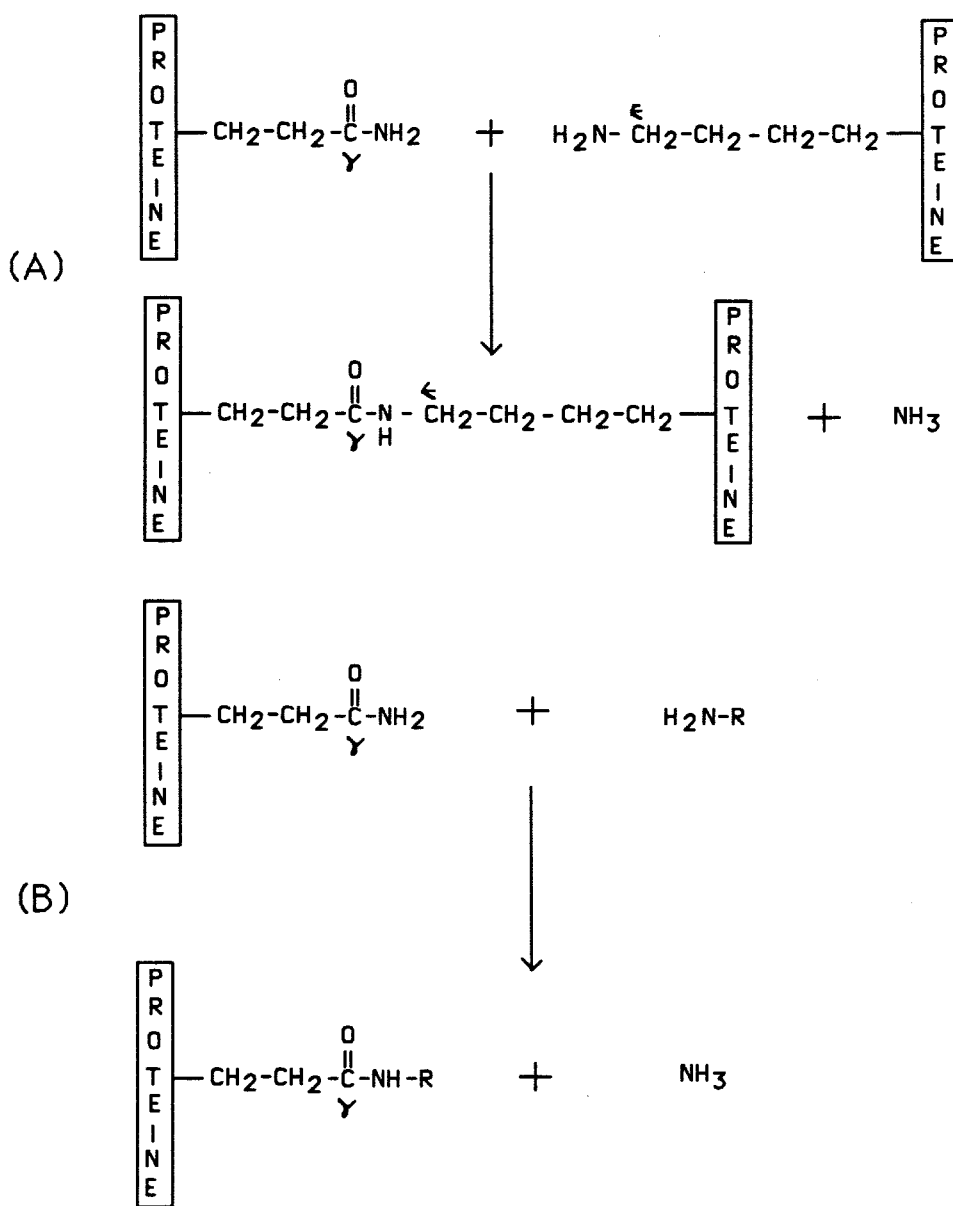


Figure 8. Deux réactions biologiques connues pour être catalysées par les TG :
 (A) Croisement entre protéines, créant des peptides à chaîne latérale.
 (B) Incorporation d'amines de petit poids moléculaire dans des protéines.

Classification

Les TG représentent une famille d'enzymes qui comprend à la fois des membres extra- et intra-cellulaires.

Certaines TG comme la TG plasmatique (le facteur XIII de coagulation) sont des enzymes extra-cellulaires qui ont, pour rôle, de stabiliser les "caillots" de fibrine en empêchant leur hydrolyse par les protéases pendant la coagulation sanguine (Lorand et coll., 1968). La TG la mieux caractérisée, la TG plasmatique, a été purifiée, clonée et séquencée (Ichinose et coll., 1986; Takahashi et coll., 1986).

D'autres TG sont des enzymes intra-cellulaires qui interviennent dans la liaison entre protéines intra-cellulaires. Il en existe deux essentiellement : la transglutaminase épidermique (ou de type I) et la TG de tissu (ou de type II). Ce sont des protéines distinctes codées par des unités transcriptionnelles distinctes (tailles des ARN messagers différentes et absence de croisement entre les sondes ADN complémentaires) avec des différences relatives à leur masse moléculaire apparente (respectivement et approximativement 90 et 80 kilodaltons), leur solubilité (particulaire et hydrosoluble), leur distribution intra-cellulaire (membranaire et cytosolique), leur distribution tissulaire (épidermique et ubiquitaire), leurs propriétés chromatographiques (éluées d'une colonne d'échange d'ions à 0.4 M NaCl et 0.25 M NaCl), leur immunoréactivité et leur rôle (Moore et coll., 1984; Davies et coll., 1984; Thacher et coll., 1985 ; Lichti et coll., 1985 ; Ichinose et coll., 1986 ; Jetten et coll., 1986 ; Ikura et coll., 1988 ; Chiocca et coll., 1988, 1989 ; Floyd et coll., 1989 ; Gentile et coll., 1991).

Les kératinocytes contiennent la TG épidermique induite durant la différenciation terminale de ces cellules. Cet enzyme lié à la face interne de la membrane plasmique, est activé durant le processus de différenciation suite à l'influx de calcium dans les cellules et lie de façon spécifique des protéines intra-cellulaires telles que l'involucrine, induites également durant la différenciation. La liaison des protéines de la face interne de la membrane plasmique provoque la formation d'une enveloppe qui revêt le squelette de kératine présent dans la cellule et conduit à la cornification typique de l'épithélium épidermique (Rice et coll., 1977, 1979). La TG épidermique offre un exemple frappant du rôle physiologique potentiel que peuvent jouer les TG dans la fonction cellulaire mais c'est un enzyme très spécifique d'un tissu donné.

La plupart des cellules de l'organisme expriment une TG différente, la TG de tissu. Cet enzyme est ubiquitaire, il est très fréquemment induit dans les cellules en différenciation terminale et évoluant vers l'apoptose. En fait, son rôle précis n'est pas encore clair. L'expression de son gène étant régulée par l'acide rétinoïque de façon transcriptionnelle en quelques minutes (Chiocca et coll., 1988 ; Chiocca et coll., 1989), l'induction de la TG par l'acide rétinoïque a été choisie comme modèle pour étudier les bases moléculaires de l'action des rétinoïdes.

Enfin, une TG intra-cellulaire isolée récemment des cellules épithéliales de trachée de lapin semble différente des deux précédentes (Floyd et coll., 1989).

Propriétés physicochimiques et enzymatiques. Structure

Les TG tissulaire les plus étudiées furent celles du foie de lapin (Abe et coll., 1977) et du foie de cochon d'Inde (Folk et coll., 1971). Cet enzyme est thermolabile et instable à pH élevé, contrairement à la TG épidermique (Lichti et coll., 1985). Son dosage utilise couramment deux substrats, la putrescine et la caséine. La liaison covalente entre les deux substrats nécessite un groupement amine du donneur d'amine (putrescine) non chargé (Folk et coll., 1973). Le pKa de la putrescine étant de 9.7, la réaction doit être favorisée à des pH élevés. Ceci a été confirmé par la détermination de la pH-dépendance de la réaction qui indique un pH optimum de 9.5 pour la réaction catalysée par les enzymes induites notamment par l'acide rétinolique. Cependant, un test de linéarité du dosage en fonction du temps montre que l'enzyme est instable à pH 9.5 et à 37°C. A 25°C, le dosage est par contre linéaire pendant 20 à 30 minutes, même à pH élevé. L'activité enzymatique près du pH neutre (7.5) est plus stable mais beaucoup plus basse (1/6 à 1/10 de l'activité à pH 9.5) et donc plus difficile à mesurer avec précision (Lichti et coll., 1985).

La première TG de tissu caractérisée et purifiée est celle du foie de cochon d'Inde par Folk et Cole (1966).

Cet enzyme se présente sous la forme d'une seule chaîne polypeptidique. Sa masse moléculaire calculée d'après la séquence en acides aminés déduite de l'ADN complémentaire (ADNc) de la TG de tissu des cellules endothéliales ou des macrophages péritonéaux de souris, est identique à celle obtenue par digestion au bromure de cyanogène de l'enzyme érythrocytaire humaine purifiée (77,253 et 76,699 respectivement) (Gentile et coll., 1991). La

masse moléculaire apparente des produits de traduction ou d'une protéine issue d'un extrait cellulaire, déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS varie et est en moyenne plus élevée (de 77 à 87 kilodaltons) indiquant une migration anormale en gels de polyacrylamide-SDS (Abe et coll., 1977 ; Folk et coll., 1977 ; Ikura et coll., 1988 ; Floyd et coll., 1989).

Une forte homologie (plus de 80 %) est retrouvée entre les séquences en acides aminés des TG de tissu provenant des cellules endothéliales, des macrophages péritonéaux de souris et du foie de cochon d'Inde. Par contre, on constate une faible homologie entre les séquences en acide aminés des macrophages péritonéaux de souris et des cellules endothéliales d'une part et celle des cellules épithéliales de trachée de lapin d'autre part (Gentile et coll., 1991). Enfin, sans surprise, la région du site actif est hautement conservée entre toutes les TG ainsi que les domaines liant le calcium.

La TG de tissu ne contient pas de sucre bien qu'elle possède des sites de glycosylation (Folk et coll., 1973).

Plusieurs anticorps polyclonaux et monoclonaux ont été produits contre la TG de tissu purifiée à partir du foie de cochon d'Inde. Il faut citer, principalement, deux anticorps produits chez le lapin (Fésus et coll., 1977) reconnaissant les formes de l'enzyme inactivée et activée par le calcium, un anticorps polyclonal de chèvre purifié par chromatographie d'affinité avec l'enzyme de rat immobilisé (Murtaugh et coll., 1983) et un anticorps monoclonal (Birckbichler et coll., 1985). Ainsi, leur utilisation a permis entre autres de réaliser des expériences en présence de cycloheximide afin de mesurer la demi-vie de la TG de tissu, estimée de l'ordre de 6 heures dans les macrophages péritonéaux de souris (Murtaugh et coll., 1983).

Ikura et coll. ont cloné et séquencé pour la première fois l'ADNc de l'ARNm de la TG de tissu du cochon d'Inde, de façon partielle (1987), puis complète (1988) : il diffère de l'ARNm du facteur XIII (Ichinose et coll., 1986). Floyd et coll. (1989) ont par la suite cloné et séquencé l'ADNc à partir des cellules épithéliales de trachée de lapin. Il est également distinct de ceux du facteur XIII et de la TG de tissu. Enfin, très récemment, a été cloné et séquencé l'ADNc à partir des macrophages péritonéaux de souris et des cellules endothéliales humaines (Gentile et coll., 1991) (figure 9). L'analyse en "Northern blot" des TG de tissu, d'abord du foie de cochon d'Inde (Ikura et coll., 1988) puis des macrophages péritonéaux de souris et des cellules endothéliales humaines (Gentile et coll., 1991), ne révèle qu'un seul ARNm de taille approximative 3.7-3.8 kb et 3.6-3.7 kb, respectivement. En outre, après traduction *in vitro*, la TG humaine des cellules endothéliales présente la masse moléculaire attendue et surtout un caractère fonctionnel car elle catalyse la conjugaison covalente (dépendant du calcium) de la putrescine à la diméthylcaséine indiquant qu'une modification post-traductionnelle de la TG de tissu n'est pas, contrairement au facteur XIII, un pré-requis pour l'activité enzymatique (Gentile et coll., 1991). L'analyse de l'ADN génomique, actuellement en cours, indique que la TG de tissu est présente en une seule copie de gène (Stein et coll., résultats non publiés). L'absence de polymorphisme avait été suggéré, auparavant, par Ikura et coll. (1988).

Distribution

La TG de tissu, enzyme ubiquitaire, a déjà été détectée dans de nombreux tissus et cellules normaux ou néoplasiques, dans des espèces différentes. D'une façon générale, le taux d'enzyme est beaucoup plus faible dans les cellules néoplasiques par rapport aux cellules normales (Birckbichler et coll., 1977).

Cet enzyme est présent dans de nombreux tissus et tout particulièrement dans le foie (Abe et coll., 1977; Folk et coll., 1971; Murtaugh et coll., 1983). Thomazy et coll. (1989) ont montré par immunocytochimie que l'aspect ubiquitaire de cet enzyme était, entre autres, lié à sa présence dans des cellules ubiquitaires périvasculaires comme les cellules endothéliales, les cellules du muscle lisse ou encore les fibroblastes.

De nombreuses cellules et lignées cellulaires normales ou néoplasiques contiennent la TG de tissu à des taux variables : les fibroblastes de différentes lignées cellulaires issues de différents organes comme les lignées WI-38 transformées ou non par SV40 (poumon humain) (Birckbichler et coll., 1977, 1983), CHO (ovaire de hamster chinois) (Milhaud et coll., 1980), NRK (rein de rat) et Balb-3T3 transformées ou non par SV40 (souris) (Davies et coll., 1980) et NIH-3T3 (souris) (Cai et coll., 1991); les cellules épithéliales de trachée de rat 2C5 (Denning et coll., 1991); les cellules épidermiques ou kératinocytes de souris (Yuspa et coll., 1982 ; Lichti et coll., 1985, 1988 ; Rice et coll., 1977, 1979) ou humains (Rubin et coll., 1986); des cellules de lignées hématopoïétiques ou type monocytes/macrophages comme les cellules HL-60 (leucémie aigüe myéloblastique et promyélocytaire humaine), les lymphocytes humains (Novogrodsky, 1978), les cellules HEL et K562 (érythroleucémies humaines) (Suedhoff et coll., 1990), les érythrocytes (Lorand et coll., 1976),

les mastocytes (Fesus et coll., 1985), les cellules THP-1 (Mehta et coll., 1986), les macrophages péritonéaux de souris résidents ou activés par le thioglycolate (Murtaugh et coll., 1983 ; Moore et coll., 1984 ; Murtaugh et coll., 1986; Chiocca et coll., 1988, 1989); les cellules endothéliales (Nara et coll., 1989); les cellules de mélanome (Scott et coll., 1982) ; les cellules gliales de la lignée SK-N-BE (neuroblastome humain) (Mélino et coll., 1988; Piacentini et coll., 1991) ; les cellules HeLa-TV (adénocarcinome du col utérin) (Piacentini et coll., 1991); les cellules de phéochromocytome (Byrd et coll., 1987); les cellules hypophysaires humaines sécrétant de l'ACTH (Kitahara et coll., 1987) et les hépatocytes (Birkbichler et coll., 1976).

La distribution ubiquitaire de la TG de tissu permet de lui attribuer un rôle dans un phénomène biologique de base comme la différenciation cellulaire ou encore la mort cellulaire programmée (Suedhoff et coll., 1990; Piacentini et coll., 1991).

Régulation

La TG de tissu est régulée par divers agents mais principalement par l'acide rétinoïque dans diverses lignées cellulaires.

L'acide rétinoïque induit l'expression de la TG de tissu notamment dans les macrophages péritonéaux de souris *in vitro* (Murtaugh et coll., 1983 ; Moore et coll., 1984 ; Murtaugh et coll., 1986 ; Chiocca et coll., 1988, 1989) et *in vivo* (Mehta et coll., 1986), dans les cellules de leucémie aigüe myéloblastique et promyélocytaire humaine HL-60 (Davies et coll., 1985), les cellules d'érythroleucémie humaine HEL (Suedhoff et coll., 1990), les cellules de neuroblastome SK-N-BE (Mélino et coll., 1988). L'acide rétinoïque induit aussi la TG de tissu dans d'autres lignées cellulaires comme les kératinocytes de souris et humains *in vitro* (Lichti et coll., 1985) et *in vivo* (Yuspa et coll., 1982), les cellules épithéliales de trachée de lapin (Floyd et coll., 1989), les lignées de cellules monocytiques THP-1 (Mehta et coll., 1986), les fibroblastes de souris NIH-3T3 (Cai et coll., 1991), les cellules endothéliales (Nara et coll., 1989) et les cellules de mélanome (Scott et coll., 1982).

La régulation de l'expression de la TG de tissu a été particulièrement étudiée dans les macrophages péritonéaux de souris. Schroff et coll. (1981) ainsi que Leu et coll. (1982) rapportent que l'activation des macrophages péritonéaux de souris est associée à une importante augmentation de l'activité TG intracellulaire. Il a été ensuite montré que cette augmentation était due à l'induction de la TG de tissu et pouvait être reproduite *in vitro* en exposant les macrophages péritonéaux de souris résidents à du sérum frais homologue (Murtaugh et coll., 1983). Point particulièrement frappant : cette induction était

très importante, la TG de tissu augmentait de 100 fois en 24 heures et atteignait jusque 1 % des protéines intra-cellulaires totales. Cette induction était spécifique car, seule, la TG de tissu était induite dans ces conditions. Une analyse systématique du sérum a été entreprise pour identifier le composant responsable de l'induction de la TG de tissu dans les macrophages. Moore et coll. (1984) ont montré que l'activité de la TG du sérum était abolie par une extraction lipidique et pouvait complètement être restaurée par l'addition de concentrations physiologiques de rétinol ou d'acide rétinoïque au sérum délipidé. Des études ultérieures ont montré que l'acide rétinoïque augmentait la synthèse *de novo* de la TG de tissu dans ces cellules (Moore et coll., 1984). La découverte des effets importants de l'acide rétinoïque sur l'activité de la TG de tissu dans les macrophages a fourni l'opportunité unique d'obtenir des informations sur les événements précoces de l'action rétinoïde. Des clones ADNc ont été isolés pour la TG de tissu de souris à partir d'une banque d'ADNc de macrophages péritonéaux de souris clonés dans un vecteur d'expression bactériophage. Ces sondes TG ont été utilisées pour étudier les cinétiques de l'induction de l'ARN messager de la TG de tissu après exposition des macrophages à l'acide rétinoïque (Chiocca et coll., 1988) (figure 10). Ces études montrent que l'acide rétinoïque augmente les taux d'ARNm de la TG de tissu 15 minutes après l'addition de l'acide rétinoïque aux cellules. Les taux d'ARNm augmentent pendant 6 à 10 heures et se trouvent à un taux de 25 à 50 fois le taux de base. Ces effets ne semblent pas impliquer une protéine intermédiaire puisqu'ils persistent en présence de cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique (figure 11). Les effets de l'acide rétinoïque sur la stabilité de l'ARNm de la TG de tissu dans les cellules traitées et non traitées par l'acide rétinoïque ont également été examinés en présence d'actinomycine D et montrent que l'acide rétinoïque n'a pas d'effet sur cette stabilité (Chiocca et

coll., 1988) (figure 12). Enfin, pour déterminer si l'induction était provoquée par une augmentation de la transcription du gène de la TG de tissu, les noyaux des macrophages non traités et traités ont été isolés et leur capacité à transcrire le gène de la TG de tissu a été mesurée *in vitro* par la technique du "run-on" (tableau III). Ces expériences ont montré qu'en présence des noyaux de cellules traitées par les rétinoïdes, la transcription du gène est 3 à 5 fois plus active qu'en présence des noyaux des cellules non traitées (Chiocca et coll., 1988, 1989) indiquant probablement, que l'acide rétinoïque exerce un effet direct sur l'expression du gène de la TG de tissu en augmentant son activité transcriptionnelle. Très récemment, une très forte corrélation a été trouvée entre les taux de récepteurs de l'acide rétinoïque alpha et bêta transfectés dans des cellules de trachée de rat 2C5 et l'induction de la TG de tissu, RAR alpha étant plus impliqué que RAR bêta dans cette réponse (Denning et coll., 1991). En outre, une diminution de l'expression du RAR alpha utilisant un vecteur d'expression anti-sens diminue l'induction de base de la TG de tissu par l'acide rétinoïque. Aussi, il est tentant de penser que les récepteurs de l'acide rétinoïque puissent être les facteurs de transcription régulant l'expression du gène de la TG de tissu. L'analyse de l'ADN génomique au niveau de la séquence située en amont du gène de la TG de tissu est, actuellement, en cours dans le laboratoire de P.J.A. Davies (Houston, Texas) pour rechercher la présence d'éventuels éléments de réponse spécifiques impliqués dans l'expression du gène régulé par l'acide rétinoïque. Ces travaux pourront ainsi valider ce modèle de façon définitive .

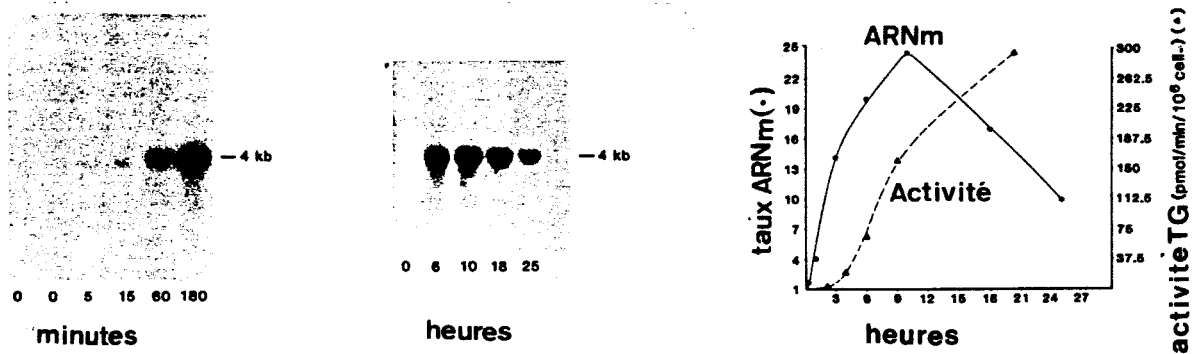


Figure 10. Induction de l'ARN messenger de la TG de tissu en fonction du temps. (A) Les macrophages péritonéaux de souris ont été traités par l'acide rétinoïque 1 μ M. (B) Comparaison entre l'induction de l'activité et de l'ARNm de la TG de tissu (d'après Chiocca, 1988).

Tableau III. Unités densitométriques mesurant la transcription du gène de la TG de tissu à partir de noyaux isolés de macrophages péritonéaux de souris non traités ou traités par l'acide rétinoïque (expérience de "run-on") (d'après Chiocca 1989).

Temps d'incubation (h)	non traitées	traitées
5	100	1220
5	180	1220
5	220	1340
3	140	545
en présence d'alpha-amanitine ¹	ND ²	0

1 inhibiteur de l'ARN polymérase II

2 non déterminées

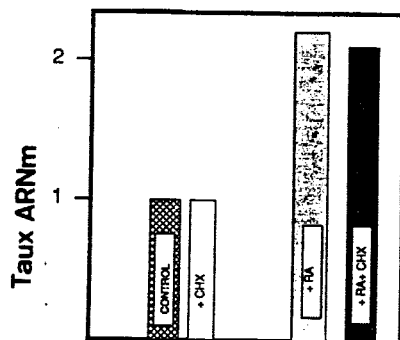


Figure 11. Effet de la cycloheximide sur l'induction de l'ARN messenger de la TG de tissu. Les macrophages péritonéaux de souris ont été traités pendant 40 minutes avec 100 μ M de cycloheximide (+ CHX) seul, avec 1 μ M d'acide rétinolique (RA) seul ou les deux (+ RA + CHX) ou non traités (Contrôle) (D'après Chiocca, 1988).

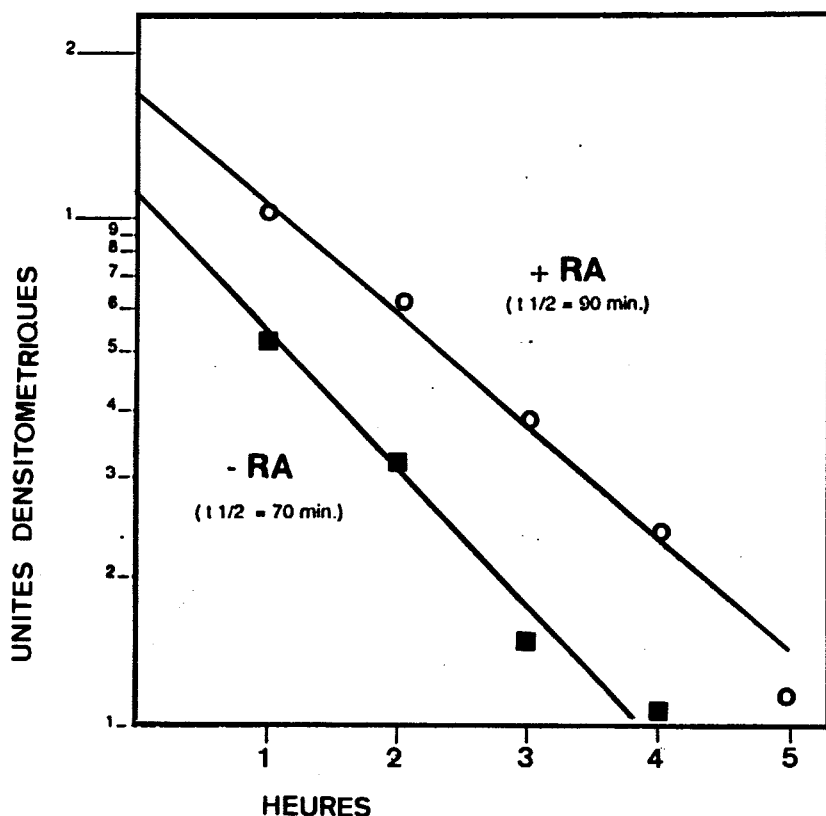


Figure 12. Effet de l'acide rétinolique sur la stabilité de l'ARN messenger de la TG de tissu. Les macrophages péritonéaux de souris ont été traités pendant 10 heures avec l'acide rétinolique tout-trans 1 μ M en présence d'actinomycine D. Les unités densitométriques traduisent les taux d'ARN messenger de la TG de tissu mesurés en fonction du temps. La demi-vie (t_{1/2}) de l'ARN messenger de la TG de tissu a été ainsi mesurée (d'après Chiocca, 1989).

Dans les cellules HL-60, l'expression de la TG de tissu est aussi induite de façon spécifique par l'acide rétinoïque au niveau de l'activité et *de novo* au niveau protéique dès la 6ème heure et pendant 48 heures (Davies et coll., 1985). Elle est également régulée au niveau de l'ARN messenger comme l'a démontrée l'analyse des produits de traduction *in vitro* à partir de l'ARN poly(A) extrait des cellules traitées et non traitées (Murtaugh et coll., 1986) (figure 13). L'expression de l'enzyme est aussi régulée de la même façon dans les cellules HEL et indépendamment de la cycloheximide (Suedhoff et coll., 1990).

D'autres agents sont aussi capables d'induire la TG de tissu comme le TGF bêta1 ("Tumor Growth Factor") dans les kératinocytes normaux (George et coll., 1990), le butyrate de sodium dans les fibroblastes de poumon humain WI-38 (Lee et coll., 1987) et les cellules PC12 de phéochromocytome (Byrd et coll., 1987), les esters de phorbol et la dexaméthasone dans les cellules épidermiques (Obinata et coll., 1977) et le TNF ("tumor necrosis factor") dans les fibroblastes de souris L929 (Davies, 1990).

En outre, des analogues de l'AMPC comme le dibutyrylAMPC (Davies, 1985) sont capables de potentialiser l'expression de la TG de tissu induite par l'acide rétinoïque. Ce type de régulation fait actuellement l'objet de nombreuses recherches.

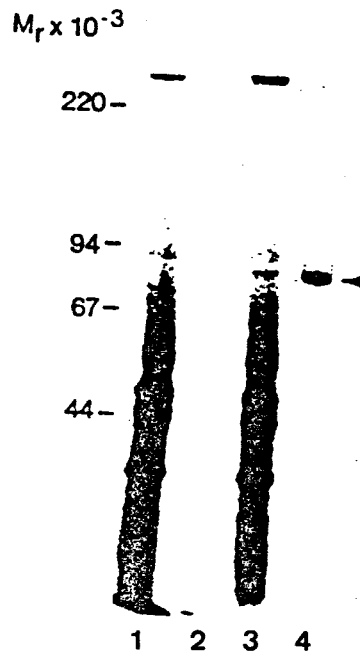


Figure 13. Traduction in vitro de l'ARN poly(A) extrait des cellules de leucémie myéloblastique et promyélocytaire HL-60 traitées pendant 18 heures par 1 mM de dibutyrylAMPc (contrôle) (1,2) ou 1 μ M d'acide rétinoïque en présence de 1 mM de dibutyrylAMPc (3,4). Les produits de traduction in vitro totaux (1,3) ou immunoprécipités avec un anticorps anti-TG de tissu (2,4) ont été mis en évidence (d'après Murtaugh, 1986).

Rôle

La TG de tissu serait impliquée dans des phénomènes ponctuels comme l'activation des macrophages (Fesus et coll., 1981 ; Schroff et coll., 1981 ; Leu et coll., 1982), la stabilisation du réseau cytosquelettique et la sécrétion et le transport des vésicules d'endocytose (Ando et coll., 1989), la liaison covalente des microtubules à d'autres composants cellulaires ou des liaisons entre neurofilaments dans le cerveau et cytokératines dans l'hépatocyte (George et coll., 1990), les modifications post-traductionnelles de l'apoptéine B (Cocuzzi et coll., 1990) et de la phospholipase A2 (Cordella-Miele, 1990). Enfin, la TG de tissu aurait également une activité GTPasique (Lee et coll., 1989).

La TG de tissu serait aussi impliquée dans de nombreux phénomènes biologiques plus généraux comme l'endocytose médiée par un récepteur (Davies et coll., 1980), les modifications post-traductionnelles de protéines durant le développement (Cariello et coll., 1990) , le maintien de l'état non-prolifératif des cellules (Birkbichler et coll., 1977), la différenciation cellulaire spontanée ou induite (Moore et coll., 1984 ; Byrd et coll., 1987 ; Ohl et coll., 1987 ; Suedhoff et coll., 1990) et l'apoptose ou mort cellulaire programmée pour laquelle elle serait un marqueur (Fesus et coll., 1987 ; Piacentini et coll., 1991 ; Fesus et coll., 1991).

4. Conclusion.

Les rétinoïdes ont connu un développement très important des années soixante aux années quatre-vingt. Plus de 1500 produits ont été synthétisés en particulier par le groupe Hoffman La Roche entre 1968 et 1983. Mais deux produits seulement ont vu le jour sur le marché en dermatologie, dans le traitement de l'acné et du psoriasis. En effet, la toxicité de ces substances constitue un obstacle majeur dans la recherche et le développement de nouveaux produits. Toutefois, ces rétinoïdes suscitent encore un certain intérêt depuis que l'on a observé leur effet inhibiteur sur la prolifération et leur effet stimulateur sur la différenciation des cellules néoplasiques. Ces substances avaient donc un avenir potentiel en thérapeutique anti-cancéreuse. L'acide rétinoïque tout-trans a notamment été utilisé avec succès dans le traitement d'une forme de leucémie, la leucémie aigüe à promyélocytes. Le développement des rétinoïdes s'est donc poursuivi, la découverte de produits plus efficaces et moins toxiques rendant nécessaires les études de relation structure-activité mais aussi de leur mécanisme d'action.

Les études de relation structure-activité ont été très nombreuses avant la découverte des récepteurs de l'acide rétinoïque. Elles ont permis de dégager un certain nombre d'éléments communs de relation structure-activité aux trois générations de rétinoïdes et de suggérer un mécanisme d'action également commun.

Concernant le mécanisme d'action, le clonage et le séquençage des récepteurs de l'acide rétinoïque, les premiers récepteurs à avoir été mis en évidence par les techniques de biologie moléculaire avant les techniques biochimiques, ont ensuite ouvert une nouvelle ère dans l'histoire des rétinoïdes. On dénombre actuellement plusieurs récepteurs comportant chacun plusieurs isoformes. Ce mécanisme d'action apparaît donc très complexe. Cette complexité est encore accentuée par le fait que certains effets de l'acide rétinoïque semblent impliquer des systèmes indépendants des

récepteurs mettant en jeu en particulier les protéines kinases A et C. Ces différentes voies de transduction jouent aussi probablement un rôle dans les effets résultant de l'interaction entre l'acide rétinoïque et d'autres substances de la famille des stéroïdes.

La différenciation cellulaire est une réponse qui permet de tester l'action anticancéreuse des rétinoïdes; toutefois sa complexité ne permet pas d'approfondir leur mécanisme d'action. Pour étudier les bases moléculaires d'action de l'acide rétinoïque, il faut une réponse primaire c'est à dire l'induction au niveau transcriptionnel d'un produit d'expression de gène dans un temps relativement court de l'ordre de 15 minutes. Le gène de la TG de tissu est un de ces rares gènes dont l'expression est régulée de façon précoce. Il constitue par conséquent un bon modèle pour étudier les bases moléculaires d'action de l'acide rétinoïque. Très récemment, l'ADN complémentaire de la TG de tissu humaine a été cloné et l'analyse, à partir de l'ADN génomique, des régions incluant le promoteur est en cours.

Il existe peu de modèles cellulaires qui sont à la fois des modèles de différenciation et d'expression de la TG de tissu. Les lignées de leucémie humaine myéloblastique et promyélocytaire HL-60 et de neuroblastome humain expriment ces deux réponses et semblent donc des modèles appropriés pour des études aussi bien pharmacologiques que fondamentales de l'action rétinoïde.

RESULTATS ET DISCUSSION

Notre travail expérimental, au sein des différents travaux menés au laboratoire (figure 14), a consisté d'abord à mettre en place les modèles cellulaires (figure 15) dans le laboratoire qui n'en disposait pas puis d'utiliser ces modèles pour répondre à un certain nombre de questions peu abordées jusque maintenant.

Bien que les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) aient été largement étudiés, leur rôle direct dans des réponses biologiques a fait l'objet de très peu de travaux. Notre premier objectif a donc été d'essayer de montrer le rôle direct de ces récepteurs dans la différenciation cellulaire et l'expression de la TG de tissu dans le modèle HL-60. L'approche choisie pour répondre à cette question a été celle de la méthodologie anti-sens qui a déjà été utilisée avec succès pour étudier la fonction de diverses protéines.

Il était ensuite important de savoir si les rétinoïdes exerçaient leurs effets biologiques avec un mécanisme d'action identique à celui de l'acide rétinoïque. En effet, compte tenu de la diversité des RAR, il était logique de se demander si le mécanisme d'action de ces rétinoïdes impliquait les mêmes récepteurs. Les effets de ces rétinoïdes de synthèse ont donc été examinés sur nos deux réponses cellulaires.

Après l'acide rétinoïque et les rétinoïdes de synthèse, il était également intéressant d'étudier les effets sur ces mêmes réponses de molécules apparentées de la famille des stéroïdes dont les récepteurs appartiennent à la même famille sur le plan fonctionnel. Un point particulièrement intéressant était d'examiner les interactions possibles entre l'acide rétinoïque et ces molécules apparentées. En effet, des interactions en général existent dans le contexte biologique et entrent dans le cadre global des phénomènes de régulation. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'interaction entre rétinoïdes et glucocorticoïdes. En effet, ces derniers sont capables de réguler les effets induits par d'autres agents selon des mécanismes situés au niveau transcriptionnel. Si une interaction primaire était mise en évidence entre rétinoïdes et glucocorticoïdes dans nos modèles cellulaires, un champ d'investigation passionnant relatif au contrôle de la transcription serait ouvert aux biologistes moléculaires.

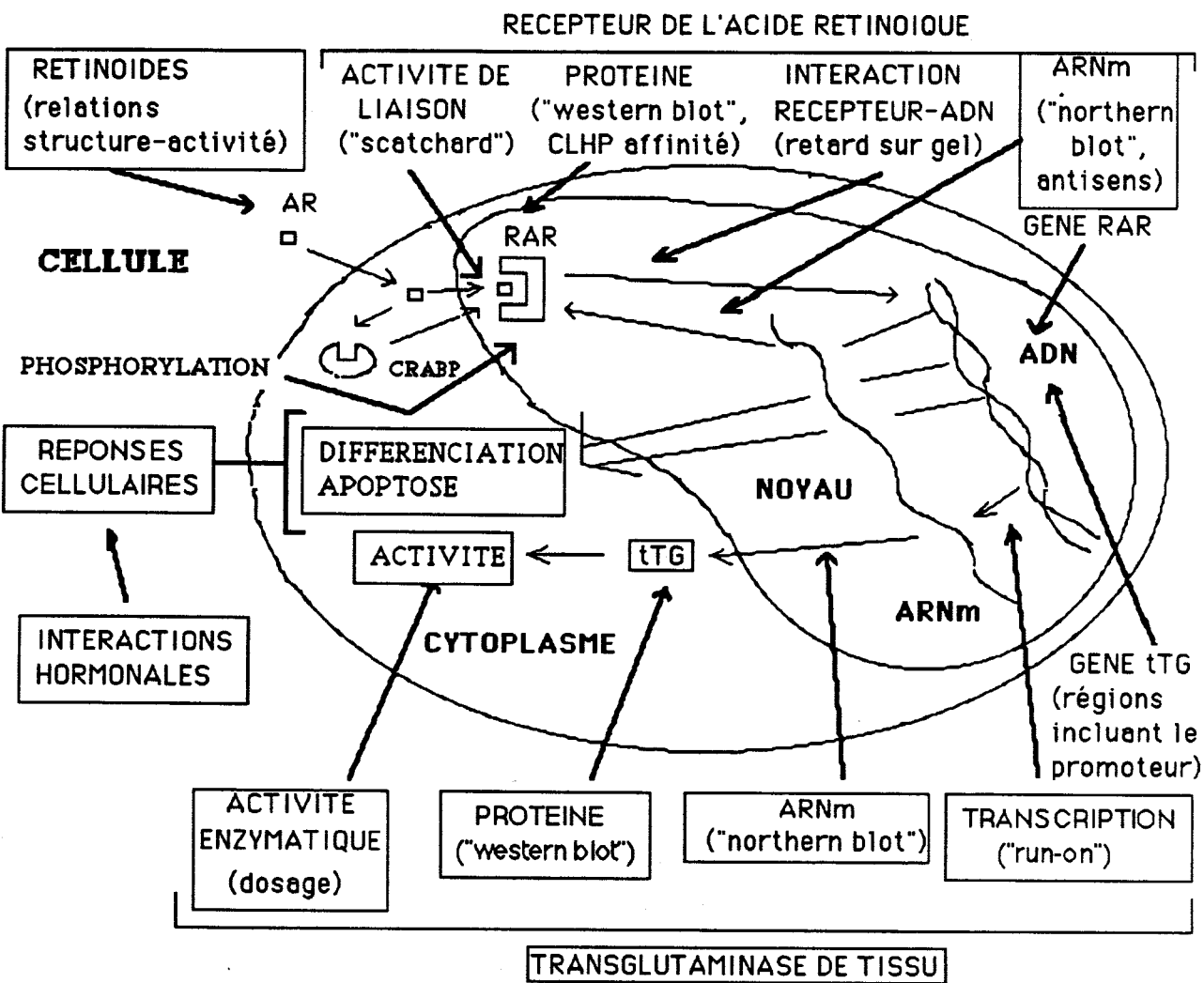


Figure 14. Schéma représentant les différents niveaux d'activité du laboratoire (niveaux d'activité personnelle : encadrés).

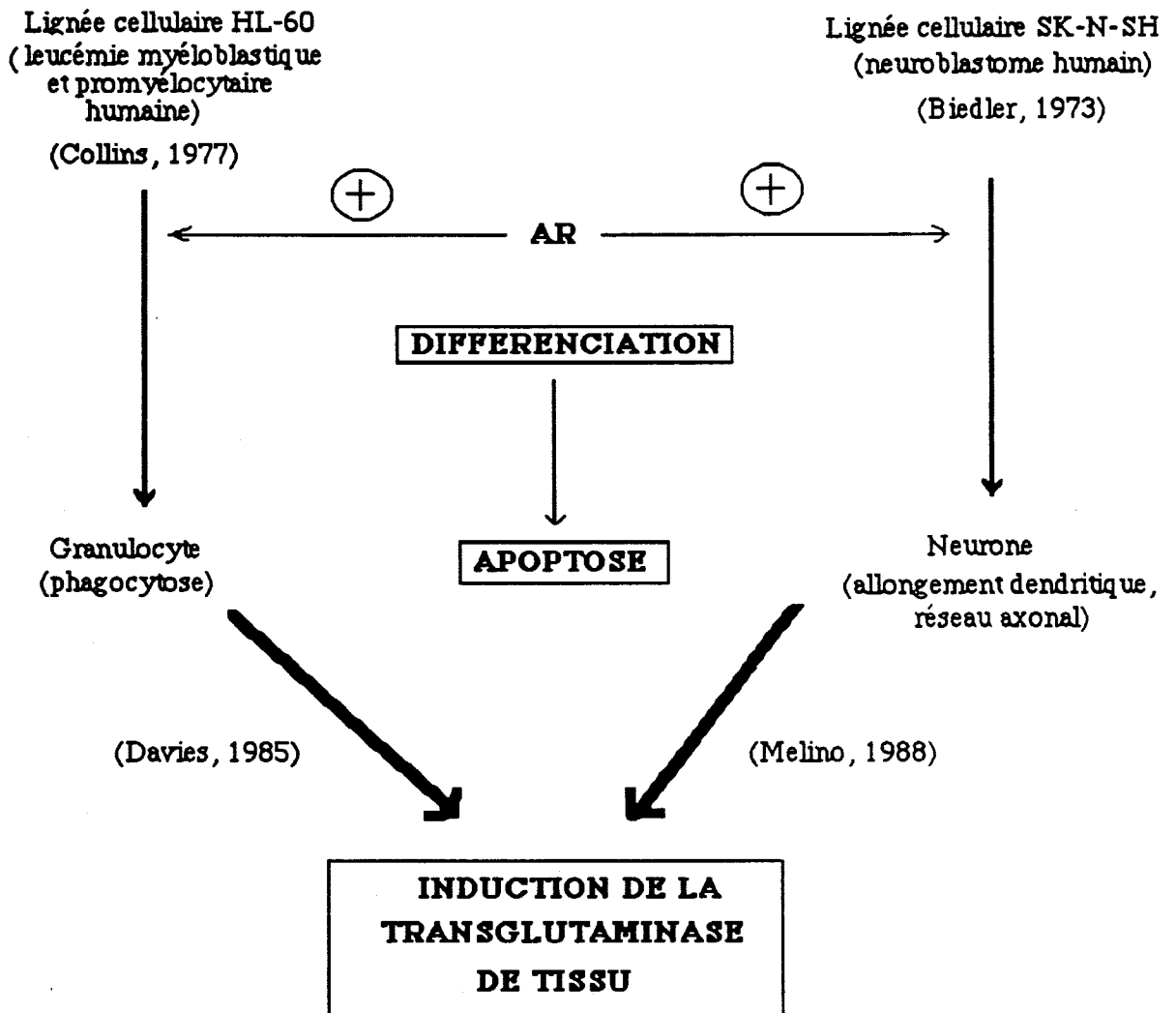


Figure 15. Modèles cellulaires pour l'étude des bases cellulaires et moléculaires d'action de l'acide rétinoïque (AR) et de ses dérivés.

