

50376
1994
17

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

50376
1994
17

Année 1994

N° d'ordre : 1292

Thèse

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

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

par

Isabelle GRILLIER



PHARMACOLOGIE MOLECULAIRE DES RETINOÏDES :
ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE DE
NOUVEAUX RETINOIDES DE SYNTHESE

¹⁹⁹⁴
Présentée le 16 février devant la commission d'examen

JURY

Président :	Professeur S. Ball
Rapporteurs :	Docteur H. de Thé Professeur U. Reichert
Examineurs :	Professeur P. Formstecher Professeur B. Sablonnière

A la mémoire de mes grands-parents

A ma famille

En témoignage de ma profonde reconnaissance et en remerciement
de son soutien tout au long de mes études

A mes amis

Pour leur précieux soutien et leur encouragement

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué au Laboratoire de Biochimie Structurale de la Faculté de Médecine de Lille dirigée par Messieurs les Professeurs M. Dautrevaux puis P. Formstecher.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur S. Ball d'avoir accepté volontiers la présidence de cette thèse.

Je remercie Messieurs les Docteurs H. de Thé et U. Reichert d'avoir accepté de juger ce travail. Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur Dautrevaux pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pendant toute la durée de cette thèse.

Monsieur le Professeur P. Formstecher,

Je tiens à vous adresser toute ma reconnaissance, vous avez été à l'origine de ce travail et vous m'avez fait bénéficier de votre rigueur scientifique, de vos vastes connaissances et de votre enthousiasme. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements et de ma profonde considération.

Monsieur le Professeur B. Sablonnière,

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour avoir guidé ce travail. Votre disponibilité permanente et vos nombreux conseils m'ont beaucoup aidé.

Je voudrais remercier tous ceux qui à divers titres ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail:

En particulier D. Manechez, qui m'a initié à la biologie cellulaire avec beaucoup d'enthousiasme, C. Richard et M.T Belin avec lesquelles ce fut un plaisir de travailler et également W. Bourguet pour toute la partie chimique, P. Lefebvre pour ses conseils toujours très judicieux en particulier en anglais...ainsi que P.M Danzé.

D. Belaïche pour m'avoir aidé à corriger avec patience ce document et N. Dallery avec qui j'ai partagé ces trois années de recherches.

Je remercie très chaleureusement également, tout le personnel du laboratoire, en particulier F. Delporte, M. Tual et B. Masselot pour leur assistance technique en culture cellulaire et plus simplement pour leur présence amicale,

sans oublier S.Tournay qui a surveillé la dactylographie de ce mémoire.

Je remercie également le Ministère de la Recherche et de la Technologie qui a financé ces trois années de travail.

Ce travail réalisé dans le laboratoire de Biochimie Structurale de la Faculté de Médecine de Lille sous la direction de Monsieur le Professeur P. Formstecher a fait l'objet des publications et communications suivantes.

A) Publications dans des revues internationales

1- DALLERY. N, SABLONNIERE. B, **GRILLIER. I**, FORMSTECHEP. P ET DAUTREVAUX. M.

Purification and Fonctional Characterization of the Ligand-Binding Domain From the Retinoic Acid Receptor α : Evidence that Sulphydryl Groups Are Involved in Ligand-Receptor Interactions.

Biochemistry, 1993, **32**, 12428-12436.

2- SABLONNIERE. B, DALLERY. N, **GRILLIER .I**, FORMSTECHEP. P ET DAUTREVAUX. M.

Physicochemical Parameters Affecting the Charcoal Adsorption Assay for Quantitative Retinoid-Binding Measurement.

Sous presse dans Analytical Biochemistry

B) Communications à des congrès par affiche

3 -MANECHEZ. D, .TBARKA. N, **GRILLIER. I**, RICHARD. C, DANZE, P. M, FORMSTECHEP. P et DAUTREVAUX. M

Repression by Glucocorticoids of Retinoic Acid Induced Transglutaminase Expression in Human Promyelocytic Cell HL60

Third international conference on transglutaminase and protein crosslinking reaction. Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, June 7-10, 1992, USA.

4- **GRILLIER. I**, SABLONNIERE. B, FORMSTECHEP. P et DAUTREVAUX .M

Expression transitoire des récepteurs de l'acide rétinoïque hRAR α et β dans les cellules Cos utilisant un système inductible : intérêt pour l'étude des relations structure-activité de nouveaux rétinoïdes.

Forum des jeunes chercheurs, Caen, France, Juillet 7-10 1992.

5- **GRILLIER. I, BOURGUET. W, MANECHEZ. D, SABLONNIERE. B, CHEN .JY, FORMSTECHER.P and DAUTREVAUX.M**

Structure Activity Relationships of Novel Substituted Chalcone Derivatives.