1. Présentation des modèles pharmacologiques.

Effets de l'acide rétinoïque sur la différenciation cellulaire.

Dans la lignée cellulaire de leucémie aigüe myéloblastique et promyélocytaire humaine HL-60, les cellules témoins sont, pour approximativement 85%, des myéloblastes et des promyélocytes, le reste étant constitué de cellules se trouvant à un stade intermédiaire de différenciation (métamyélocytes, myélocytes). Ces cellules à l'état non différencié présentent un noyau rond volumineux, un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, la présence de granulations non spécifiques (azurophiles) et une taille en général un peu plus élevée que celle des cellules différenciées (figures 16 et 18). Après traitement par l'acide rétinoïque 1 μ M pendant 5 jours, on peut observer un nombre significatif (figure 19) de cellules présentant les caractéristiques morphologiques des granulocytes neutrophiles au stade terminal de différenciation c'est à dire un noyau un peu moins volumineux et surtout déformé voire typiquement polylobé, un rapport nucléo-cytoplasmique plus faible, la disparition des granulations azurophiles et une taille en général plus faible (figures 17 et 19). Ensuite les granulocytes matures mettent en jeu leur programme de mort cellulaire ou apoptose avec une condensation chromatiniene et une fragmentation nucléaire caractéristiques (figure 19, flèches). La différenciation morphologique des cellules HL-60 induite par l'acide rétinoïque est maintenant classique (Breitman et coll., 1980a) et l'évolution des cellules, une fois différenciées, vers la mort cellulaire par apoptose est un phénomène qui a été décrit récemment pour les cellules HL-60 (Martin et coll., 1990).

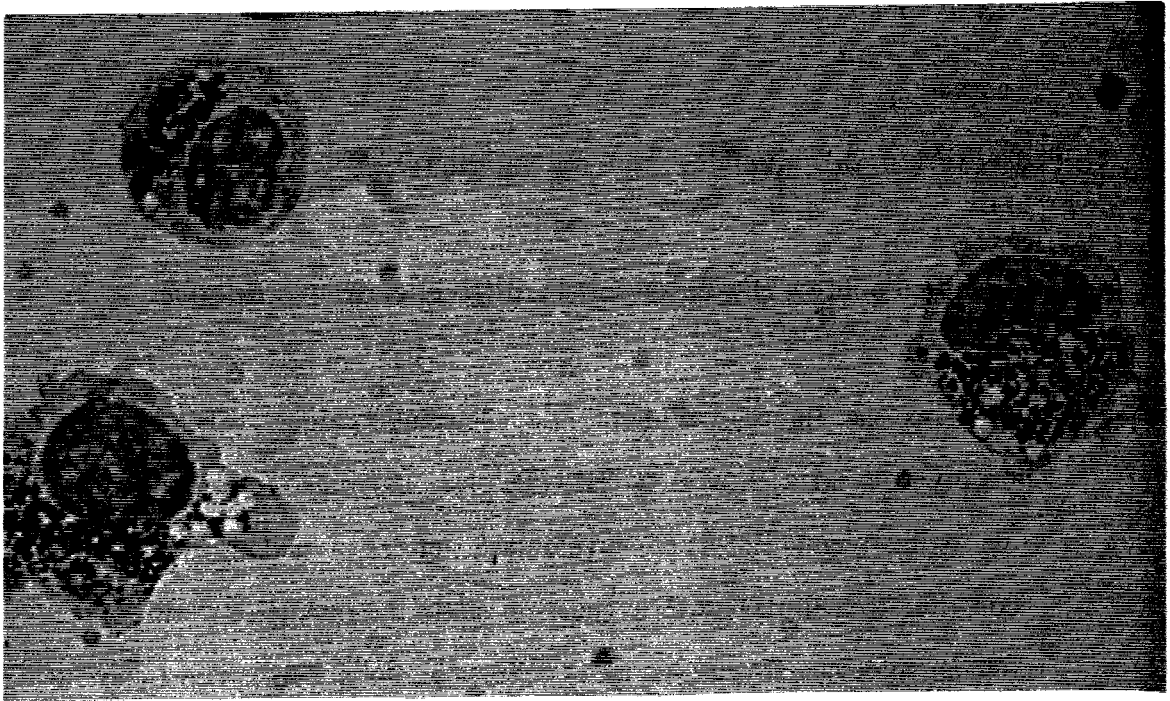


Figure 16. Cellules de leucémie à promyélocytes HL-60 non traitées (x 1000)

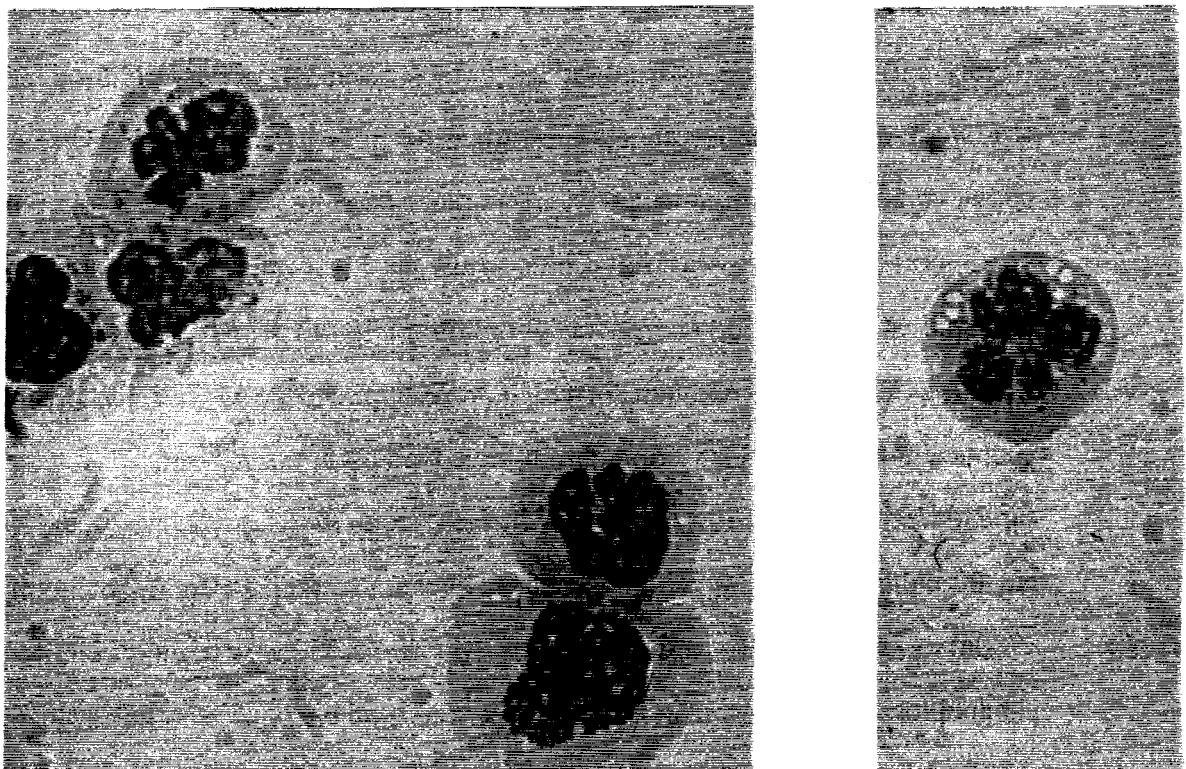


Figure 17. Différenciation morphologique des cellules de leucémie à promyélocytes HL-60 traitées par l'acide rétinoïque tout-trans $1 \mu\text{m}$ pendant 5 jours (x 1000).

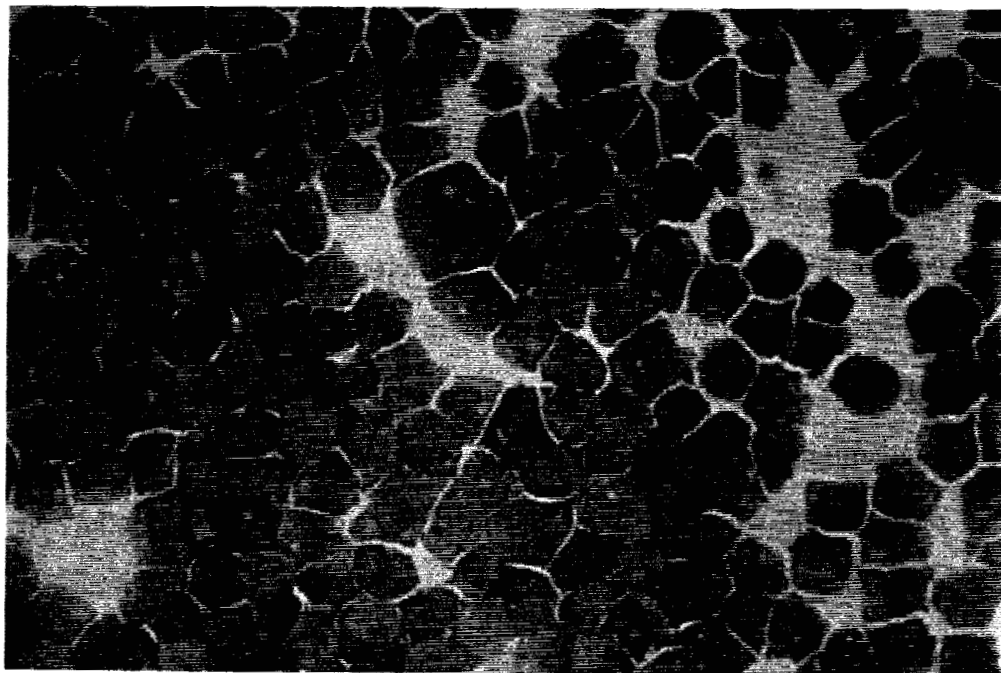


Figure 18. Cellules de leucémie à promyélocytes HL-60 non traitées (x 400).

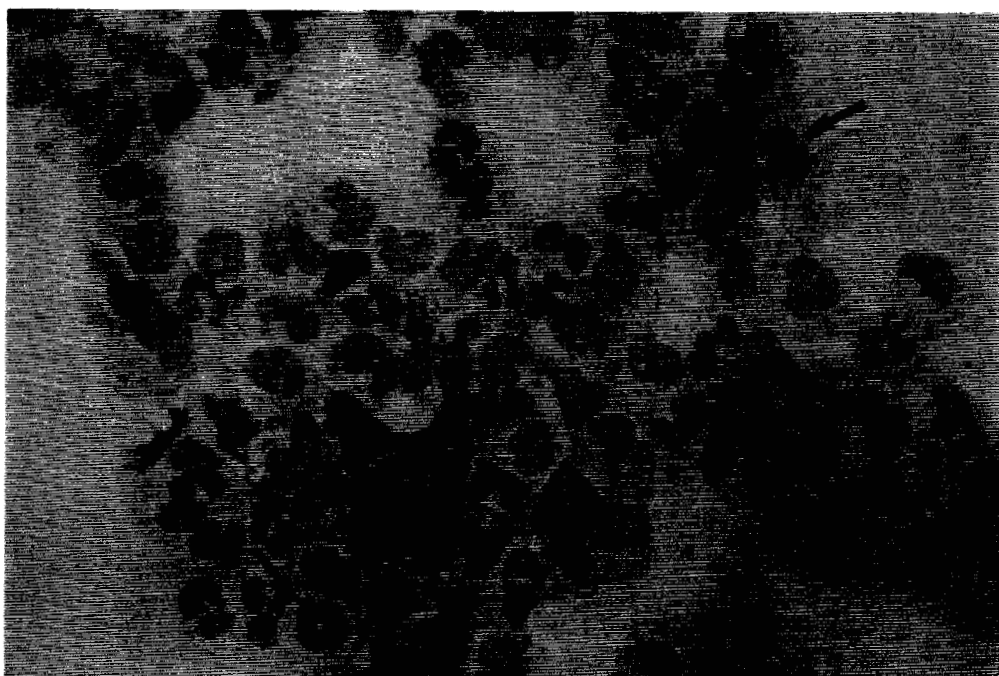


Figure 19. Différenciation morphologique des cellules de leucémie à promyélocytes HL-60 traitées par l'acide rétinoïque tout-trans 1 μ M pendant 5 jours (x400). Cellules HL-60 en voie d'apoptose (flèches).

Cette différenciation morphologique est corrélée avec la différenciation fonctionnelle c'est à dire l'acquisition de la propriété de phagocytose par les cellules différenciées. Cette différenciation fonctionnelle est mesurée par le test de réduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT), marqueur de différenciation cellulaire. Le principe est le suivant : au cours de la phagocytose, il y a une augmentation des processus d'oxydo-réduction avec activation de la NADPH oxydase et production d'anion superoxyde ce qui conduit à la réduction du NBT qui devient alors insoluble en milieux aqueux et précipite sous forme de dépôts ou de granulations noires dans le cytoplasme (figure 20). Il est possible alors de mesurer facilement le nombre de cellules contenant ces dépôts noirs et d'établir une courbe dose-réponse de la différenciation cellulaire induite par l'acide rétinoïque. Ce modèle est également classique pour mesurer l'effet de l'acide rétinoïque et de façon plus spécifique des acides rétinoïques sur la différenciation cellulaire (Breitman et coll., 1980a; Shudo et coll., 1985).

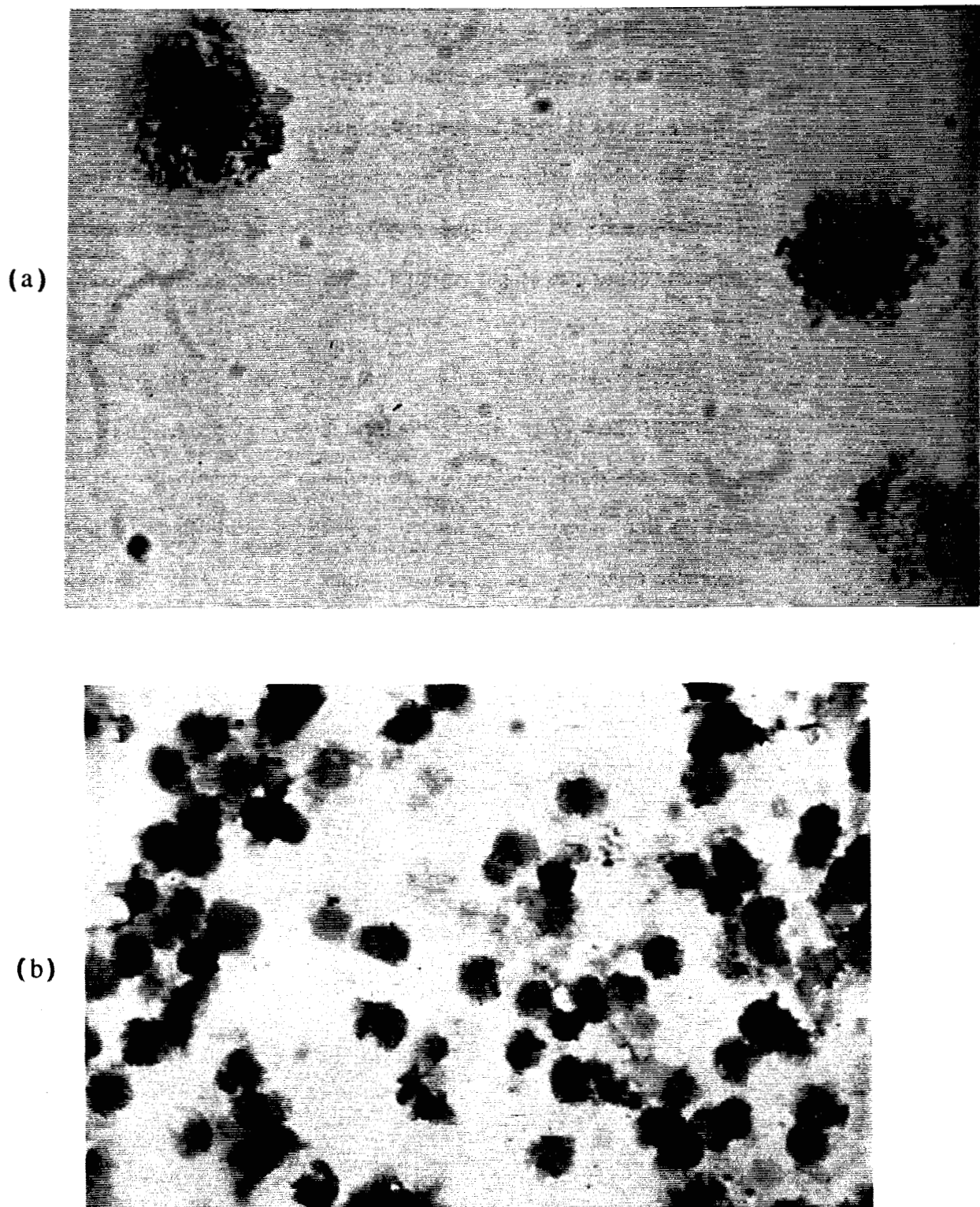


Figure 20. Différenciation fonctionnelle des cellules de leucémie à promyélocytes HL-60 traitées par l'acide rétinolique tout-trans $1 \mu\text{M}$ pendant 5 jours.
(a) x 1000 (b) x 400

Dans la lignée de neuroblastome humain SK-N-SH, deux types cellulaires différents coexistent. Des cellules de type neuronal avec des prolongements courts (figures 21 et 23), typiquement neuroblastomateuses (figure 21a) ou ressemblant à des fibroblastes (figure 21b), ou de type glial plus volumineuses (figure 21c). L'hétérogénéité de cette lignée explique le relatif manque de reproductibilité des réponses cellulaires en particulier à l'acide rétinoïque. Toutefois, après traitement par l'acide rétinoïque tout-trans $10 \mu\text{M}$ pendant 4 jours, on peut observer un allongement des dendrites et axones avec la mise en place d'un véritable réseau neuronal (figure 22 et 24). C'est la formation du réseau neuronal qui est observée ou non après traitement par les rétinoïdes et qui constituent une réponse de type tout ou rien. Ainsi, sur ce critère, la différenciation des cellules SK-N-SH est observée pour des concentrations d'acide rétinoïque aussi faibles que 10 nM . C'est donc un modèle assez sensible mais non quantitatif et imprécis à partir duquel aucune courbe dose-réponse ne peut être construite.

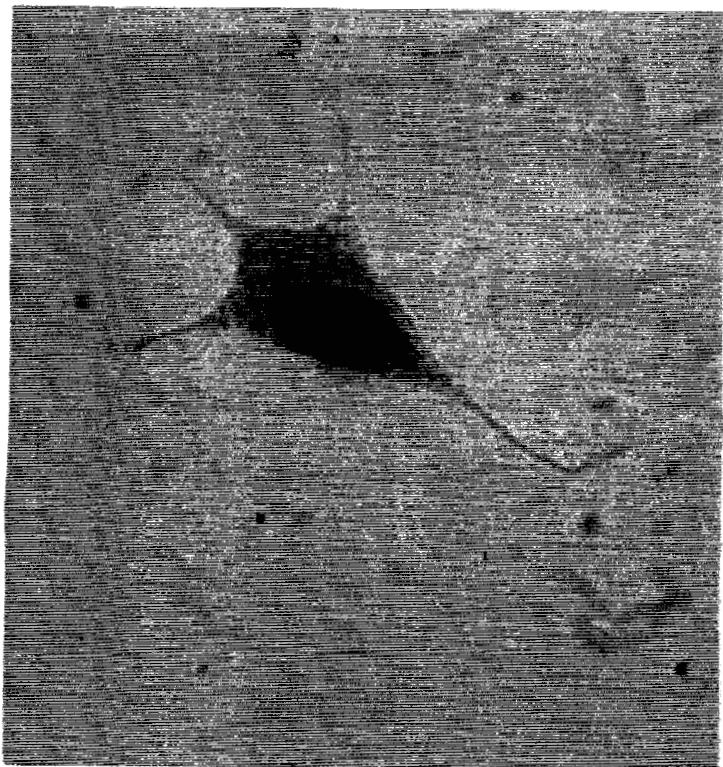
**a****b****c**

Figure 21. Cellules de neuroblastome humain SK-N-SH non traitées (x 1000).
(a) Cellule de type neuronal (b) Cellule de type fibroblastique
(c) Cellule de type glial

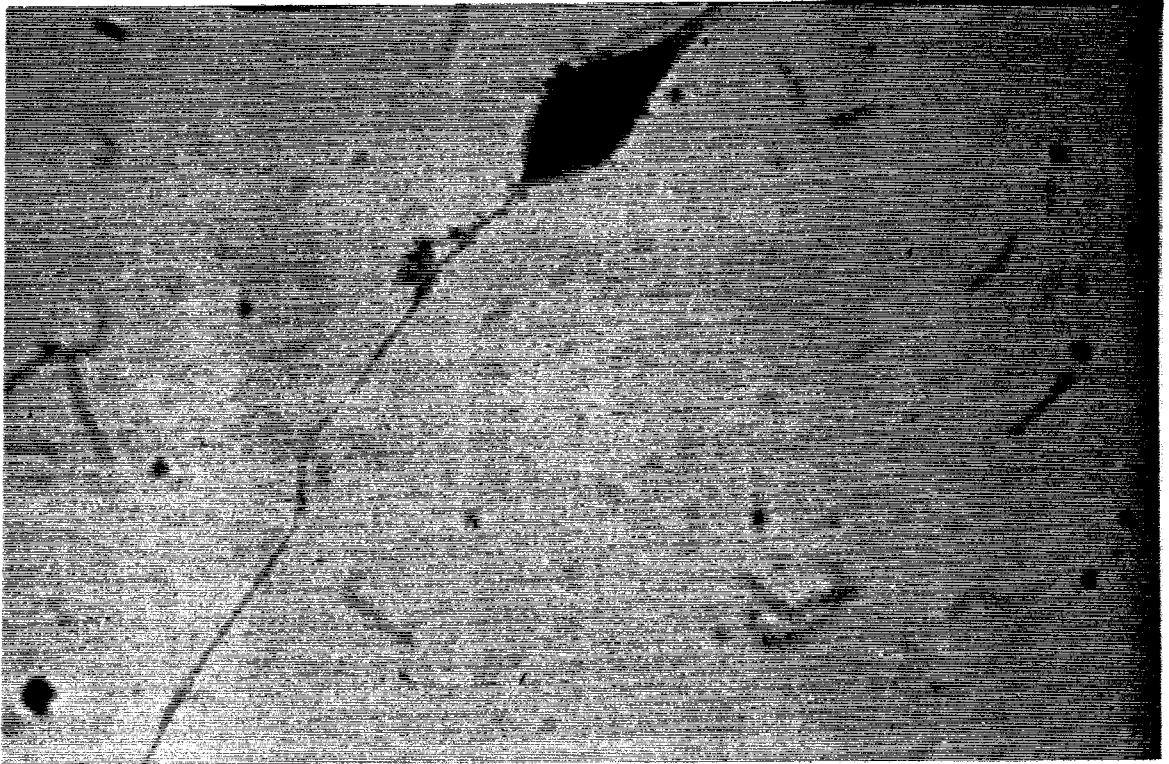


Figure 22. Différenciation morphologique des cellules de neuroblastome humain SK-N-SH traitées par l'acide rétinoïque tout-trans 10 μ M pendant 4 jours (x 1000).

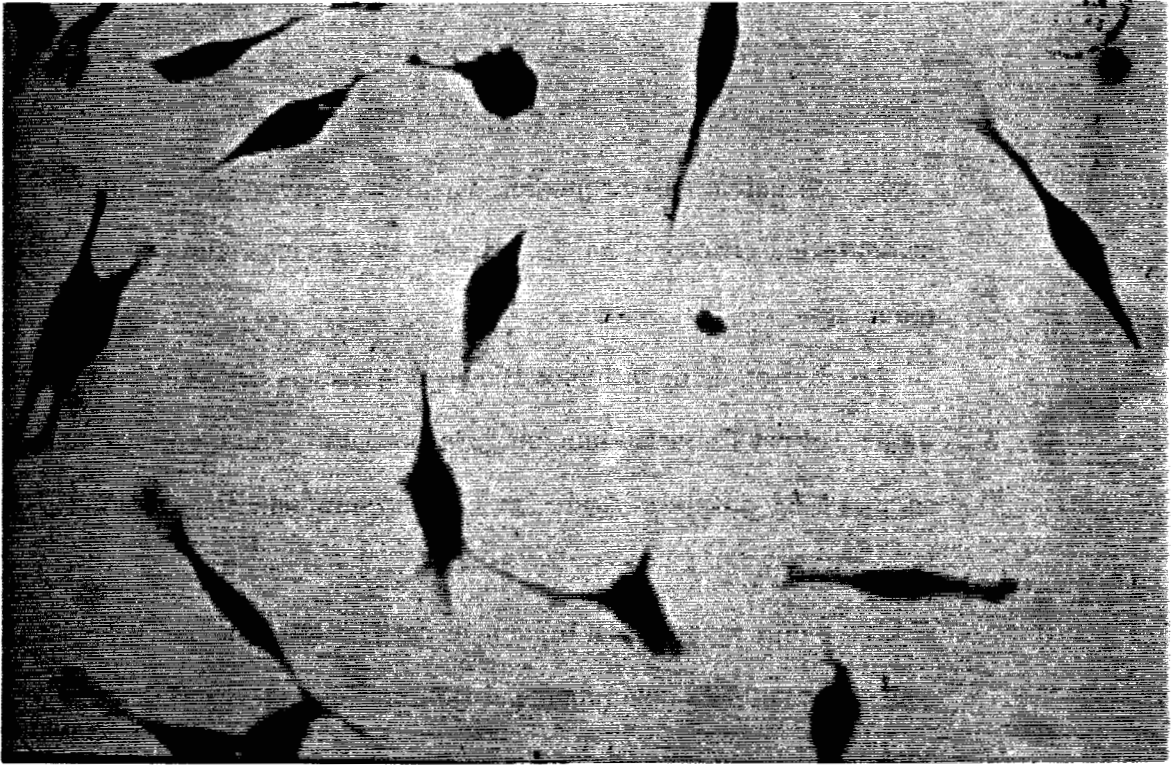


Figure 23. Cellules de neuroblastome humain SK-N-SH non traitées (x 400).



Figure 24. Différenciation morphologique des cellules de neuroblastome humain SK-N-SH traitées par l'acide rétinoïque tout-trans $10 \mu\text{M}$ pendant 4 jours (x 400).

Ce n'est pas le cas du modèle de différenciation des cellules HL-60 qui présente les critères d'un bon modèle pharmacologique pour l'étude des rétinoïdes.

Le sous-clone de la lignée HL-60 utilisé dans cette étude présente, après traitement par l'acide rétinoïque $1\mu\text{M}$ pendant 5 jours, en moyenne 55 % de cellules NBT-positives (figure 25). La concentration efficace 50 % (CE50) pour l'acide rétinoïque tout-trans est de 49 nM. Le sous-clone de la lignée HL-60 semble moins répondre au traitement par l'acide rétinoïque tout-trans que les sous-clones utilisés notamment par Breitman et coll. (1980b). Ces divergences sont liées à la multiplicité des sous-clones de la lignée HL-60 dispersés dans de nombreux laboratoires et qui présentent des variations tout à fait considérables des réponses cellulaires sur le plan qualitatif et quantitatif. Par exemple, 40 % des sous-clones HL-60 ne répondraient pas à l'acide rétinoïque tout-trans quant à la différenciation cellulaire (Birnie et coll., 1988). Toutefois, le modèle utilisé dans notre étude est sensible puisque la réponse est obtenue à des concentrations d'acide rétinoïque tout-trans faibles de l'ordre de 1 nM (figure 25). Ce modèle est, en outre, quantitatif par l'utilisation du test de réduction du NBT, dose-dépendant et relativement reproductible. Il présente une certaine spécificité vis à vis de l'acide rétinoïque qui induit la réponse à des concentrations très faibles, d'autres agents comme le diméthylsulfoxyde (DMSO) n'induisant la différenciation cellulaire qu'à des concentrations très élevées (figure 30).

Effet de l'acide rétinoïque sur l'expression de la TG de tissu.

La TG de tissu est un enzyme dont l'activité est induite par l'acide rétinoïque dans plusieurs lignées cellulaires dont les cellules de leucémie aigüe myéloblastique et promyélocytaire humaine HL-60 et les cellules d'érythroleucémie HEL (figure 26). Dans les cellules HL-60 non traitées, l'activité de la TG de tissu n'est pas détectée alors que dans les cellules HEL, le taux de base est largement détecté et représenterait au moins 40 fois le taux de base des cellules HL-60. Toutefois, l'induction de l'enzyme par l'acide rétinoïque tout-trans est beaucoup plus faible dans les cellules HEL (1.6 fois) que dans les cellules HL-60 (au moins 10 fois). Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus par d'autres équipes (Davies et coll., 1985; Suedhoff et coll., 1990). L'activité de la TG de tissu est également induite dans les cellules de neuroblastome humain SK-N-SH (figure 26). Il existe aussi, dans les cellules SK-N-SH, un taux de base de l'enzyme, 10 fois inférieur à celui des cellules HEL mais une induction par l'acide rétinoïque tout-trans au moins 5 fois plus élevée que dans les cellules HEL. L'induction de l'enzyme par l'acide rétinoïque tout-trans avait déjà été signalée dans une autre lignée cellulaire de neuroblastome, la lignée SK-N-BE (Mélino et coll., 1988; Piacentini et coll., 1991).

Il s'agit bien de la même TG de tissu détectée dans les trois lignées cellulaires puisqu'elle est reconnue par un anticorps monoclonal anti-TG de tissu de foie de cochon d'Inde (Birckbichler et coll., 1985) dans les trois cas (résultats non présentés).

Ainsi, l'observation d'une induction élevée par l'acide rétinoïque tout-trans de la TG de tissu dans la lignée HL-60, contrairement à la lignée HEL, fait de cette lignée un modèle pharmacologique sensible pour l'étude des rétinoïdes sur cette réponse. Le modèle SK-N-SH peut également servir de modèle pharmacologique acceptable.

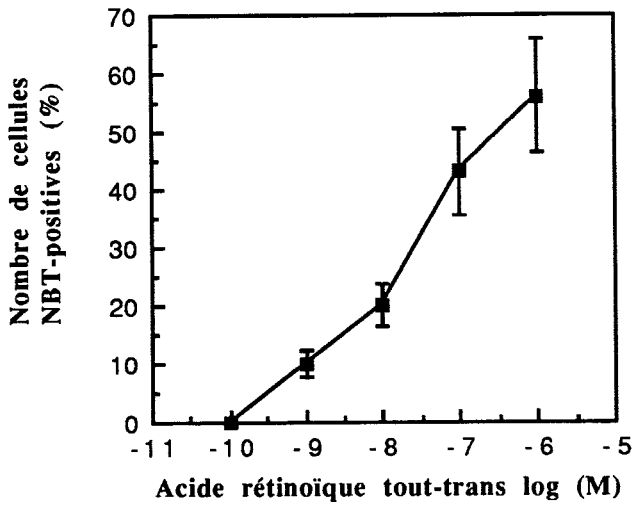


Figure 25. Courbe dose-réponse de l'acide rétinoïque tout-trans sur la différenciation des cellules de leucémie à promyélocytes humaine HL-60 traitées pendant 5 jours.

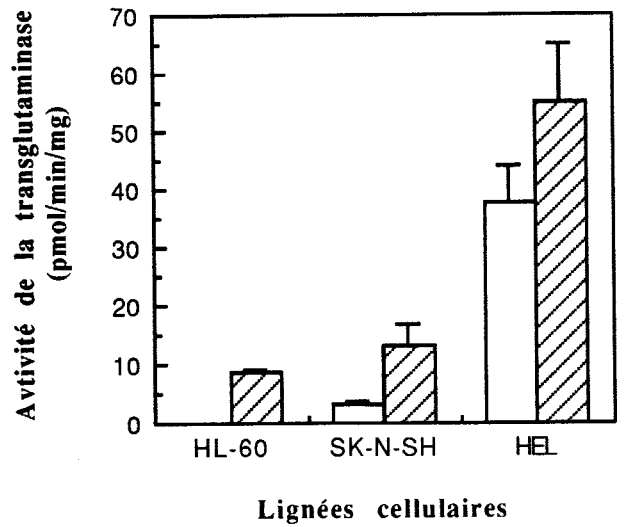


Figure 26. Distribution de la transglutaminase de tissu dans les cellules de leucémie à promyélocytes HL-60, de neuroblastome humain SK-N-SH et d'érythroleucémie HEL, non traitées (barres blanches) ou traitées par l'acide rétinoïque tout-trans 1 μ M pendant 48 heures (barres rayées).

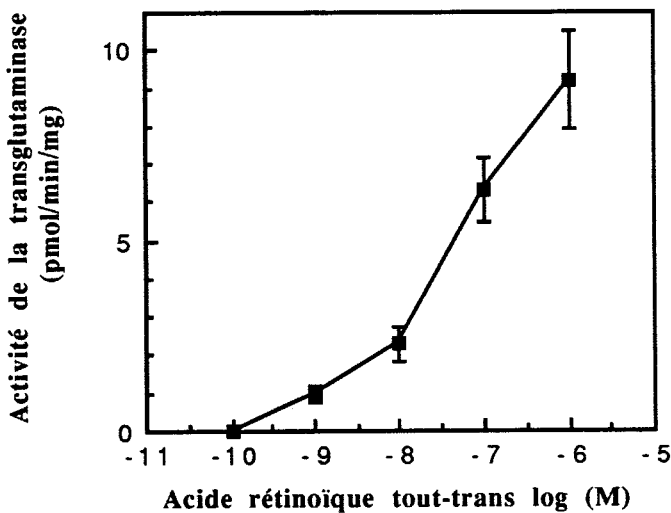


Figure 27. Courbe dose-réponse de l'acide rétinoïque tout-trans sur l'activité de la transglutaminase de tissu dans les cellules de leucémie à promyélocytes HL-60 traitées pendant 48 heures.

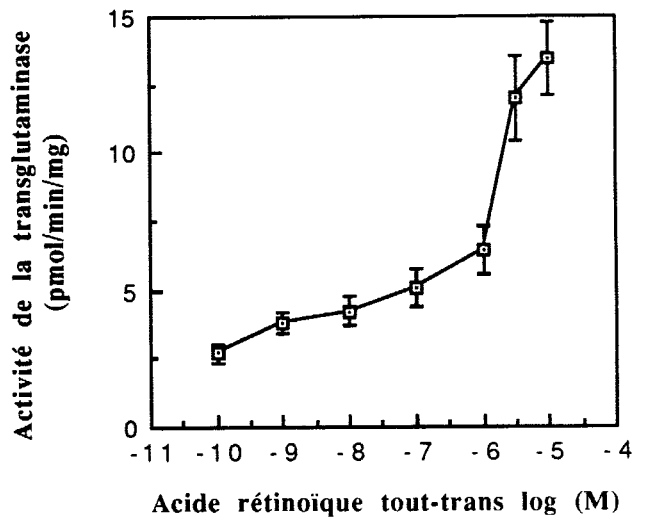


Figure 28. Courbe dose-réponse de l'acide rétinoïque tout-trans sur l'activité de la transglutaminase de tissu dans les cellules de neuroblastome humain SK-N-SH traitées pendant 48 heures.

L'induction de la TG de tissu par l'acide rétinoïque tout-trans est quantitative, dose-dépendante et relativement reproductible dans les lignées cellulaires HL-60 et SK-N-SH (figures 27 et 28). En outre, ces deux modèles sont particulièrement sensibles puisqu'une réponse est obtenue à des concentrations très faibles d'acide rétinoïque tout-trans respectivement à 1 nM et 0.1 nM.

L'acide rétinoïque tout-trans semble plus actif sur la réponse enzymatique dans le modèle HL-60 que dans le modèle SK-N-SH compte tenu des valeurs d'EC50 respectivement de 95.6 nM et 1364 nM dans les deux modèles. En outre, il faut noter que ces courbes dose-réponse apparaissent biphasiques, indiquant peut-être l'existence de plusieurs mécanismes sous-tendant l'action rétinoïde sur l'expression de l'enzyme.

L'induction de l'activité de la TG de tissu par l'acide rétinoïque semble en outre une réponse spécifique puisque la réponse n'est pas induite par d'autres agents comme le diméthylsulfoxyde (DMSO) qui pourtant induit la différenciation cellulaire indiquant que les deux réponses sont indépendantes au moins dans la lignée cellulaire HL-60 (figure 30).

Une étude plus approfondie de la régulation de la TG de tissu par l'acide rétinoïque tout-trans a été entreprise ensuite afin d'étudier le mécanisme moléculaire de l'action rétinoïde et aussi pour valider ce modèle. Une cinétique de la réponse a été réalisée dans les cellules HL-60 et a montré que l'activité de la TG de tissu était détectée, de façon précoce, dès la 6ème heure (figure 29). La précocité de la réponse est un argument indirect en faveur d'un mécanisme transcriptionnel sous-tendant l'action de l'acide rétinoïque tout-trans.

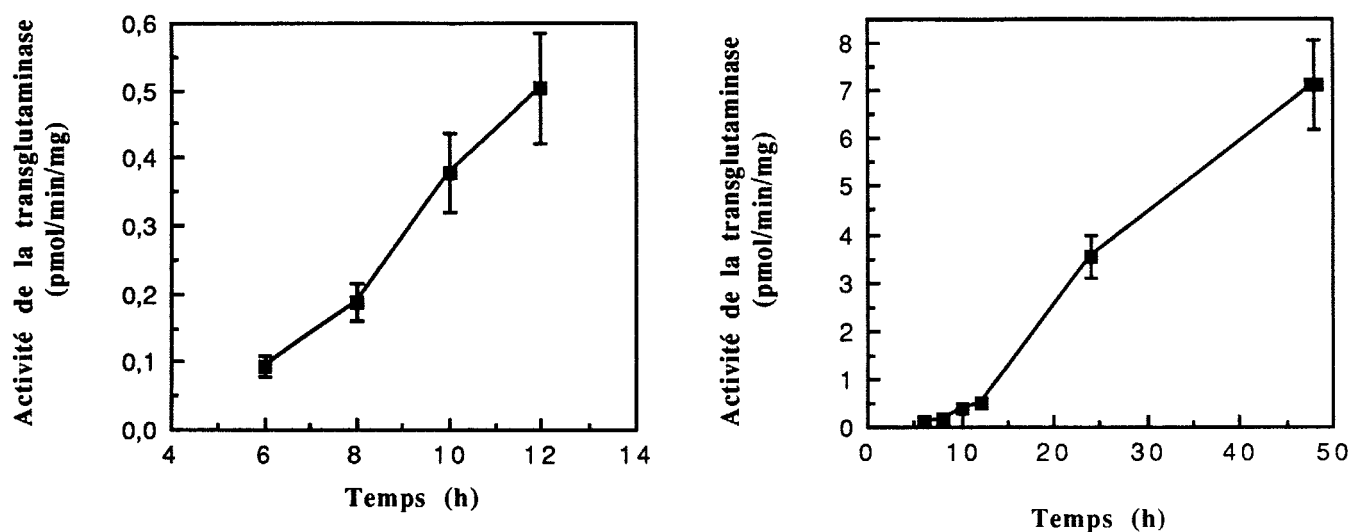


Figure 29. Cinétique de l'induction de l'activité de la transglutaminase de tissu par l'acide rétinoïque 1 μ M dans les cellules de leucémie à promyélocytes humaine HL-60.

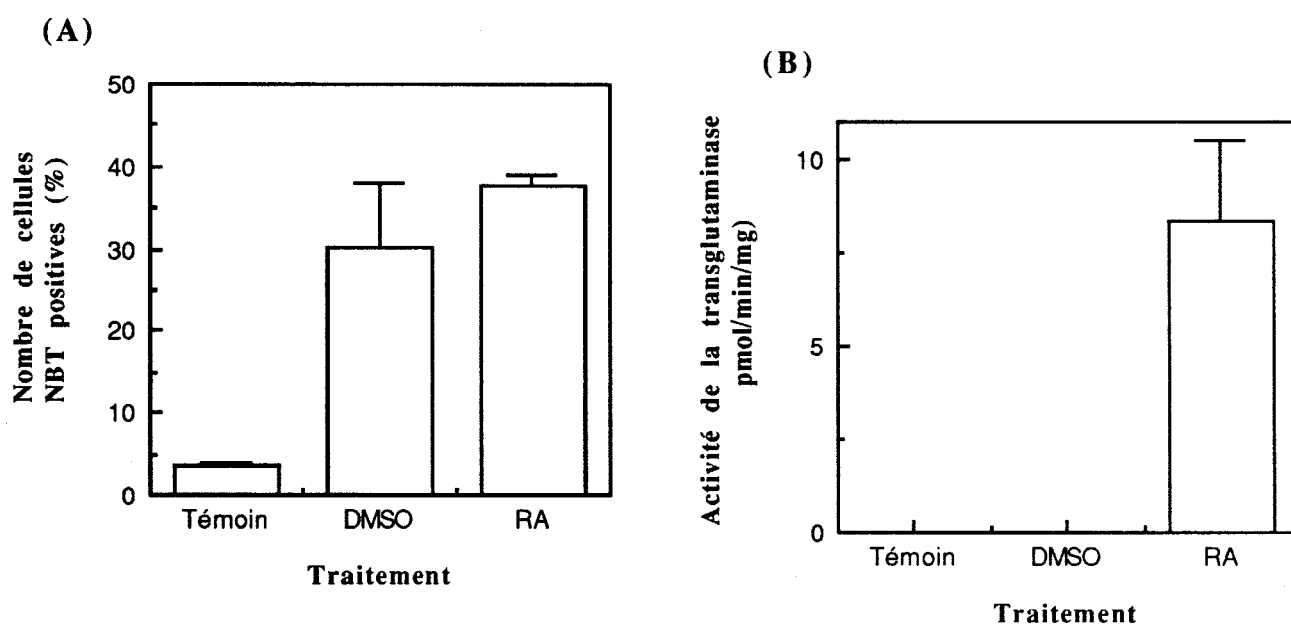


Figure 30. Effets de l'acide rétinoïque tout-trans 1 μ M et du diméthylsulfoxyde (DMSO) 1.25 % sur la différenciation après 5 jours (A) et sur l'activité de la transglutaminase de tissu après 48 heures (B) dans les cellules de leucémie à promyélocytes humaine HL-60.

D'autres arguments en faveur du contrôle transcriptionnel de la réponse ont été apportés par l'étude de la régulation de la TG de tissu par l'acide rétinoïque d'abord au niveau protéique dans les cellules HL-60 par *western blot* utilisant un anticorps monoclonal anti-TG de foie de cochon d'Inde (Birckbichler et coll., 1985) (figure 32) puis au niveau de l'ARN messager de l'enzyme dans les cellules HEL par *northern blot* utilisant une sonde ADNc humaine de 1 kb (hTG1.0) (figure 31). Ces résultats confirment d'ailleurs des observations antérieures (Davies et coll., 1985; Suedhoff et coll., 1990). Mais ce sont des expériences de "run-on" (transcription in vitro à partir de noyaux isolés de macrophages péritonéaux de souris) menées par Chiocca et coll. (1988,1989) qui ont prouvé, par contre, de façon directe le caractère transcriptionnel de cette induction.

En conclusion, l'expression de la TG de tissu est une réponse primaire à l'acide rétinoïque tout-trans pouvant servir de modèle pour étudier les bases moléculaires de l'action rétinoïde (Chiocca et coll., 1989) mais c'est aussi un modèle sensible, spécifique et très précis pouvant être utilisé comme modèle pharmacologique. La TG de tissu est un enzyme dont le taux est faible dans les cellules néoplasiques par rapport aux cellules normales (Birckbichler et coll., 1977) et dont l'expression est induite au cours de la différenciation cellulaire bien qu'il n'existe pas de corrélation entre les deux réponses. Ce modèle a donc un certain rapport avec la pathologie. Enfin, cet enzyme est ubiquitaire. Ce modèle peut donc s'adresser à n'importe quelle lignée cellulaire ou tissu néoplasique en conservant les critères de précision nécessaire pour établir des courbes dose-réponse contrairement au modèle de différenciation cellulaire.

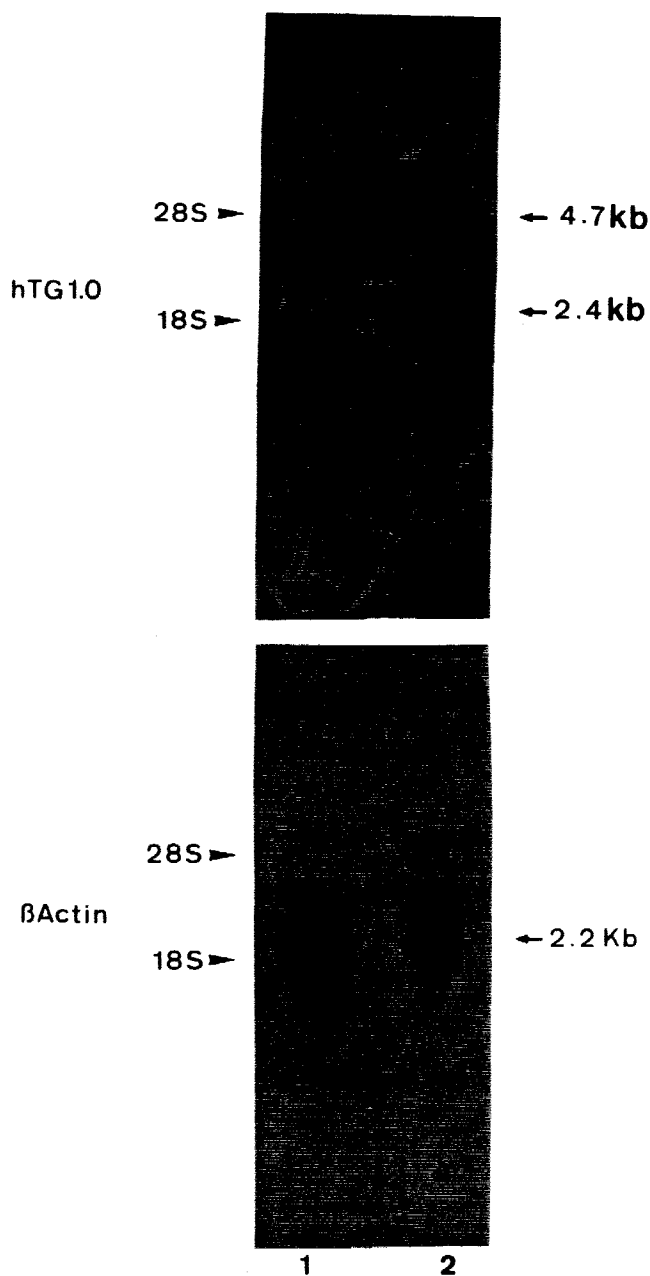


Figure 31. Induction de l'ARN messenger de la transglutaminase de tissu par l'acide rétinolique tout-trans 1 μ M dans les cellules d'érythroleucémie humaine HEL traitées pendant 12 heures. L'ARN messenger est détecté par northern blot utilisant la sonde ADNc hTG1 (P.Davies, Houston, Texas). La béta-actine est utilisée comme contrôle interne. Les ARN ribosomiaux 18S (5 kb) et 28S (2.1 kb) servent de témoins de poids moléculaire.

1. Cellules HEL non traitées
2. Cellules HEL traitées

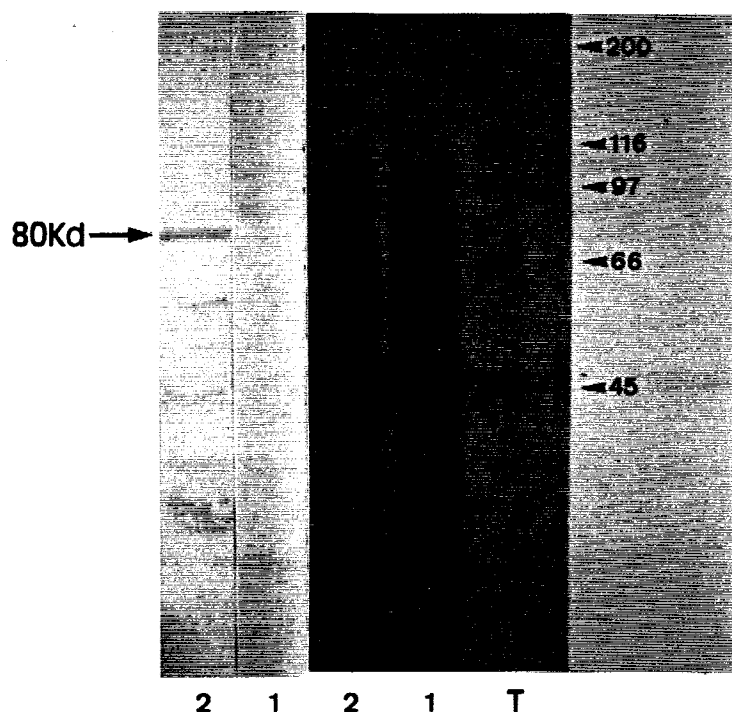


Figure 32. Induction de la protéine transglutaminase de tissu par l'acide rétinolique tout-trans 1 μ M dans les cellules de leucémie à promyélocytes humaine HL-60 traitées pendant 48 heures. L'enzyme est détecté par western blot utilisant un anticorps monoclonal anti-transglutaminase de tissu de cochon d'Inde (P.Birckbichler, Oklahoma). Les protéines totales (à droite) servent de contrôles internes.

1. Cellules HL-60 non traitées
2. Cellules HL-60 traitées
- T Témoins de poids moléculaire

2. Récepteurs de l'acide rétinoïque : relais des réponses physiologiques à l'acide rétinoïque. L'approche anti-sens.

Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont maintenant bien connus mais leur rôle direct dans une réponse biologique n'a pas encore été beaucoup étudié dans la différenciation et l'expression de la TG de tissu dans les cellules HL-60. La méthodologie anti-sens a déjà été utilisée avec succès pour examiner la fonction cellulaire de protéines. C'est donc cette approche que nous avons sélectionnée pour explorer l'implication des récepteurs dans nos réponses.

Principe.

Les ARN messagers sont des cibles pour des oligodésoxynucléotides (ODN) synthétiques anti-sens ou des ARN anti-sens produits *in situ* à partir de vecteurs d'expression transfectés. Ces agents forment avec l'ARN messenger ciblé un complexe hybride pouvant provoquer un arrêt prématuré de la transcription ou une inhibition de la traduction en empêchant la fixation des ribosomes ou leur progression sur cet ARN messenger. Ces complexes serviraient aussi de cibles à la Ribonucléase H, un enzyme qui dégrade les acides nucléiques double-brins. D'autres mécanismes ont aussi été décrits comme l'inhibition du transport de l'ARN messenger du noyau vers le cytoplasme. Ainsi la protéine codée ne serait plus traduite et donc synthétisée. Il faut signaler que, bien que l'ARN messenger possède des segments en double brin responsables d'une structure secondaire, ceux-ci sont instables et peuvent se séparer momentanément constituant à cet instant une cible idéale pour les acides nucléiques anti-sens.

L'utilisation de ces acides nucléiques anti-sens a de multiples applications. Ils ont été utilisés en tant qu'anti-viraux. Un exemple d'actualité est leur utilisation

avec succès contre la multiplication du HIV *in vitro* (Zamecnik et coll., 1986). Une autre application est leur utilisation en cancérologie. Des ODN anti-sens ont par exemple été capables d'inhiber l'expression d'oncogènes *in vitro* comme c-myc dans les cellules de leucémie myéloblastique et promyélocytaire humaine HL-60 (Holt et coll., 1988; Wickström et coll., 1988).

Ces agents constituent aussi des outils très puissants en recherche fondamentale pour explorer la fonction d'expression de gènes et peuvent être utilisés en particulier pour étudier le rôle des récepteurs dans diverses réponses biologiques.

Le tableau IV montre un certain nombre d'exemples où la méthodologie anti-sens a été utilisée.

La méthode la plus utilisée et la plus efficace est la transformation des cellules hôtes avec un vecteur d'expression d'ARN anti-sens. Ces vecteurs d'expression anti-sens contiennent des fragments de gènes insérés en sens inverse de leur orientation biologique. Ce fragment génère ainsi un polynucléotide anti-sens capable de réguler de façon artificielle l'expression du gène dont il est issu. Une autre méthodologie utilisée consiste à micro-injecter de l'ARN anti-sens préparé *in vitro* dans des systèmes qui se prêtent mal à une transformation stable ou à l'utilisation de promoteurs nécessaires pour obtenir une expression efficace des gènes transfectés. Mais les ARN anti-sens utilisés précédemment sont longs de plusieurs centaines voire plusieurs milliers de nucléotides ce qui donne naissance à des structures secondaires pouvant limiter les possibilités d'appariement avec les ARN messagers ciblés. Cet inconvénient a été contourné par une approche non plus génétique mais chimique avec l'utilisation d'oligodésoxynucléotides de synthèse anti-sens courts (12 à 15 bases).

Tableau IV. Inhibition anti-sens de l'expression de quelques gènes dans les cellules eucaryotes.

A. Gènes codant pour un ARN anti-sens.

Gène inhibé	Origine	Cellules hôtes	Méthodes	Références
Thymidine kinase	Virus herpès simplex	L (souris)	microinjection et transformation	Izant (1984,1985) Kim (1985)
Thymidine kinase	Poulet	L (souris)	microinjection et transformation	Izant (1985)
Béta-actine	Souris	L (souris) BSC-1 (singe)	transformation	Izant (1985)
hsp26	Drosophile	Drosophile	transformation	McGarry (1986)
Chloramphénicol acétyl-transférase	Entérobactérie	L (souris)	transformation	Izant (1985)
Récepteur des glucocorticoïdes	Rat	CV-1 (singe)	transformation	Pépin (1990)
RAR-alpha	Humain	trachée de rat	transformation	Denning (1991)

B. ARN anti-sens ou ADN complémentaire microinjecté ou additionné au milieu de culture.

Gène inhibé	Inhibiteur	Origine	Cellules hôtes	Références
Béta-globine	ARN	Xéopus	oeufs de grenouille	Melton (1985)
Thymidine kinase	ARN	virus herpès simplex	oeufs de grenouille	Harland (1985)
Béta-actine	ARN	Souris	BSC-1 singe	Izant (1985)
Chloramphénicol transférase	ARN	Entérobactérie	oeufs de grenouille	Harland (1985)
Interleukine 2 et 3	ADN	Humain	oeufs de grenouille	Kawasaki (1985)
C-myc	ADN	Humain	HL-60	Holt (1988) Wickström (1988)
RAR-alpha	ADN	Humain	Kératinocytes	Cope (1989)

Les ODN anti-sens.

L'approche anti-sens la plus facile d'exécution et à entreprendre en première intention est l'utilisation d'oligodésoxynucléotides anti-sens exogènes. Leur utilisation suppose la stratégie suivante :

- choix de la séquence
- choix du type d'oligomère anti-sens "normal" ou modifié
- choix du système *in vitro* ou *in vivo*

choix de la séquence

Celle-ci suppose la connaissance préalable de l'ARN messager ciblé. Les séquences en 5' au niveau du site d'initiation AUG chevauchant la méthionine initiale ou commençant à partir de cette méthionine et s'étendant aux 4 ou 5 codons suivants semblent les plus efficaces (Coleman et coll., 1984; Blake et coll., 1985a; Blake et coll., 1985b).

La taille de l'oligomère est également importante pour la sélectivité mais aussi pour l'hydrosolubilité et le franchissement de la membrane cellulaire. Un oligomère de 8 bases présentant une moins bonne sélectivité (Blake et coll., 1985), un oligomère de 21 bases étant moins hydrosoluble et franchissant mal la membrane cellulaire (Marcus-Sekura et coll., 1987), ce sont les oligomères de 15 bases qui semblent être les meilleurs en regard de ces critères. Une très bonne sélectivité est observée avec ces oligomères de 15 bases puisqu'une telle séquence ne peut être trouvée qu'une seule fois sur 500 millions de paires de bases de l'ADN (Baum et coll., 1988). En outre, ils présentent une hydrosolubilité suffisante pour être en solution dans le cytosol et s'hybrider ainsi avec l'ARN messager ciblé mais pas trop pour pouvoir traverser la membrane

cellulaire. Enfin, il faut aussi tenir compte du rapport GC/AT qui est important quant à la capacité de l'oligomère à s'hybrider avec l'ARN messager cible.

Choix du type d'oligomère anti-sens

D'un point de vue pratique, il est logique de commencer par l'utilisation des oligonucléotides anti-sens phosphodiester "normaux" et de tester plusieurs séquences. Ces oligomères ont l'avantage d'être rapidement préparés de façon automatique et en quantité importante (10 μ moles) avant purification par chromatographie liquide haute performance. La pureté est importante car des séquences incorrectes peuvent diminuer l'inhibition spécifique à une concentration donnée d'oligomère. Des oligomères contrôles doivent, en outre, être utilisés et peuvent comporter les mêmes séquences avec le changement d'une ou plusieurs bases, des séquences d'une région non-codante, des séquences complètement aléatoires avec vérification par une recherche informatisée ou encore mieux les séquences sens. Des homopolymères peuvent également être utilisés comme séquences contrôles.

Un certain nombre de travaux montrent que des ODN non modifiés sont capables de réguler négativement l'expression de gènes. On peut citer entre autres des gènes impliqués dans la réplication virale (Zamecnik et coll., 1978) ou encore des gènes eucaryotes comme ceux codant pour l'oncogène c-myc (Holt et coll., 1988; Wickström et coll., 1988) ou pour le récepteur de l'acide rétinoïque RAR alpha (Cope et coll., 1989) à des concentrations variant de 10 à 30 μ M.

Les oligonucléotides sont rapidement dégradés par des nucléases *in vivo* (Wickström, 1986). L'utilisation d'un ODN a permis dans un premier temps d'augmenter la stabilité, le groupement hydroxyle en 2' des oligoribonucléotides

étant une cible enzymatique. Un certain nombre de modifications ont ensuite été réalisées au niveau des liaisons phosphodiester et ont permis d'augmenter considérablement la résistance aux nucléases et d'améliorer la pénétration de ces nucléotides.

Les analogues méthylphosphonates ont, en plus de leur résistance aux nucléases, la particularité de bien pénétrer la membrane cellulaire. En effet, 50 % de ces analogues sont retrouvés dans la cellule après 24 heures (Marcus-Sekura, 1987). Toutefois, ils sont difficiles à synthétiser et ne peuvent donc l'être de façon automatique ce qui explique leur coût très élevé. Ils sont peu hydrosolubles et par contre solubles dans les particules lipidiques intra-cellulaires et les membranes cellulaires. Ces différentes caractéristiques font qu'ils sont utilisés à des concentrations très élevées (100 à 300 μM). Ils ont notamment été utilisés pour inhiber la réplication du virus de l'herpès simplex de type I *in vitro* (Smith et coll., 1986).

Les analogues phosphorothioates sont encore plus stables que les analogues précédents. Ils ont en plus l'avantage d'être hydrosolubles et de pouvoir être synthétisés de façon automatique ce qui permet de diminuer le coût qui reste toutefois encore très élevé. Leur grande stabilité et leur hydrosolubilité expliquent pourquoi leurs effets se manifestent à des concentrations beaucoup plus faibles (1 à 30 μM). Toutefois, ils présentent l'inconvénient d'être toxiques dans un certain nombre de systèmes. Ils ont été utilisés pour inhiber la réplication du HIV *in vitro* (Matsukura et coll., 1978).

Les alpha-ODN sont encore plus résistants aux nucléases que les composés précédents. Toutefois, leur coût lié à leur synthèse très difficile limite leur utilisation.

Les analogues liés de façon covalente à des groupements chimiques présentent une affinité considérablement augmentée pour leur cible ce qui augmente la durée de vie du complexe hybride. Ils sont, en outre, actifs à concentrations très faibles (1 μM). Parmi les groupements chimiques utilisés, il faut signaler l'acridine (Toulmé et coll., 1985; Cazenave, 1985) et la porphyrine contenant un atome de fer (Boutorin et coll., 1984) ou encore un groupement imidazole (Asseline et coll., 1984). Ces deux derniers ont la particularité de se comporter comme des "paires de ciseaux" c'est à dire de pouvoir couper sélectivement la séquence cible. Il faut, enfin citer le groupement poly-(L-lysine) (Mr 14,000) couplé à l'extrémité 3' par les groupes epsilon-amino des résidus de lysine via un noyau N-morpholine (Bayard et coll., 1986). Cette poly-(L-lysine) augmente considérablement la pénétration à travers la membrane cellulaire. Ce qui explique que les ODN couplés à la poly-(L-lysine) soient actifs à des concentrations très faibles (1 μM) (Lemaître et coll., 1987).

Malheureusement, la plupart de ces ODN modifiés ne sont pas commercialisés. Lorsqu'ils le sont, ils présentent un coût très élevé ce qui constitue un obstacle majeur à leur utilisation courante.

choix du système

Les ODN anti-sens ont surtout été utilisés dans des systèmes *in vitro* et des systèmes de culture de cellules animales. En effet, la culture cellulaire fournit un système rapidement manipulable pour examiner les effets biologiques d'oligomères anti-sens.

Toutefois, avant d'entreprendre l'utilisation d'oligomères anti-sens en culture cellulaire, il convient de vérifier leur stabilité et leur pénétration dans les cellules et d'éliminer une éventuelle toxicité.

Il faut, en outre, savoir que lorsque l'on utilise du sérum animal qui contient des nucléases, il est indispensable de l'inactiver par la chaleur avant utilisation et lorsque des oligomères "normaux" sont utilisés.

Différents types cellulaires ont des capacités différentes pour la capture des oligomères et c'est le temps de capture qui varie. Le mécanisme de transport des ODN n'est pas encore clair. Il n'implique probablement pas un processus actif. Ainsi, la concentration d'oligomère est considérablement plus basse dans les cellules que dans le milieu de culture (Marcus-Sekura, 1988). Reste à savoir si le mécanisme est un mécanisme de diffusion facilitée ou passive. Toutefois certains auteurs pensent qu'il impliquerait un processus d'endocytose via un récepteur (Loke et coll., 1989).

En culture cellulaire, les concentrations utilisées doivent être situées entre 5 et 200 μM . Enfin, les oligonucléotides doivent être ajoutés en moyenne 4 heures avant l'agent déclenchant la réponse (Marcus-Sekura et coll., 1987; Smith et coll., 1986). Ce temps a été déterminé lors d'expériences de transfection où les oligonucléotides anti-sens utilisés contenaient une séquence régulatrice de l'expression d'un gène chloramphénicol acétyltransférase (CAT) (Marcus-Sekura et coll., 1987).

Toutefois, chaque expérience nécessite de grandes quantités d'oligodésoxynucléotides purifiés ce qui limite considérablement l'usage de cette approche. De plus, l'inhibition de l'expression de l'ARN messager n'est jamais complète.

Résultats personnels.

La première étape a consisté à sélectionner des séquences appropriées. Des ODN anti-sens de 15 bases complémentaires de la région contenant le codon d'initiation AUG de l'ARNm des récepteurs de l'acide rétinoïque alpha et bêta présents dans les cellules HL-60 (Gallagher et coll., 1989; Largman et coll., 1989; Hashimoto et coll., 1989, Wang et coll., 1989) ont été utilisés dans notre étude (figure 33). La teneur en bases GC (entre 54 % et 66 %) est suffisante pour que l'oligomère s'hybride avec l'ARNm cible en formant un complexe stable. Nous avons utilisé des ODN phosphodiester non modifiés. Leurs effets ont été examinés sur la différenciation cellulaire et l'expression de la TG de tissu induite par l'acide rétinoïque dans les cellules HL-60. Pour les expériences, les cellules ont été cultivées en milieu défini sans sérum de veau foetal. En effet, les ODN sont instables en présence de sérum de veau foetal et stables en milieu défini comme le montre ultérieurement une étude utilisant des ODN marqués au phosphore 32 (couloirs 1,2 et 3 de la figure 40). Des concentrations élevées (30 μ M) ont été utilisées, des concentrations supérieures s'étant révélées toxiques dans les cellules HL-60. Les oligomères ont été ajoutés à la suspension cellulaire 4 heures avant l'addition de l'acide rétinoïque et renouvelés toutes les 24 heures jusque l'analyse de la réponse c'est à dire 5 jours pour la différenciation cellulaire et 48 heures pour l'induction de la TG de tissu. Aucun effet significatif n'a été observé sur les deux réponses (figures 34 et 35). Les expériences ont été également menées à des temps plus courts (6 et 18 heures) pour lesquels la réponse est détectable. Dans ces conditions, nous n'avons pas non plus observé d'effet significatif (figures 36 et 37). La combinaison des deux oligomères anti-RARalpha (15 μ M) et anti-RARbêta (15 μ M) n'a pas non plus abouti à un résultat positif (résultats non présentés). La première raison pouvant expliquer ce résultat

ASéquence -15/+15 de l'ARNm **hRARalpha** (Giguère, 1987)

5' ⁻¹⁵ CUG UGG CCG CUU GGC ^{-1 +1} AUG GCC AGC AAC AGC ⁺¹⁵ 3'

Séquences anti-sens utilisées

3' -----AC ACC GGC GAA CCG T----- 5' **1**

3' ----- ACC GGC GAA CCG TAC----- 5' **2**

3' -----TAC CGG TCG TTG TCG----- 5' **3**

BSéquence -15/+3 de l'ARNm du **hRARbêta** (=hap) (de Thé, 1987)

5' ⁻¹⁵ AGU GCA AGG GAG AUC ^{-1 +1} AUG 3'

Séquence anti-sens utilisée

3' -----CA CGT TCC CTC TAG T----- 5'

Figure 33. Séquences oligodésoxynucléotidiques complémentaires de l'ARNm des récepteurs de l'acide rétinoïque alpha (A) et bêta (B).

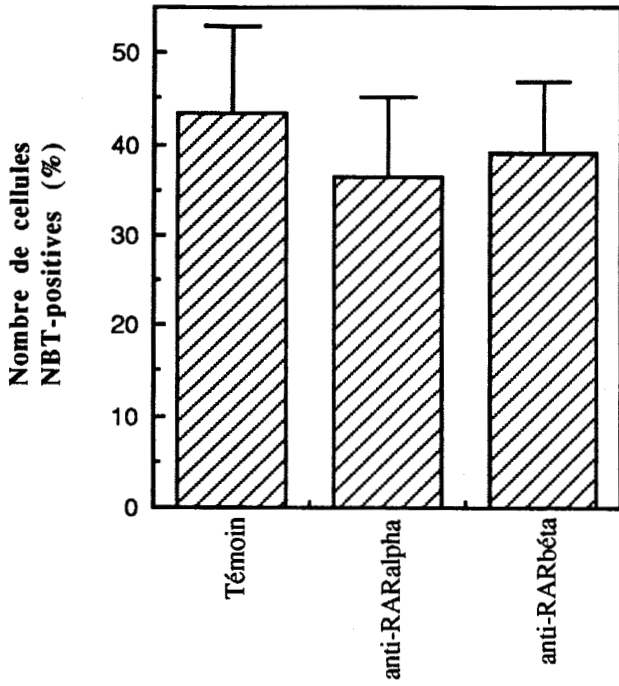


Figure 34. Effet des oligodésoxynucléotides anti-RARalpha (30 μ M) et anti-RARbêta (30 μ M) sur la différenciation des cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60 induite par l'acide rétinoïque tout-trans 1 μ M pendant 5 jours.

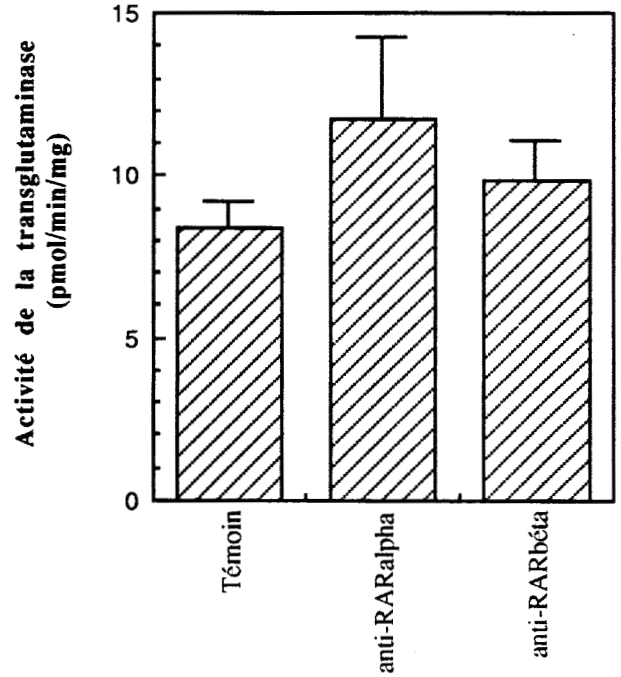


Figure 35. Effet des oligodésoxynucléotides anti-RARalpha (30 μ M) et anti-RARbêta (30 μ M) sur l'induction de la transglutaminase de tissu induite par l'acide rétinoïque tout-trans 1 μ M pendant 48 heures.

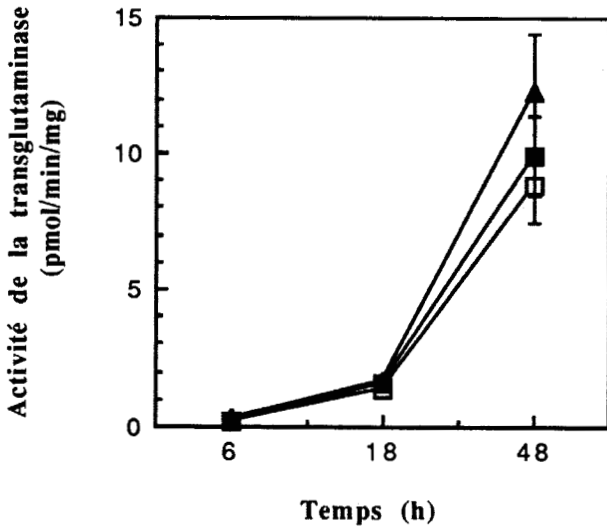


Figure 36. Effet de l'acide rétinoïque tout-trans 1 μ M seul (■), en présence d'oligo-désoxynucléotide anti-RARalpha 30 μ M (▲) ou anti-RARbêta 30 μ M (□) sur l'activité de la transglutaminase de tissu dans les cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60 après 6, 18 et 48 heures d'incubation.

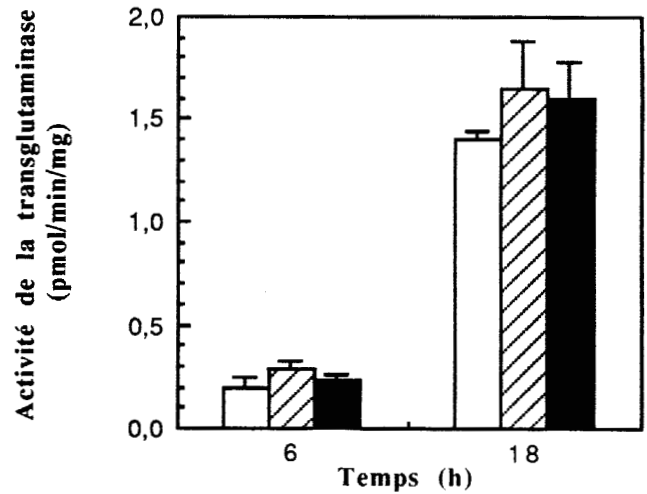


Figure 37. Effet de l'acide rétinoïque tout-trans 1 μ M seul (barre blanche), en présence d'oligodésoxynucléotide anti-RARalpha 30 μ M (barre rayée) ou anti-RARbêta 30 μ M (barre noire) sur l'activité de la transglutaminase de tissu dans les cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60 après 6 et 18 heures d'incubation.

est la faible pénétration des ODN. Une étude de la pénétration intra-cellulaire a été donc réalisée dans un premier temps. Nous avons tenté d'abord d'améliorer cette pénétration en utilisant des ODN couplés à la poly(L-lysine). Une étude de la toxicité et de l'incorporation de la poly(L-lysine) fluorescente ont montré que l'on ne pouvait utiliser une concentration de poly(L-lysine) supérieure à 1 μM (figure 38) et qu'à cette concentration, la poly(L-lysine) ne pénétrait pas dans les cellules HL-60. La figure 39 montre un contrôle positif où la poly(L-lysine) fluorescente est incorporée dans un autre type cellulaire. Une autre approche a donc été tentée pour améliorer la pénétration : la lipofection. Cette méthode utilise des liposomes cationiques (Lipofectin^R) qui forment des complexes avec les ODN chargés négativement. Auparavant, les temps optimaux de lipofection ont été établis pour plusieurs lignées cellulaires dont les cellules HL-60 (tableau 5). La lipofection améliore le pourcentage d'oligomère captés (entre 2 et 10 fois) dans toutes les lignées cellulaires (tableau 5). L'amélioration apportée par la lipofection est en outre confirmée par une autre technique basée sur la détection d'oligodésoxynucléotides marqués au phosphore 32 par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 20 % avec une concentration finale identique (3.4 μM) en présence ou en absence de Lipofectin^R (figures 42 et 43). Toutefois, il faut respecter le rapport entre la quantité de liposomes cationiques (30 μg) et la quantité d'oligodésoxynucléotides (20 μg) ce qui limite la concentration finale d'oligomère pouvant être utilisée alors qu'en absence de Lipofectin^R, la concentration d'oligodésoxynucléotide peut atteindre 30 μM . Par conséquent, compte tenu du rapport entre le gain obtenu en pénétration et la limite imposée à la concentration finale, globalement la lipofection n'apporte pas de véritable amélioration quant à la quantité présente dans la cellule.

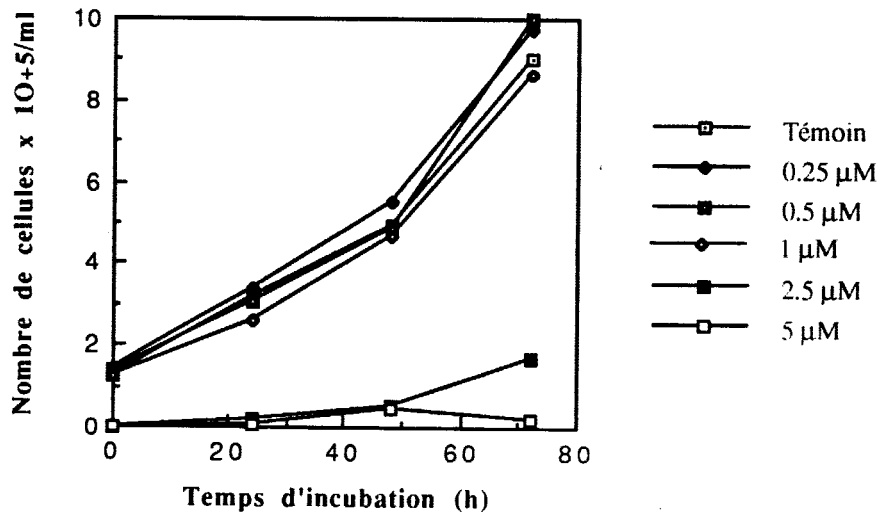


Figure 38. Effet de la poly(L-lysine) sur la prolifération des cellules de leucémie à promyélocytes HL-60.

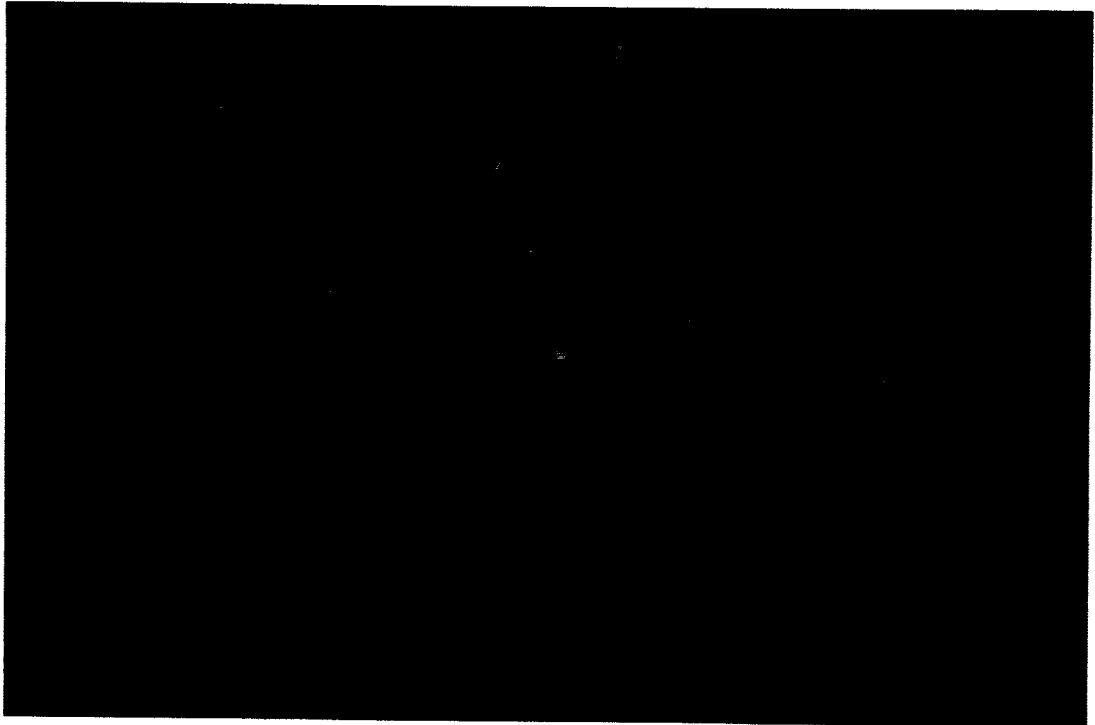


Figure 39. Incorporation de la poly(L-lysine) fluorescente dans les cellules fibroblastiques de souris L929.

Tableau V. Etude de la pénétration intra-cellulaire d'un ODN anti-sens marqué au phosphore 32 en absence ou en présence de lipofectin^R dans deux lignées de cellules en monocouche, T47D (cancer du sein humain) et SK-N-SH (neuroblastome humain) et deux lignées de cellules en suspension, HL-60 (leucémie à promyélocytes) et U-937 (lymphome histiocytaire).

Type cellulaire	Pénétration intra-cellulaire (%) *	
	En absence de lipofectin ^R	En présence de lipofectin ^R
T47D ¹	0.5	1.0
SK-N-SH ²	0.3	1.3
HL-60 ³	0.6	6.7
U-937 ³	0.2	2.6

* la pénétration intra-cellulaire est mesurée comme c'est indiqué dans les procédures expérimentales.

1 incubation pendant 5 heures

2 incubation pendant 7 heures

3 incubation pendant 9 heures

Le deuxième paramètre pouvant expliquer l'absence de réponse anti-sens est l'instabilité des ODN non modifiés dans le milieu intra-cellulaire. Les oligomères sont stables dans le milieu RPMI 1640 défini (couloirs 1 et 3, figure 40) et dans le milieu OPTIMEM, milieu utilisé pour la lipofection (couloirs 4, 5, 6, figure 40). La dégradation des ODN dans le milieu semble être plus importante en présence des cellules et de Lipofectin^R (figure 41). Une dégradation des oligomères a également été observée dans différentes lignées cellulaires, dans le cas présent en présence de Lipofectin^R, dans le milieu intra-cellulaire (couloirs 3 et 5, figure 42; couloirs 3, figure 43) excepté, de façon surprenante, dans les cellules SK-N-SH (couloir 8, figure 43). Il faut signaler que ces cellules toléraient mal l'absence de sérum de veau foetal dans nos expériences. Les cellules ont été cultivées en présence ou en absence de Lipofectin^R et d'oligodésoxynucléotides (3.4 µM) pendant 9 heures puis dans du milieu RPMI 1640 défini en présence d'oligodésoxynucléotides jusque la 24 ème heure avant l'étude de la stabilité. Dans toutes les cellules et notamment dans les cellules HL-60, il persiste des ODN intacts après 24 heures (couloir 5, figure 42). Il faut signaler que la différence de migration électrophorétique entre l'oligodésoxynucléotide et un "primer" commercialisé utilisé comme contrôle est liée à une composition en bases différentes (53 % et 60 % de bases GC respectivement) (figure 43).

Des essais ont été de nouveau réalisés en présence de Lipofectin^R dans les cellules HL-60 sur la réponse TG de tissu mais se sont aussi révélés négatifs.

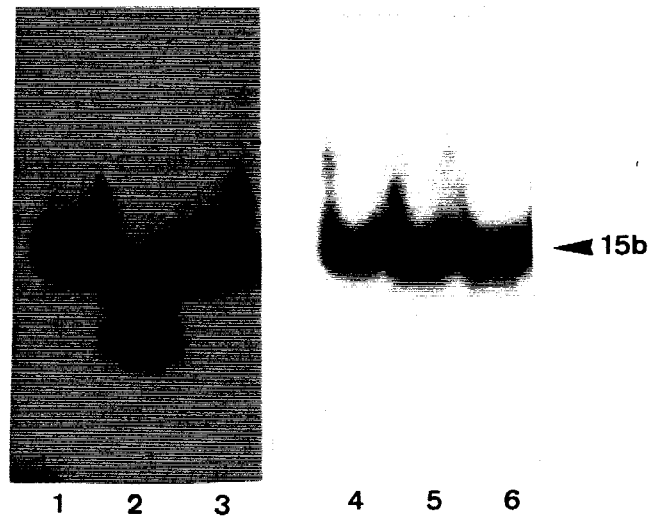


Figure 40. Etude de la stabilité d'un ODN anti-sens de 15 bases (flèches), en absence de cellule, dans le milieu RPMI1640 sans sérum de veau foetal (SVF) pendant 1 heure (1), avec SVF 10 % pendant 1 heure (2), sans SVF pendant 12 heures (3) ou dans le milieu OPTIMEM sans SVF (4,5,6) pendant 9 heures.