The 10th symposium on advances in skin pharmacology "From molecular biology to therapeutic"

CIRD GALDERMA, Sophia antipolis, Valbonne, France, October 1-3 1992.

6- **GRILLIER. I, BOURGUET. W, SABLONNIERE. B, CHEN. JY, FORMSTECHER.P et DAUTREVAUX.M**

Relations structure-activité de nouveaux rétinoïdes dérivés chalcones et triphénylethyléniques de l'acide rétinoïque.

Les 7 èmes journées Franco-Belges de pharmacochimie "De la conception à la réalisation en pharmacochimie", Lille , France, 4-6 Mai 1993.

Résumé

Les rétinoïdes, dérivés actifs de la vitamine A, exercent des effets biologiques multiples. Ils participent notamment au contrôle de l'homéostasie tissulaire. Le mécanisme d'action de ces molécules commence à être élucidé. Il nécessite la liaison à des récepteurs nucléaires, récemment clonés, qui se comportent alors comme des facteurs de transcription inductibles.

Leur application thérapeutique, longtemps restreinte à dermatologie, commence à apparaître prometteuse dans le domaine de la cancérologie. Leur toxicité, limite néanmoins leur utilisation. La conception de molécules antagonistes et/ou spécifiques offre l'espoir de restreindre cette toxicité cellulaire.

Dans cette perspective, nous avons mis en place des modèles pharmacologiques pour étudier les relations structure-activité de nouvelles molécules. Ces modèles permettent une évaluation des rétinoïdes de synthèse, à partir de trois démarches essentielles ; la mesure de l'activité de liaison, la mesure de l'activité transactivatrice *in vitro* et la mesure de réponses biologiques : l'induction de la différenciation et l'étude d'une réponse primaire : l'expression de la transglutaminase de tissu.

Au total, cette étude a permis le développement de molécules agonistes aussi bien, dans les réponses biologiques mesurées sur des cellules transfectées que dans des modèles de différenciation cellulaire utilisant les cellules HL 60.

Nous avons également obtenu des produits à activité agoniste sélective des récepteurs α et β à la fois au niveau de l'activité de liaison et de l'activité transactivatrice, ainsi qu'un composé à activité plus spécifique des récepteurs γ . Cette activité antagoniste est très modeste, mais néanmoins significative. Malheureusement, dans les modèles HL 60, ces composés triphényléthyléniques se révèlent totalement inactifs aussi bien dans l'induction de la transglutaminase, que dans celle de la différenciation.

Un point particulièrement intéressant a également été révélé, c'est la discordance entre l'activité de liaison au récepteur et l'activité transactivatrice du composé Ch55 et de certains de nos dérivés.

Enfin les rétinoïdes interagissent avec d'autres voies de transduction, au niveau de certaines réponses biologiques, comme c'est le cas pour les glucocorticoïdes qui répriment l'effet de la transglutaminase. Nous avons montré que pour deux lignées cellulaires leucémiques, cette inhibition nécessite un récepteur des glucocorticoïdes fonctionnel.

GLOSSAIRE

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
AMPc :	Adénosine Monophosphate cyclique
AR :	Acide rétinoïque
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
CAT :	Chloramphénicol Acétyl transférase.
CE50	Concentration Efficace 50%
CL50 :	Concentration Létale 50%
CL100 :	Concentration Létale 100%
CME :	Concentration Minimum Efficace
Cos :	Cellules fibroblastiques de rein de singe
CRABP :	Cellular Retinoic Acid Binding Protein
CRPB :	Cellular Retinol Binding Protein
CRE :	Cyclic AMP Responsive Element
DE50% :	Dose Efficace 50%
DMBA :	7,12-Diméthylbenzanthracène
DTT :	Dithiothreitol
DXM :	Dexaméthasone
HBV:	Virus de l'hépatite B
HEL :	Human Erythroleukemia
HL 60 :	Human Leukemia
Hox :	Gènes homéotiques de vertébrés
HRE :	Hormone Response Element
Kd :	Constante de dissociation à l'équilibre
Ki :	Constante d'inhibition
MMTV :	Mouse Mammary Tumor Virus
NBT :	Nitrobleu de Tétrazolium

pb :	Paire de base
pKA:	Protéine Kinase A
pKC :	Protéine Kinase C
RAR :	Retinoic Acid Receptor
RARE :	Retinoic Acid Response Element
RBP :	Retinol Binding Protein
RSBP :	Retinoid Specific Binding Protein
RXR :	Récepteurs des rétinoïdes différents des RAR : récepteur du rétinoïde X
RXRE :	Elément de réponse des RXRs
SV40 :	Simian Virus 40
TAF :	Transactivation function
TG :	Transglutaminase
TPA :	12-O-Tetradecanoyl phorbol-13-Acetate
TRAP :	Thyroid Hormone Receptor Auxiliary Protein
TRE :	Thyroid Response Element
Tris :	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TTR :	Trans Thyrétine
VDR :	Récepteur de la vitamine D