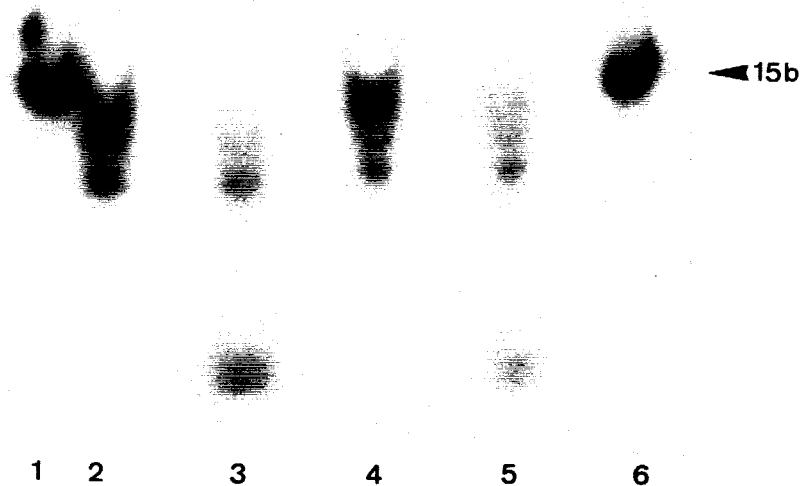


Figure 41. Etude de la stabilité d'un ODN anti-sens de 15 bases (flèches) en présence des cellules de leucémie à promyélocytes HL-60 (2,3) et de lymphome histiocyttaire U937 (4,5), dans le milieu OPTIMEM sans SVF en absence de lipofectin^R (2,4) ou en présence de lipofectin^R (3,5) pendant 9 heures. ODN témoins (1,6).

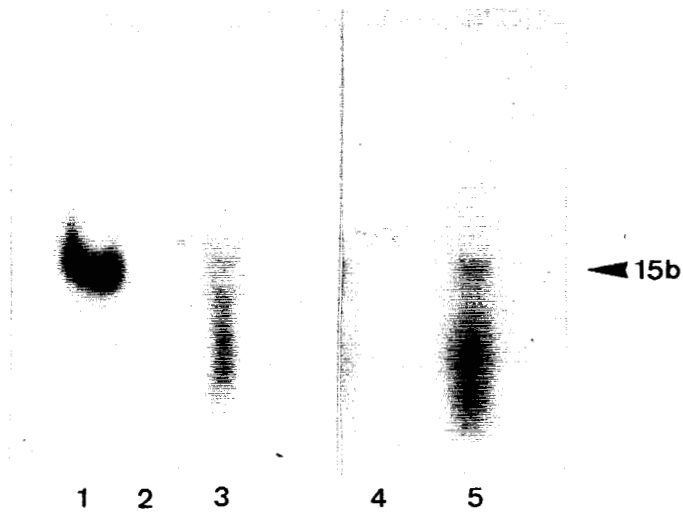


Figure 42. Etude de la pénétration intra-cellulaire et de la stabilité d'un ODN anti-sens de 15 bases (flèches) dans les cellules de lymphome histiocytaire U937 (2,3) et de leucémie à promyélocytes HL-60 (4,5) en absence (2,4) et en présence de lipofectin^R (3,5). ODN anti-sens témoins (1).

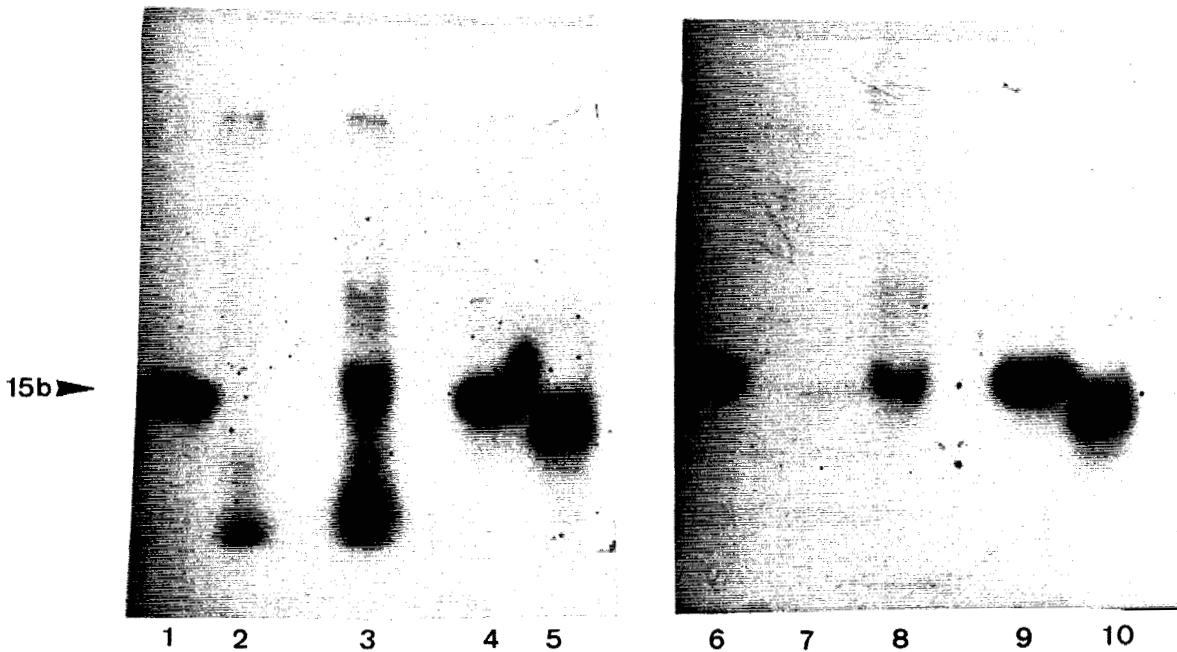


Figure 43. Etude de la pénétration intra-cellulaire et de la stabilité d'un ODN anti-sens de 15 bases (flèches) dans les cellules de cancer du sein humain T47D (2,3) et de neuroblastome humain SK-N-SH (7,8) en absence (2,7) ou en présence de lipofectin^R (3,8). ODN anti-sens témoins (1,4,6,9) et un oligonucléotide commercialisé ("primer") de 15 bases (5,10).

2.4 Discussion.

Au laboratoire, nous nous sommes intéressés aux effets de l'acide rétinoïque sur la différenciation et une réponse primaire, l'expression de la TG de tissu dans un modèle classique qui est celui des cellules HL-60. Deux récepteurs, RARalpha et RARbeta ont été mis en évidence dans les cellules HL-60 (Hashimoto, 1988). En outre, les récepteurs de l'acide rétinoïque ont déjà été montrés comme étant impliqués d'une part dans la différenciation des cellules HL-60 à partir d'une souche de cellules résistantes redevenues sensibles après transfection d'un vecteur d'expression RARalpha (Collins et coll., 1990) d'autre part dans l'expression de la TG de tissu à partir de cellules transfectées avec des vecteurs d'expression sens et anti-sens des RAR alpha et beta (Denning et coll., 1991).

Pour montrer l'implication de ces récepteurs dans la différenciation et l'expression de la TG de tissu induite par l'acide rétinoïque, l'approche anti-sens nous a semblé la méthode la mieux adaptée et la plus directe. La méthodologie anti-sens a déjà été utilisée pour réguler l'expression de récepteurs comme le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (Sumikawa et coll., 1988), le récepteur des cellules T de la surface membranaire (Zheng et coll., 1989), le récepteur des glucocorticoïdes (Pepin et coll., 1991) mais aussi le RARalpha (Cope et coll., 1989).

D'un point de vue stratégique, nous avons choisi d'abord d'utiliser la méthode la plus simple et la moins coûteuse c'est à dire celle basée sur l'utilisation d'oligodésoxynucléotides anti-sens non modifiés simplement ajoutés au milieu de culture. Cette technique a déjà été utilisée avec succès de nombreuses fois pour

démontrer le rôle de protéines dans des phénomènes biologiques. La démonstration du rôle de l'oncogène c-myc surexprimé dans l'état non-différencié des cellules HL-60 utilisant des ODN anti-sens non modifiés constitue à cet égard un exemple-type de succès rencontré avec cette méthodologie (Holt et coll., 1988; Wickström, et coll., 1988). Et ce sont aussi des ODN anti-sens qui ont été utilisés pour montrer l'implication du récepteur de l'acide rétinoïque et du RAR alpha dans une réponse biologique (Cope et coll., 1989). Un ODN anti-sens de 15 bases complémentaires de la séquence incluant le codon d'initiation et les quatre codons suivants de l'ARNm de RAR alpha a été synthétisé et utilisé d'après les séquences décrites (Giguère et coll., 1987; Brand et coll., 1988) c'est à dire 5'- CAT GCC AAG CGG CCA - 3'. L'inhibition de l'expression du récepteur a été obtenue avec des concentrations d'oligonucléotide variant de 5 à 40 μ M. En outre, l'oligodésoxynucléotide à 30 μ M ajouté au milieu de culture 90 minutes avant l'addition du rétinol a provoqué à 37°C après une période d'incubation de 3 heures et demi une diminution de 50 % de la réponse biologique. Il s'agissait, en l'occurrence, de l'induction de la phosphatase alcaline, un enzyme régulé de novo par les rétinoïdes (Reese et coll., 1981; Reese et coll., 1983; Ng et coll., 1988). Ce travail a permis, en outre d'estimer la demi-vie du récepteur qui serait courte entre 60 et 90 minutes et le taux critique de récepteur qui serait de l'ordre de 20 à 25 % dans les cellules traitées par rapport aux cellules non-traitées après une exposition de plus de 3 heures. En dessous de ce taux critique, les cellules se différencient de façon terminale et meurent par apoptose (Tomei et coll., 1988).

De la même façon, nous avons utilisé des séquences non modifiées de 15 bases incluant le codon d'initiation qui ont déjà été montrées comme étant les plus efficaces (Coleman et coll., 1984; Blake et coll., 1985a;

Blake et coll., 1985b). La faible pénétration intra-cellulaire des ODN constituait un problème connu dans l'utilisation de ces agents. Lemaître et coll. (1987) ont mis au point des ODN couplés à la poly(L-lysine) pour améliorer cette pénétration et ont réussi à inhiber l'expression de protéines jouant un rôle dans la réplication virale avec des concentrations de l'ordre de 1 μM . Malheureusement, dans notre travail, à la concentration la plus élevée sans avoir de toxicité, la poly(L-lysine) ne pénètre pas dans les cellules. Quant à l'utilisation de la Lipofectin^R, si elle améliore la pénétration, elle limite toutefois la concentration finale d'oligomères ce qui n'apporte rien quant à la quantité présente dans les cellules. Donc la pénétration reste encore un problème majeur quant à l'utilisation des ODN.

D'autres méthodes pourraient être utilisées pour l'améliorer comme par exemple l'électroporation.

La dégradation des ODN par les nucléases cellulaires est aussi un problème majeur et a déjà été rapportée (Wickström et coll., 1986; Holt et coll., 1988). Sachant que des ODN en présence de Lipofectin^R (améliorant de 10 fois la pénétration) à la concentration de 3.4 μM peuvent être équivalents à des ODN en l'absence de Lipofectin^R à la concentration de 30 μM , il resterait toutefois à cette concentration, une certaine quantité d'ODN intacts au bout de 24 heures. La question que l'on peut se poser est de savoir si celle-ci est suffisante pour obtenir un effet. La suite logique de ce travail est de vérifier si l'hybridation s'effectue réellement dans les cellules en détectant le complexe hybride comme ceci a déjà été fait pour un autre ARNm, celui de l'oncogène c-myc (Holt et coll., 1988) (figure 44). La prochaine étape est de démontrer la diminution du taux de récepteur par exemple par western blot utilisant un anticorps spécifique.

Enfin, il existe d'autres alternatives comme l'utilisation d'oligodésoxynucléotides modifiés ou encore de vecteurs d'expression anti-sens.

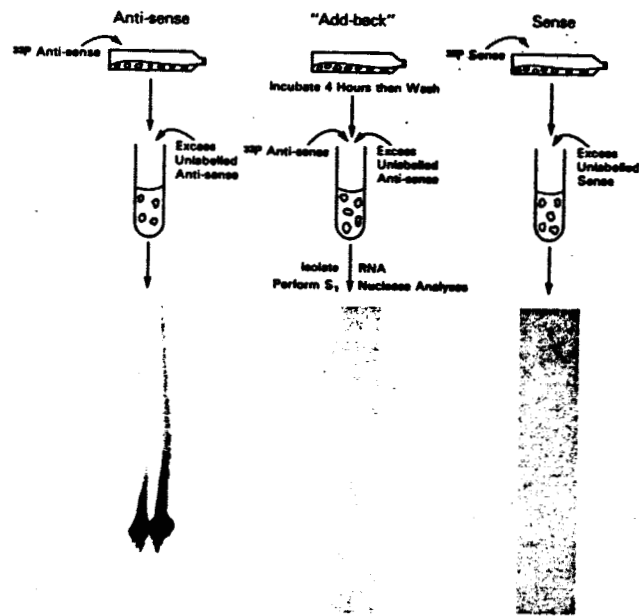


Figure 44. Autoradiogramme et schéma montrant la détection du complexe formé entre l'oligodésoxynucléotide anti-sens et l'ARN messenger de c-myc endogène. Le complexe migre au même niveau qu'un témoin de 15 bases, taille qui correspond à celle de l'oligomère anti-sens utilisé (d'après Holt, 1988).

Enfin, en dehors des problèmes de méthodologie, il est possible que les résultats négatifs soient liés à la cible, c'est à dire l'ARNm des RARalpha et bêta. En effet de multiples isoformes ont été décrites pour chacun de ces récepteurs avec des variations dans la région du codon d'initiation. La détection du complexe hybride permettrait de répondre à cette question. Enfin, il est possible que l'expression de la TG de tissu ne mette pas en jeu les récepteurs de l'acide rétinoïque.

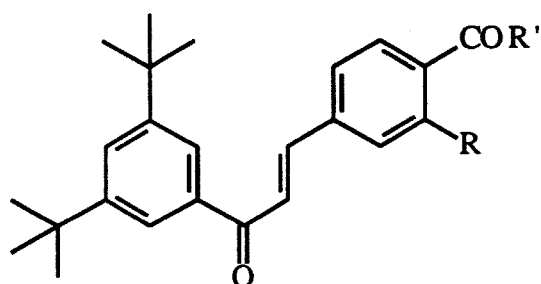
3. Acide rétinoïque et rétinoïdes : mécanisme d'action identique ?

La découverte d'un polymorphisme des RAR a soulevé un certain nombre de questions. L'une d'entre elles nous a particulièrement intéressés et concerne le mécanisme d'action de l'acide rétinoïque et des rétinoïdes. En effet, compte tenu de ce polymorphisme, l'acide rétinoïque et ses dérivés s'adressent-ils aux mêmes récepteurs pour exercer leurs effets ? C'est ce que nous avons tenté de savoir en utilisant des acides rétinobenzoïques, outils très puissants pour étudier le mécanisme d'action des rétinoïdes.

3.1 Résultats personnels.

Le Ch55 est un acide rétinobenzoïque de type chalcone et se trouve parmi les produits les plus actifs sur la différenciation des cellules HL-60 (Shudo et coll., 1985).

A partir de cette molécule ont été synthétisés des produits présentant soit une substitution en 3' dans le voisinage du groupement carboxylique (BW24, BW25) soit substitution du groupement carboxylique libre indispensable à l'activité et à la liaison au récepteur (Shudo et coll., 1985; Cavey et coll., 1990) par estérification (BW28) ou par amidification (Cham1) (figure 45).



R	R'	
H	OH	Ch55
OH	OH	BW 24
$O(CH_2)_3NHCOOC(CH_3)_3$	OH	BW 25
H	NHC_2H_5	Cham 1
H	OCH_3	BW 28

Figure 45. Nouveaux acides rétinobenzoïques synthétisés au laboratoire.

Effets sur la différenciation cellulaire et la toxicité aigüe.

L'induction de la différenciation des cellules HL-60 par le Ch55 et le BW24 est détectée pour des concentrations aussi faibles que 0.1 nM (figure 46) avec un profil de courbe dose-réponse comparable. La comparaison des concentrations efficaces 50 % (CE50) (tableau VI) montre que le Ch55 et le BW24 sont respectivement 41 fois et 31 fois plus actifs que l'acide rétinoïque tout-trans dans les cellules HL-60. Dans les cellules SK-N-SH, ces molécules sont approximativement 100 fois plus actives que l'acide rétinoïque tout-trans sur la différenciation cellulaire (tableau VI). L'activité beaucoup plus élevée du Ch55 sur ce modèle avait déjà été décrite auparavant (Shudo et coll., 1985). Le BW25 portant un substituant beaucoup plus volumineux est, par contre, peu actif sur la différenciation des cellules HL-60 (16%). Les dérivés carboxamide (Cham1) et l'analogue méthylester (BW28) sont inactifs.

Les molécules les plus actives sont également les plus toxiques. Ainsi, le Ch55 et le BW24 sont respectivement 20 fois et 12 fois plus toxiques dans les cellules HL-60 et respectivement 8 fois et 6 fois plus toxiques dans les cellules SK-N-SH (tableau VI).

Effets sur l'expression de la TG de tissu.

La situation est différente de celle observée dans la différenciation cellulaire. Les courbes dose-réponse du Ch55 et du BW24 sur l'activité de la TG de tissu n'ont pas ici le même profil que celle de l'acide rétinoïque dans les deux lignées cellulaires, HL-60 et SK-N-SH (figure 47). A partir de 0.1 μM dans les cellules HL-60 et 5 μM dans les cellules SK-N-SH, une dissociation de la réponse apparaît entre l'acide rétinoïque tout-trans et les dérivés acides rétinobenzoïques dans un rapport de 1/5 dans les cellules HL-60 et 1/2 dans les cellules SK-N-SH. Ceci est confirmé au niveau protéique dans les cellules HL-60 (figure 49). Le tableau VII indique les valeurs d'EC50 calculées pour chaque rétinoïde. Compte tenu de la dissociation de la réponse cellulaire induite d'une part par l'acide rétinoïque et d'autre part les rétinoïdes en rapport probablement avec un mécanisme d'action différent, les EC50 ne peuvent pas être comparées. Par contre, on peut comparer les effets du Ch55 et de son dérivé hydroxylé, BW24 qui présentent une EC50 très voisine.

La prochaine étape a consisté à tenter d'élucider les mécanismes différents pouvant expliquer cette induction différentielle de la TG de tissu par l'acide rétinoïque et les acides rétinobenzoïques.

Il est possible que l'induction de cette réponse implique les récepteurs de l'acide rétinoïque. Aussi, nous avons mis en compétition ces rétinoïdes pour savoir si ceux-ci s'adressaient éventuellement aux mêmes récepteurs.

La figure 48 montre que l'acide rétinobenzoïque, Ch55 et l'acide rétinoïque en association ne présentent pas d'effets antagonistes. L'expérience a été réalisée avec deux concentrations différentes d'acide rétinoïque.

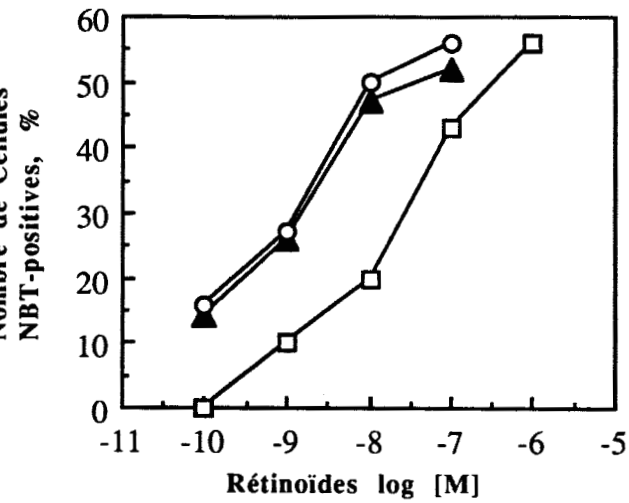


Figure 46. Courbe dose-réponse de l'acide rétinoinique tout-trans (□) et des acides rétinobenzoïques, Ch55 (▲) et BW24 (○) sur la différenciation des cellules de leucémie à promyélocyte HL-60 traitées pendant 5 jours.

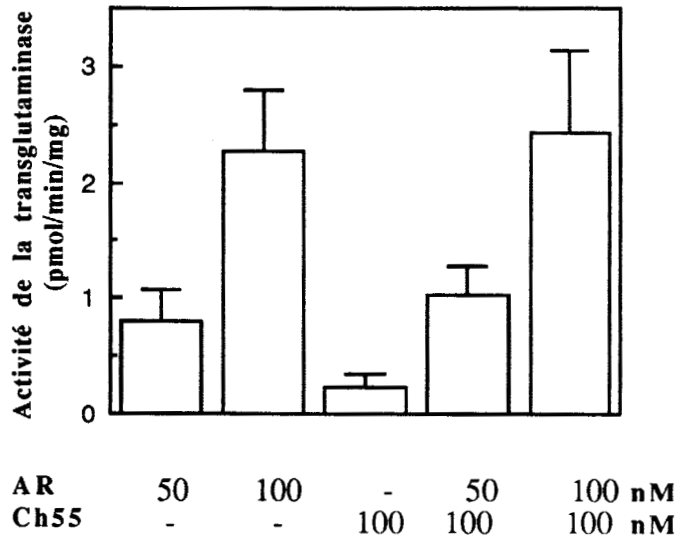


Figure 48. Compétition entre l'acide rétinoinique tout-trans (AR) et l'acide rétinobenzoïque Ch55 sur l'activité de la transglutaminase de tissu dans les cellules de leucémie à promyélocyte humaine HL-60 traitées pendant 48 heures.

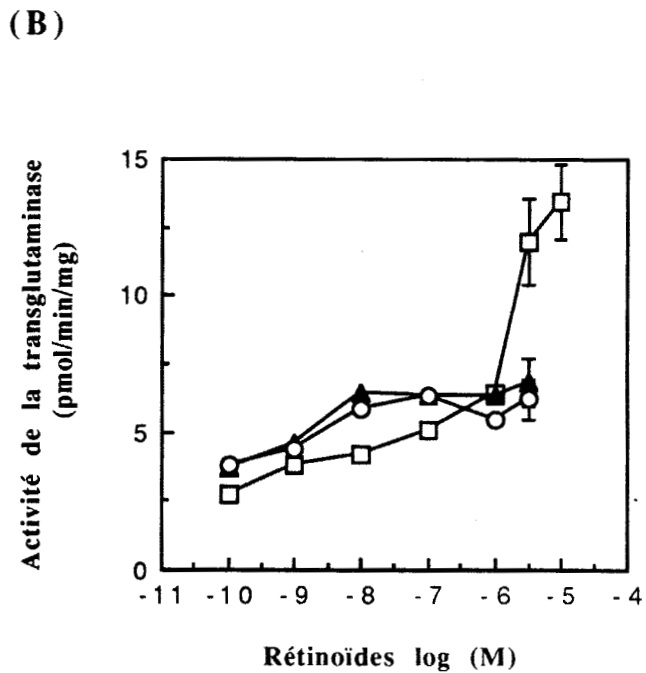
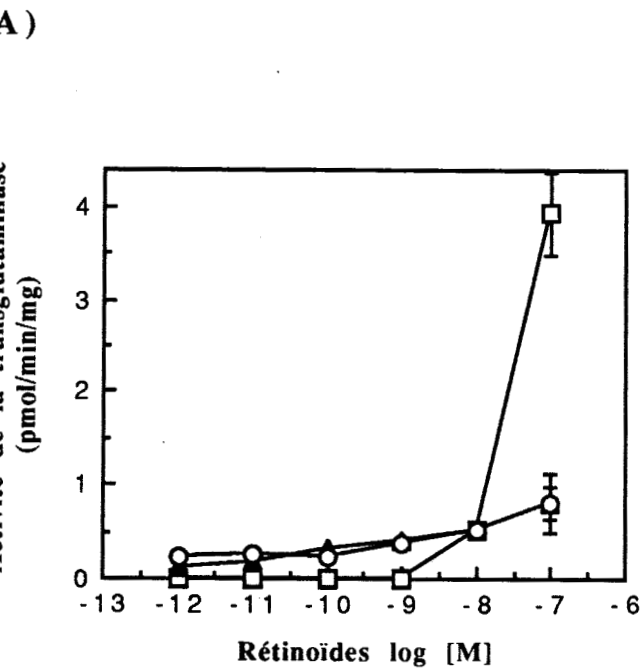


Figure 47. Courbes dose-réponse de l'acide rétinoinique tout-trans (□) et des acides rétinobenzoïques, le Ch55 (▲) et le BW24 (○) sur l'activité de la transglutaminase de tissu après 48 heures dans les cellules de leucémie à promyélocytes humaine HL-60 (A) et les cellules de neuroblastome humain SK-N-SH (B).

Tableau VI. Effets de l'acide rétinoïque tout-trans et des acides rétinoïques, Ch55 et BW24, sur la différenciation et la toxicité aigüe dans les cellules de leucémie à promyélocyte HL-60 et de neuroblastome humain SK-N-SH.

Rétinoïdes	réduction du NBT HL-60 (CE50, nM)	réseau axo- dentritique SK-N-SH (CME, nM)	exclusion au bleu trypan HL-60 (CL50, μ M)	perte d'adhérence SK-N-SH (CL, μ M)
Acide rétinoïque	49.0	10.0	>10.0	50
Ch55	1.2	0.1	0.5	6
BW24	1.6	0.1	0.8	8

CE50 : concentration efficace 50%
 CME : concentration minimale efficace
 CL50 : concentration létale 50%
 CL100 : concentration létale 100%

Tableau VII. Effets de l'acide rétinoïque tout-trans et des acides et rétinoïques, Ch55 BW24, sur l'activité de la TG de tissu dans les cellules de leucémie à promyélocyte humaine HL-60 et de neuroblastome humain SK-N-SH.

Rétinoïdes	activité de la TG HL-60 (CE50, nM)	activité de la TG SK-N-SH (CE50, nM)
Acide rétinoïque tout-trans	95.6	1364
Ch55	2.4	1.7
BW24	3.2	2.4

CE50 : concentration efficace 50%

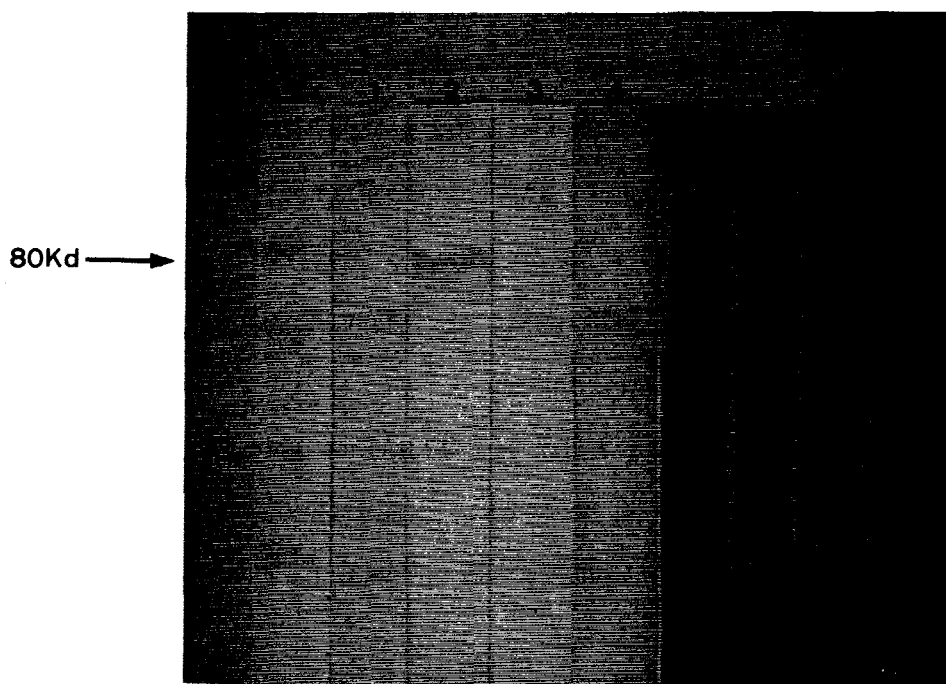


Figure 49. Effets de l'acide rétinoïque tout-trans et des acides rétinobenzoyés, Ch55 et BW24, sur l'expression de la transglutaminase de tissu dans les cellules HL-60 traitées pendant 48 heures. L'enzyme est détecté par western blot utilisant un anticorps monoclonal anti-TG de tissu de cochon d'Inde (P.Birckbichler, Oklahoma). Les protéines totales du cytosol (à droite) servent de contrôles internes.

1. Cellules HL-60 non traitées
2. Cellules HL-60 traitées par l'acide rétinoïque tout-trans 0.1 μ M
3. Cellules HL-60 traitées par le Ch55 0.1 μ M
4. Cellules HL-60 traitées par le BW24 0.1 μ M
- T Témoins de poids moléculaire

Pour savoir si l'acide rétinoïque induisait la TG de tissu en impliquant des systèmes indépendants des récepteurs comme par exemple ceux qui impliquent la PKA et la PKC, nous avons étudié l'effet d'inhibiteurs de PKA (H8) et PKC (H7) sur cette réponse cellulaire induite par l'acide rétinoïque.

H-7 inhibe d'environ 80 % l'expression de la TG de tissu induite par l'acide rétinoïque tout-trans. Cet effet est particulièrement net pour les fortes concentrations (0.1 et 1 μ M) (figures 50 et 52). Par contre, H-7 n'inhibe pas de façon significative l'expression de l'enzyme induite par l'analogue acide rétinoïque Ch55 (figure 53). Il faut signaler que H7 seul induit faiblement l'expression de la TG de tissu.

Contrairement à H-7, H-8 20 μ M n'a que très peu d'effet significatif sur l'induction de la TG de tissu par l'acide rétinoïque tout-trans (figures 50 et 52). Des concentrations plus élevées ont été utilisées mais se sont révélées toxiques pour les cellules HL-60.

L'activité de cet inhibiteur a été contrôlée par ailleurs comme le montre la figure 51. En effet, l'AMPc potentialise l'induction de la TG de tissu par l'acide rétinoïque tout-trans dans les cellules HL-60 (figures 51 et 54) et cette potentialisation est diminuée en présence de H8 (figure 51).

Il faut signaler que l'AMPc est capable de potentialiser l'expression de cet enzyme induit non seulement par l'acide rétinoïque tout-trans mais aussi par d'autres rétinoïdes, les acides rétinoïques (Ch55, BW24) et anthracényle (CD367) (figure 55). D'autres agents qui augmentent les taux d'AMPc intracellulaire sont aussi capables de potentialiser l'expression de la TG de tissu induite par l'acide rétinoïque tout-trans. C'est le cas, notamment, du VIP ("vasoactive intestinal peptide") plus précisément dans une lignée de neuroblastome humain, la lignée SK-N-SH (figure 56).

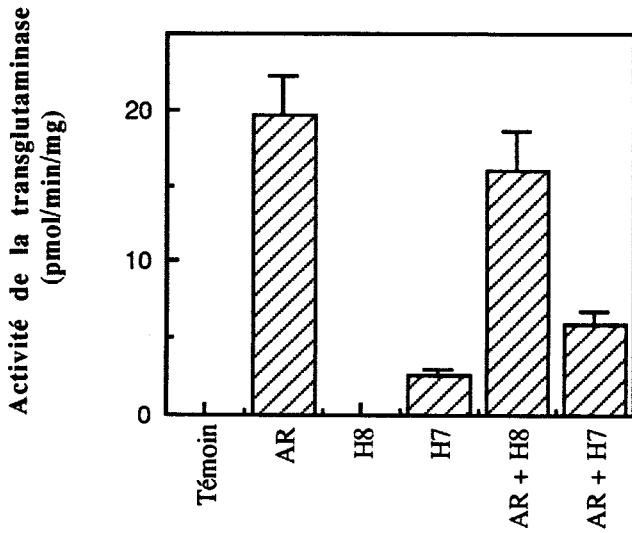


Figure 50. Effet de l'acide rétinoïque tout-trans 1 μ M, de H8 20 μ M, inhibiteur de PKA et H7 20 μ M, inhibiteur de PKC ou de la combinaison de ces traitements sur l'induction de la transglutaminase de tissu dans les cellules de leucémie à promyélocytes HL-60 pendant 48 heures.

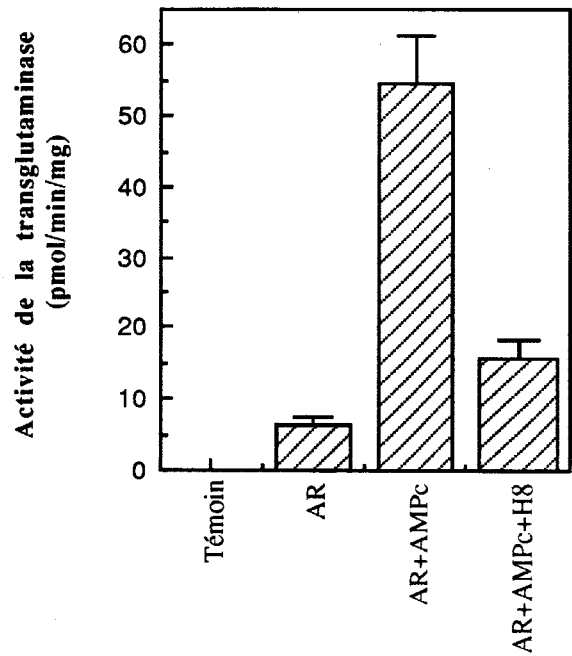


Figure 51. Effet de l'acide rétinoïque tout-trans 1 μ M seul ou en présence de dibutyrylAMPc 1 mM, en absence ou en présence de H8 20 μ M, inhibiteur de PKA dans les cellules de leucémie à promyélocytes HL-60 pendant 48 heures.

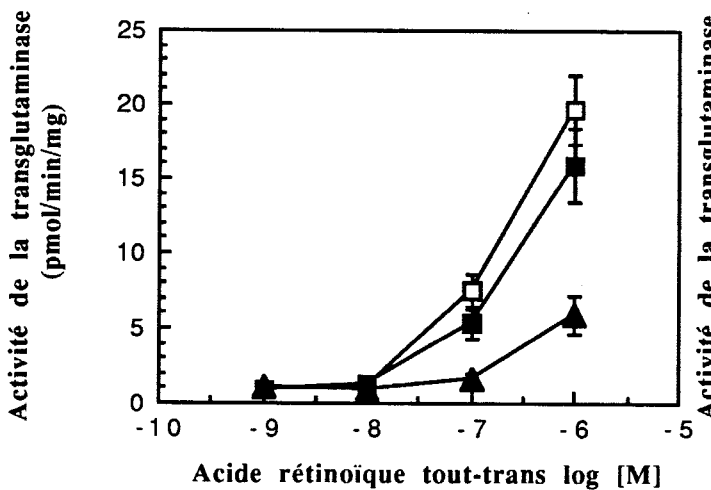


Figure 52. Courbes dose-réponse de l'acide rétinoïque tout-trans seul (□), en présence de H8, inhibiteur de la PKA (■) ou en présence de H7, inhibiteur de la PKC (▲) sur l'induction de la transglutaminase de tissu dans les cellules de leucémie à promyélocytes HL-60 pendant 48 heures.

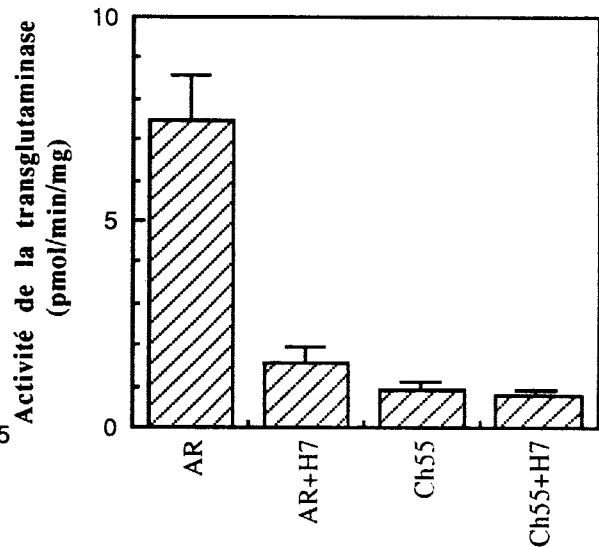


Figure 53. Effet de l'acide rétinoïque tout-trans 0.1 μ M et de l'analogue Ch55 0.1 μ M, seuls ou en présence de H7 20 μ M, inhibiteur de PKC sur l'induction de la transglutaminase de tissu dans les cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60.

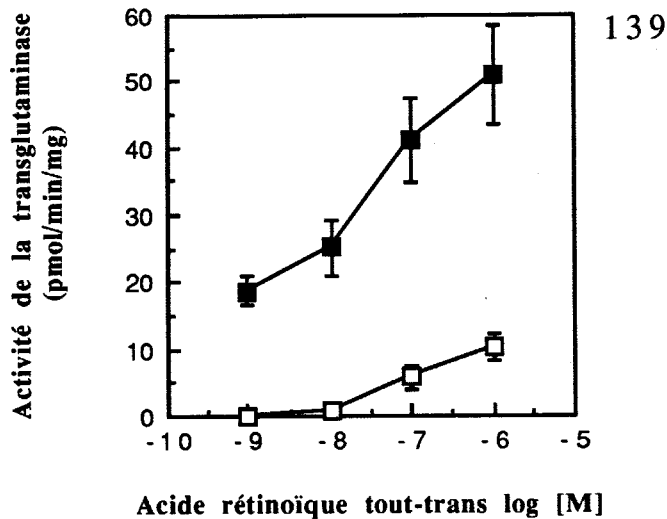


Figure 54. Courbe dose-réponse de l'acide rétinoïque tout-trans sur l'induction de la transglutaminase de tissu dans les cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60 en absence (□) ou en présence (■) de dibutyrylAMPc 1 mM pendant 48 heures.

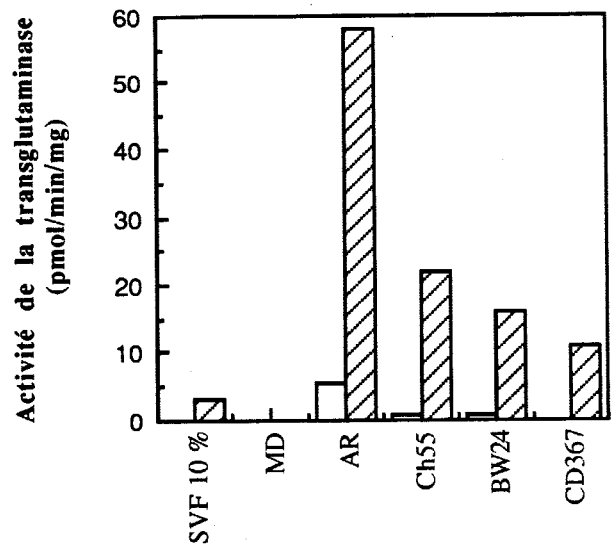


Figure 55. Effet de l'acide rétinoïque tout-trans et de ses analogues acides rétinoïques (Ch55, BW24) et anthracényl (CD367) sur l'induction de la transglutaminase de tissu dans les cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60 en absence (barres blanches) ou en présence (barres rayées) d'AMPc 1 mM pendant 48 heures. Activité de la transglutaminase de tissu dans les cellules cultivées en milieu défini (MD) ou milieu contenant du sérum de veau foetal (SVF) en présence d'AMPc 1 mM.

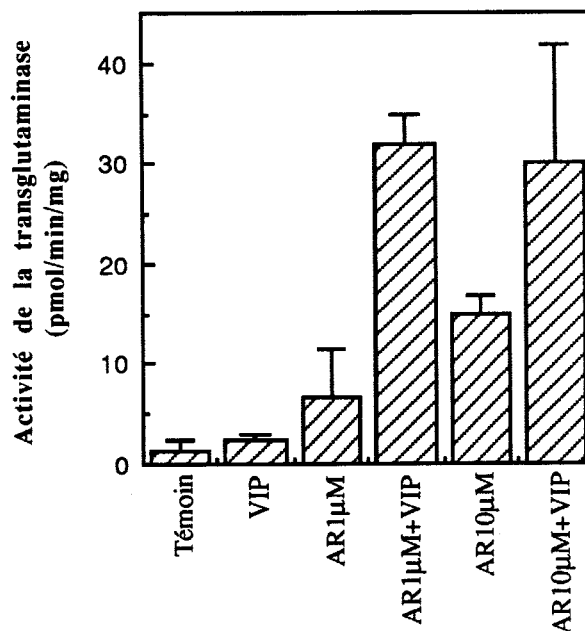


Figure 56. Effet du VIP 1 μM en absence ou en présence d'acide rétinoïque tout-trans 1 μM ou 10 μM sur l'activité de la transglutaminase de tissu dans les cellules de neuroblastome humain SK-N-SH pendant 48 heures. Cellules non traitées (Témoin).

3.2 Discussion

Les acides rétinobenzoiques ont été testés dans un premier temps sur la différenciation des cellules HL-60. Le Ch55 se révèle beaucoup plus actif que l'acide rétinolique sur cette réponse cellulaire comme ceci a déjà été décrit dans la littérature (Shudo et coll., 1985) mais également très toxique.

La différenciation des cellules HL-60 est un modèle classique pour étudier les effets des acides rétinobenzoiques et ce modèle nous a permis d'abord de vérifier la forte activité de ces molécules synthétisées dans notre laboratoire avant de les tester sur des réponses moins classiques et plus originales comme l'induction de la TG de tissu.

Nous en avons profité en outre pour dégager quelques éléments de relation-activité. Ainsi, l'addition d'un groupement hydroxyle (BW24) dans le voisinage du groupement carboxylique ne modifie pas l'activité de ces produits. Aussi, peuvent être envisagées à ce niveau des substitutions plutôt de taille moyenne car la présence d'un substituant trop volumineux (BW25) diminue l'activité probablement en raison de l'encombrement stérique provoqué notamment par le groupement tertio-butyl terminal, pouvant interagir défavorablement avec le groupement carboxylique libre. L'absence d'activité des dérivés carboxamides (Cham 1) et des dérivés méthylesters (BW28) confirme une fois de plus le caractère essentiel du groupement carboxylique libre pour l'activité (Roberts et coll., 1984). Ces molécules n'ont pas de caractère antagoniste vis à vis du Ch55 ou de l'acide rétinolique (résultats non montrés) confirmant l'implication du groupement carboxylique libre dans la liaison au récepteur (Cavey et coll., 1990).