TABLE DES MATIERES

REVUE GENERALE	p15
<u>I - ACIDE RETINOIQUE ET RETINOIDES NATURELS</u>	p18
1 - DEFINITION	p18
2 - STRUCTURE CHIMIQUE DES RETINOIDES NATURELS	p18
3 - METABOLISME	p20
3.1 Absorption intestinale du rétinol	p20
3.2 Capture des chylomicrons	p20
3.3 Transfert du rétinol dans les cellules cibles	p22
3.4 Métabolisme intracellulaire	p22
<u>3.4.1 Obtention de métabolites actifs</u>	p22
<u>3.4.2 Le catabolisme de l'acide rétinoïque</u>	p25
4 - LES EFFETS BIOLOGIQUES DE L'ACIDE RETINOIQUE	p25
4.1 Action sur la morphogénèse	p26
<u>4.1.1 Formation du bourgeon d'aile chez le poulet</u>	p26
<u>4.1.2 Zone d'activité polarisante</u>	p26
<u>4.1.3 Les gènes Hox et l'acide rétinoïque</u>	p28
<u>4.1.4 Conclusion</u>	p29
4.2 La différenciation cellulaire	p29
<u>4.2.1 La différenciation des épithélia cutanés</u>	p29
<u>4.2.2- La différenciation des cellules cancéreuses</u>	p32
5 - UTILISATION THERAPEUTIQUE DES RETINOIDES	p34
5.1 Traitement curatif	p34
5.2 Traitement préventif	p36
<u>II - MECANISME D'ACTION DE L'ACIDE RETINOIQUE</u>	p37
1 - LES PROTEINES LIANT LES RETINOIDES	p37
1.1 Les protéines cytoplasmiques	p37
1.2 Les protéines nucléaires	p41
<u>1.2.1 Les récepteurs de l'acide rétinoïque</u>	p41

a) La découverte	p41
b) Structure des RARs	p43
- <u>Le domaine A/B</u>	p46
- <u>Le domaine C</u>	p46
- <i>Structure</i>	p46
- <i>Reconnaissance de l'ADN</i>	p51
- <i>Fonction de dimérisation</i>	p51
- <u>Le domaine D</u>	p51
- <u>Le domaine E</u>	p53
- <i>La région LI</i>	p53
- <i>La région Ti</i>	p53
- <i>La région de dimérisation</i>	p53
- <i>La région L2</i>	p54
<u>Le domaine F</u>	P54
c) Les isoformes des RARs	p54
- <i>Structure</i>	p54
- <i>Expression</i>	P55
<u>1.2.2 Une nouvelle classe de récepteur de l'acide rétinoïque : Les RXRs</u>	
a) Découverte	
b) Structure	p56
c) Le ligand	p57
2 LA REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE	p59
2.1 Les éléments de réponse	p59
2.2 Spécificité des éléments de réponse	p59
2.3 Le mécanisme de l'activation transcriptionnelle	p61
2.4 Les mécanismes de la répression transcriptionnelle	p65
<u>2.4.1 Fixation sur les mêmes sites d'ADN</u>	p65
<u>2.4.2 Interaction protéine-protéine</u>	p65
2.5 Conclusion	p68
2.6 Pathologie	p69
3 - AUTRES MECANISMES D'ACTION	p71
3.1 Les protéines kinases	p71
3.2 Les effets post-transcriptionnels	p71

III ETUDES DES RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE DES RETINOIDES DE SYNTHESE

1 - LES ETUDES MENEES SUR LES RECEPTEURS NATURELS	p73
2 - RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE DES RETINOIDES SUR LA BASE DE LEURS ACTIVITES BIOLOGIQUES	p74
2.1 Tests biologiques utilisés	p74
<u>2.1.1 in vitro</u>	p74
a) Culture d'organes	p74
b) Cultures cellulaires	p75
<u>2.1.2 in vivo</u>	p76
2.2 Les résultats	p77
2.2.1 Les rétinoïdes de première génération	p77
2.2.2 Les rétinoïdes de deuxième génération	p77
2.2.3 Les rétinoïdes de troisième génération	p79
3 RELATION STRUCTURE-ACTIVITE DES RETINOIDES ET RECEPTEURS RECOMBINANTS	p84
3.1 Etude de la liaison récepteur-ligand	p84
<u>3.1.1 Modèles d'étude de la liaison récepteur-ligand</u>	p84
a) Les systèmes procaryotes	p84
b) Les systèmes d'expression eucaryotes	p84
Expression dans les cellules SF9 infectées par Baculovirus	p84
Les cellules transfectées	p84
<u>3.1.2 Les résultats</u>	p85
3.2 Mesure de l'effet transactivateur	p88
<u>3.2.1 Principe</u>	p88
<u>3.2.2 les résultats</u>	p88
3.4 Les ligands antagonistes	p90
3.5 Les ligands spécifiques des RXRs	p92

RESULTATS ET DISCUSSION p93

PREMIERE PARTIE : ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE ACTIVITE DE NOUVEAUX RETINOIDES DE SYNTHESE p96

I - PRESENTATION DES MOLECULES p97

1 - Les ligands destinés à la chromatographie d'affinité	p97
1.1 Structure chimique des rétinoïdes de synthèse	p97
1.2 Conception de ces ligands	p97
2 - Conception d'antagonistes potentiels	p97
2.1 Structure chimique des rétinoïdes de synthèse	p99
2.2 Stratégie de mise en oeuvre	p100
<u>2.2.1 Les composés chalcones</u>	p101
<u>2.2.2 Les composés triphényléthyléniques</u>	p103

II- ETUDES DES RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE

1 - DIFFERENTES ETAPES EMPLOYEES POUR L'ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE DES RETINOIDES	p103
2 - ETUDE DE L'ACTIVITE DE LIAISON DES RETINOIDES	P103
2.1 Choix du récepteur recombinant	p105
<u>2.1.1 Récepteurs recombinants eucaryotes produits dans les cellules transfectées</u>	p105
a) Présentation du modèle	p105
b) Obtention de la protéine recombinante	p107
<u>2.1.2 Récepteurs recombinants produits dans les cellules SF 9 infectées par baculovirus : (Baculovirus Expression Vector System : BEVS)</u>	p109
a) Présentation du modèle	p109
b) Principe de la production du recepteur	p109
<u>2.1.3 Les récepteurs recombinants bactériens</u>	p111
a) Présentation du modèle	p111
b) Principe de la production de la protéine recombinante	p113
<u>2.1.4 Conclusion</u>	p113
2.2 Principe de la mesure de l'activité de liaison	p113
<u>2.2.1 Constante de dissociation</u>	p113
a) Définition de la constante de dissociation	p113
b) Détermination du Kd	p114
<u>2.2.2 Constante d'inhibition</u>	p114
a) Définition	p114
b) Détermination de la valeur du Ki	p114
2.3 Etudes de Scatchard	p115
2.4 Compétitions	p119
3 - MESURE DE L'EFFET TRANSACTIVATEUR	p122

3.1 Principe	p122
<u>3.1.1 Présentation du modèle</u>	p122
<u>3.1.2 Validation du modèle</u>	p123
<u>3.1.3 Calcul de la concentration efficace à 50%</u>	p123
3.2 Résultats et interprétation	p123
3.3 Conclusion	p127
4 - AUTRES TESTS BIOLOGIQUES	p129
4.1 Rétinoides de synthèse et différenciation cellulaire	p129
<u>4.1.1 Présentation du modèle</u>	p129
<u>4.1.2 Résultats et interprétations</u>	p130
<u>4.1.3 Conclusion</u>	p131
4.2 Induction de la transglutaminase	p131
<u>4.2.1 Présentation du modèle</u>	p132
<u>4.2.2 Principe du dosage</u>	p134
<u>4.2.3 Résultats et interprétation</u>	p134
<u>4.2.4 Conclusion</u>	p136
<u>DEUXIEME PARTIE : ETUDE DU CONTROLE DE L'EXPRESSION DE LA TRANSGLUTAMINASE DE TISSU PAR LES RETINOIDES ET LES GLUCOCORTICOIDES</u>	p137
1 - RESULTATS ACQUIS PRECEDEMMENT	p138
2 - RESULTATS PERSONNELS ET INTERPRETATION	p138
3 - CONCLUSION	p142
<u>CONCLUSION</u>	p143
<u>APPENDICE TECHNIQUE</u>	p146
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p165

REVUE GENERALE

L'acide rétinoïque, dérivé actif de la vitamine A joue un rôle fondamental dans de nombreuses étapes de la vie cellulaire. Il est notamment impliqué dans la morphogenèse et dans le contrôle de l'homéostasie tissulaire (régulation de la prolifération, de la différenciation et de la mort cellulaire programmée ou "apoptose"). Ces effets suscitent naturellement beaucoup d'intérêt en pathologie humaine.