Mais ce qui nous intéressait davantage était l'étude des effets de ces acides rétinobenzoïques sur l'expression de la TG de tissu, réponse beaucoup plus originale et plus adaptée aux études de mécanisme d'action en raison de son caractère primaire. Une différence de niveau d'induction a été observée entre l'acide rétinoïque et les rétinoïdes, ces derniers n'ayant qu'une faible activité maximale sur cette réponse cellulaire.

Cette dissociation pourrait refléter l'implication du même récepteur avec une affinité et une activation transcriptionnelle différente. Des expériences de compétition entre les deux types de molécules ne sont pas en faveur de cette hypothèse puisqu'aucun antagonisme n'est observé pour des concentrations supérieures à 10 nM dans les cellules HL-60 (figure 48). Une telle observation a déjà été décrite avec un autre acide rétinobenzoïque, l'acide tétrahydrotétraméthylnaphtalénylpropénylbenzoïque (TTNPB) qui induit faiblement l'activité de la TG de tissu dans les cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60 alors que ce rétinoïde présente une forte affinité pour les récepteurs RARalpha et RARbeta transfectés dans des cellules Cos (Gil et coll., 1990). Ces auteurs avaient suggéré alors que cette réponse pouvait impliquer un autre "récepteur" non encore décrit dans les cellules HL-60.

Il pourrait ainsi exister un deuxième type de "récepteur" qui expliquerait l'effet de l'acide rétinoïque à fortes doses. Quel est ce "récepteur" non reconnu par les acides rétinobenzoïques ? Il pourrait s'agir en fait plutôt qu'un récepteur, d'enzymes, les protéine kinases A ou C qui seraient le siège d'une interaction directe avec l'acide rétinoïque. En effet, l'acide rétinoïque exercerait des effets biologiques qui n'impliqueraient pas les récepteurs classiques mais des systèmes impliquant d'autres voies de transduction comme celles de l'AMPC/PKA (Plet et coll., 1982) ou du DAG/PKC (figure 5). L'éventuelle implication de ces systèmes dans la différenciation et l'expression de la TG de tissu dans les

cellules HL-60 a déjà fait l'objet d'un certain nombre de travaux. Ainsi l'AMPC seul n'a pas d'effet sur ces réponses mais par contre potentialise celles induites par l'acide rétinoïque (Olsson et coll., 1982; Davies, 1985). En outre, au cours de la différenciation des cellules HL-60 vers la voie granulocytaire induite par l'acide rétinoïque, un certain nombre de modifications ont été observées et en particulier une augmentation de la PKA (Olsson et coll., 1982; Fontana et coll., 1984) ainsi que de la PKC (Makowske et coll., 1988). La PKC semble également être impliquée dans la différenciation des cellules HL-60 mais vers la voie monocytes/macrophages induite par les esters de phorbol (TPA). En effet, cette différenciation est inhibée par la 1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-méthylpipérazine ou H7, un inhibiteur de la PKC (Matsui, 1986).

Pour étudier l'implication de ces systèmes dans l'expression de la TG de tissu induite par l'acide rétinoïque tout-trans dans les cellules HL-60, nous avons utilisé des inhibiteurs de protéine kinases, H7 mais aussi le N-[2-(méthylamino)éthyl]-5-isoquinoline-sulfonamide (H-8). Ces inhibiteurs ne sont pas spécifiques puisqu'ils inhibent à divers degrés la PK GMPc-dépendante, la PK AMPc-dépendante (PKA), la PK calcium-dépendante (PKC) et enfin la PK dépendante du complexe calcium-calmoduline. Toutefois, H-8 inhibe de façon plus marquée la PKA ($K_i=1.2 \mu\text{M}$ contre $K_i=3 \mu\text{M}$ pour H-7) et H-7 est le plus puissant inhibiteur de PKC ($K_i=6 \mu\text{M}$ contre $K_i=15 \mu\text{M}$ pour H-8) (Hidaka, 1984).

Ces résultats suggèrent que l'induction différentielle de l'expression de la TG de tissu par l'acide rétinoïque tout-trans et les acides rétinoïques est liée à un effet sélectif de l'acide rétinoïque tout-trans sur le système impliquant la PKC lorsque de fortes concentrations sont utilisées. On peut penser que la PKC induirait alors la phosphorylation de facteurs de transcription qui à leur tour induiraient la transcription du gène de la TG de tissu. Le mécanisme par lequel

l'acide rétinoïque tout-trans agit sur la PKC est encore obscur mais sa compréhension est tout à fait fondamentale pour avancer un peu plus dans l'élucidation des bases cellulaires et moléculaires d'action de l'acide rétinoïque.

L'effet de H-7 seul sur l'expression de l'enzyme (figure 50) est difficile à expliquer en regard des résultats précédents. Il est possible que cet effet soit lié à l'inhibition importante de la prolifération des cellules HL-60 par H-7 comme l'ont déjà observé Matsui et coll. (1986) et que nous avons vérifié au laboratoire (résultats non montrés). En effet, une corrélation étroite existe entre l'état de prolifération cellulaire et le taux de TG de tissu expliquant le faible taux détecté dans les cellules néoplasiques (Birckbichler, 1977). Il serait intéressant de savoir si cet effet est précoce ou tardif. Un effet tardif serait en faveur de l'hypothèse précédente.

Par contre, le système AMPc/PKA ne semble pas ou très peu impliqué dans l'induction de la TG de tissu par l'acide rétinoïque tout-trans dans les cellules HL-60. Toutefois, il faut signaler que l'AMPc, activateur de la PKA, potentialise l'expression de la TG de tissu induite par l'acide rétinoïque comme l'a également décrit Davies (1985) Cette potentialisation est aussi observée en présence des rétinoïdes de synthèse. Par conséquent, l'expression de cet enzyme ne semble pas être régulée par un effet activateur de l'acide rétinoïque sur la PKA. Cet effet potentialisateur de l'AMPc est reproduit avec un peptide, le VIP qui augmente l'AMPc intra-cellulaire mais cette fois-ci, dans les cellules SK-N-SH. Le VIP est connu pour exercer son activité selon un mécanisme impliquant un récepteur membranaire couplé au système adénylcyclase/AMPc/PKA. Récemment, il a été montré que le taux de ce récepteur était régulé positivement par l'acide rétinoïque tout-trans (Muller, 1989). Ces deux raisons expliquent la potentialisation de l'expression

de la TG de tissu induite par l'acide rétinoïque tout-trans dans la lignée cellulaire SK-N-SH (figure 56).

En résumé, l'effet de l'acide rétinoïque tout-trans à fortes concentrations (0.1 à 1 μM) sur l'expression de la tansglutaminase de tissu dans les cellules HL-60 semble impliquer la PKC et peu ou pas la PKA. Cet effet de l'acide rétinoïque tout-trans sur la PKC n'est pas retrouvé avec l'acide rétinoïque, Ch55. Ceci explique probablement la différence de niveau d'induction de la TG de tissu obtenue dans les cellules HL-60 avec des concentrations élevées de rétinoïdes (0.1 μM).

Actuellement, les travaux se poursuivent pour "asseoir" définitivement l'implication de la PKC dans l'induction de cet enzyme par l'acide rétinoïque. A court terme, nous tenterons de confirmer le rôle joué par la PKC en montrant qu'un de ses activateurs, le TPA, est capable d'augmenter la réponse induite par l'analogie acide rétinoïque, le Ch55 dans les cellules HL-60.

Enfin, à moyen et long terme, il est important de savoir à quel niveau l'acide rétinoïque pourrait interagir avec cette protéine kinase ?

Il est possible qu'une interaction physique directe se produise entre les deux, une rétinoylation de l'enzyme conduisant à son activation. En effet, en dehors des récepteurs, l'acide rétinoïque et certains rétinoïdes seraient capables de se lier de manière covalente à d'autres protéines comme par exemple les protéines G et les oncogènes ras et modifieraient leur fonction (Goldstein et coll., 1990; Glomset et coll., 1990). Il est aussi connu que, dans une des étapes du cycle visuel, le 11-cis rétinol se lie de façon covalente à l'opsine (Stryer, 1987). Enfin, il est tout à fait important de signaler que dans les cellules HL-60, plusieurs protéines semblent lier de façon covalente l'acide rétinoïque, la rétinoylation de ces

protéines faisant intervenir des liaisons thioesters après activation de l'acide rétinoïque au cours d'une réaction impliquant le coenzyme A (Takahashi et coll., 1989; Takahashi et coll., 1990). 80 % de ces protéines rétinoylées sont nucléaires et correspondent à une seule protéine ayant la même masse moléculaire que les récepteurs de l'acide rétinoïque. Toutefois, 20 % des protéines rétinoylées sont extra-nucléaires et n'ont pas été examinées par ces auteurs. Aussi, il serait très intéressant de poursuivre ces travaux en essayant d'identifier ces dernières parmi lesquelles pourrait se trouver une protéine kinase.

Un certain nombre d'effets biologiques de l'acide rétinoïque impliqueraient, en dehors des récepteurs, d'autres protéines activées par rétinoylation. Cette nouvelle approche du mécanisme d'action de l'acide rétinoïque permettra de répondre à un certain nombre de questions restées jusqu'à maintenant sans réponse comme celle plus ponctuelle relative au mécanisme qui sous-tend l'induction de la TG de tissu par l'acide rétinoïque.

3.3 Conclusion.

Les expériences utilisant la méthodologie anti-sens décrite précédemment n'ont pas permis d'établir le rôle joué par les récepteurs de l'acide rétinoïque dans l'expression de la TG de tissu induite par l'acide rétinoïque. Ces résultats pourraient refléter, en dehors des problèmes liés à la méthodologie ou à la cible, un rôle mineur de ces récepteurs dans cette réponse cellulaire dans laquelle, d'après les observations précédentes, un autre système jouerait lui un rôle actif, celui impliquant la PKC. Celle-ci n'intervient pas toutefois dans la réponse induite par les acides rétinoïques. La différence de niveau d'induction observée entre l'acide rétinoïque et ces dérivés serait donc liée au rôle joué par cet enzyme.

Le mécanisme d'action de ces rétinoïdes semble par conséquent différent de celui de l'acide rétinoïque dans l'induction de la TG de tissu. Il est possible que les récepteurs de l'acide rétinoïque aient un rôle même mineur dans l'expression de cette enzyme induite par l'acide rétinoïque et les rétinoïdes. Mais, dans tous les cas, il semblerait qu'une partie majeure de la réponse induite par l'acide rétinoïque implique un autre système, celui de la PKC, et que, par contre, ce système n'intervienne pas dans cette même réponse induite par les acides rétinoïques.

Un certain nombre d'effets biologiques de l'acide rétinoïque semblerait impliquer des protéines activées par rétinoylation. Aussi, une activation directe de la pKC par rétinoylation a été suggérée.

Les investigations se poursuivent actuellement pour confirmer le rôle de la PKC dans l'expression de la TG de tissu induite par l'acide rétinoïque, d'autres travaux étant nécessaires pour explorer de façon plus approfondie l'interaction entre l'acide rétinoïque et la PKC.

4. TG de tissu et interaction acide rétinoïque et dexaméthasone ("cross-talk").

Après l'acide rétinoïque et ses analogues dont les structures chimiques sont relativement éloignées de celle de l'acide rétinoïque, nous nous sommes intéressés aux effets de molécules de structure différente mais qui appartiennent à la même famille d'agents dont le mécanisme d'action implique des récepteurs intra-cellulaires, facteur de transcription régulant l'expression de gènes. Nous avons commencé par étudier les effets des glucocorticoïdes sur nos réponses cellulaires. De plus, les glucocorticoïdes ayant la particularité de réguler au niveau transcriptionnel un certain nombre de réponses induites par d'autres agents, nous nous sommes intéressés non seulement à leurs effets propres mais aussi à leur capacité à interagir avec l'acide rétinoïque sur ces même réponses.

4.1 Résultats personnels.

La dexaméthasone seule n'a aucun effet sur la différenciation des cellules HL-60 et n'interagit pas avec l'acide rétinoïque sur cette réponse cellulaire (figure 57).

La dexaméthasone seule n'a pas non plus d'effet sur l'expression de la TG de tissu dans les cellules HL-60 (figure 61) mais par contre inhibe l'activité de l'enzyme induite par l'acide rétinoïque approximativement de 50 % à 70 % avec une activité détectable à 1 nM (figure 58).

L'inhibition est temps-dépendante (figure 59) et apparaît de façon précoce, 6 heures après l'addition de l'acide rétinoïque et de la dexaméthasone au milieu de culture (figure 60).

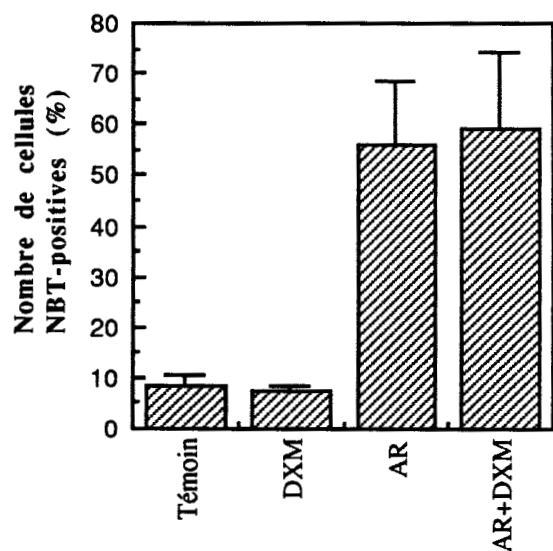


Figure 57. Effet de la dexaméthasone $1 \mu\text{M}$ sur la différenciation des cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60 induite par l'acide rétinoïque tout-trans $1 \mu\text{M}$ pendant 5 jours.

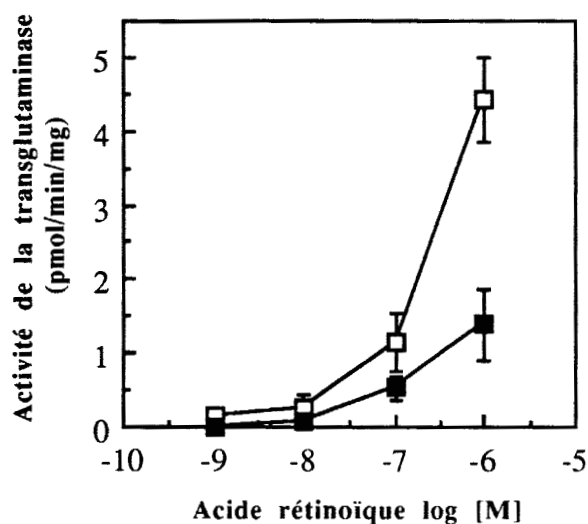


Figure 58. Effet de l'acide rétinoïque tout-trans seul (□) ou en présence de dexaméthasone $1 \mu\text{M}$ (■) sur l'activité de la transglutaminase de tissu dans les cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60 pendant 48 heures.

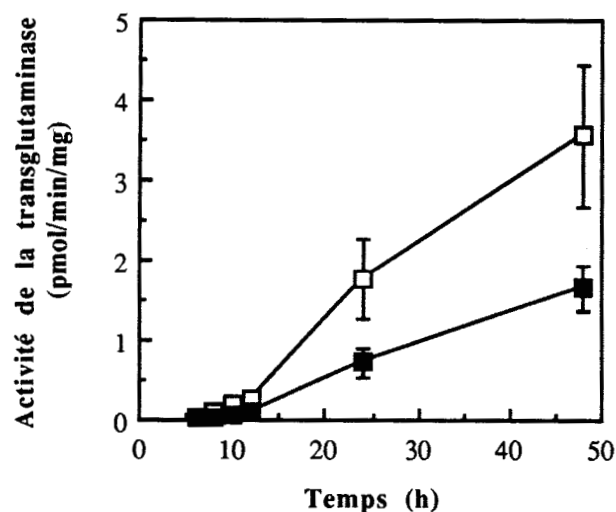


Figure 59. Effet de l'acide rétinoïque tout-trans $1 \mu\text{M}$ seul (□) ou en présence de dexaméthasone $1 \mu\text{M}$ (■) sur l'activité de la transglutaminase de tissu en fonction du temps dans les cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60.

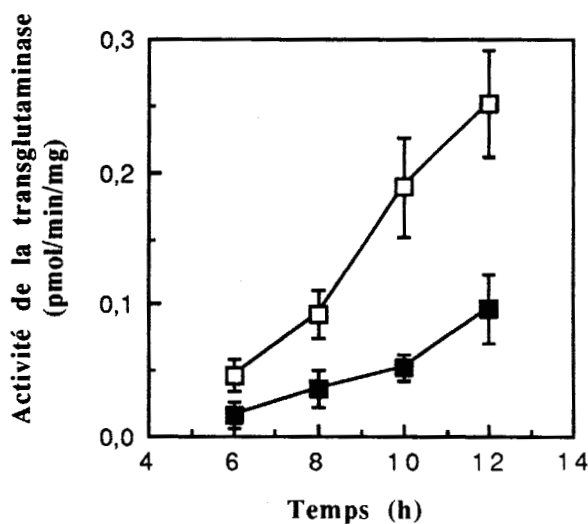


Figure 60. Effet de l'acide rétinoïque tout-trans $1 \mu\text{M}$ seul (□) ou en présence de dexaméthasone $1 \mu\text{M}$ (■) sur l'activité de la transglutaminase de tissu dans les cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60 à des temps précoces.

L'inhibition survient à des concentrations très faibles de l'ordre de 0.1 nM à 1 nM c'est à dire 1 000 fois à 10 000 fois plus faibles que celle de l'acide rétinoïque (figure 62).

Le RU486, antagoniste glucocorticoïde, inverse l'effet à une concentration dix fois supérieure à celle de la dexaméthasone (figure 61). La courbe dose-réponse (figure 62) montre que cette inversion se produit également à des concentrations de RU486 égales à celle de la dexaméthasone.

Les mêmes résultats sont également observés en présence de l'analogue acide rétinobenzoïque, le Ch55 (figure 64).

L'AMPC potentialise l'effet de l'acide rétinoïque sur l'activité de la TG de tissu (figure 63). En présence de dexaméthasone, une modification de la potentialisation n'est pas observée à des temps courts (18 heures) mais une diminution de celle-ci apparaît nettement à des temps plus longs (48 heures). Toutefois, dans ces conditions, cette diminution semble plus faible (approximativement 30 % à 48 heures) qu'en l'absence d'AMPC (approximativement 50 % à 48 heures) (figure 63).

L'inhibition par la dexaméthasone de la TG de tissu induite par l'acide rétinoïque dans les cellules HL-60 et l'inversion de cet effet par la RU486 a aussi été observée non seulement au niveau de l'activité mais aussi au niveau de la protéine détectée par un anticorps monoclonal anti-TG de tissu (P.Birckbichler, Oklahoma) (figure 65). Ce résultat a été obtenu à partir d'extraits cytosoliques analysés en électrophorèse sur gel de polyacrylamide 7.5 % suivi d'un transfert sur filtre de nitrocellulose et d'une immunorévélation avec un deuxième anticorps couplé à la peroxydase (western blot).

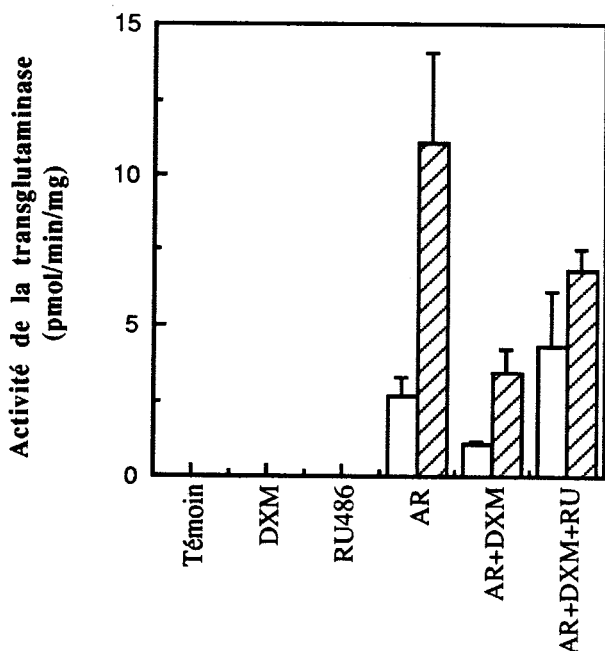


Figure 61. Effet de la dexaméthasone (DXM) 1 μ M, du RU486 10 μ M, de l'acide rétinoïque tout-trans (AR) à 0.1 μ M (barres blanches) et 1 μ M (barres rayées) seul ou en présence de DXM ou en présence de DXM et de RU486 sur l'activité de la transglutaminase de tissu dans les cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60 pendant 48 heures.

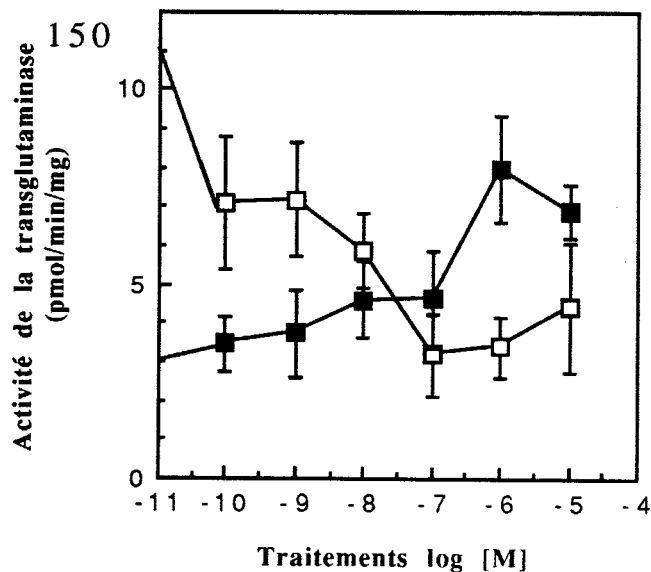


Figure 62. Courbe dose-réponse des effets de la dexaméthasone (□) et du RU486 (■) sur l'activité de la transglutaminase de tissu induite par l'acide rétinoïque tout-trans 1 μ M dans les cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60 pendant 48 heures.

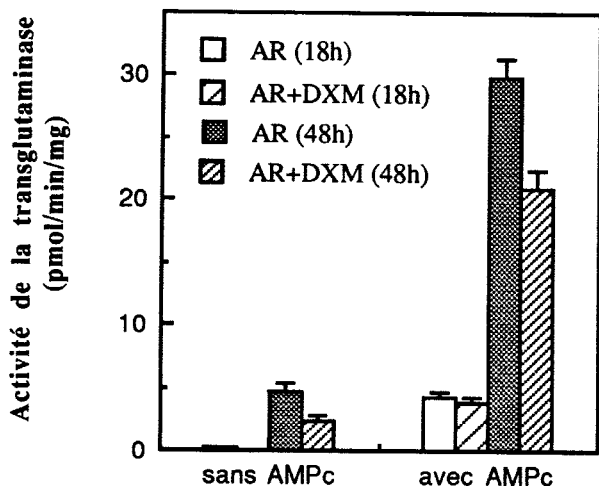


Figure 63. Effet de la dexaméthasone 1 μ M sur l'activité de la transglutaminase de tissu induite par l'acide rétinoïque tout-trans 1 μ M en absence ou en présence d'AMPc 1 mM dans les cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60.

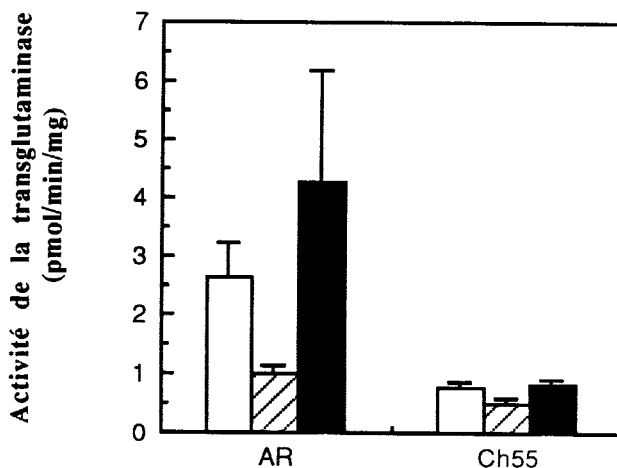


Figure 64. Effet de l'acide rétinoïque tout-trans 0.1 μ M et de l'analogue acide rétinoïque Ch55 0.1 μ M seuls (barres blanches), en présence de dexaméthasone 1 μ M (barres hachurées) ou de dexaméthasone 1 μ M et de RU486 10 μ M (barres noires) sur l'activité de la transglutaminase de tissu dans les cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60 pendant 48 heures.

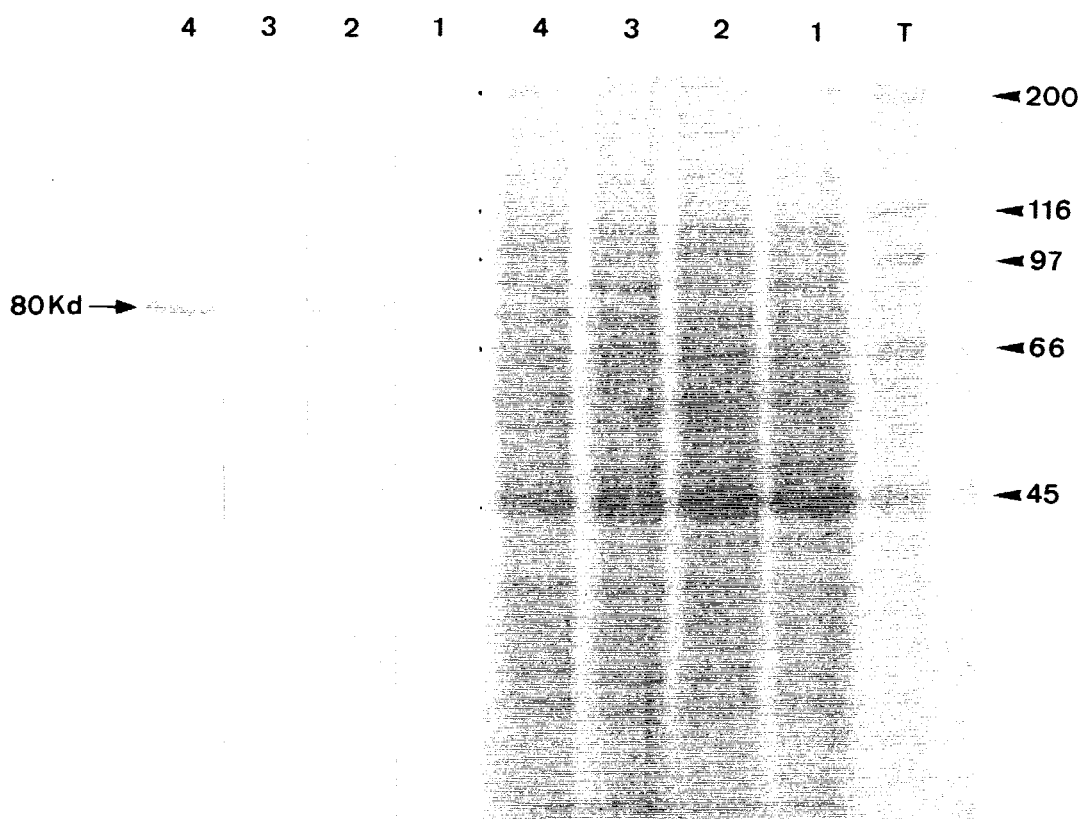


Figure 65. Expression de la protéine TG de tissu dans les cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60 non traitées (1), traitées par l'acide rétinoïque tout-trans $1 \mu\text{M}$ seul (2), en présence de dexaméthasone $1 \mu\text{M}$ (3) ou en présence de dexaméthasone $1 \mu\text{M}$ et de RU486 $10 \mu\text{M}$ (4) pendant 48 heures. L'enzyme est détecté par western blot utilisant un anticorps monoclonal anti-TG de tissu de cochon d'Inde. Les protéines totales (à droite) servent de contrôles internes. T (témoins de poids moléculaire).

L'implication probable des récepteurs des glucocorticoïdes dans cet effet répresseur de la dexaméthasone nous a amené à vérifier la présence de ce récepteur dans les cellules HL-60. Deux approches ont été utilisées. La protéine (94 Kd) a été mise en évidence par la technique de western blot utilisant l'anticorps monoclonal R250 développé contre le domaine N-terminal du récepteur des glucocorticoïdes de rat par Okret et coll.(1981) (figure 66).

Enfin, la technique de northern blot a permis également de détecter l' ARNm du récepteur des glucocorticoïdes à l'aide d'une sonde ADNc spécifique (Chambon, Strasbourg) (Kumar et coll., 1987) (figure 67). Dans les cellules HL-60, un seul transcrit approximativement de 5.4 kb a été détecté.

Nous avons, ensuite, tenté de rechercher cet effet inhibiteur de la dexaméthasone et l'inversion de cet effet par le RU486 dans d'autres lignées cellulaires. Ainsi, les mêmes résultats ont été observés dans les cellules de neuroblastome humain SK-N-SH (figure 68). Par contre, les cellules d'érythroleucémie se comportent différemment : elles ne présentent pas cette activité inhibitrice de la dexaméthasone (figure 68). Ce dernier résultat a été confirmé au niveau protéique en *western blot* utilisant l'anticorps monoclonal anti-TG de tissu (figure 69) et au niveau ARNm en *northern blot* utilisant une sonde humaine spécifique (Gentile et coll., 1991) (figure 70). En *western blot*, la même protéine de 80 Kd est détectée dans les cellules HL-60 et HEL (figures 65 et 69) mais aussi dans les cellules SK-N-SH (résultat non montré). En *northern blot*, deux transcripts de 4.7 kb et 2.4 kb sont détectés dans les cellules HEL (figure 70). Il faut signaler que contrairement aux cellules HL-60, les cellules HEL et SK-N-SH présentent un taux de base en TG de tissu (figures 68).

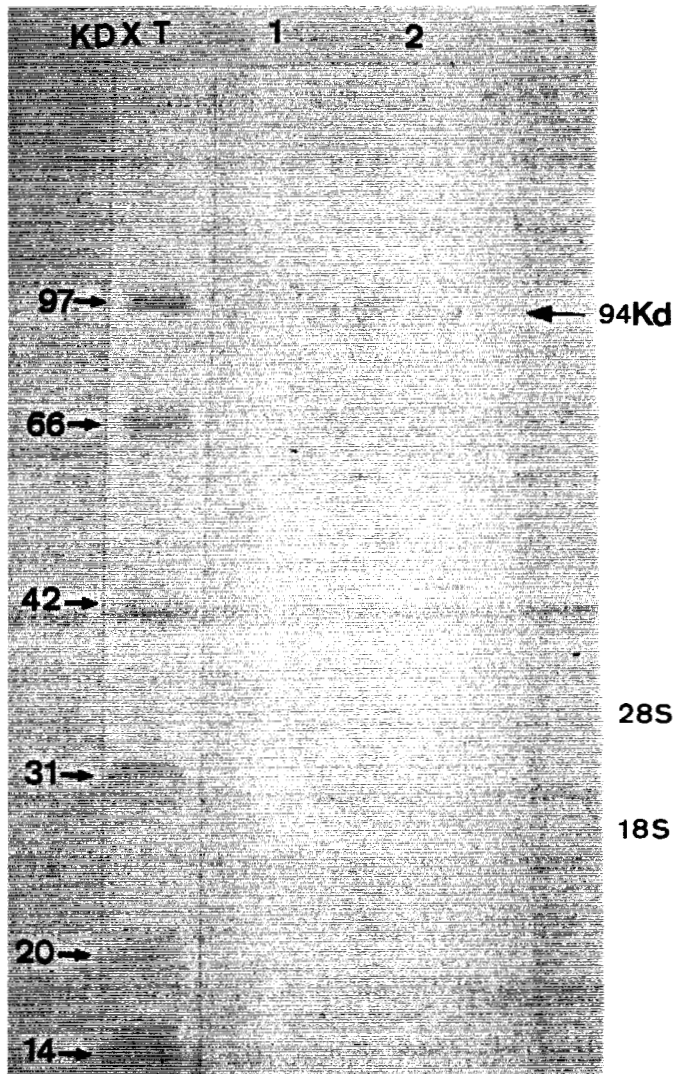


Figure 66. Détection du récepteur des glucocorticoïdes (GR) par western blot utilisant un anti-corps monoclonal anti-récepteur dans les cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60 non traitées (1) ou traitées par l'acide rétinoïque tout-trans 1 μM (2) pendant 48 heures.

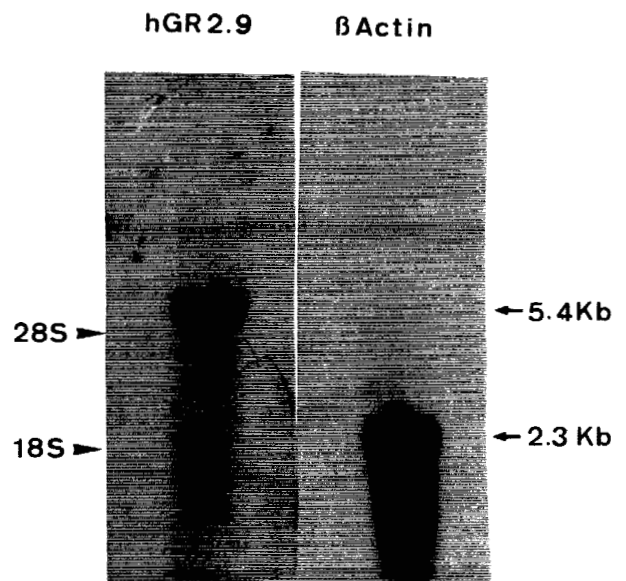


Figure 67. Détection du récepteur des glucocorticoïdes (GR) par northern blot utilisant une sonde ADNc hGR2.9 à partir de 25 μg d'ARN poly(A)⁺ extrait des cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60. La bêta-actine sert de témoin interne de poids moléculaire.

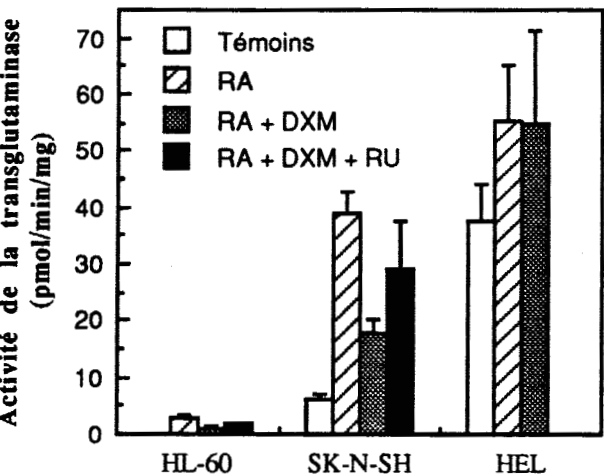


Figure 68. Activité de la transglutaminase de tissu induite pendant 48 heures par l'acide rétinoïque tout-trans 1 μ M seul, en présence de dexaméthasone (DXM) 1 μ M ou de dexaméthasone 1 μ M et de RU486 10 μ M dans les cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60, de neuroblastome humain SK-N-SH et d'érythroleucémie HEL.

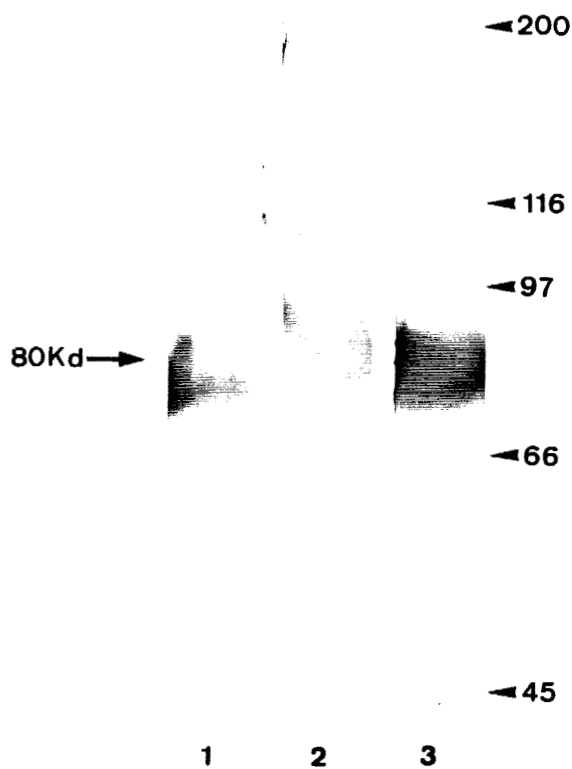


Figure 69. Expression de la protéine transglutaminase de tissu détectée par western blot utilisant un anticorps monoclonal anti-transglutaminase de tissu de cochon d'Inde dans les cellules d'érythroleucémie humaine HEL non traitées (1), traitées par l'acide rétinoïque tout-trans 1 μ M (2), traitées par l'acide rétinoïque tout-trans 1 μ M et dexaméthasone 1 μ M (3) pendant 48 heures.

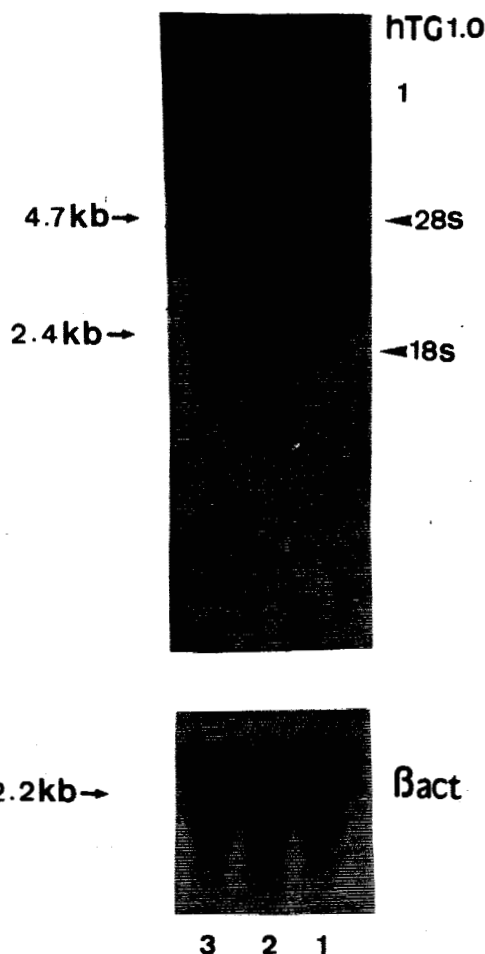


Figure 70. Expression de l'ARN messager de la transglutaminase de tissu détecté par northern blot utilisant une sonde ADNc hTG1.0 dans les cellules d'érythroleucémie humaine HEL non traitées (1), traitées par l'acide rétinoïque tout-trans 1 μ M (2), traitées par l'acide rétinoïque tout-trans 1 μ M et dexaméthasone 1 μ M (3) pendant 12 heures.

Le récepteur des glucocorticoïdes a été détecté dans les cellules HEL en *western blot* et en *northern blot*. En *western blot*, la même protéine de 94 Kd correspondant au récepteur a été mise en évidence dans les cellules HEL mais aussi les cellules HL-60 et des extraits cytosoliques de foie de rat, tissu de référence connu pour être riche en ce récepteur (figure 71). Le récepteur semble plus abondant dans les cellules HEL que dans les cellules HL-60.

L'ARNm du récepteur des glucocorticoïdes est également détecté dans les cellules HEL et son taux n'est d'ailleurs pas modifié par le traitement par l'acide rétinoïque (figure 72). Contrairement aux cellules HL-60, deux transcrits de 5.0 kb et 2.1 kb ont été détectés dans cette lignée cellulaire.

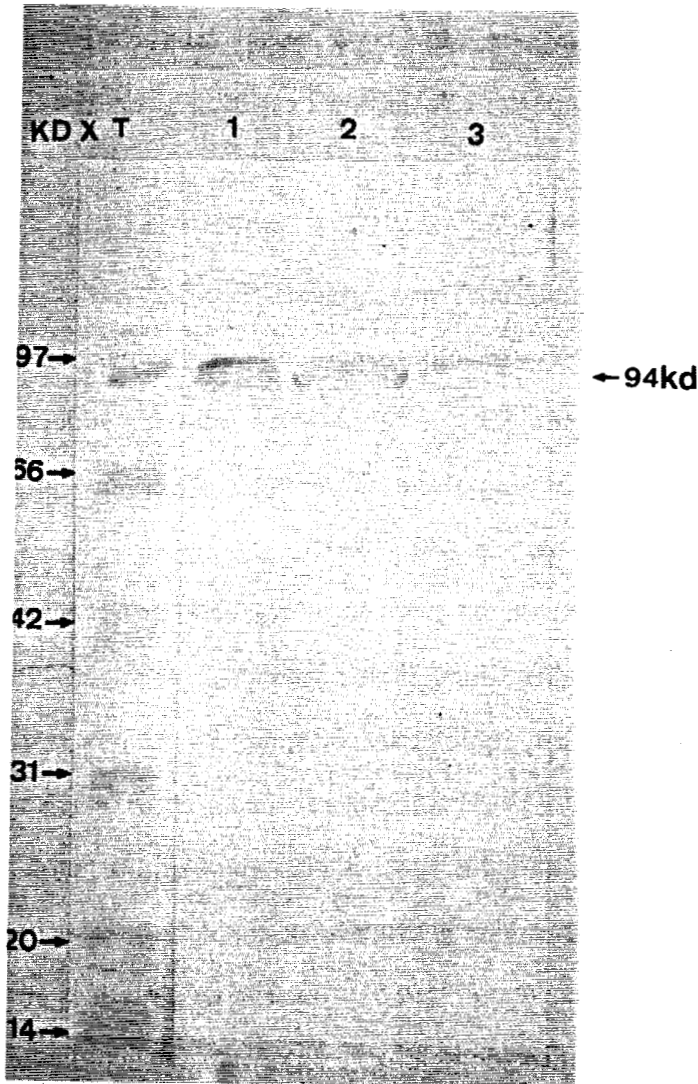


Figure 71. Détection du récepteur des glucocorticoïdes par western blot utilisant un anticorps monoclonal anti-récepteur dans le foie de rat (1), les cellules d'érythroleucémie humaine HEL (2) et les cellules de leucémie humaine à promyélocytes HL-60 (3).