Les effets biologiques de l'acide rétinoïque nécessitent l'intervention de récepteurs nucléaires. Une première famille de récepteurs a été décrite, elle comprend trois membres RAR α , β , γ . Plus récemment, une deuxième famille de récepteurs, agissant comme des co-régulateurs des récepteurs RARs a été découverte. Il s'agit des récepteurs RXR α , β , γ . Ils lient préférentiellement un métabolite de l'acide rétinoïque, l'acide 9 cis rétinoïque. Cette famille de récepteurs appartient à la vaste famille des récepteurs nucléaires qui comprend de nombreuses protéines dont notamment les récepteurs stéroïdiens et thyroïdiens. Ce sont des facteurs de transcription inductibles par un ligand spécifique.

L'action des rétinoïdes sur la différenciation de nombreux types cellulaires explique l'intérêt porté à ces molécules en thérapeutique. Ainsi depuis quelques années, l'utilisation des rétinoïdes a connu des progrès extrêmement prometteurs, non seulement en dermatologie, mais aussi et surtout en cancérologie.

C'est ainsi que dans la leucémie à promyélocytes, le traitement par l'acide rétinoïque permet la stimulation du programme de différenciation cellulaire et l'obtention de rémissions. Cette possibilité thérapeutique offre des perspectives tout à fait nouvelles par rapport à l'utilisation classique de la chimiothérapie et a relancé de manière spectaculaire l'intérêt porté à la pharmacochimie des rétinoïdes.

Les rétinoïdes présentent malheureusement de nombreux effets toxiques notamment tératogènes. Leur faible indice thérapeutique justifie la recherche de composés à action sélective, c'est-à-dire orientés vers la reconnaissance d'un seul des trois récepteurs, ainsi que la recherche d'antagonistes. C'est dans cette optique que nous avons mis en place, avec d'autres au laboratoire, des modèles d'étude des relations structure-activité de nouveaux rétinoïdes de synthèse.

Ces modèles permettent une évaluation des rétinoïdes de synthèse, conçus par un groupe de chimistes de Lille I (J-L Bernier et son équipe), à partir de trois démarches essentielles.

- Mesure de l'activité de liaison des rétinoïdes

- Mesure de l'activité transactivatrice *in vitro*

- Mesure de réponses biologiques : l'induction de la différenciation et l'étude d'une réponse primaire : l'expression de la transglutaminase de tissu.

Nous avons également participé à l'étude de la régulation par l'acide rétinoïque et les glucocorticoïdes, de cette réponse primaire dans deux lignées cellulaires leucémiques.

Nous développerons notre revue générale autour de trois points forts, les molécules naturelles et leur métabolisme, la régulation transcriptionnelle combinatoire des RARs et la pharmacologie des rétinoïdes. Ces trois points sont en effet essentiels à la compréhension de notre travail.

I ACIDE RETINOIQUE ET RETINOIDES NATURELS

1 - DEFINITION

L'acide rétinoïque est un métabolite actif de la vitamine A. Cette dernière molécule est responsable de nombreux effets biologiques. Elle intervient notamment dans la reproduction, la croissance et les mécanismes de la vision. Mais la vitamine A ou rétinol n'est pas à proprement parler le responsable direct de l'ensemble de ces effets. De nombreux métabolites sont maintenant identifiés. Les principaux sont l'acide rétinoïque et le rétinaldéhyde.

L'acide rétinoïque exerce de très nombreux effets propres, sur des mécanismes biologiques essentiels comme la morphogénèse, la croissance et la différenciation cellulaire.

Le rétinaldéhyde, métabolite d'oxydation du rétinol, joue un rôle essentiel dans la perception visuelle de nuit. L'ensemble des métabolites définissent les "rétinoïdes naturels".

2 - STRUCTURE CHIMIQUE DES RETINOIDES NATURELS

Les rétinoïdes naturels sont représentés principalement par le rétinol, le 11 cis rétinaldéhyde et l'acide rétinoïque (Figure 1).

La structure des rétinoïdes est globalement hydrophobe. Ce sont des hydrocarbures polyisopréniques qui comportent donc cinq doubles liaisons conjuguées. Ces dernières expliquent la sensibilité particulière de ces molécules à la lumière et à l'oxydation.

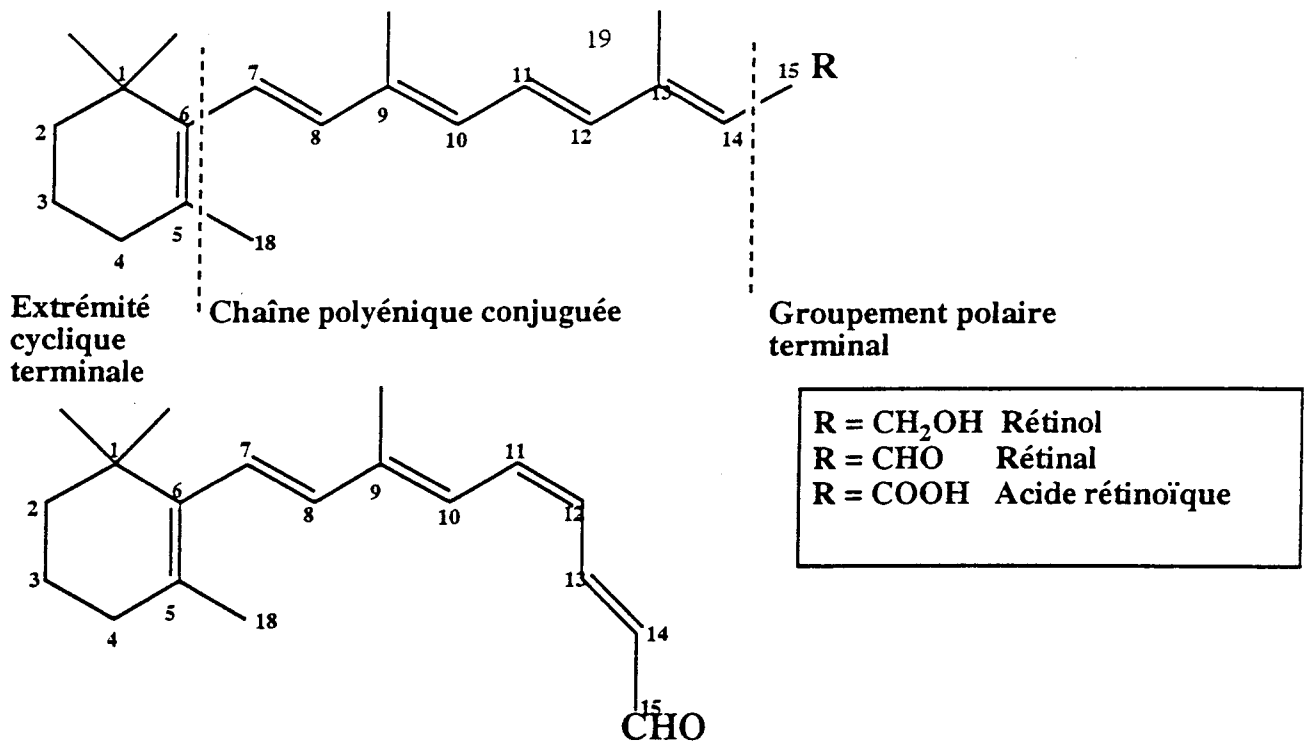
La structure des rétinoïdes comporte 3 parties :

- une extrémité cyclique terminale hydrophobe,
- une chaîne polyénique,
- une extrémité polaire.

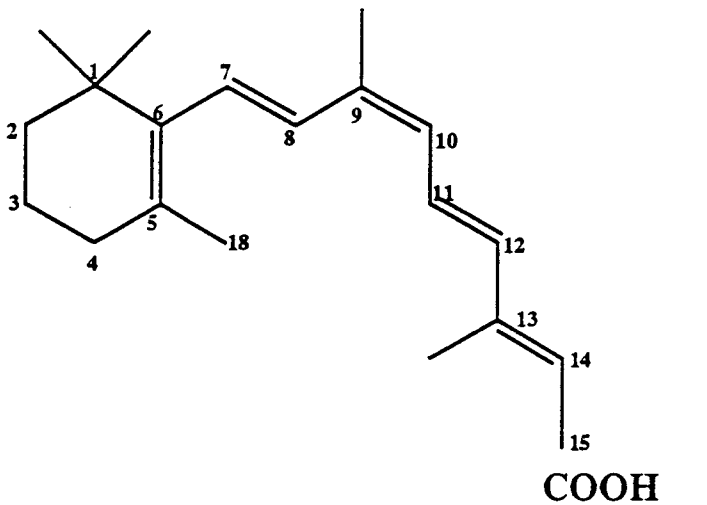
C'est l'extrémité polaire qui porte le groupement fonctionnel :

- CH₂OH pour le rétinol,
- CHO pour le rétinal,
- COOH pour l'acide rétinoïque.

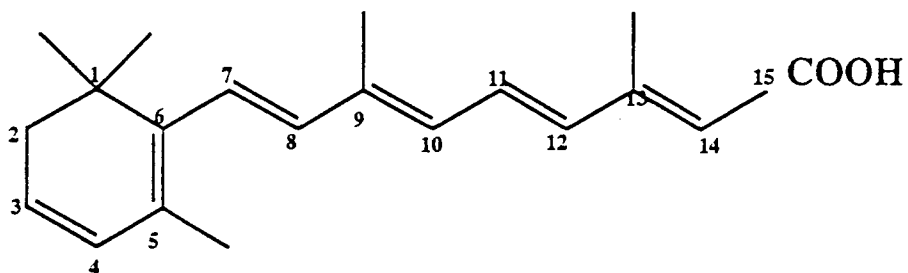
Le 11 cis rétinaldéhyde est caractérisé par une double liaison 11-12 en configuration cis, ce qui entraîne une cassure de l'axe de la molécule au niveau de sa chaîne latérale.