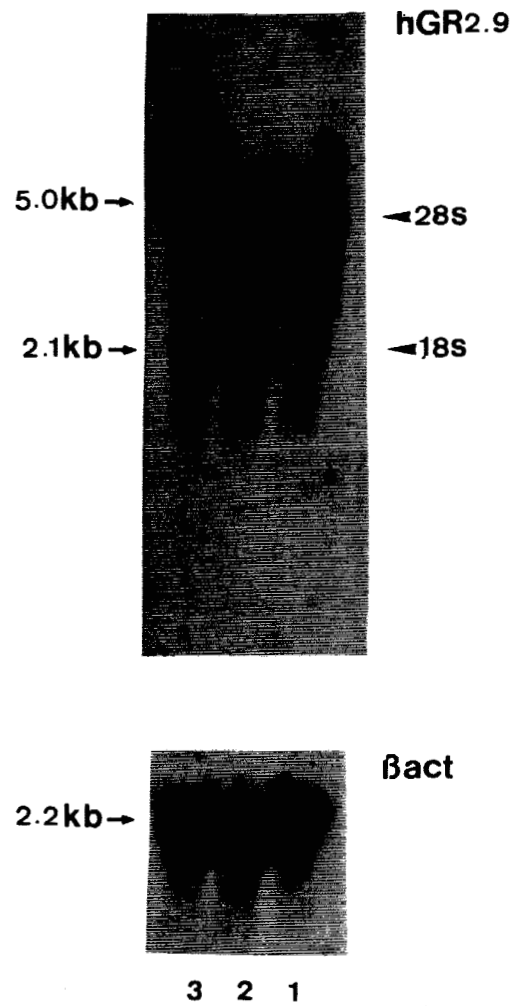


Figure 72. Détection de l'ARNm du récepteur des glucocorticoïdes par northern blot utilisant une sonde ADNc hGR2.9 à partir d'ARN total (40 µg) extrait des cellules d'érythroleucémie humaine HEL non traitées (1), traitées par l'acide rétinoïque tout-trans 1 µM (2) et traitées par l'acide rétinoïque tout-trans 1 µM et la dexaméthasone 1 µM (3) pendant 12 heures.

4.2 Discussion

La dexaméthasone seule n'a aucun effet sur l'expression de la TG de tissu dans les cellules HL-60 contrairement à d'autres lignées cellulaires comme par exemple les cellules tumorales de type macrophage P388D1 (Goldman et coll., 1985). Par contre, elle inhibe l'expression de l'enzyme induite par l'acide rétinoïque.

Des effets opposés entre les rétinoïdes et les glucocorticoïdes ont déjà été décrits sur un certain nombre de réponses biologiques comme ceux par exemple observés sur la différenciation cellulaire des cellules de carcinome squameux humain SqCC/Y1 mais qui, dans le cas présent, ne semblaient pas impliquer le récepteur des glucocorticoïdes (Violette et coll., 1989).

Des effets antagonistes ont aussi été observés au niveau de la différenciation des cellules tumorales de type macrophage P388D1 dont l'activité phagocytaire induite par l'acide rétinoïque est inhibée de 80% en 24 heures par la dexaméthasone (Goldman et coll., 1985). Le mécanisme de cette interaction semble impliquer un produit intermédiaire, la prostaglandine F₂alpha puisqu'il a été montré que l'acide rétinoïque stimulait la synthèse et la libération de celle-ci (Takenaga et coll., 1982). Goldman et coll. (1985) montrent, en outre, des effets opposés entre la dexaméthasone et l'acide rétinoïque au niveau de l'activité de la TG dans cette lignée de cellules tumorales de type macrophage P388D1. Mais contrairement à ce que nous avons observé dans les cellules HL-60, la dexaméthasone seule augmente l'activité de la TG (deux fois) alors que l'acide rétinoïque seul la diminue (de 50%). Il s'agit toutefois d'une observation isolée. Ces auteurs montrent aussi que la dexaméthasone (60 nM) augmente toujours l'activité de la TG dans les cellules traitées par l'acide rétinoïque (1 µM)

montrant un antagonisme entre ces deux produits au niveau de cette réponse biologique .

Ces effets opposés des rétinoïdes et des corticoïdes ont également été observés au niveau de l'expression de gènes tels que ceux de la phosphatase alcaline et de l'ostéonectine dans les cellules de type préostéoblaste UMR201 (Ng, 1989). En effet la dexaméthasone réduit l'expression de la phosphatase alcaline induite par l'acide rétinoïque dans ces cellules. En outre, l'acide rétinoïque seul provoque une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'ostéonectine qui est inhibée par la dexaméthasone. Cet antagonisme est également observé au niveau de l'activité transcriptionnelle d'une construction ostéonectine-CAT. Ces différents résultats montrent l'importance des interactions hormonales dans l'expression de la fonction ostéoblastique.

Il existe encore d'autres exemples où les rétinoïdes et les glucocorticoïdes exercent des effets opposés comme sur la croissance et l'activité de liaison du facteur de croissance épidermique (EGF) dans des cellules normales de rein de rat (Roberts, 1984a) ainsi que sur la synthèse du récepteur de l'EGF dans les cellules de poumon de rat foetal (Oberg, 1989). Dans ce dernier cas, il a été suggéré que l'effet de l'acide rétinoïque impliquerait un contrôle transcriptionnel via un facteur intermédiaire qui, à son tour, modifierait les taux d'ARNm du récepteur de l'EGF alors que la dexaméthasone aurait un effet direct sur la transcription de ce dernier (Oberg, 1989).

Des effets opposés entre rétinoïdes et glucocorticoïdes ont également été signalés dans les cellules de kératinocytes PAM-212 au niveau de l'ARNm de l'interleukine1 dont le taux est augmenté par l'acide rétinoïque et diminué par la dexaméthasone. Cet effet de la dexaméthasone est, en outre, inversé par le RU486.

Enfin, très récemment des auteurs ont montré *in vivo* les effets opposés de l'acide rétinoïque et de la dexaméthasone sur les taux d'ARN messager de la protéine intra-cellulaire liant le rétinol (CRBP) dans le foie et le poumon de rat (Rush, 1991). Or s'il a été mis en évidence un élément de réponse à l'acide rétinoïque en amont du gène codant pour la CRBP, aucun élément de réponse aux glucocorticoïdes n'a été détecté en amont de ce gène (Mangelsdorf et coll., 1990). Des expériences de "run-on" sont actuellement en cours pour savoir si ces effets de l'acide rétinoïque et de la dexaméthasone se situent à un niveau transcriptionnel.

Dans notre travail, nous rapportons un exemple où les rétinoïdes et les glucocorticoïdes ont des effets antagonistes sur une réponse cellulaire dont on sait qu'elle est régulée de façon transcriptionnelle (Chiocca et coll., 1988; Chiocca et coll., 1989). Compte tenu de cette dernière donnée, il était légitime de se demander si la dexaméthasone interagissait avec l'acide rétinoïque à ce niveau. Nous avons donc entrepris de démontrer le caractère transcriptionnel de cette inhibition.

La précocité de cet effet inhibiteur de la dexaméthasone constitue un premier argument indirect en faveur de cette thèse. Le deuxième argument indirect étant la faible concentration de dexaméthasone (1 000 à 10 000 fois inférieure à celle de l'acide rétinoïque) suffisante à faire apparaître l'inhibition. Le troisième argument est le rôle joué par les récepteurs des glucocorticoïdes dans cet effet inhibiteur inversé par le RU486.

Ces résultats ont été reproduits au niveau protéique. La protéine TG de tissu n'est pas détectée dans les cellules HL-60 non traitées mais elle est par contre induite en présence d'acide rétinoïque. Elle présente une taille de 80 Kd. Ces observations sont identiques à celles rapportées par P.J.A. Davies (1985) avec

l'utilisation d'un anticorps différent, polyclonal et purifié par chromatographie d'affinité. L'inhibition par la dexaméthasone a été également montrée au niveau de la protéine TG de tissu indiquant que probablement le mécanisme qui sous-tend cet effet n'est pas du à des modifications post-traductionnelles. Au niveau protéique a également été confirmée l'implication du récepteur des glucocorticoïdes dans cette inhibition inversée en présence du RU486.

Les investigations se poursuivent actuellement au niveau de l'ARNm de la TG de tissu pour savoir si l'action répressive des glucocorticoïdes s'effectue aussi à ce niveau ce qui serait un argument supplémentaire en faveur d'une régulation transcriptionnelle.

Le récepteur des glucocorticoïdes étant vraisemblablement impliqué dans cette interaction entre la dexaméthasone et l'acide rétinoïque et n'ayant jamais été mis en évidence dans les cellules HL-60, nous avons voulu vérifier sa présence. Le récepteur a été mis en évidence directement en *western blot* par un anticorps monoclonal anti-récepteur et en *northern blot* par une sonde ADNc spécifique. Au niveau protéique, le récepteur a la taille attendue (94 kd) comme ceci a déjà été rapporté dans d'autres lignées cellulaires humaines comme par exemple les cellules de cancer du sein MCF-7 (Govindan et coll., 1985). Au niveau ARNm, un seul transcrit de 5.4 kb a été détecté dans les cellules HL-60 et peut correspondre au transcrit mineur 5.0 kb mis en évidence dans les cellules MCF-7 dans lesquelles deux autres transcrits avaient été détectés, un transcrit mineur de 6.5 kb et surtout un transcrit majeur de 7.0 kb qui a aussi été retrouvé dans d'autres lignées cellulaires humaines et que nous n'avons pas retrouvé dans les cellules HL-60.

Pour résumer l'ensemble des résultats précédents, les glucocorticoïdes réprimerait donc peut-être de façon transcriptionnelle l'expression de la TG de tissu induite par l'acide rétinoïque et cette répression mettrait en jeu le récepteur des glucocorticoïdes.

Un certain nombre de travaux montrent que l'expression d'un certain nombre de gènes induite par divers agents est réprimée directement par les glucocorticoïdes via leur récepteur. Trois mécanismes principaux ont pu être ainsi dégagés (figure 73).

Le premier mécanisme (A), décrit récemment, met en jeu un complexe qui résulte d'une interaction entre un récepteur et une autre protéine (Schüle et coll., 1990; Yang-Yen et coll., 1990; Jonat et coll., 1990; Lucibello et coll., 1990). Ce mécanisme a été suggéré pour la première fois quand a été mis en évidence un hétérodimère résultant de l'interaction entre des motifs de liaison à l'ADN de deux facteurs de transcription, la région C du récepteur des glucocorticoïdes et la région "leucine zipper" des composants c-jun-c-fos des complexes AP-1, cette interaction étant le mécanisme qui sous-tendait l'effet inhibiteur de la dexaméthasone de l'expression, sous le contrôle du promoteur du gène de la collagénase, d'un gène test chloramphénicol acétyltransférase (CAT) induit par un ester de phorbol.

Il a été montré en outre que l'expression du gène de la collagénase et de la stromélysine n'était pas seulement inhibée par les glucocorticoïdes mais aussi par l'acide rétinoïque et que le même site AP-1 dans ces promoteurs était la cible de la répression impliquant les récepteurs rétinoïques (Nicholson, 1990; Schüle, 1991).

Très récemment, des observations ont permis de suggérer fortement que les récepteurs rétinoïques pouvait inhiber l'activité Jun-Fos par un mécanisme de

type interaction protéine-protéine et que le domaine de liaison à l'ADN était nécessaire à l'activité répressive (Schüle, 1991).

Une interaction directe protéine-protéine a été mise en évidence entre le complexe Jun-Fos et les récepteurs des glucocorticoïdes ou rétinoïques (Jonat, 1990; Yang-Yen, 1990; Diamond, 1990).

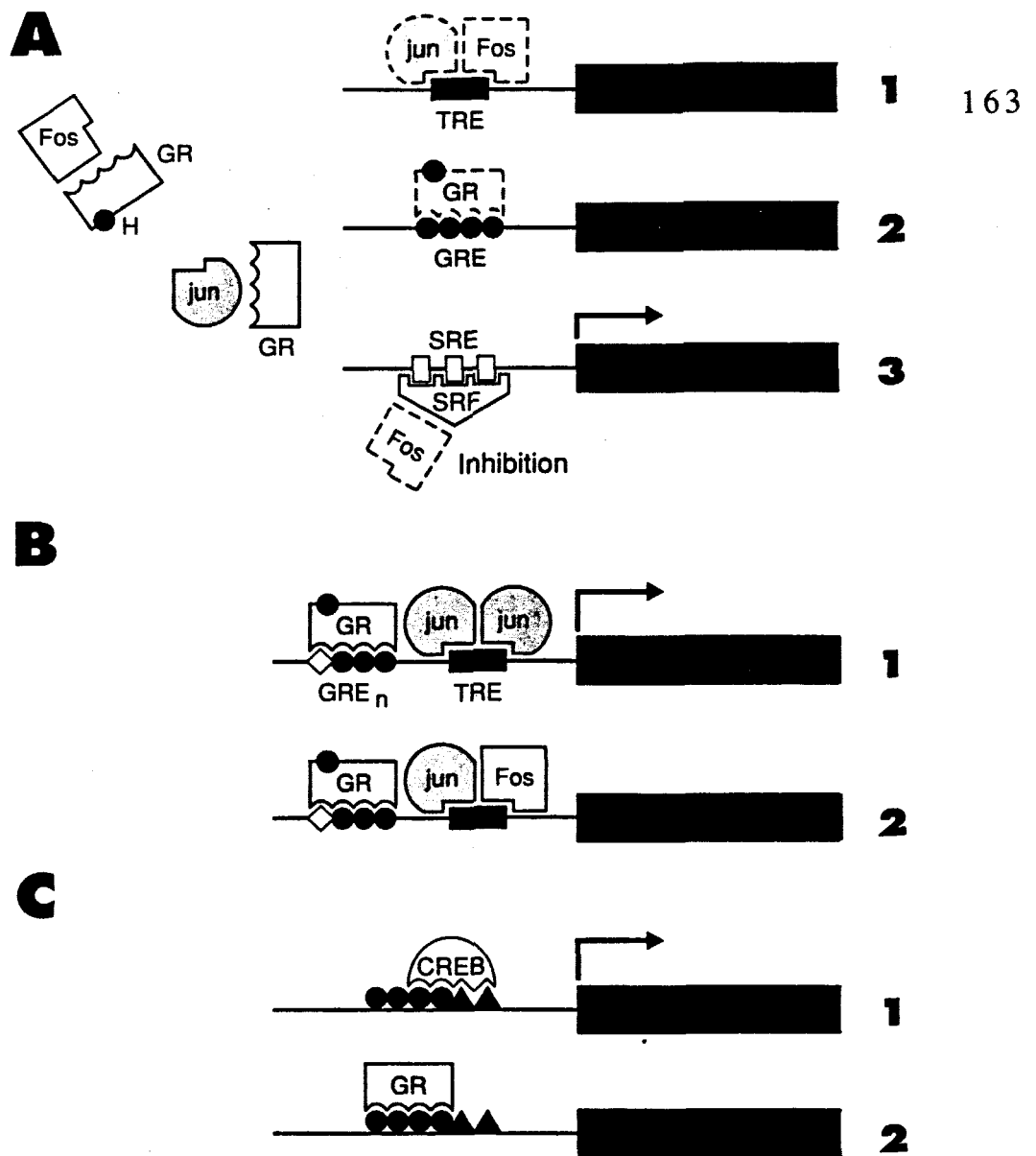


Figure 73. Schéma représentant les trois principaux mécanismes qui sous-tendent la régulation négative de la transcription de gènes par les glucocorticoïdes (d'après Médecine-Sciences, 1990).

TRE : "TPA responsive element", site de fixation du complexe AP-1; GRE : "glucocorticoïdes responsive element", site de fixation du récepteur des glucocorticoïdes (GR); GRE_n GRE négatif; SRE : "serum responsive element", site de fixation du facteur protéique SRF ; CRE : "AMPC responsive element", site de fixation du facteur protéique CREB; H : Hormones glucocorticoïdes.

Les flèches partant du début du gène indiquent l'activité transcriptionnelle.

A. La formation des complexes entre GR et Fos ou Jun rend ces trois protéines indisponibles pour exercer leurs effets biologiques : stimulation transcriptionnelle des gènes à TRE par le complexe Jun-Fos (1), des gènes à GRE par le GR (2), inhibition des gènes à SRE par Fos (3). En pointillé est représenté l'agencement des facteurs lorsqu'ils ne sont pas complexés.

B. L'interaction au niveau d'un GRE_n dégénéré et d'un TRE proche de GR et des complexes AP-1 dépend de la nature de ces derniers : activation s'il s'agit d'un homodimère Jun-Jun (1), inhibition dans le cas d'un hétérodimère Jun-Fos (2).

C. La fixation de l'activateur CREB et de GR étant mutuellement exclusive, les hormones glucocorticoïdes inhibent la transcription du gène en provoquant le déplacement de CREB remplacé par GR (2).

Il a été montré en outre que la répression du gène de la sous-unité alpha de l'hormone glycoprotéine humaine par les glucocorticoïdes était indépendante de la liaison au récepteur à son élément de réponse (Krishna et coll., 1991) et qu'elle impliquait probablement une interaction protéine-protéine entre le récepteur des glucocorticoïdes et la protéine CREB, la protéine leucine zipper se liant à son élément de réponse à l'AMPc (Habener, 1990).

Le deuxième mécanisme serait basé sur l'existence d'un élément de réponse des glucocorticoïdes négatif en amont d'un certain nombre de gènes comme ceux de la proliférine (Diamond, 1990), de la proopiomélanocortine (Drouin, 1989) ou encore de la prolactine bovine (Sakai, 1988).

Le troisième mécanisme mettrait en jeu le chevauchement entre un GRE et CRE, la fixation du récepteur et de l'activateur transcriptionnel comme par exemple la protéine CREB étant mutuellement exclusive. Ce mécanisme expliquerait l'antagonisme entre la vitamine D et le complexe Jun-Fos pour l'activation du gène de l'ostéocalcine (Akerblom, 1988).

Si l'inhibition par la dexaméthasone de l'expression de la TG de tissu induite par l'acide rétinoïque est transcriptionnelle, lequel de ces trois mécanismes principaux pourrait sous-tendre cet effet ?

Il est certain que la connaissance de la séquence située en amont du gène de la TG pourrait répondre en partie à cette question. P.J.A. Davies et son équipe sont actuellement en train d'analyser au niveau de l'ADN génomique cette région où existeraient peut-être des éléments de réponse de type GRE, RARE, CRE ou encore TRE (ou site AP1) (figures 9 et 73).

Toutefois, on peut spéculer en faveur de l'un ou l'autre mécanisme à partir d'arguments indirects, ce qui peut orienter les recherches dans telle ou telle direction dans l'analyse directe des séquences incluant le promoteur.

Ainsi, dans notre étude, nous avons observé que cette inhibition était moins marquée en présence d'AMPc ce qui peut constituer un élément en faveur du mécanisme C impliquant le chevauchement d'un élément de réponse de type GRE négatif et de type CRE.

En conclusion, plusieurs arguments expérimentaux indirects et certaines données de la littérature peuvent nous faire penser que l'action répressive de la dexaméthasone sur l'expression de la TG de tissu induite par l'acide rétinoïque dans les cellules HL-60 est située au niveau transcriptionnel ce qui justifie la poursuite des investigations pour en apporter la preuve directe.

Par la suite, nous avons trouvé intéressant de savoir si cette observation était reproduite dans d'autres lignées cellulaires. La lignée cellulaire de neuroblastome humain SK-N-SH semble se comporter comme la lignée cellulaire HL-60. Par contre, la lignée de cellules d'érythroleucémie humaine HEL ne présente pas cet effet de la dexaméthasone bien qu'elle soit proche de la lignée cellulaire HL-60 puisqu'elles sont toutes les deux issues du tissu hématopoïétique. Cette absence de réponse à la dexaméthasone dans les cellules HEL a été constatée au niveau de l'activité, de la protéine et de l'ARNm de la TG de tissu. Au niveau protéique, une protéine de 80 Kd reconnue par un anticorps monoclonal anti-TG de tissu a été détectée dans les cellules HEL comme ceci avait été rapporté (Suedhoff et coll., 1990).

Au niveau de l'ARNm, nous avons détecté d'abord un transcrit approximativement de 4.7 kb dans les cellules HEL, la taille ayant été estimée à

partir des témoins de poids moléculaire plus ou moins fiables, les ARN ribosomiaux (ARNr) 28S (4.7 kb) et 18S (2.1 kb). Suedhoff et coll. (1990) ont également détecté dans les cellules HEL deux transcrits, un transcrit mineur approximativement de 4.0 kb qui peut correspondre à notre transcrit de 4.7 kb. Il faut signaler que notre transcrit majeur 4.7 kb est situé au niveau du témoin 28S comme le transcrit détecté dans les macrophages péritonéaux de souris (Chiocca et coll., 1988). Suite au clonage et au séquençage de l'ADNc de la TG de tissu humain, un seul transcrit doit être normalement détecté et doit présenter une taille de 3.6 à 3.7 kb (Gentile et coll., 1991). Actuellement, ces expériences sont en train d'être reproduites mais en utilisant une échelle de poids moléculaire beaucoup plus fiable que les témoins 18S et 28S pour mesurer la taille des transcrits.

A côté du transcrit approximativement de 4.0 kb, d'autres transcrits ont également été détectés. Suedhoff et coll. (1990) ont détecté un transcrit majeur de 7.4 kb que nous n'avons pas trouvé dans le clone de cellules HEL disponible au laboratoire. Par contre, nous avons détecté un deuxième transcrit minoritaire et de taille inférieure 2.4 kb, situé légèrement au dessus du témoin 18S (2.1 kb). Ces différents transcrits de taille supérieure ou inférieure, comme ceci a déjà été évoqué précédemment, peuvent être en relation avec des anomalies de la transcription, de l'épissage ou de la longueur de la queue poly(A) qui peuvent en outre subir des variations d'un sous-clone de cellules HEL à l'autre. Ces auteurs et nous-même avons utilisé comme sondes spécifiques, des fragments issus, après digestion enzymatique, de l'ADNc de la TG de tissu humaine cloné dans un vecteur de type pBluescript SK (-) qui nous a été généreusement offert par le Docteur P. Davies (Houston, Texas). Pour l'hybridation, Suedhoff et coll. se sont servis d'un fragment de 2.2 kb de la région codante à partir d'un insert de 3.5 kb correspondante à la quasi-totalité du gène. Dans notre laboratoire, nous

avons utilisé la totalité de l'insert cloné dans le vecteur c'est à dire un fragment de la région codante de 1.0 kb.

Pourquoi les cellules HEL ne répondent-elles pas à la dexaméthasone ? La première raison venant à l'esprit est l'absence de récepteur des glucocorticoïdes dans cette lignée cellulaire. Nous avons donc voulu vérifier ce point.

Les cellules HEL, comme les cellules HL-60, possèdent le récepteur des glucocorticoïdes. Le récepteur est détecté au niveau protéique par le même anticorps monoclonal anti-récepteur décrit précédemment et présente une taille de 94 Kd, correspondant à la taille déjà publiée de ce récepteur (Govindan et coll., 1985). Au niveau ARNm, deux transcrits approximativement de 5.0 kb et 2.1 kb ont été visualisés en *northern blot* utilisant une sonde ADNc spécifique. Le transcrit 5.0 kb peut correspondre au transcrit de 5.4 kb détecté dans les cellules HL-60. Comme dans les cellules HL-60, aucun transcrit approximativement de 7.0 kb retrouvé dans plusieurs lignées cellulaires humaines (Govindan et coll., 1985) n'a été détecté dans les cellules HEL. Aussi, il semblerait que ce transcrit de 7.0 kb soit absent dans les lignées cellulaires de type hématopoïétique où, par contre, un transcrit approximativement de 5.0 kb à 5.4 kb semble être présent dans tous les cas. Un transcrit de taille plus faible (2.1 kb) a déjà été décrit dans d'autres lignées cellulaires. De la même façon, ce sont les ARNr 18S et 28S qui ont servi de poids moléculaire.

L'absence de réponse à la dexaméthasone dans les cellules HEL n'est donc pas liée à l'absence de récepteur des glucocorticoïdes. Mais celui-ci est-il fonctionnel ? C'est ce que nous tenterons d'élucider dans des expériences futures présentées maintenant dans les perspectives.

Quelles sont donc les perspectives à envisager maintenant suite aux résultats précédents ?

Ce sujet concernant la répression différentielle par les glucocorticoïdes de l'expression de la TG de tissu induite par l'acide rétinoïque dans les cellules hématopoïétiques nous amène à emprunter deux voies parallèles.

La première s'orientera vers la compréhension du mécanisme d'action qui sous-tend cette répression par les glucocorticoïdes dans les cellules HL-60.

La deuxième tentera de répondre à la question relative au caractère différentiel de la réponse dans des lignées cellulaires différentes, dans le cas présent, les cellules HL-60 et HEL.

Dans un premier temps, il est indispensable d'examiner si l'inhibition apparaît au niveau de l'ARNm. Si c'est le cas, il faudra vérifier si cet effet des glucocorticoïdes au niveau de l'ARNm d'une part implique ou non de protéines intermédiaires en utilisant un inhibiteur de la synthèse protéique, la cycloheximide d'autre part diminue ou non la stabilité de l'ARNm de la TG de tissu en mesurant sa demi-vie en présence d'un inhibiteur de synthèse d'ARN, l'actinomycine D. Mais seules les expériences de "run-on" c'est à dire l'étude de la transcription du gène de la TG de tissu à partir de noyaux isolés de cellules non traitées et traitées par la dexaméthasone permettront d'apporter la preuve directe du caractère transcriptionnel ou non de la réponse. Si cette régulation est vraiment transcriptionnelle, la connaissance des séquences incluant le promoteur du gène de la TG de tissu apportera sans nul doute des informations essentielles qui permettront d'avancer un peu plus dans la compréhension du mécanisme qui sous-tend l'action répressive des glucocorticoïdes au moins sur cette réponse cellulaire. Dans un récent rapport, il a déjà été signalé que le gène de la TG de

tissu existait en seule copie (Gentile et coll., 1991). Aussi, il est fort probable que tout le mystère qui entourait jusqu'à maintenant ces régions promotrices sera dévoilé dans un avenir très proche.

Enfin, on ne peut pas éliminer la possibilité d'un contrôle post-transcriptionnel ou même post-translationnel. Toutefois, cette dernière possibilité semble peu probable puisque la TG de tissu ne subit pas de modifications post-translationnelles pour être active (Gentile et coll., 1991).

Concernant la réponse différentielle aux glucocorticoïdes observée dans les cellules HL-60 et les cellules HEL, il faut vérifier le caractère fonctionnel du récepteur des glucocorticoïdes détecté dans les cellules HEL. Aussi, sont en cours des expériences visant à démontrer la capacité ou non du récepteur endogène des cellules HEL à activer la transcription d'un gène reporter de type CAT couplé à une séquence de type MMTV comportant l'élément de réponse GRE et incluse dans un vecteur d'expression transfecté par électroporation. Si le récepteur est fonctionnel, il faudra poursuivre les investigations par exemple en comparant les séquences de la région promotrice situées en amont du gène de la TG de tissu dans les deux lignées cellulaires HL-60 et HEL ou encore rechercher et analyser les complexes de transcription pouvant être le siège de variations d'une lignée cellulaire à l'autre. Secondairement, on peut mesurer l'activité de liaison entre un glucocorticoïde marqué et le récepteur d'une part, entre ce même récepteur et une séquence de type GRE d'autre part.

Enfin, la TG de tissu est un enzyme qui semble jouer un rôle fondamental dans la mort cellulaire programmée ou apoptose et a même été considérée comme un marqueur de ce phénomène biologique (Fésus et coll., 1987, Piacentini et coll., 1991; Fesus et coll., 1991). En outre, les cellules HL-60, une

fois différenciées de façon terminale entament leur programme de mort cellulaire 6 jours après le traitement par l'acide rétinoïque (Martin et coll., 1990). Aussi, il nous a semblé intéressant de savoir si les glucocorticoïdes étaient capables de réprimer l'apoptose déclenchée après la différenciation terminale des cellules HL-60 induite par l'acide rétinoïque. Les réponses envisagées sont actuellement au stade de mise au point et sont représentées par la mesure de l'index apoptotique, l'étude par immunofluorescence utilisant l'anticorps monoclonal anti-TG de tissu de l'induction de la TG de tissu prédominante dans les corps apoptotiques et la mise en évidence de la fragmentation de l'ADN, événement précoce de la mort cellulaire programmée.

CONCLUSION

Les rétinoïdes sont des substances originales et très prometteuses sur le plan thérapeutique et notamment dans le domaine de la chimiothérapie anticancéreuse, originales par leur mécanisme d'action et prometteuses car elles constituent le premier exemple de traitement différenciateur ayant réussi avec succès dans une pathologie de ce type.

Dans la recherche et le développement de tels produits, il est en outre fondamental de bien connaître le mécanisme d'action. Pour cela, il faut disposer de modèles permettant d'explorer celui-ci au niveau cellulaire et moléculaire. La différenciation cellulaire et l'expression de la TG de tissu dans des cellules de leucémie aigüe myéloblastique et promyélocytaire humaine HL-60 sont les deux réponses qui nous ont permis d'atteindre partiellement ces objectifs.

Récemment, ont été clonés et séquencés les récepteurs de l'acide rétinoïque. Il était donc logique dans un premier temps de chercher s'ils étaient impliqués dans nos réponses cellulaires. La méthodologie anti-sens a été utilisée dans cette perspective. Le rôle de ces récepteurs n'a toutefois pas pu être démontré soit pour des raisons d'ordre méthodologique soit parce qu'ils sont en réalité très peu ou pas du tout impliqués dans ces effets induits par l'acide rétinoïque. Toutefois, les investigations doivent être poursuivies en utilisant des vecteurs d'expression anti-sens ou en changeant radicalement de méthodologie.

Nous nous sommes demandés ensuite si l'acide rétinoïque et ses dérivés de la famille des acides rétinobenzoïques de type chalcone exerçaient leurs effets selon un mécanisme d'action identique. Nous avons ainsi observé alors que les niveaux d'expression de la TG de tissu induite par l'acide rétinoïque et les acides rétinobenzoïques étaient très différents, ces derniers n'induisant que très peu cette réponse. Nous avons ensuite constaté que cette différence ne semblait pas

ou très peu impliquer les récepteurs de l'acide rétinoïque. C'est alors que nous nous sommes orientés vers d'autres voies de transduction n'impliquant par ces récepteurs autrement dit celles correspondant aux systèmes AMPc/protéine kinase A et diacylglycérol/protéine kinase C. L'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques nous ont permis de montrer que cette différence de niveau d'induction de la TG de tissu entre l'acide rétinoïque et les acides rétinoïques semblait impliquer la protéine kinase C dont l'activité serait induite par le premier mais pas par les seconds. Ces résultats indiquaient une différence de mécanisme d'action entre l'acide rétinoïque et les acides rétinoïques au moins dans l'induction de cet enzyme. D'autres expériences sont à envisager pour établir avec certitude le rôle de la protéine kinase C dans l'expression de la TG de tissu et surtout pour préciser le niveau auquel interagissent l'acide rétinoïque et la protéine kinase C, un processus de rétinoïlation de l'enzyme ayant été suggéré.

Enfin, les effets d'autres molécules de la famille des stéroïdes et plus précisément des glucocorticoïdes ont été étudiés sur nos réponses cellulaires, seules ou en combinaison avec l'acide rétinoïque. Une répression par les glucocorticoïdes de l'expression de la TG de tissu induite par l'acide rétinoïque a été observée alors dans les cellules HL-60 au niveau de l'activité et au niveau de la protéine. La précocité de cet effet, des concentrations actives très faibles et l'implication du récepteur des glucocorticoïdes sont autant d'arguments supplémentaires en faveur de la nature transcriptionnelle de cet effet répresseur des glucocorticoïdes. Après avoir vérifié que la réponse existe aussi au niveau de l'ARNm, qu'une protéine intermédiaire n'est pas impliquée dans cette réponse et que la stabilité de l'ARNm n'est pas non plus affectée, seules les expériences de transcription à partir de noyaux isolés de cellules traitées ou non

par la dexaméthasone apporteront la preuve directe du caractère transcriptionnel de cet effet inhibiteur.

Dans une autre lignée de cellules hématopoiétiques, la lignée de cellules d'érythroleucémie humaine HEL, l'inhibition par les glucocorticoïdes de l'expression du gène de la TG de tissu n'a pas été observée bien que le récepteur des glucocorticoïdes y soit présent. Pour explorer cette différence entre les cellules HL-60 et HEL, il faut d'abord démontrer le caractère fonctionnel ou non du récepteur des glucocorticoïdes présent dans les cellules HEL avant de rechercher une origine transcriptionnelle à cette réponse différentielle des deux types cellulaires.

D'une façon plus générale, l'interaction entre glucocorticoïdes et rétinoïdes entre dans le cadre des phénomènes de régulation pouvant exister en biologie. Cette interaction peut également être prise en compte lors de traitements dans le cadre général des interactions médicamenteuses.

Un certain nombre de résultats ont été présentés et des perspectives énoncées toujours dans le but de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'acide rétinoïque et d'une façon plus large des rétinoïdes, ce qui constitue une base essentielle pour la recherche et le développement des ces substances.

Ces molécules soulèvent actuellement un intérêt considérable depuis qu'elles ont été utilisées avec succès dans le traitement d'une leucémie aigüe, la leucémie à promyélocytes, ces produits étant donc potentiellement anti-cancéreux. En outre, à côté des laboratoires de recherche fondamentale, certains laboratoires pharmaceutiques s'intéressent toujours à ces produits et d'autres de plus en plus nombreux commencent à s'y intéresser. Et ceci est un signe très encourageant quant à l'avenir de ces molécules.

APPENDICE TECHNIQUE

1.Culture cellulaire.

Les cellules de leucémie humaine à myéloblastes et promyélocytes HL-60 et d'érythroleucémie HEL sont cultivées en suspension. Elles sont entretenues dans du milieu RPMI 1640 contenant 15 % de sérum de veau foetal décomplémenté (30 minutes à 56°C) , de la L-glutamine 4 mM , de la pénicilline 100 UI/ml et de la streptomycine 100 µg/ml en atmosphère humide contenant 5 % (v/v) de CO₂ à 37°C. Le milieu doit être renouvelé tous les 2 jours dès que les cellules atteignent 10⁶ cellules/ml (confluence maximale).

Les cellules nerveuses SK-N-SH sont des cellules de neuroblastome humain en monocouche. Elles sont maintenues dans du milieu MEM contenant 10 % de sérum de veau foetal, de la L-glutamine 4 mM, de la pénicilline 100 UI/ml, de la streptomycine 100 µg/ml et des acides aminés non essentiels 1 % en atmosphère humide contenant 5 % (v/v) de CO₂ à 37° C. Le milieu doit également être renouvelé tous les deux jours.

2. Tests de différenciation cellulaire et de toxicité.

2.1 Différenciation.

les cellules HL-60.

La différenciation morphologique des cellules HL-60 est observée sur une préparation cytocentrifugée à 600 tours/min (cytopspin Shandon^(R)) pendant 10 minutes puis colorée : May Grünwald pur : 2 minutes, May Grünwald dilué au 1/2 : 3 minutes, Giemsa dilué au 1/10 : 10 minutes, H₂O : 1 minute.

La différenciation fonctionnelle est évaluée selon le test de réduction du NBT (nitrobleu de tétrazolium). Les cellules différenciées apparaissent avec un noyau déformé et contiennent des grains ou dépôts noirs qui correspondent au nitrobleu de tétrazolium réduit devenu insoluble.

Pour le test de différenciation, les cellules HL-60 ($2 \cdot 10^5$ cellules/ml) sont traitées avec des concentrations variables de rétinoïdes pendant cinq jours dans du milieu défini sans sérum de veau foetal (insuline 5 µg/ml, de la transferrine 5 µg/ml et du sélénium 5 ng/ml). Si le rétinoïde est utilisé à la concentration de 1 µM, le sérum de veau foetal peut être utilisé sans qu'il y ait d'interférence avec les protéines contenues dans le sérum (sérumalbumine, SRBP "serum retinol binding protein").

Pour le test de réduction du NBT, 10^6 cellules sont incubées à 37° C pendant 20 minutes avec un volume égal d'une solution saline contenant 400 ng d'ester de phorbol (TPA) (Sigma^(R)) fraîchement dilué et 0,5 % de NBT. Puis elles subissent une cytocentrifugation. Les lames sont fixées à l'air sec puis colorées au May Grünwald-Giemsa. Le pourcentage de différenciation est déterminé par comptage direct au microscope du nombre de cellules NBT-positives sur 200 cellules minimum.

les cellules SK-N-SH.

Les cellules SK-N-SH ($10^4/\text{cm}^2$) sont incubées avec les rétinoïdes pendant quatre jours avec du milieu en présence de sérum de veau foetal 5 %. La différenciation morphologique est observée à partir d'une préparation colorée au violet cristal.

2.2 Toxicité.

Dans les cellules HL-60 et SK-N-SH, la toxicité est appréciée respectivement par le test d'exclusion au bleu trypan après cinq jours et par la perte complète d'adhérence associée au contrôle de l'exclusion du bleu trypan quatre jours après l'addition des rétinoïdes.

3. Dosage de l'activité de la TG de tissu.

Principe

La réaction est basée sur l'incorporation d'un substrat radioactif aminé, la putrescine tritiée (25-35 mCi/ml, Amersham^(R)) dans une protéine "accepteur", la caséine (Sigma^(R)), la précipitation sur filtre de l'isotope lié à la protéine par l'acide trichloracétique, l'élimination de la radioactivité libre par des lavages successifs et par comptage de la radioactivité restante sur le filtre correspondante à la protéine précipitée.

Incubation

Les cellules HL-60 (5.10^5 cellules/ml) et les cellules SK-N-SH (5.10^4 cellules/ml) sont traitées pendant 48 heures avec des concentrations variables de rétinoïdes, respectivement dans des flacons à six puits, chaque puit contenant 5 ml de milieu défini constitué de RPMI 1640 auquel on ajoute de l'insuline 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, de la

transferrine 5 $\mu\text{g/ml}$ et du sélénium 5 ng/ml et dans des boites de Pétri de 55 cm^2 contenant 10 ml de MEM avec 5% de sérum de veau foetal.

Récupération

Les cellules sont récupérées et centrifugées à 1200 tours/min pendant 10 minutes. Les cellules HL-60 sont lavées une fois et les cellules SK-N-SH trois fois avec du tampon TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl). Les cellules SK-N-SH sont récupérées par grattage. Les culots secs sont congelés à -20°C .

Dosage

Pendant la décongélation à température ambiante, 150 μl de solution de lyse TET (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100) sont ajoutés aux culots cellulaires. Une fois décongelées, les cellules sont transférées immédiatement dans une première série de tubes 1.5 ml dans la glace. Une centrifugation est réalisée à 4°C pendant 10 minutes à 16 000 tours/min. Après la récupération du surnageant et le transfert dans une seconde série de tubes 1.5 ml, 50 μl du lysat cellulaire sont récupérés après homogénéisation dans une troisième série de tubes 1.5 ml. Les échantillons sont préparés en duplicate. Le reste est congelé à -20°C pour le dosage des protéines. Faire 2 blancs au début et à la fin de la série en ajoutant 50 μl de solution de lyse ou de mélange réactif en présence d'un chélateur de calcium comme l'EDTA 100mM (empêchant la réaction qui nécessite la présence de calcium). Sont ajoutés ensuite aux échantillons, 50 μl de mélange réactionnel (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM CaCl_2 , 15 mM β -mercaptoéthanol, 2 mg N,N'-diméthylcaséine/ml, 2 μCi ^3H -putrescine, 0.1 mM putrescine et 0,2 mg de protéine du lysat cellulaire dans un volume final de 100 μl). La réaction se fait à 30°C pendant 20 minutes. La réaction est ensuite stoppée dans la glace. Un volume de 80 μl du mélange réactionnel est déposé

sur un filtre de papier Whatman 3 MM que l'on plonge aussitôt dans un bain froid d'acide trichloracétique à 10 % sous agitation douce pendant 20 minutes.

Le complexe ^3H -putrescine-N, N'-diméthylcaséine précipite sur le papier filtre. La ^3H -putrescine libre est éliminée par lavages successifs, 3 fois dans l'acide trichloracétique froid à 5% pendant 5 minutes, 1 fois dans un mélange éthanol/acétone froid (v/v) pendant 5 minutes, 1 fois dans de l'acétone froid pendant 5 minutes. Les filtres sont séchés à température ambiante puis comptés après avoir ajouté 5 ml de liquide à scintillation.

Calcul

Les valeurs sont mesurées en soustrayant les valeurs de base obtenues à partir du mélange réactionnel correspondant au blanc. Une unité d'enzyme est définie comme la quantité d'enzyme liant 1 pmol de putrescine à la N,N'-diméthylcaséine/min/mg de protéine présente dans le lysat cellulaire.

$$\text{activité (pmol/min/mg)} = \frac{\text{cpm} - \text{cpm blanc}}{r \times 2220 \times AS \times T \times Q}$$

cpm = nombre de cpm obtenu à partir de l'échantillon

cpm blanc = nombre de cpm obtenu à partir du blanc

r = rendement de la putrescine tritiée

2220 dpm = 1 nCi

AS = activité spécifique en Ci/mmol (nCi/pmol)

T = temps réactionnel en minutes

Q = quantité de protéine déposée sur le filtre en mg

5. Technique du "northern blot".

5.1 Préparation de la sonde ADNc.

Matériel

Les vecteurs portant l'insert qui servira de sonde sont aliquotés et conservés à -20°C

Milieu LB : 50g Biotrypcase (Biomérieux)
25g extrait de levure (Biomérieux)
25g de NaCl
1ml NaOHN 10N
dans 5 ml H₂O stérile

TAE : Tris 48.4 g
Acide acétique glacial 11,42 ml
EDTA 0.5 M, pH8 20 ml
pH 8.3-8.4
H₂O qsp 1000 ml

GTE : Glucose 50 mM
Tris 25mM pH8
EDTA 10 mM

Transformation

Les bactéries HB101 (confluence correspondant à une densité optique comprise entre 0.3 et 0.4) compétentes sont conservées à -80°C.