11 cis rétinaldéhyde



Acide 9 cis rétinoïque



Acide 3-4 didéhydro rétinoïque

Figure 1 : Structure des principaux rétinoïdes naturels

D'autres rétinoïdes ont été découverts plus récemment : l'acide 3-4 didéhydrorétinoïque qui intervient dans la morphogenèse des membres (Thaler *et al.*, 1990) et l'acide 9 cis rétinoïque (Levin *et al.*, 1992).

3 - METABOLISME

3.1 Absorption intestinale du rétinol

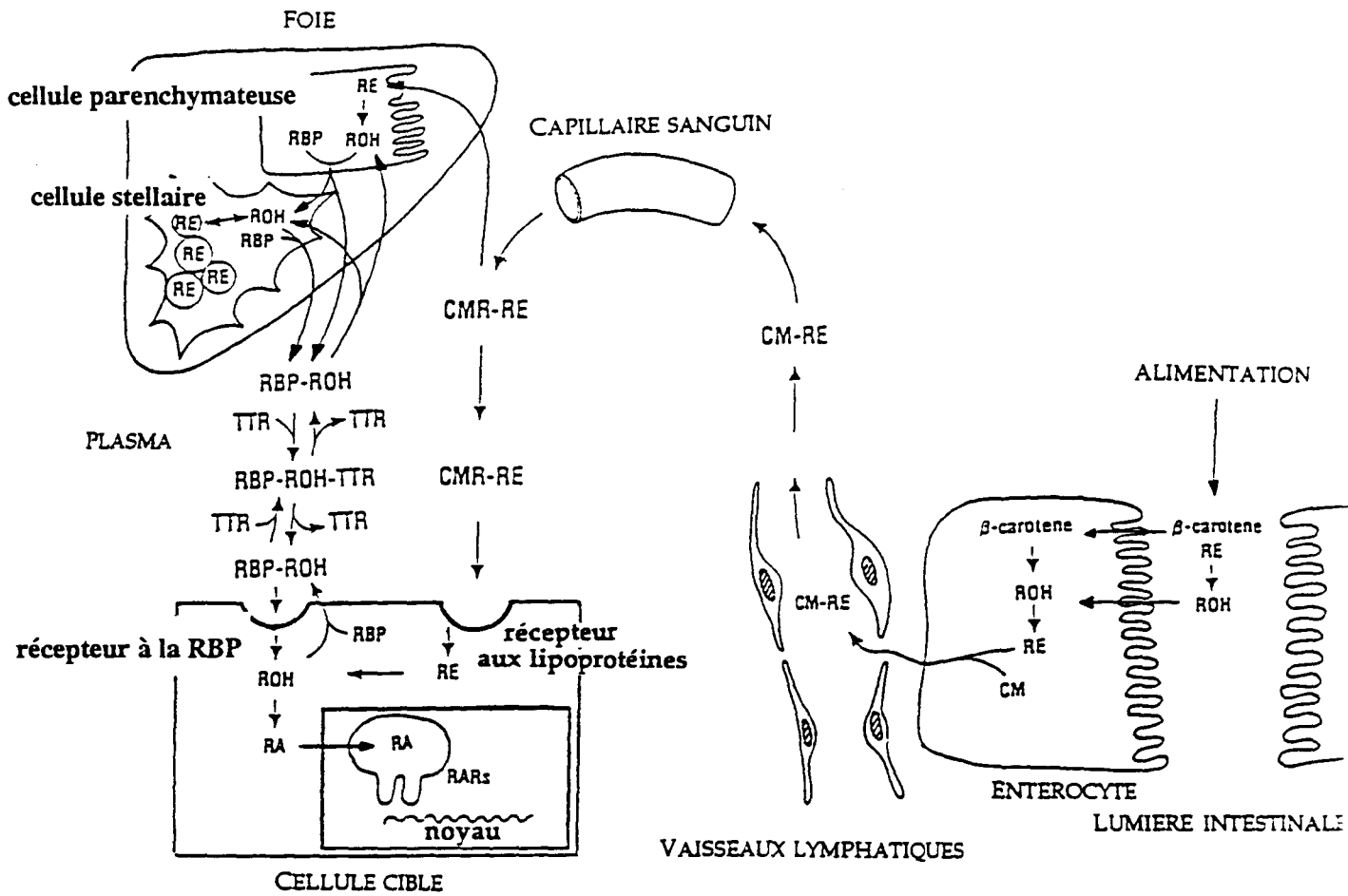
Les principales sources alimentaires de la vitamine A sont les esters du rétinol, d'origine animale et les β caroténoïdes (provitamine A) d'origine végétale. Après ingestion, la majorité des esters du rétinol sont hydrolysés enzymatiquement en rétinol dans la lumière intestinale (Goodman et Blaner, 1984 ; Ong *et al.*, 1993). Les β caroténoïdes sont convertis en rétinol puis en rétinol dans les entérocytes (Blomhoff *et al.*, 1990). Le taux de conversion est plus faible pour les β -carotènes (70%) que pour les esters du rétinol (90%). Le rétinol est ensuite estérifié par des acides gras à longues chaînes puis incorporé dans les chylomicrons. Ces derniers sont alors déversés dans la lymphe puis dans le sang où ils subissent l'action de la lipoprotéine lipase, ce qui aboutit à la formation de chylomicrons résiduels.