Après décongélation à 0°C pendant 1 heure, elles sont transférées dans un tube en verre autoclavé.

80 ng puis 200 ng de vecteurs sont ajoutés aux bactéries.

Après une incubation à 0°C pendant 20 minutes, 5 chocs thermiques sont réalisés pendant 30 minutes alternativement à 37 °C et 0°C puis 1.4 ml de milieu XTY sont ajoutés.

Après une incubation de 45 minutes à 37°C, 200 µl de suspension bactérienne sont étalés sur une boîte de Pétri en présence d'ampicilline et milieu LB. L'incubation a lieu à 37°C jusqu'au lendemain.

Préculture

125 µl d'ampicilline (100 mg/ml) sont ajoutés dans 100 ml de milieu LB (flacon de 250 ml) puis 400 µl de la suspension de bactéries transformées et l'incubation est réalisée à 37°C sous agitation.

Culture

500 µl d'ampicilline (100mg/ml) sont ajoutés dans 400 ml de milieu LB (erlen de 2l) puis 2 ml de milieu de préculture. L'incubation a lieu ensuite à 37°C sous agitation. Après 4 heures de culture, la densité optique est mesurée à 580 nm pour évaluer la confluence. Ajouter 2 ml de chloramphénicol (34 mg/ml) puis laisser incuber à 37°C sous agitation pendant une nuit.

Extraction-Purification.

Après centrifugation 20 minutes à 3000 tours à 4°C, le culot bactérien est récupéré, placé dans la glace.

Le culot est repris dans 10 ml de solution GTE, homogénéisé puis transféré dans un flacon 250 ml.

La solution GTE est de nouveau ajoutée en présence de lysozyme.

Incuber 30 minutes à 0°C.

Ajouter 40 ml d'une solution NaOH/SDS 1%.

Incuber 10 minutes à 0°C.

Ajouter 30 ml d'une solution AcOK 3M, pH=4.8.

Incuber 10 minutes à 0°C.

Centrifuger pendant 45 minutes, 12000 tours /minute, à 4°C.

Filtrer sur laine de verre du surnageant.

Récupérer le surnageant, mesurer le volume.

Ajouter 0.6 volume d'isopropanol.

Incuber pendant 15 minutes à température ambiante.

Centrifuger à 12000 tours, 30 minutes à 15°C.

Laver le culot avec de l'éthanol 70 % à température ambiante.

Centrifuger pendant 20 minute, à 12000 tours à 15 °C.

Sécher le culot.

Contrôle de la préparation plasmidique.

Prendre le culot dans 0.3 ml d'eau stérile.

Electrophorèse en gel d'agarose 1 % et dépôt d'un échantillon (2 µl) pur, dilué au 1/10 et au 1/50 pou déterminer la bonne concentration.

Préparation de l'insert utilisé comme sonde.

Digestion enzymatique pour libérer l'insert du vecteur.

ex: pour contrôle analytique après digestion par EcoRI

Echantillon	2µl
Eau	14 µl
Tampon H (dilué au 1/10)	2µl
EcoRI (dilué au 1/10)	2µl

incubation pendant 2 heures à 37°C suivi d'une électrophorèse sur gel d'agarose 1 %

ex : dans un but préparatif

Echantillon	30 µl
Eau	30 µl
Tampon H (dilué au 1/10)	7.5 µl
EcoRI (dilué au 1/10)	2.5 µl

incubation à 37°C pendant 2 heures

EcoRI (dilué au 1/10)	2.5 µl
-----------------------	--------

incubation à 37°C pendant 2 heures

EcoRI (dilué au 1/10)	2.5 µl
-----------------------	--------

incubation à 37°C pendant 2 heures

puis électrophorèse analytique (60 volts) agarose 1 %

5 µl échantillon/5 µl eau/2µl bleu de bromophénol

5µl témoin (1 kb) /5 µl eau/2µl bleu de bromophénol

puis électrophorèse préparative (40 volts) agarose 1 % pendant 10 heures

75 µl échantillon/15 µl bleu de bromophénol

Electro-élution de l'insert

matériel : appareil "Biotrap" (Schleicher et Schull)

La bande préparative correspondant à l'insert est découpée sous ultra-violet puis déposée dans la chambre d'élution en présence de tampon TAEx1 à 0°C.

L'élution s'effectue à 140 volts pendant 4 heures puis une inversion de la polarité pendant 20 secondes à 200 volts. L'éluat est ensuite prélevé et contrôlé en électrophorèse sur gel d'agarose 1 %.

L'insert est ensuite stocké à - 20°C.

5.2 - Extraction de l'ARN

La principale source d'échec dans toute tentative d'extraction de l'ARN est la contamination par les ribonucléases. Les RNases sont des enzymes très stables qui n'exigent pas de co-facteurs pour agir. Pour éviter toute contamination par des ribonucléases d'origine externe, les précautions suivantes doivent être prises

- Les mains étant une source importante de ribonucléases, le manipulateur doit porter des gants stériles à usage unique.

- Tous les produits chimiques utilisés pour l'extraction de l'ARN doivent être exempts de ribonucléases et prélevés stérilement.
- Les solutions seront filtrées (0,22 µm) avec un matériel stérile, sauf le SDS (dodécyl sulfate de sodium).
- L'eau et toutes les solutions tampons doivent être traitées avec le diéthylpyrocarbonate (DEPC) 0,1 % qui est un puissant inhibiteur de RNase.

Il est nécessaire d'autoclaver toute solution ainsi traitée pour éliminer les traces de DEPC susceptibles d'inactiver le RNA par carboxyméthylation. Le DEPC est utilisé seulement lorsque l'ARN n'est pas utilisé pour des réactions enzymatiques. En outre, les tampons contenant du Tris ne devront pas être traités de cette manière car le DEPC très instable en présence de Tris se décomposerait en éthanol et dioxyde de carbone.

Il en est de même pour le SDS qui ne peut pas être autoclavé.

N.B. : Le DEPC doit être manipulé sous une hotte car il est cancérigène.

- Les récipients en verre sont mis à l'étuve à 180° C pendant plusieurs heures. Les récipients en plastique peuvent être rincés avec du chloroforme qui inactive les ribonucléases.
- On travaillera au maximum dans la glace.

Les techniques d'extraction de l'ARN.

Technique d'extraction au chlorure de césium

- Après centrifugation de la suspension cellulaire à 1200 tours/min pendant 10 minutes et 3 lavages du culot avec du tampon PBS stérile, pH 7,5 (NaCl 130 mM, KH₂ PO₄ 6,4 M, Na₂ HPO₄ 6,4 mM, EDTA 1,8 mM) à 4°C pendant 5 minutes, le culot doit être repris dans 3,4 ml de tampon de lyse isothiocyanate de guanidium 4 M (isothiocyanate de guanidium 4 M, citrate trisodique 5 mM, β-mercaptoéthanol 10 mM, laurylsarcosine 0,5 %).
- Homogénéiser et laisser agir 10 minutes.
- Verser le lysat obtenu dans un homogénéiseur de Dounce et ajouter 1,36 g de chlorure de césium.
- Homogénéiser le lysat.
Passer à plusieurs reprises (5fois) l'homogénat fluide au travers d'une fine aiguille jusqu'à l'obtention de gouttelettes, pour casser l'ADN.
- Déposer dans des tubes Beckman pour rotor SW60, 1 ml de solution de chlorure de césium 5,7 M-EDTA 0,1 M, pH 7,5.
- Couler doucement au dessus 3 ml d'homogénat en respectant l'interface.
- Ultracentrifuger à 41 000 tours/min pendant 12 heures à 20° C. On réalise un gradient de densité, ce qui permet de séparer les protéines, l'ADN et l'ARN. Le culot contient l'ARN que l'on veut extraire.

Il est alors récupéré de la façon suivante :

- clampage du tube
 - élimination du surnageant par retournement
 - coupure du tube maintenu retourné
 - séchage du culot en maintenant le tube retourné sur papier aluminium stérile pendant une heure.
- Reprendre le culot par 250 µl de tampon Tris 10 mM, EDTA 1 mM, SDS 1 %. Bien homogénéiser. Laisser 15 minutes à la température ambiante pour bien dissoudre le culot dans le tampon.
- Récupérer dans une première série de tubes à centrifuger résistant aux solvants organiques en polypropylène (Falcon). Renouveler trois fois l'opération pour obtenir un volume final de 1 ml et bien récupérer tout l'ARN.
- réaliser deux extractions au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (1.5 ml) (vol 100/96/4) puis une extraction chloroforme/alcool isoamylique
- Après avoir récupéré la phase aqueuse supérieure, ajouter 2,5 volume d'éthanol refroidi à - 20° C et 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2.
- Congeler à - 70° C pendant 2 heures minimum pour précipiter l'ARN.

Technique à la protéinase K/Phénol-Chloroforme

- Ajouter 500 µl de solution de lyse (NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Tris 1 mM, pH 8,0, NP40 0,65%) au culot cellulaire encore congelé.
- Dès la décongélation, remettre en suspension et transférer dans un tube

1.5 ml dans la glace.

- Laisser 5 minutes et centrifuger pendant 2 minutes à 10 000 tours/min à 4°C.

- Récupérer le surnageant dans un tube 1.5 ml (non placé dans la glace)

Ajouter 1,5 µl d'EDTA 500 mM, pH 8,0 (1,5 mM) 37,5 µl de SDS 10 % (0,8 %) 11,25 µl de protéinase K (225 µg/ml)

Bien mélanger et incuber 10 minutes à 37°C.

- Dans la glace, ajouter 800 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (100/96/4).

Agiter pendant 1 minute par retournement.

Centrifuger 6 minutes à 10 000 tours/min.

- Transférer le surnageant dans un Eppendorf

Ajouter 700 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamylique.

Agiter 1 minute par retournement et centrifuger 2 minutes à 10 000 tours/min.

- Au surnageant, ajouter 2,5 volume d'éthanol refroidi à - 20° C et 0.1 volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2.

- Congeler à - 70° C.

Détermination de la concentration en ARN.

- Centrifuger à 11 000 tours/min pendant 10 minutes à 4° C.

- Eliminer le surnageant et laisser évaporer.

- Reprendre le culot par 100 µl d'eau traitée au DEPC. Bien homogénéiser.

- Prélever un échantillon de 10 µl de cette solution et le déposer dans 990 µl d'eau

stérile pour mesurer l'absorbance à 260 et 280 nm.

- Aliquoter le reste de la solution en fractions correspondant à 40 µg de l'ARN. Les aliquotes seront conservés à - 80°C et repris auparavant par 2,5 volumes d'éthanol et 0,1 volume d'acétate de sodium.

La mesure de l'absorbance à 260 nm permet de déterminer la concentration en ARN (A 260). La mesure de l'absorbance à 280 nm permet de déterminer la concentration en protéines (A 280). Le rapport A260/A280 détermine la pureté de l'ARN. On considère que l'ARN est suffisamment pur lorsque ce rapport est compris entre 1,7 et 2,0.

5.3 - Electrophorèse en gel d'agarose en présence de formaldéhyde.

L'électrophorèse est pratiquée dans une cuve horizontale (Biorad) en présence d'un agent dénaturant : le formaldéhyde.

Tampons et solutions.

* Tampon MOPS 10 X pH 7,0

MOPS (morpholinopropanesulfonic acid) 0,4 M;

acétate de sodium 0,1 M, EDTA 10 mM, pH 7,5.

* Composition du gel

Agarose 1,2 %, tampon MOPS 1,1 X, formaldéhyde 6,6 %

(2,2 M) à partir d'une solution à 37% dans l'eau (12,3 M),

solution désionisée sur résine Bio-Rad AG 501 x 8.

* Tampon de migration

Tampon MOPS 1 X.

* Tampon de dénaturation de l'échantillon stocké à 4°C

formamide désionisé sur résine Bio-Rad AG 501 x 8,50 %,

formaldéhyde désionisé 2,4 M,

tampon MOPS 1 X.

* Tampon de bleu de bromophénol

Glycérol 50 % (alourdit l'échantillon)

EDTA 10 mM pH 8,0,

bleu de bromophénol 0,4 %

* Solution colorante (pour le gel)

Solution de bromure d'éthidium 10 mg/l dans le tampon SSC 10

X (citrate de sodium trisodique 2H₂O 0,3 M - NaCl 3 M, pH

7,0).

N.B. Le bromure d'éthidium étant cancérigène, il faut le manipuler sous une hotte avec gants et masque. De plus, après usage, il est conseillé de récupérer la solution dans un flacon spécial afin de la détruire .

Technique.

Travailler sous une hotte à cause du formaldéhyde et du formamide.

- Traiter la cuve à électrophorèse avec de la soude 1 M pendant 30 minutes puis rincer abondamment avec de l'eau stérile traitée au DEPC.
- Préparer le gel : faire bouillir le mélange agarose-tampon MOPS et n'ajouter le formaldéhyde désionisé qu'après refroidissement (60° C).
- Couler le gel et refouler les bulles en bas du gel avec un embout stérile. Laisser durcir 40 minutes avant d'enlever le peigne.
- Placer le gel dans la cuve contenant le tampon de migration.
- Les échantillons d'ARN aliquotés et stockés à - 80° C dans l'éthanol sont centrifugés à 10 000 tours/min pendant 10 minutes à 4°C.
Eliminer délicatement les surnageants et placer immédiatement les tubes contenant les culots dans la glace.
- Reprendre les culots par 20 µl de tampon de dénaturation froid. Après avoir remis les culots en suspension, les placer au bain-marie à 68°C pendant 5 minutes.
- Plonger immédiatement les tubes dans la glace.
- A chaque échantillon, ajouter 7 µl de solution de bleu de bromophénol.
- Déposer la totalité dans les puits. Laisser migrer dans la glace quelques heures à 50 volts, migration de la cathode vers l'anode.
- Démouler le gel et le laver 5 à 6 fois dans du tampon SCC 10 X sous agitation.
- Le gel destiné à la visualisation sous UV de l'ARN est placé dans la solution colorante 5 minutes sous agitation puis décoloré par du tampon SCC 10 X (renouveler le tampon plusieurs fois) pendant plusieurs heures.

5.4 Transfert.

Après une électrophorèse en gel d'agarose, les fragments d'ARN sont transférés par capillarité sur un support solide (nitrocellulose) à température ambiante.

- Découper une membrane (Gene screen plus Du Pont) à la taille du gel et la laver quelques minutes dans de l'eau stérile puis dans du tampon SSC 20 X.

- Préparer une feuille de papier Whatman 3 MM aux dimensions du gel et une autre plus grande qui servira de pont. Les tremper dans le tampon SSC 20 X.

- Sur une cuve contenant le tampon de transfert SSC 20 X, poser une plaque de verre stérile (support) puis le pont papier Whatman dont les deux extrémités trempent dans la cuve.

. Déposer le gel puis le filtre de nylon découpé aux dimensions du gel tout en évitant les bulles d'air.

. Ajouter sur le filtre la feuille de papier Whatman, une épaisseur de 10 cm de papier buvard, une plaque de verre et un poids (0,2 à 0,4 kg) afin de créer un courant d'absorption du tampon de bas en haut.

. Border le gel de parafilm de façon à obtenir un système étanche.

- Au bout de 2 heures, changer le papier buvard.

Le tampon entraîne l'ARN du gel vers le filtre de nylon par capillarité. Le transfert se fait pendant 8 à 10 heures. Récupérer le filtre et le placer entre deux feuilles de papier

5.5 - Marquage de la sonde par le système des amorces multiples.

Principe.

La technique repose sur l'utilisation d'hexanucléotides pour amorcer la synthèse d'ADN en de nombreux sites d'une sonde d'ADN dénaturé selon la méthode de Feinberg et Vogelstein. La synthèse est catalysée par le grand fragment d'ADN polymérase I (fragment de Klenow), en présence de désoxynucléotides triphosphates marqués par du phosphore³² (P^{32}). Cette méthode de marquage permet d'obtenir des sondes dont la spécificité est supérieure à 10^9 cpm/ g. L'utilisation d'une sonde nucléique marquée au P^{32} permet de détecter une très faible quantité d'ARN cible complémentaire (0,01 pg).

Marquage

Utilisation du kit Amersham "Multiprime DNA labelling system" dont la composition est la suivante :

- Solution 1 : multiprime buffer solution

Mélange de dATP, dGTP, TTP dans un tampon Tris-HCl pH 8,0, MgCl₂, β-mercaptoéthanol.

- Solution 2 : Primer solution

Hexanucléotides pris au hasard en solution dans l'eau.

- Solution 3 : Enzyme solution

Fragment de Klenow d'ADN polymérase I à une unité par microlitre dans du tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 6,5, β -mercaptoéthanol 10 mM, glycérol 50%.

Technique.

- Dans un tube 1.5 ml, introduire :

1 μ l de la solution contenant la sonde (25 ng)

27 μ l d'eau stérile.

- Chauffer à 95° C pendant 2 min 30 au bain-marie afin de dénaturer la sonde

. Plonger immédiatement le tube dans la glace.

- Ajouter dans l'ordre :

Solution 1 : 10 μ l

Solution 2 : 5 μ l

Solution 3 : 2 μ l

dCTP : 5 μ l (800 Ci/mme)

Le volume total de solution dans le tube est de 50 μ l.

- Mélanger doucement. Centrifuger quelques secondes.

- Incuber à température ambiante pendant 4 à 7 heures.

Le contrôle du pourcentage d'incorporation de dCT-P³² dans la sonde s'effectue après élimination par gel-filtration du dCT-P³² non incorporé (colonne de 1 ml de gel Sephadex G50 équilibrée dans du tampon T₁₀E₁)

lauryl sarcosyl 1 %). L'activité spécifique calculée est en moyenne de 10 dpm/ μg .

5.6 - Préhybridation et hybridation des filtres.

Cette étape va permettre de visualiser le signal d'hybridation entre l'ARNm recherché et la sonde marquée au ^{32}P . Préhybridation et hybridation sont réalisées à 42° C dans un sac hermétiquement scellé et dans le même tampon (formamide 50 % ; SDS 0,5 % ; SSC 6X ; ADN de sperme de hareng dénaturé 0,2 mg/ml ; T10E1) à raison de 100 μl de tampon/cm² de filtre.

Préhybridation.

Pendant 6 heures à 42° C sous agitation.

Hybridation.

Le sac est vidé et rempli de tampon frais (100 μl de tampon/cm² de filtre) additionné de la sonde radioactive préalablement dénaturée par chauffage à 100° C pendant 10 minutes puis brutalement refroidie dans la glace. 15 à 20.10⁶ cpm sont utilisés pour des filtres de 100 à 150 cm². L'hybridation est effectuée pendant 16 heures sous agitation douce.

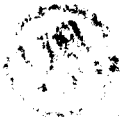
Lavage des filtres.

Ces lavages vont permettre d'éliminer l'excès de sonde et la sonde retenue de façon non spécifique sur la membrane.

- Premier lavage à température ambiante pendant 5 minutes dans une solution SSC 2 X - SDS 0,5 %.
- Puis deux lavages à 42° C pendant 30 minutes et sous agitation douce dans une solution SSC 0,1 X - SDS 0,5 %.

5.7 - Autoradiographie.

Le filtre est mis en contact avec un film XO MAT IR Kodak, dans une cassette contenant deux écrans intensificateurs (Dupont, Chronex : Lightning plus) à - 80° C. Le temps d'exposition varie de quelques heures à plusieurs jours selon l'intensité du signal.



6. Protocole relatif à l'utilisation d'oligodésoxynucléotide couplé à la poly(L-lysine).

Avant d'utiliser les ODN couplés à la poly(L-lysine) (Eurogentec), il faut tester auparavant la sensibilité des cellules à la poly(L-lysine) et vérifier le pourcentage de cellules réceptives à la poly(L-lysine).

Sensibilité des cellules à la poly(L-lysine)

Méthode :

Mesurer la courbe de croissance des cellules en présence de concentrations croissantes de poly(L-lysine).

Protocole

Préparer une boîte à 24 puits contenant 4000 cellules par puits dans du milieu de culture.

Huit heures plus tard, remplacer le milieu par 500 μ l de milieu frais.

Ajuster la concentration en poly(L-lysine) (par ligne de 6 puits) à 0.25, 0.5, 1, 2.5 et 5 μ M, le dernier puits étant utilisé comme contrôle non traité (tampon). Deux heures plus tard, remplacer par du milieu frais.

Seize heures plus tard, compter le nombre de cellules dans chaque puits d'une ligne.

Répéter le comptage toutes les 24 heures pendant 3 jours.

La concentration maximale en poly(L-lysine) que l'on pourra utiliser dans les expériences anti-sens sera la concentration la plus élevée n'interférant pas ou peu avec la croissance des cellules.

pourcentage de cellules réceptives à la poly(L-lysine)

Déposer dans une boîte à 24 puits une suspension de cellules à étudier afin d'atteindre un degré de confluence de 50 %, laisser reposer 2 heures puis changer le milieu.

Après huit heures, remplacer le milieu par 500 μ l de milieu frais et ajouter soit de la poly(L-lysine)-FITC (Eurogentec) à la concentration optimale déterminée lors de l'expérience décrite précédemment soit de la poly(L-lysine)-FITC traitée par la trypsine (1/10 de la solution de poly(L-lysine) comme contrôle négatif.

Suivre avec un microscope à fluorescence l'évolution de la fluorescence des cellules. La fixation de la poly(L-lysine) fluorescente sur les cellules est très rapide. La fluorescence est d'abord associée à la membrane puis en majorité cytoplasmique et finalement répartie dans l'ensemble de la cellule. Comme les cellules mortes fixent parfaitement la poly(L-lysine)-FITC il est préférable de réaliser en parallèle une coloration au bleu trypan.

La pourcentage de confluence qui permet au moins 80 % d'incorporation est retenu dans les expériences ultérieures.

Expérience avec un ODN couplé à la poly(L-lysine)(OL-PLL)

Préparer 3 boîtes à 6 puits de cellules à la confluence idéale (50 %).

Remplacer le milieu de chaque puits par 2 ml de milieu frais.

Ajouter dans chaque boîte de l'OL-PLL dans les puits 1 et 4, de l'oligodésoxynucléotide aléatoire (OLA-PLL) dans les puits 2 et 5, du tampon dans les puits 3 et de la PLL dans le puits 6. Les quantités suivantes de réactifs sont conseillées :

boîte n°1 : 0.25 μ M

boîte n°2 : 0.5 μ M

boîte n°3 : 1 μ M

Cependant ces concentrations devront être ajustées suivant la sensibilité de la souche cellulaire à la PLL.

Remettre à l'incubateur au moins 30 minutes avant de réaliser la mesure de l'effet anti-sens. Dans ces conditions expérimentales, l'effet anti-sens dure au moins 10 heures.

7. Lipofection.

Il s'agit d'une nouvelle méthode de transfection utilisant un lipide chargé positivement, DOTMA (N[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride) formant des liposomes et interagissant spontanément avec l'ADN ou l'ARN provoquant la formation d'un complexe liposome/polynucléotide qui capte 100 % des polynucléotides. Les complexes peuvent délivrer les molécules d'acide nucléique aux cellules en culture. Ce réactif est disponible sous le nom de Lipofectin^R (BRL, GIBCO).

protocole

Diluer 30 µg Lipofectin^R et 20 µg d'ADN dans deux tubes séparés contenant 1.5 ml d'OptiMEM^R sans sérum de veau foetal (GIBCO).

Mélanger doucement (il ne faut qu'il y ait de précipitation) les deux composants juste avant de les ajouter aux cellules ($4 \cdot 10^6$ cellules).

Incuber à 37°C pendant le temps optimal mesuré pour la lignée cellulaire utilisée.

Remplacer ensuite par du milieu frais (RMPI 1640) en présence d'insuline, transferrine et sélénium (milieu défini) et incubation jusqu'à analyse de la réponse.

8. Marquage des oligonucléotides (Kit Amersham).

L'extrémité 5' de l'oligonucléotide est marquée en présence de [γ -³²P]ATP et de T4polynucléotidekinase. La radioactivité libre est éliminée par chromatographie sur des petites colonnes de 1ml de Séphadex G50.

5. Technique du "Western blot".

5.1 Electrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant

- Cuve à électrophorèse verticale : Protean Slab Electrophoresis Cell Bio Rad
(réf.. 71651420).

Solutions

Solution A à 7,5 % d'acrylamide

Acrylamide	75,00 g
Bis acrylamide	2,00 g
Tris	45,30 g
SDS	1,00 g
TEMED	0,3 ml
HCl 5,6 N	qsp pH 6,8
H ₂ O	qsp 1000 ml

Solution C de concentration

Acrylamide	30,00 g
Bis acrylamide	0,80 g
Tris	15,10 g
SDS	1,00 g
TEMED	0,5 ml

HCl 5,6 N	qsp pH	6,8
H ₂ O	qsp	1000 ml

Solution aqueuse de persulfate d'ammonium à 10 % (v/v) (à préparer extemporanément)

Tampon d'électrophorèse (4 fois concentré)

Tris		12,00 g
Glycine		57,20 g
SDS		4,00 g
HCl 5,6 N	qsp pH	8,3
H ₂ O	qsp	1000 ml

(à diluer au 1/4 avant utilisation)

"Sample buffer" (tampon de dénaturation pour échantillons protéiques)

Tris-HCl		0,08 M pH 6,8
SDS		3 % (p/v)
β-mercaptoéthanol		5 %
Glycérol (v/v)		20 % (v/v)
Bleu de bromophénol		0,001 % (p/v)

Marqueurs de masse moléculaire

(Kit Bio Rad, Haut et bas poids moléculaire)

* 6T (LMW) Composition	KD
Phosphorylase b du muscle de lapin	97,400
Sérumalbumine bovine	66,200
Ovalbumine du blanc d'oeuf de poule	42,699
Anhydrase carbonique bovine	31,000

Inhibiteur trypsique du soja	21,500
Lysozyme du blanc d'oeuf de poule	14,400
* 5T (HMW) Composition	KD
Myosine	200,000
β -galactosidase d' <i>E.coli</i>	116,250
Phosphorylase du muscle de lapin	97,400
Sérumalbumine bovine	66,200
Ovalbumine du blanc d'oeuf de poule	42,699

Solution de coloration des gels :

Bleu brillant R250 de Coomassie (Merck 12553)	1,0 g
Acide trichloracétique 50 % (p/v)	250 ml
Méthanol	250 ml
Eau ultra pure	qsp 1000 ml

Solution de décoloration :

Méthanol	500 ml
Acide acétique	160 ml
Eau ultra pure	1300 ml

Protocole.

Un bouchon d'acrylamide (solution à 10 %) (5 ml + 50 μ l de persulfate d'ammonium) est coulé pour maintenir l'étanchéité du système (2 plaques de

verre 160 x 180 mm ; 1,5 mm d'épaisseur). 30 ml de solution à 7,5 % d'acrylamide sont ensuite coulés (30 ml de solution A + 100µl de persulfate) et polymérisent 15 mn à 50 °C.

Puis le gel de concentration est coulé (7,5 ml de solution C + 150 µl de persulfate d'ammonium) et le peigne rajouté immédiatement.

Après une pré-électrophorèse, les échantillons protéiques sont déposés dans les puits en présence de bleu de bromophénol 0,001 % et de glycérol après avoir été traités 3 mn au bain-marie bouillant en présence de 3 % de SDS.

L'électrophorèse est réalisée à 35 mA (par gel) pendant 4 h. Les gels sont démoulés puis fixés et colorés dans la solution de coloration pendant 2 h. L'excès de colorant est éliminé par lavage du gel dans la solution de décoloration.

5.2 Transfert sur filtre de nitrocellulose.

Matériel

Appareil LKB 2005 Transphor Electroblotting Unit (BROMA, Sweden)

Nitrocellulose Schleicher & Schull BA 85 (0,45 µm)

Tampon de transfert

Tris-HCl 25 mM pH 8,3

Glycine 150 mM

Méthanol 20 %

Le gel de polyacrylamide est placé en contact avec la feuille de nitrocellulose préalablement équilibrée dans du tampon. Le transfert s'effectue pendant 5 h à

60V (0,3A) ou 16h à 20V, en évitant l'échauffement de la cuve à l'aide d'une circulation d'eau courante. Après électrotransfert, les protéines sont colorées 5 mn par une solution aqueuse de Rouge Ponceau à 0,2 % contenant 3 % d'acide trichloracétique. L'excès de colorant est éliminé par plusieurs lavages de la feuille de nitrocellulose à l'eau distillée. La feuille est soit séchée et stockée, soit utilisée immédiatement pour l'immunorévélation.

5.3 Techniques immunochimiques.

Réactifs et tampons

- TBS

Tris-HCl	10 mM
NaCl	150 mM
pH	7,4

- TNT (à préparer extemporanément)

TBS	1000 ml
Tween 20 (0,1 %, p/v)	1 gramme

- Révélateur (à préparer extemporanément)

4-chloro-1-naphtol (SIGMA C8890)	50 mg
à dissoudre dans 17 ml de méthanol	
TBS	qsp 100 ml

ajouter H₂O₂ à 30 % 60 µl

Mode opératoire

- Saturation de la feuille de nitrocellulose dans la solution de TBS contenant 5 % (p/v) de lait écrémé en poudre 1h à 37° C.
- Lavage 2 fois 15 minutes dans TBS à température ambiante, 1 fois 15 minutes dans le TNT
- Incubation avec l'anticorps en solution dans TNT, lait écrémé en poudre 1 % (p/v) 1h à 2h à température ambiante.
- Lavage 3 fois 15 minutes dans le TNT
- Incubation avec l'anticorps marqué à la peroxydase (système lapin ou système souris) à une solution 1/1000e ou 1/500e respectivement dans TNT, lait écrémé 1% (p/v) 1 heure sous agitation à température ambiante.
- Lavage 2 fois 15 minutes dans le TNT
- Lavage 1 fois dans le TBS
- Révélation par la solution de 4-chloronaphtol et de H₂O₂ immuncomplexes révélés sous forme de bandes colorées en violet.

BIBLIOGRAPHIE

- Abe, T., Chung, S.I., Di Augustine, and Folk, J.E.** (1977).
Biochem., 16 : 5495-5501.
- Abemayor, E., and Sidell, N.** (1989).
Environmental Health Perspectives, 80 : 3-15.
- Adamo, S., De Luca, L.M., Akalovsky, I., and Bhat, P.V.** (1979).
J. Natl. Cancer Inst., 62 : 1473-1478.
- Akerblom, I.E., Slater, E.P., Beato, M., Baxter, J.D.,
and Mellon, P.L.**(1988).
Science, 241 : 350-353.
- Ando, Y., Imamura, S., Owada, M.K., Kakunaga, T.,
and Kannagi, R.** (1989).
Biophys. Biochem. Res. Commun., 163 : 944-951.
- Arens, J. F. and Van Dorp, D. A.** (1946).
Nature (London), 157 : 190-191.
- Asseline, U., Delarue, M., and Lancelot, G.**(1984).
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81 : 3297-3301.
- Baniahmad, A., Steiner, C., Köhne, A.C., and Renkawitz, R.**(1990).
Cell, 61 : 505-514.
- Bates, S.E., Mickley, L.A., Chen, Y.-N., Richert, N., Rudick, J.,
Biedler, J.L., and Foso, A.T.** (1989).
Mol. Cell Biol., 9 : 4337-4344.
- Baum, R.M.** (1988).
Chem. Eng. News, 20-26.
- Bayard, B., Brisbal, C., and Lebleu, B.** (1986).
Biochem., 25 : 3730-3736.
- Beato, M.** (1989).
Cell, 56 : 335-344.
- Benbrook, D., Lernhardt, E., and Pfahl, M.** (1988).
Nature, 333 : 669-672.
- Bentley, D.L., and Groudine, M.** (1986).
Nature, 321 : 702-706.
- Berenblum, I., and Shubik, P.** (1947).
Br. J. Cancer, 1 : 379-391.
- Biedler, J.L., Helson, L., and Spengler, B.A.** (1973).
Cancer Res., 33 : 2643-2652.
- Birckbichler, P.J., Orr, G.R., Patterson, M.K., Jr.** (1976).
Cancer Res., 36 : 2911-2914.

Birckbichler, P.J., Orr, G.R., Conway, E., Patterson, M.K. Jr.(1977).
Cancer Res., 37 : 1340-1344.

**Birckbichler, P.J., Upchurch, H.F., Patterson, M.K., Jr.,
and Conway, E.** (1985).
Hybridoma, 4 : 179-186.

Birnie, G.D. (1988).
Br.J.Cancer, 58 : 41-45.

Blake, K.R., Murakami, A., and Miller, P.S. (1985a).
Biochem., 24 : 6132-6138.

**Blake, K.R., Murakami, A., Spitz, S.A., Glave, S.A., Reddy, M.P.,
Ts'o, P.O.P., and Miller, P.S.** (1985b).
Biochem., 24 : 6139-6145.

Bollag, W. (1974).
Eur. J. Cancer, 10 : 731-737.

Bollag, W. (1979).
Cancer Chemother. Pharmacol., 3 : 207-215.

Bollag, W., Rüegg, R. and Ryser, G. (1980).
U.S. patent 4,224,244 (Hoffmann-La Roche, F., und Co.,AG).
Chem. Abstr., 95 : 150961 (1981).

Bollag, W., and Hartmann, H. R. (1983).
Cancer Surveys, 2 : 293-314.

**Boutorin, A., Vlassov, V., Kazakov, S., Kutiavin, I.,
and Podyminogen, M.**(1984).
Febs Lett., 172 : 43-46.

Bradford, M. (1976).
Anal. Biochem., 72 : 248-256.

**Brand, N.J., Petkovich, M., Krust, A., Chambon, P., de Thé, H.,
Marchio, A., Tiollais, P., and Dejean, A.**(1988).
Nature, 332 : 850-853.

Breitman, T.R., Selonick, S.E., and Collins, S.J. (1980a).
Proc. Natl. acad. Sci., 77 : 2936-2940.

Breitman, T.R., Collins, S.J., and Keene, B.R. (1980b).
Exp.Cell Res., 126 : 494-498.

Byrd, J.C., and Lichti, U. (1987).
J. Biol. Chem., 262 : 11699-11705.

Cai, D., Ben, T., and De Luca, L.M. (1991).
Biophys. Biochem. Res. Commun., 175 : 1119-1124.

- Cariello, L., Wilson, J., Lorand, L. (1984).
Biochem., 23 : 6843-6850.
- Cariello, L., Velasco, P.T., Wilson, J., Parameswaran, K.N.,
Karush, F., and Lorand, L.(1990)
Biochem., 29 : 5103-5108.
- Cavey, M.T., Martin, B., Carlavan, I., and Schroot, B. (1990).
Anal. Biochem., 186 : 19-23.
- Cazenave, C., Loreau, N., Thuong, N.T., Toulme, J.J.,
and Helene, C. (1987).
Nucl. Acids Res., 15 : 4717-4736.
- Chiocca, E.A., Davies, P.J., and Stein, J.P. (1988).
J. Biol. Chem., 263 : 11584-11589.
- Chiocca, E.A., Davies, P.J., and Stein, J.P. (1989).
J. Cell. Biochem., 39 : 293-304.
- Chomienne, C., Ballerini, P., Balitrand, N., Amar, M.,
Bernard, J.F., Boivin, P., Daniel, M.T., Berger, R., Castaigne, S.,
and Degos, L. (1989).
Lancet, 1 : 746-747.
- Ciccarone, V., Spengler, B.A., Meyers, M.B., Biedler, J.L., and Ross,
R.A. (1989).
Cancer Res., 49 : 219-225.
- Cocuzzi, E., Piacentini, M., Beninati, S., and Chung, S.I. (1990).
Biochem. J., 265 : 707-713.
- Coleman, J., Green, P.J., Inouye, M. (1984).
Cell, 37 : 429-436.
- Collins, S.J., Gallo, R.C., and Gallagher, R.E.(1977).
Nature, 270 : 347-349.
- Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E., and Gallo, R. (1978).
Proc. Natl. Acad. Sci., 75 : 2458-2462.
- Collins, S.J., Muscetti, F.W., Gallagher, R.E., and Gallo, R.C. (1979).
J. Exp. Med., 149 : 969-974.
- Collins, S.J., Bodner, A., Ting, R., and Gallo, R.C. (1980).
Int. J. Cancer, 25 : 213-218.
- Collins, S.J. and Groudine, M. (1982).
Nature, 298 : 679-682.
- Collins, S.J. (1987).
Blood, 70 : 1233-1236

- Collins, S.J., Robertson, K.A., Mueller, L. (1990).**
Mol. Cell. Biol., 10 : 2154-2163.
- Cope, F.O., and Wille, J.J., (1989).**
Proc. Natl. Acad. Sci., 86 : 5590-5594.
- Cordetella-Miele, E., Miele, L. , and Hukhersee, A.B. (1990).**
J. Biol. Chem., 265 : 17180-17188.
- Crettaz, M., Baron, A., Siegenthaler, G.,and Hunziker, W.(1990).**
Biochem.J., 272 : 391-397.
- Curran, T., Franza, J.R. (1988).**
Cell, 55 : 395-397.
- Cushing, H., and Wollbach, S.B. (1927).**
Am. J. Pathol., 3 : 203-215.
- Dadabay, C.Y., and Pike, L.J.(1989).**
Biochem.J., 264 : 679-685.
- Dalton, W.T., Ahearn, M.J., Mc Credie, K.B., Freireich, E.J., Stass, S.A., and Trujillo, J.M.(1988).**
Blood, 71 : 242-246
- Davies, P.J.A., Davies, D.R., Levitzki, A., Maxfield, F.R., Milhaud, P., Willingham, M.C., and Pastan, I.H. (1980).**
Nature, 283 : 162-167.
- Davies, P.J.A., Murtaugh, M.P. (1984).**
Mol. Cell Biochem., 58 : 69-77.
- Davies, P.J., Murtaugh, M.P., Moore, W.T., Jr., Johnson, G.S., and Lucas, D. (1985).**
J. Biol. Chem., 260 : 5166-5174.
- Dawson, M.I., Chan, R.L., Derdzinski, K., Hobbs, P.D., Chao, W., and Schiff, L.J.(1983).**
J. Med. Chem., 26: 1653-1656.
- Dawson, M.I., Hobbs, P.D., Chan, R. L.-S., and Chao, W.R. (1981b).**
J. Med. Chem., 24 : 1214-1223.
- Dean, M., Levine, R.A., and Campisi (1986).**
J. Mol. Cell Biol., 6 : 518-524.
- Dejean, A., Bougueleret, L., Grzeschik, K.-H., and Tiollais, P. (1986).**
Nature, 322 : 70-72.
- DeLuca, L.M.(1991)**
FASEB J., 5 : 2924-2933.

- Demay, M.B., Gerardi, J.M., DeLuca, H.F., and Kronenberg, H.M.** (1990).
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 87 : 369-373.
- Denning, M.F., and Verma, A.K.** (1991).
Biophys.Biochem.Res.Comm., 175 : 344-350.
- DeRuyter, M.G., Lambert, W.E., and DeLeenheer, A.P.** (1979).
Anal.Biochem., 98 : 402-409.
- Deutsch, P.J., Hoeffler, J.P., Jameson, J.L., Habener, J.F.** (1988).
Proc. Natl. Acad. Sci., 85 : 7922-7926.
- de Thé, H., Marchio, A., Tiollais, P., and Dejean, A.** (1987).
Nature, 330 : 667-670.
- de Thé, H., Vivanco-Ruiz, M.D.M., Tiollais, P., Stunnenbag, H., and Dejean, A.** (1990).
Nature, 343 : 177-180.
- Diamond, M.I., Miner, J.N., Yoshinaga, S.K., and Yamamoto, F.R.** (1990).
Science, 249 : 1266-1272.
- Dollé, P., Ruberte, E., Kastner, P., Petkovich, M., Stoner, C.M., Gudqs, L.J., and Chambon, P.** (1989).
Nature, 342 : 702-705.
- Dollé, P., Ruberte, E., Leroy, P., Morriss-Kay, G., and Chambon, P.** (1990).
Development, 110 : 1133-1151.
- Douer, D., and Koeffler, H.** (1982).
J. Clin. Invest., 69 : 277-283.
- Drouin, J., Trifiro, M.A., Plante, R.K., Nemer, R., Ericksson, P., and Wrangle, O.** (1989).
Mol. Cell Biol., 9 : 5305-5314.
- Duester, G., Shean, M.L., Mc Bride, M.S., and Stewart, M.J.** (1991).
Mol. Cell. Biol. 11 : 1638-1646.
- Durston, A.J., Timmermans, J.P.M., Hage, W.J., Hendriks, H.F.J., de Vries, N.J., Heideveld, M., and Nieuwkoop, P.D.** (1989).
Nature : 340 : 140-144.
- Eichele, G.** (1989).
Trends Gen., 5 : 246:251.
- Eick, D., and Bornkamm, G.W.** (1986).
Nucleic Acids Res., 14 : 8331-
- Evain-Brion, D., Raynaud, F., Laurent, P., Plet, A., Leduc, B., Anderson, W.B.** (1986).
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 83 : 5272-5276.

- Evans, R.M.** (1988).
Science, 240 : 889-895.
- Fell, H.B., and Mellanby, E.** (1952).
J. Physiol. (London), 116 : 320-349.
- Fesus, L., Laki, K.** (1977).
Biochem., 16 : 4061-4066.
- Fesus, L., Sandor, M., Horvath, L.I., Bagyinka, C., Erdei, A., and Gergely, J.** (1981).
Mol. Immunol., 18 : 633-638.
- Fesus, L., Szucs, E.F., Barrett, K.E., Metcalfe, D.D., Folk, J.E.** (1985).
J. Biol. Chem., 260 : 13771-13778.
- Fesus, L., Thomazy, V., and Falus, A.** (1987).
Febs Lett., 224 : 104-108.
- Fesus, L., Davies, P.J.A., and Piacentini, M.** (1991)
Europ.J.Cell Biol., 56 : 170-177.
- Fischkoff, S.A., Pollak, A., Gleich, G.J., Testa, J.R., Misawa, S., and Reber, T.J.** (1984).
J. Exp. Med., 160 : 179-196.
- Flink, I.L., and Morkin, E.** (1990).
J.Biol.Chem., 265 : 11233-11237.
- Floyd, E.E., and Jetten, A.M.** (1989).
Mol. Cell. Biol., 9 : 4846-4851.
- Folk, J.E., and Cole, P.W.** (1966).
J. Biol. Chem., 241 : 3240.
- Folk, J.E., and Gross, M.** (1971).
J. Biol. Chem., 246 : 6683-6691.
- Folk, J.E., and Chong, S.I.** (1973).
Adv. Enzymol., 38 : 109-191.
- Folk, J.E., and Finlayson, J.S.** (1977).
Adv. Protein. Chem., 31 : 1-133.
- Folk, J.E.** (1980).
Ann. Rev. Biochem., 49 : 517-531.
- Fontana, J.A., Emler, C., Ku, K., Mc Clung, J.K., Butcher, F.R., and Durham, J.P.** (1984).
J. Cell Physiol., 120 : 49-60.
- Fontana, J.A., Wright, D.G., Schiffman, E., Corcoran, B.A., and Deisseroth, A.** (1980).
Proc. Natl. Acad.Sci.USA, 77 : 3664-3668.

- Frolik, C.A., Dart, L.L., and Sporn, M.B.** (1981).
Biochem. Biophys. Acta, 663 : 329-335.
- Gallagher, R.E., Said, F., Pua, I., Papenhausen, P.R., Paietta, E., and Wiernik, P.** (1989).
Leukemia, 3 : 789-795.
- Gaub, M.P., Lutz, Y., E., Petkovich, M., Brand, N., and Chambon, P.** (1989).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 : 3089-3093.
- Gentile, V., Saydak, M., Chiocca, E.A., Akande, O., Birckbicher, P.J., Lee, K.N., Stein, J.P., and Davies, P.J.A.** (1991).
J. Biol. Chem., 266 : 478-483.
- George, M.D., Vollberg, T.M., Floyd, E.E., Stein, J.P., and Jetten, A.M.** (1990).
J. Biol. Chem., 265 : 11098-11104.
- Gezer, S., Yasin, Z., Imren, S., Freeman, J., Black, A., and Raza, A.** (1988).
Cancer Res., 48 : 5989-5994.
- Giguere, V., Ong, E.S., Segui, P., and Evans, R.M.** (1987).
Nature, 330 : 624-629.
- Giguere, V., Shago, M., Zirngibl, R., Tate, P., Rossant, J., and Varmuza, S.** (1990).
Mol. Cell. Biol., 10 : 2335-2340.
- Gil, D., Chandraratna, R., Breen, T., Arefieg, T., Marler, D., Henry, E., Basilion, J., and P.Davies** (1990).
J. Cell Biol. (Suppl.), 111 : 344a (1925)
- Glass, C.K., Franco, R., Weinberger, c., Albert, V., Evans, R.M., and Rosenfeld, M.G.** (1987).
Nature, 329 : 738-741.
- Glomset, J.A., Gelb, M.H., Farnsworth** (1990).
Trends Biochem. Sci., 15 : 139
- Goerig, M., Habenicht, A.J.R., Zeh, W., Salbach, P., Burkhard, K., Rothe, D.E.R., Nastainczyk, W., and Glomset, J.A.** (1988).
Proc. Natl. Acad. Sci., 263 : 19384-19391.
- Goldman, R.** (1985).
Cancer Res, 45 : 3118-3124.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S.** (1990)
Nature, 343 : 425-430.
- Govindan, M.V.** (1979)
J. Steroid. Biochem., 108 : 47-53.

- Graupner, G., Wills, K.N., Tsukerman, M., Zhang, X.K., and Pfahl, M.** (1989).
Nature, 340 : 653-656.
- Greaves, M.F., Chan, L.C., Furley, A.J.W., Watt, S.M., and Molgaard, H.V.** (1986).
Blood, 67 : 1-7.
- Green, P.J., Pines, O., and Inouye, M.** (1986).
Ann. Rev. Biochem., 55 : 569-597.
- Guidez, F., Perignon, J.L., Houllier, A.M., Balitrand, N., and Abita, J.P.** (1991).
Leukemia, 5 : 699-703.
- Habener, J. F.** (1990).
Mol. Endocrinol., 4 : 1087-1094.
- Haffket, S.C., and Seeds, N.W.** (1975).
Life Sci., 16 : 1649-1658.
- Hanni, R., and Ryser, G.** (1979).
U.S. patent 4,169,103 (Hoffmann-La Roche, Inc.).
Chem. Abstr., 92 : 59038 (1980).
- Harland, R., Weintraub, H.**(1985).
J.Cell Biol., 101 : 1094-1099.
- Hashimoto, Y., Kagechika, H., Kawachi, E., and Shudo, K.** (1987).
Chem. Pharm. Bull., 34 : 2275-2278.
- Hashimoto, Y., Kagechika, H., Kawachi, E., and Shudo, K.** (1988).
Jpn J. Cancer Res. (Gann), 79 : 473-483 and correction 79 : 1065.
- Hashimoto, Y., Petkovich, M., Gaub, M.P., Kagechika, H., Shudo, K., and Chambon, P.** (1989).
Mol. Endocrinol., 3 : 1046-1052.
- Hashimoto, Y., Kagechika, H., and Shudo, K.** (1990).
Biophys. Biochem. Res. Commun., 166: 1300-1307.
- Hassel, J.R., Pennypacker, J.P., and Lewis, C.A.** (1978).
Exp. Cell Res., 112 : 409-417.
- Haussler, M., Sidell, N., Kelly, M., Donaldson, C.** (1983).
Proc. Natl. Acad. Sci., 80 : 5525-5529.
- Hemmi, H., Breitman, T.R.** (1987).
Blood, 69 : 501:507.
- Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., and Sasaki, Y.**(1984).
Biochem., 23 : 5036-5041.
- Holmes, H. N., and Corbet, R.E.** (1937).
J.Am.Chem.Soc., 59 : 2042-2047.

- Holt, J.T., Redner, R.L., and Niehuis, A.W. (1988).**
Mol. Cell. Biol., 8 : 963
- Holt, J.T., Redner, R.L., and Nieinhuis, A.W. (1988).**
Mol. Cell Biol., 8 : 963-973.
- Huang, M., Ye, H.-C., Chen, S.-R., Chai, J.-R., Lu, H.-X., Zhao, L., Gu, L.-J., Wang, Z.-Y. (1988).**
Blood, 72 : 567-572.
- Huebner, K., Isobe, M., Crole, C.M., Golde, D.W., Kaufman, S.E., and Gasson, J.C. (1985).**
Science, 230 :1282-1285
- Ichinose, A., Hendryckson, L.E., Fusikawa, K., Davie, E.W. (1986).**
Biochem., 25 : 6900-6906.
- Ikura, K., Nasu, T., Yokota, H., Tsuchiya, Y., Sasaki, R., and Chiba, H. (1988).**
Biochem., 27 : 2898-2905.
- Isler, O. (1971).**
Birkhäuser Verlag, Basel. A.C. Griffin, and C.R. Shaw. Eds., pp. 441-453.
Raven, New York.
- Isler, O., Huber, W., Ronco, A., and Kofler, M.(1947).**
Helv.Chim.Acta, 30 : 1911-1927.
- Izant, J.G., and Weintraub, H. (1985).**
Science, 229 : 345-352.
- Izant, J.G., Weintraub, H. (1984).**
Cell, 36 : 1007-1015.
- Izumo, S., and Mahdavi, V.(1988).**
Nature, 334 : 539-542.
- Jetten, A.M., and Shirley, J.E. (1985).**
Exp. Cell. Res., 156 : 221-230.
- Jetten, A.M., and Shirley, J.E. (1986).**
J. Biol. Chem., 261 : 15097-15101.
- Jetten, A.M., Anderson, K., Deas, M.A., Kagechika, H., Lotan, R., Mearick, J.I., and Shudo, K. (1987).**
Cancer Res., 47 : 3523-3527.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H.J., Park, K.-K., Cato, A.C.B., Gebel, S., Ponta, H., and Herrlich, P. (1990).**
Cell, 62 : 1189-1204.
- Kagechika, H., Kawachi, E., Hashimoto, Y., and Shudo, K. (1984).**
Chem. Pharm. Bull, 32 : 4209-4212.

Kagechika, H., Kawachi, E., Hashimoto, Y., and Shudo, K. (1985).
Chem. Pharm. Bull., 33 : 5597-5600.

Kagechika, H., Kawachi, E., Hashimoto, Y., and Shudo, K. (1986).
Chem. Pharm. Bull, 34 : 2275-2278.

**Kagechika, H., Kawachi, E., Hashimoto, Y., Himi, T.,
and Shudo, K.** (1988).
J. Med. Chem., 31 : 2182-2192.

Kagechika, H., Kawachi, E., Hashimoto, Y., and Shudo, K. (1989).
J. Med. Chem., 32 : 834-840.

Karrer, P., Helfenstein, A., Wehrli, H., and Wettstein, A. (1930).
Helv.Chim.Acta, 13 : 1084-1099.

Karrer, P., Morf, R., and Schöpp, K. (1931).
Helv.Chim.Acta, 14 : 1431-1436.

**Kastner, P., Krust, A., Mendelsohn, C., Garnier, J.M., Zelent, A.,
Leroy, P., Staub, A., Chambon, P.** (1990).
Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 87 : 2700-2704.

Kawasaki, E.S.(1985).
Nucleic Acids Res., 13 : 4991-5004.

Kim, S.K., Wold, B.J.(1985).
Cell, 42 : 129-138.

**Kitagawa, S., Nosiri, H., Nakamura, M., Gallagher, R.E.,
and Saito, M.** (1989).
J. Biol. Chem., 264 : 16149-16154.

**Kitahara, A., Mikawa, H., Ohtsuki, H., Yamagata, Y., Murachi, T.,
and Kannagi, R.** (1987).
Clin. Endocrinol. Metab., 65 : 885-890.

Krishna, V.(1991).
Mol. Endocrinol, 5 : 100-110.

**Krust, A., Kastner, P., Petkovich, M., Zelent, A.,
and Chambon, P.** (1989).
Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 86 : 5310-5314.

**Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.-R.,
and Chambon, P.**(1987).
Cell, 51 : 941-951.

Lachman, H.M., and Skoultchi, A.I. (1984).
Nature, 310 : 592-594.

Ladoux, A., Gragoe, E.J., Jr., Geny, B., and Abita, J.P. (1987).
J. Biol. Chem., 262 : 811-816.

- Landschultz, W.H., Johnson, P.F., Mc Knight, S.L.** (1988).
Science, 240 : 1759-1764.
- Largman, C., Detmer, K., Corral, J.C., Hack, F.M.,
and Lawrence, H.J.** (1989).
Blood, 74 : 99-102.
- Larson, R.A., Kondo, K., Vardiman, J.W., Butler, A.E., Colomb,
H.M., and Rowley, J.D.** (1984).
Am. J. Med., 76 : 827-841.
- Lasnitzki, I.** (1955).
Br. J. Cancer, 9 : 434-441.
- Lee, K.N., Birckbichler, P.J., Patterson, M.K., Jr. Conway, E., and
Maxwell, M.** (1987).
Biochim.Biophys.Acta, 928 : 22-28.
- Lee, K.N., Birckbichler, J., and Patterson, M.K. Jr.** (1989).
Biophys. Biochem. Res. Commun., 162 : 1370-1375.
- Lemaitre, M., Bayard, B., and Lebleu, B.** (1987).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 : 648-652.
- Leu, R.W., Herriott, M.J., Moore, P.E., Orr, G.R.,
and Birckbichler, P.J.** (1982).
Exp. Cell. Res., 141 : 191-199.
- Lichti, U., Ben, T., and Yuspa, S.H.** (1985).
J. Biol. Chem., 260 : 1422-1426.
- Loeliger, P.** (1979).
Ger. Offen. 2,854,354 (Hoffmann-La Roche, F., und Co. AG).
Chem. Abstr., 91 : 140631.
- Loeliger, P.** (1980).
Ger. Offen. 2,819,213 (Hoffmann-La Roche, F., und Co. AG).
Chem. Abstr., 90 : 87133.
- Loeliger, P., Bollag, W., and Mayer, H.** (1980).
Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther., 15 : 9-15.
- Loke, S.L., Stein, C.A., Zhang, X.H., Mori, K., Nakanishi, M.,
Subasinghe, C., Cohen, J.S., and Neckers, L.M.** (1989).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 : 3474-3478.
- Lorand, L., Downey, J., Gotoh, T., Jacobsen, A., and Tokura, S.** (1968).
Biophys. Biochem. Res. Commun., 31 : 222-230.
- Lorand, L., and Conrad, S.M.** (1984).
Mol. Cell. Biochem., 58 : 9-35.
- Lorand, L., Weismann, L.B., Epel, D.L., Bruner-Corand, J.** (1976).
Proc. Natl. Acad. Sci., 73 : 4479-4481.

- Lotan, R., and Nicolson, G.L.** (1977).
J. Natl. Cancer Inst., 59 : 1717-1722.
- Lotan, R., Giotta, G., Nork, E., and Nicolson, G.L.** (1978).
J. Natl. Cancer Inst., 60 : 1035-1041.
- Lotan, R., Neumann, G., and Lotan, D.** (1980).
Cancer Res., 40 : 1097-1102.
- Lotan, R., Neumann, G., and Lotan D.** (1981).
Ann. N.Y. Acad. Sci., 359 : 150-170.
- Lucas, P.C., O'Brien, R.M., Mitchell, J.A., Davis, C.M., Imai, E., Forman, B.M., Samuels, H.H., and Granner, D.K.**(1991).
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 88 : 2184-2188.
- Lucibello, F.C., Slater, E.P., Jooss, K.U., Beato, M., and Müller, R.** (1990).
Embo J., 9 : 2827-2834.
- McGarry, T.J., Lindquist, S.**(1986).
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 88 : 399-403.
- Makowske, M., Ballester, R., Cayre, Y., and Rosen, O.M.** (1988).
J. Biol. Chem., 263 : 3402-3410.
- Mangelsdorf, D.J., Ong, E.S., Dyck, J.A., and Evans, R.M.** (1990).
Nature, 345 : 224-229.
- Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., Kliewer, S.A., Borgmeyer, U., Ong, E.S., and Evans, R.M.**(1991).
Cell, 66 : 555-561.
- Marchok, A.C., Rhoton, J.C., and Nettesheim, P.** (1978).
Cancer Res., 38 : 2030-2037.
- Marcus-Sekura, C.J., Woerner, A.M., Shinozuka, K., Zon, G., and Quinnan, G.V., Jr.** (1987).
Nucleic Acids Res., 15 : 5749-5763.
- Marcus-Sekura, C.J.**(1988).
Anal.Biochem., 172 : 289-295.
- Martin, S.J., Bradley, J.G., and Cotter, T.G.** (1990).
Clin. Exp. Immunol., 79 : 448-453.
- Matsui, T., Nakao, Y., Koizumi, T., Katakami, Y. and Fusita, T.** (1986).
Cancer Res. 46 : 583-587.
- Matsukuma, M., Shinozuka, K., Zon, G., and al.** (1978).
Proc. Natl. Acad. Sci., 84 : 7706-7710.

- Mattei, M.G., Petkovich, M., Mattei, J.F., Brand, N., and Chambon, P.** (1988).
Hum. Genet., 80 : 186-187.
- Mayer, H., Bollag, W., Hänni, R., and Rüegg, R.** (1978).
Experientia, 34 : 1105-111.
- McCollum, E. V., and Davis, M.** (1913).
J.Biol.Chem., 15 : 167-175.
- McGuire, J., Langdon, R., Birchall, N., and Kupper, T.** (1988).
Ann. N.Y. Acad. Sci., 548 : 283-290.
- McKenzie, R.M., Hellwege, D.M., McGregor, M.L., Rockley, N.L., Riquetti, P.J., and Nelson, E.C.** (1978a).
J. Chromatogr., 155 : 379-387.
- McKenzie, R.M., Hellwege, D.M., McGregor, M.L., and Nelson, E.C.** (1978b).
Lipids, 14 : 714-717.
- McKenzie, R.M., McGregor, M.L., and Nelson, E.C.** (1978c).
J. Labelled Compd. Radiopharm., 15 : 265-278.
- Médecine-Sciences** (1990).
6 : 1003-1006.
- Mees, A., Adamson, E., and Graham, C.** (1979).
Nature, 281 : 309-311.
- Mehta, K., and Lopez-Berestein, G.** (1986).
Cancer Res., 46 : 1388-1394.
- Melino, G., Farrace, M.G., Ceru, M.P., and Piacentini, M.** (1988).
Exp.Cell Res., 179 : 429-445.
- Melton, D.A.** (1985).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 : 114-118.
- Milhaud, P.G., Davies, P.J.A., Pastan, S., and Gottesman, M.M.** (1980).
Biochim.Biophys.Acta, 630 : 476-484.
- Montminy, M.R., Sevarino, K.A., Wagner, J.A., Mandel, G., and Goodman, R.H.** (1986).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 : 6682-6686.
- Moore, W.T., Jr., Murtaugh, M.P., and Davies, P.J.A.** (1984).
J. Biol. Chem., 259 : 12794-12802.
- Morton, R.A.** (1944).
Nature (London), 153 : 69-71.
- Muller, J.M., Lolait, S.J., Yu, V.C., Sadée, W., Waschek, J.A.** (1989)
J.Biol.Chem., 264 : 3647-3650.

- Munos-Canores, P., Vik, D.P., and Tack, B.F.(1990).
J.Biol.Chem., 265 : 20065-20068.
- Murray, M., Cunningham, T., Parada, L., Dautry, F., Lebowitz, P.,
and Weinberg, R.A. (1983).
Cell, 33 : 749-755.
- Murtaugh, M.P., Dennison, O., Stein, J.P., and Davies, P.J.A. (1986).
J. Exp. Med., 163 : 1325-1330.
- Murtaugh, M.P., Mehta, K., Johnson, J., Myers, M., Julieno, R.L.,
and Davies, P.J.A.(1983).
J. Biol. Chem., 258 : 11074-11081.
- Nara, K., Nakanishi, K., Hagiwara, H., Wakita, S.,
and Hirose, S. (1989).
J. Biol. Chem., 264 : 19308-19312.
- Nervi, C., Grippo, J.F., Sherman, M.J., George, M.D.,
and Jetten, A.M. (1989).
Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 86 : 5854-5858.
- Newberger, P., Chovaniec, M., Greenberger, J., and Cohen, H. (1979).
J. Cell Biol., 82 : 315-322.
- Ng, K.W., Gummer, P.R., Michelangeli, V.P., Bateman, J.F.,
Mascara, T., Cole, W.G., and Martin, T.J. (1988).
J. Bone Mi.Res., 3 : 53-61.
- Ng, K.W., Manji, S.S., Young, M.F., and Findlay, D.M.(1989).
Mol.Endocrinol., 3 : 2079-2085.
- Nicholson, R.C., Mader, S., Nagpal, S., Leid, M., Rochette-Egly, C.,
and Chambon, P. (1990).
Embo J., 9 : 4443-4454.
- Nishizuka, Y. (1984).
Nature, 308 : 693-698.
- Noda, M., Vogel, R.L., Craig, A.M., Prah, J., DeLuca, H.F.,
and Denhardt, D.T.(1990).
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 87 : 9995-9999.
- Noji, S., Nohno, T., Koyama, E., Muto, K., Ohyama, K., Aoki, Y.,
Tamura, K., Ohsugi, K., Ide, H., Taniguchi, S., and Saito, T. (1991).
Nature, 350 : 83 : 86.
- Novogrodsky, A., Quittner, S., Rubin, A.L., and Stenzel, K.H. (1978).
Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 75 : 1157-1161.
- Oberg, K.C., and Carpenter, G. (1989).
Mol. Endocrinol., 3 : 915-922.
- Obinata, A., Endo, H. (1977).
Nature, 270 : 440-441.

- Ohl, L., and Schindler, J. (1987).**
Exp. Cell. Biol., 55 : 28-33.
- Okret, S., Carlstedt-Duke, J., Wrangle, O., Carlstrom, K.,
and Gustafsson, J.A.(1981).**
Biochim.Biophys.Acta, 677 : 205-219.
- Olsson, I.L., Breitman, T.R., and Gallo, R.C. (1982).**
Cancer Res., 42 : 3928-3933.
- Ozono, K., Liao, J., Kerner, S.A., Scott, R.A., and Pike, J.W.(1990).**
J.Biol.Chem., 265 : 21881-21888.
- Pahlman, S., Musala, A.I., Abrahamsson, L., Mattsson, M.E.K.,
and Esscher, T. (1984).**
Cell Differ., 14 : 135-144.
- Parmley, R.T., Akin, D.T., Barton, J.L., Gilbert, S.,
and Kinkade, J.M. (1987).**
Cancer Res., 47 : 4932-4935.
- Pepin, M.C., and Barden, N. (1991).**
Mol. Cell. Biol., 11 : 1647-1653.
- Perez-Polo, J.R., Loerrbach-Perez, K.,
and Tiffany-Castiglioni, E. (1979).**
Dev. Biol., 71 : 341-355.
- Petkovich, M., Brand, N.J., Krust, A., and Chambon, P. (1987).**
Nature, 330 : 444-450.
- Petty, K.J., Desvergne, B., Mitsuhashi, T., and Nicodem, V.M.(1990).**
J.Biol.Chem., 265 : 7395-7400.
- Piacentini, M., Fesus, L., Farrace, M.G., Ghibelli, L., Piredda, L.,
and Melino, G. (1991).**
Europ. J. Cell. Biol., 54 : 246:254.
- Plet, A., Evain, D., Anderson, W.B.(1982)**
J.Biol.Chem., 257 : 889-893.
- Prasad, K.N. (1975).**
Biol. Rev., 50 : 129-165.
- Ragsdale, C.W., Petkovich, M., Gates, P.B., and Chambon, P. (1989).**
Nature, 341 : 654-657.
- Rees, J.L., Daly, A.K., and Redfern, C.P.F. (1989).**
Biochem. J., 259 : 917-919.
- Reese, D., Fiorentino, G., Clafin, A., Malinin, T.,
and Politano, V. (1981).**
Biophys. Biochem. Res. Commun., 102 : 315-321.

- Reese, D., Gordon, B., Gratzner, H., Clafin, A., Malanin, T., Block, N., and Politano, V. (1983).**
Cancer Res., 43 : 5443-5450.
- Rice, R.H., and Green, H. (1977).**
Cell, 11 : 417-422.
- Rice, R.H., and Green, H. (1979).**
Cell, 18 : 681-694.
- Rizzino, A., and Crowley, C. (1980).**
Proc. Natl. Acad. Sci., 77 : 457-461.
- Roberts, A.B., Anzano, M.A., Lamb, L.C., Smith, J.M. (1984a).**
Cancer Res., 44 : 1635-1641.
- Roberts, A.B., and Sporn, M.B. (1984b).**
in the Retinoids, vol.1 and 2.
Roberts, A.B., Sporn, M.B., and Goodman, D.S., eds.(New York : Academic Press).
- Roesler, W.J., Vanderbark, G.R., and Hanson, R.W. (1988).**
J. Biol. Clin., 263 : 9063-906
- Rosenberger, M. (1982).**
J. Org. Chem., 47 : 1698-1701.
- Rovera, G., O'Brian, T.G., and Diamond, L. (1979).**
Science, 204 : 868-870.
- Ruberte, E., Dollé, P., Krust, A., Zelent, A., Morriss-Kay, G., and Chambon, P.(1990).**
Development, 108 : 213-222.
- Ruberte, E., Doll, P., Chambon, P., and Morris-Kay, G. (1991).**
Development, 111 : 45-60.
- Rubin, A.L., and Rice, R.K. (1986).**
Cancer Res., 46 : 2356-2361.
- Rush, M.G., Riaz-Ul-Haq, V., Chytil, F. (1991).**
Endocrinol., 129 : 705-709.
- Sachs, L. (1978).**
Nature, 274 : 535-539.
- Sachs, L.(1980).**
Proc. Natl. Acad. Sci. , 77 : 6152-6159.
- Sakai, D.D., Helms, S., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.-A., Rottman, F.M., and Yamamoto, K.R. (1988).**
Genes Dev., 2 : 1144-1154.
- Sap, J., Munoz, A., Schmitt, J., Stunnenberg, H., and Vennström, B.(1989).**
Nature, 340 : 242-244.

- Sato, M., Hiragun, A., and Mitsui, H.** (1980).
Biophys. Biochem. Res. Commun., 95 : 1839-1845.
- Savill, J.S., Henson, P.M., and Haslett, C.** (1989).
J. Clin. Invest., 84 : 1518-1527.
- Schroff, G., Neumann, C., and Sorg, C.** (1981).
Eur. J. Immunol., 11 : 637-642.
- Schüle, R., Umesono, K., Mangelsdorf, D.J., Bolado, J., Pike, J.W., and Evans, R.M.** (1990a).
Cell, 91 : 497-504.
- Schüle, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I.M., and Evans, R.M.** (1990b).
Cell, 62 : 1217-1226.
- Schüle, R., Rangarajan, P., Yang, N., Kliewer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Verma, I.M., and Evans, R.M.** (1991).
Proc. Natl. Acad. Sci., 88 : 6092-6096.
- Scott, K.F.F., Meyskens, F.L., and Russel, D.H.** (1982).
Proc. Natl. Acad. Sci., 79 : 4093-4097.
- Segal, S., and Khoury, G.** (1979).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 : 5611-5615.
- Shudo, K., Kagechika, H., Kawachi, E., and Hashimoto, Y.** (1985).
Chem. Pharm. Bull., 33 : 404-407.
- Sidell, N.** (1982).
J.N.C.I., 68 : 589-596.
- Sidell, N., Altman, A., Haussler, M., and Seeger, R.C.** (1983).
Exp. Cell. Res., 148 : 21-30.
- Sidell, N., Sarafian, T., Kelly, M., Tsuchida, T., and Haussler, M.** (1986).
Exp. Cell. Biol., 54 : 287-300.
- Siebenlist, U., Bressler, P., and Kelly, K.** (1988).
Mol. Cell Biol., 8 : 867-872.
- Simons, R.W., and Kleckner, N.** (1983).
Cell, 34 : 683-691.
- Slack, J.M.W.** (1987).
Nature, 327 : 553-554.
- Smith, C.C., Aurelian, L., Reddy, M.P., Miller, P.S., and Tso, P.O.P.** (1986).
Proc. Natl. Acad. Sci., 83 : 2787-2791.

Song, S., and Siu, C.-H. (1989).
Febs lett., 256 : 51-54.

Speers, W.C. (1982).
Cancer Res., 42 : 1843-1849.

Sporn, M.B., Clamon, G.H., Dunlop, N.M., Newton, D.L., Smith, J.M., and Saffiotti, U. (1975).
Nature, 253 : 47-50.

Sporn, M.B., and Roberts, A.B. (1983).
Cancer Res., 43 : 3034-3040.

Stephenson, M., and Zamecnik, P. (1978).
Proc. Natl. Acad. Sci., 75 : 285-288.

Strickland, S., and Mahdavi, M. (1978).
Cell, 15 : 393-403.

Strickland, S., Breitman, T.R., Frickel, F., Nürrenbach, A., Hädicke, E., and Sporn, M.B. (1983) .
Cancer Res., 43 : 5268-5272.

Stryer, L. (1987)
Sci.Am., 257 : 32-35.

Sucov, H.M., Murakami, K.K., and Evans, R.M.(1990).
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 87 : 5392-5396.

Suedhoff, T., Birckbichler, P.J., Lee, K.N., Conway, E., and Patterson, M.K., Jr.(1990).
Cancer Res., 50 : 7830-7834.

Sumikawa, K., and Miledi, R. (1988).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 : 1302-1306.

Takahashi, N., Takahashi Y., and Putman (1986).
Proc. Natl. Acad. Sci., 83 : 8018-8023.

Takahashi, N., and Breitman, T.R.(1989).
J.Biol.Chem., 264 : 5159-5163.

Takahashi, N., and Breitman, T.R.(1990).
J.Biol.Chem., 265 : 19158-19162.

Takenaga, K., Honma, Y., Kado, J., and Hozumi, M. (1982).
Gann, 73 : 175-188.

Takigawa, M., Ishida, H., Takano, T., and Suzuki, F. (1980).
Proc. Natl. Acad. Sci., 77 : 1481-1485.

Tanaka, H., Abe, E., Miyaura, C., Shiina, Y., and Shuda, T. (1983).
Biophys. Biochem. Res. Commun., 117 : 86-92.

- Thacher, S.M., and Rice, R.H.** (1985).
Cell, 40: 685-695.
- Thaller, C., and Eichele, G.** (1987).
Nature, 327: 625-628.
- Thiele, C.J., Reynolds, C.P., and Israel, M.A.** (1985).
Nature, 313: 404-406.
- Thomazy, V., Fesus, L.** (1989).
Cell Tissue Res., 255: 215-224.
- Tomei, L.D., Kanter, P., and Wenner, C.E.** (1988).
Biophys. Biochem. Res. Commun., 155: 324-331.
- Toulme, J.J., Krisch, H.M., Loreau, N., Thuong, N.T.,
and Helene, C.** (1986).
Proc. Natl. Acad. Sci., 83: 1227-1231.
- Umesono, K., Giguere, V., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G.,
and Evans, R.M.** (1988).
Nature, 336: 262-265.
- Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C.,
and Evans, R.M.** (1991).
Cell, 65: 1255-1266.
- Vasios, G.W., Gold, J.D., Petkovich, M., Chambon, P.,
and Gudas, L.J.** (1989).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 9099-9103.
- Vasios, G., Mader, S., Gold, J.D., Leid, M., Lutz, Y., Gaub, M.P.,
Chambon, P., and Gudas, L.** (1991).
Embo J., 10: 1149-1158.
- Verma, A.K., Rice, H.M., Shapas, B.G., and Boutwell, R.K.** (1978).
Cancer Res., 38: 793-801.
- Vinson, C.R., Sigler, P.B., Mc Knight, S.L.** (1989).
Science, 246: 911-922.
- Violette, S.M., King, I., and Sartorelli, A.C.** (1989)..
J. Invest. Dermatol., 93: 165-168.
- Wagner, M., Thaller, C., Jessell, T., and Eichele, G.** (1990).
Nature, 345: 819-822.
- Wald, G.** (1934).
Nature (London), 134: 35-37.
- Wang, C., Curtis, J.E., Mi den, M.D., and Mc Culloch, E.A.** (1989).
Leukemia, 3: 264-269.

- Waschek, J.A., Muller, J.M., Duan, D.S., Sadee, W.(1989).
Febs Lett., 250 : 611-614.
- Wertz, P.W., Kensler, T.W., Mueller, G.C., Verma, A.K., and
Boutwell, R.K. (1979).
Nature (London), 277 : 227-229.
- Wickström, E. (1986).
J. Biochem. Biophys. Methods, 13 : 97-102.
- Wickström, E.L., Bacon, T.A., Gonzalez, A., Freeman, D.L.,
Lyman, G.H., Wickström, E. (1988).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 : 1028-1032.
- Wood, W.M., Kao, M.Y., Grodon, D.F., and Ridgway, E.C.(1989).
J.Biol.Chem., 264 : 14840-14847.
- Yang-Yen, H.-F., Chambard, J.-C., Sun, Y.-L., Smeal, T., Schmidt,
T.J., Drouin, J., and Karin, M. (1990).
Cell, 62 : 1205-1215.
- Yokohama, K., and Imamoto, F. (1987).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 : 7363-7367.
- Yuspa, S., Ben, T., and Steiner, P. (1982).
J. Biol. Chem., 257 : 9906-9908.
- Yuspa, S.H., and Harris, C.C. (1974).
Exp. Cell Res, 86 : 95-105.
- Yuspa, S.H., Lichti, U., Ben, T., and Hennings, H. (1981).
Ann. N.Y. Acad. Sci., 359 : 260-274.
- Zamecnick, P.C., Goodchild, J., Yaguchi, J., and Sarin, P. (1986).
Proc. Natl. Acad. Sci., 83 : 4143-4146.
- Zamecnik, P.C., Stephenson, M.L. (1978).
Proc. Natl. Acad. Sci., 75 : 280-284.
- Zelent, A., Krust, A., Petkovich, M., Kastner, P.,
and Chambon, P. (1989).
Nature, 339 : 714-717.
- Zheng, H., Sahai, B.M., Kilgannon, P., Fotedar, A.,
and Green, D.R. (1989).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 : 3758-3762.
- Zilz, N.D., Murray, M.B., and Towle, H.C.(1990).
J.Biol.Chem., 265 : 8136-8143.

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

Pages

ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION

Figure 1. Rétinoïdes naturels et synthétiques de 1ère et 2ème génération.	10
Figure 2. Rétinoïdes synthétiques de 3ème génération.	11
Figure 3. Rétinoïdes synthétiques de 3ème génération.	12
Figure 4. Métabolisme et mécanisme d'action de l'acide rétinoïque.	28
Figure 5. Voies de transduction impliquant les PKA et PKC.	40
Figure 6. Différenciation des cellules hématopoïétiques.	47
Figure 7. Apoptose des cellules HL-60.	55
Figure 8. Réactions catalysées par les TG.	69
Figure 9. Séquences de l'ADNc de la TG de tissu des macrophages péritonéaux de souris et de l'endothélium humain.	75
Figure 10. Cinétique de l'induction par l'AR de l'ARNm de la TG de tissu des macrophages péritonéaux de souris.	81
Figure 11. Effet de la cycloheximide sur l'induction par l'AR de l'ARNm de la TG de tissu des macrophages péritonéaux de souris.	82
Figure 12. Effet de l'AR sur la stabilité de l'ARNm de la TG de tissu des macrophages péritonéaux de souris.	82
Figure 13. Induction par l'AR de l'ARNm de la TG de tissu des cellules HL-60.	84

RESULTATS

Figure 14. Niveaux d'activité personnelle au sein du laboratoire.	90
Figure 15. Modèles cellulaires pour l'étude des bases cellulaires et moléculaires d'action des rétinoïdes.	91
Figure 16. Cellules HL-60 non traitées (x1000).	93
Figure 17. Différenciation morphologique des cellules HL-60 traitées par l'AR. (x1000).	93
Figure 18. Cellules HL-60 non traitées (x400).	94
Figure 19. Différenciation morphologique des cellules HL-60 traitées par l'AR. (x400).	94
Figure 20. Différenciation fonctionnelle des cellules HL-60 traitées par l'AR.	95
Figure 21. Cellules SK-N-SH non traitées (x1000).	98
Figure 22. Différenciation des cellules SK-N-SH traitées par l'AR (x1000).	99
Figure 23. Cellules SK-N-SH non traitées (x400).	100
Figure 24. Différenciation des cellules SK-N-SH traitées par l'AR (x400).	100
Figure 25. Courbe dose-réponse de l'AR sur la différenciation des cellules HL-60.	103
Figure 26. Distribution de la TG de tissu dans diverses lignées cellulaires.	103
Figure 27. Courbe dose-réponse de l'AR sur l'activité de la TG de tissu dans les cellules HL-60.	103
Figure 28. Courbe dose-réponse de l'AR sur l'activité de la TG de tissu dans les cellules SK-N-SH.	103
Figure 29. Cinétique de l'induction par l'AR de l'activité de la TG de tissu dans les cellules HL-60.	105
Figure 30. Effets de l'AR et du DMSO sur la différenciation et l'activité de la TG dans les cellules HL-60.	105
Figure 31. Induction par l'AR de l'ARNm de la TG de tissu dans les cellules HEL.	107
Figure 32. Induction par l'AR de la protéine TG dans les cellules HL-60.	107
Figure 33. Séquences oligodésoxynucléotidiques anti-sens anti-RARs.	117

Figure 34. Effets des ODN anti-sens sur la différenciation des cellules HL-60 induites par l'AR.	118
Figure 35. Effets des ODN anti-sens sur l'activité de la TG de tissu induite par l'AR dans les cellules HL-60.	118
Figure 36. Cinétique de l'effet des ODN sur l'activité de la TG de tissu induite par l'AR dans les cellules HL-60.	118
Figure 37. Effet des ODN sur l'activité de la TG de tissu induite par l'AR à des temps précoces dans les cellules HL60.	118
Figure 38. Effet de la poly(L-lysine) sur la croissance des cellules HL-60.	120
Figure 39. Incorporation de la poly(L-lysine) fluorescente dans les cellules de fibroblastes de souris L929.	120
Figure 40. Etude de la stabilité d'un ODN dans plusieurs milieux de culture.	123
Figure 41. Etude de la stabilité d'un ODN en absence ou en présence de Lipofectin ^R .	123
Figure 42. Etude de la pénétration et de la stabilité d'un ODN dans les cellules HL-60 et HEL.	124
Figure 43. Etude de la pénétration et de la stabilité d'un ODN dans les cellules T47D et SK-N-SH.	124
Figure 44. Mise en évidence d'un complexe ARNm-ODN anti-sens.	128
Figure 45. Nouveaux acides rétinobenzoïques synthétisés au laboratoire.	131
Figure 46. Courbe dose-réponse des rétinoïdes sur la différenciation des cellules HL-60.	134
Figure 47. Courbe dose-réponse des rétinoïdes sur l'activité de la TG de tissu dans les cellules HL-60 et SK-N-SH.	134
Figure 48. Compétition entre l'acide rétinoïque et les acides rétinobenzoïques sur l'activité de la TG de tissu.	134
Figure 49. Effet des rétinoïdes sur l'expression de la protéine TG de tissu dans les cellules HL-60.	136
Figure 50. Effet de H7 et H8 sur l'activité de la TG de tissu induite par l'AR dans les cellules HL-60.	138
Figure 51. Effet de H8 sur l'activité de la TG de tissu induite par l'AR et potentialisée par l'AMPc.	138
Figure 52. Courbes dose-réponse de l'acide rétinoïque sur l'activité de la TG de tissu en présence de H7 et H8.	138

Figure 53. Effet de H7 sur l'activité de la TG de tissu induite l'AR et les acides rétinobenzoïques.	138
Figure 54. Courbes dose-réponse de l'AR sur l'activité de la TG de tissu en absence et en présence d'AMPC.	139
Figure 55. Effet de l'AMPC sur l'activité de la TG de tissu induite par les rétinoïdes.	139
Figure 56. Effet du VIP sur l'activité de la TG de tissu induite par l'AR dans les cellules SK-N-SH.	139
Figure 57. Effet de la DXM sur la différenciation des cellules HL-60 induite par l'AR.	148
Figure 58. Courbe dose-réponse de l'AR sur l'activité de la TG de tissu en absence ou en présence de la DXM dans les cellules HL-60.	148
Figure 59. Cinétique de l'effet de la DXM sur l'activité de la TG de tissu induite par l'AR dans les cellules HL-60.	148
Figure 60. Cinétique de l'effet de la DXM sur l'activité de la TG de tissu induite par l'AR dans les cellules HL-60 à des temps précoces.	148
Figure 61. Effet de la DXM sur l'activité de la TG de tissu induite par l'AR en absence ou en présence de RU486 dans les cellules HL-60.	150
Figure 62. Courbe dose-réponse des effets de la DXM et du RU486 sur l'activité de la TG de tissu induite par l'AR dans les cellules HL-60.	150
Figure 63. Effet de la DXM sur l'activité de la TG de tissu induite par l'AR en absence et en présence d'AMPC dans les cellules HL-60.	150
Figure 64. Effet de la DXM sur l'activité de la TG de tissu induite par l'AR et le Ch55 dans les cellules HL-60.	150
Figure 65. Effet de la dexaméthasone et du RU486 sur les taux de la protéine TG de tissu induits par l'AR dans les cellules HL-60.	151
Figure 66. Détection par western blot du récepteur des glucocorticoïdes dans les cellules HL-60.	153
Figure 67. Détection par northern blot du récepteur des glucocorticoïdes dans les cellules HL-60.	153
Figure 68. Effet de la DXM et du RU486 sur l'activité de la TG de tissu induite par l'AR dans différentes lignées cellulaires.	154
Figure 69. Effet de la DXM sur l'expression de la protéine TG de tissu induite par l'AR dans les cellules HEL.	154
Figure 70. Effet de la DXM sur les taux d'ARNm de la TG de tissu induits par l'AR dans les cellules HEL.	154

Figure 71. Détection par western blot du récepteur des glucocorticoïdes dans les cellules HEL.	156
Figure 72. Détection par northern blot du récepteur des glucocorticoïdes dans les cellules HEL.	156
Figure 73. Les trois principaux mécanismes qui sous-tendent la régulation négative de la transcription de gènes par la DXM.	163

TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau I. Modèles <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> utilisés pour l'étude des rétinoïdes.	15
Tableau II. Comparaison des éléments de réponse liant l'ADN dans les séquences répétées directes et palindromiques.	35
Tableau III. Transcription <i>in vitro</i> du gène de la TG de tissu à partir des noyaux isolés de cellules HL-60 traitées ou non par l'AR ("run-on").	81
Tableau IV. Inhibition anti-sens de l'expression de quelques gènes dans les cellules eucaryotes.	110

RESULTATS ET DISCUSSION.

Tableau V. Etude de la pénétration intra-cellulaire d'un ODN dans plusieurs lignées cellulaires.	121
Tableau VI. Effets des rétinoïdes sur la différenciation et la toxicité des cellules HL-60 et SK-N-SH.	135
Tableau VII. Effets des rétinoïdes sur l'activité de la TG de tissu des cellules HL-60 et SK-N-SH.	135