3.2 Capture des chylomicrons

Deux voies s'offrent alors aux chylomicrons résiduels. La première, majoritaire, est la capture des chylomicrons résiduels par les cellules parenchymateuses du foie. La deuxième voie, minoritaire, est la capture directe par les cellules périphériques. Cette voie est particulièrement utilisée en période d'intense prolifération et différenciation des cellules immunitaires (Blomhoff *et al.*, 1990).

Le mécanisme de cette capture est encore mal connu, il interviendrait *via* un processus actif qui mobiliserait des récepteurs proches de ceux des LDL.

Au niveau des cellules parenchymateuses du foie, les esters du rétinol sont rapidement hydrolysés en rétinol. Ce dernier associé à une protéine de liaison, la Retinol Binding Protein (RBP), est alors excrété de manière paracrine dans les cellules stellaires du foie où il peut être stocké durant plusieurs mois. Le complexe rétinol-RBP est ensuite excrété dans le sang et son taux circulant est précisément régulé (Blomhoff *et al.*, 1990). La majeure partie du complexe se lie réversiblement à une deuxième protéine la Transthyréline (TTR) (Figure 2). La fonction principale de cette protéine est d'éviter la filtration glomérulaire du complexe RBP-rétinol.



ROH = Rétinol
 RE = Esters du rétinol
 CM = Chylomicron
 CMR = Chylomicron résiduel
 RBP = Retinol binding protein
 TTR = transthyretine
 RA = Acide rétinoïque
 RAR = Récepteur de l'acide rétinoïque

Figure 2 : Absorption, stockage, métabolisme de la vitamine A (D'après Blomhoff *et al.*, 1990)

3.3 Transfert du rétinol dans les cellules cibles

Le mécanisme de pénétration du rétinol dans les cellules cibles n'est pas clairement établi. Des études cinétiques suggèrent l'existence d'un récepteur membranaire de la RBP qui permettrait une pénétration active du rétinol (Eriksson *et al.*, 1986). L'équipe de Bavik (Bavik *et al.*, 1991) a mis en évidence la présence d'un tel récepteur au niveau des cellules du pigment rétinien bovin et l'homologue a été décrit chez la souris (Donovan *et al.*, 1993). Cependant, pour l'instant aucun récepteur n'a été caractérisé dans d'autres lignées cellulaires. Pour la plupart des cellules la diffusion passive est vraisemblablement le mécanisme prépondérant.

3.4 Métabolisme intracellulaire

Au niveau cytoplasmique, le rétinol peut suivre deux voies métaboliques. La première est la transformation en métabolites actifs responsables des effets biologiques des rétinoïdes. La deuxième est le catabolisme de ce composé.

3.4.1 Obtention de métabolites actifs

Deux mécanismes entraînent la formation de ces composés (Figure 3) :

- l'oxydoréduction,
- l'isomérisation.

La synthèse *in situ* de l'acide rétinoïque à partir du rétinol nécessite plusieurs types de déshydrogénases, notamment l'alcool déshydrogénase cytosolique. D'autres enzymes ont été également mises en évidence, telles qu'une rétinol déshydrogénase microsomiale, oxydant le rétinol en rétinal ainsi qu'une rétinal déshydrogénase cytosolique, métabolisant le rétinal en acide rétinoïque de manière irréversible (Leo *et al.*, 1987 ; Napoli *et al.*, 1991 ; Blomhoff *et al.*, 1990 ; Ross, 1993).

Les processus d'isomérisation, quant à eux, sont peu décrits. Le 11 cis rétinaldéhyde peut être généré à partir des esters du rétinol par l'intervention d'une isomérohydrolase. Un processus similaire est évoqué pour l'acide 9 cis rétinoïque (Rondo *et al.*, 1993).

De nombreux progrès restent encore à faire pour élucider ces processus car l'équipement enzymatique qui aboutit à la formation de métabolites actifs n'est pas clairement identifié.

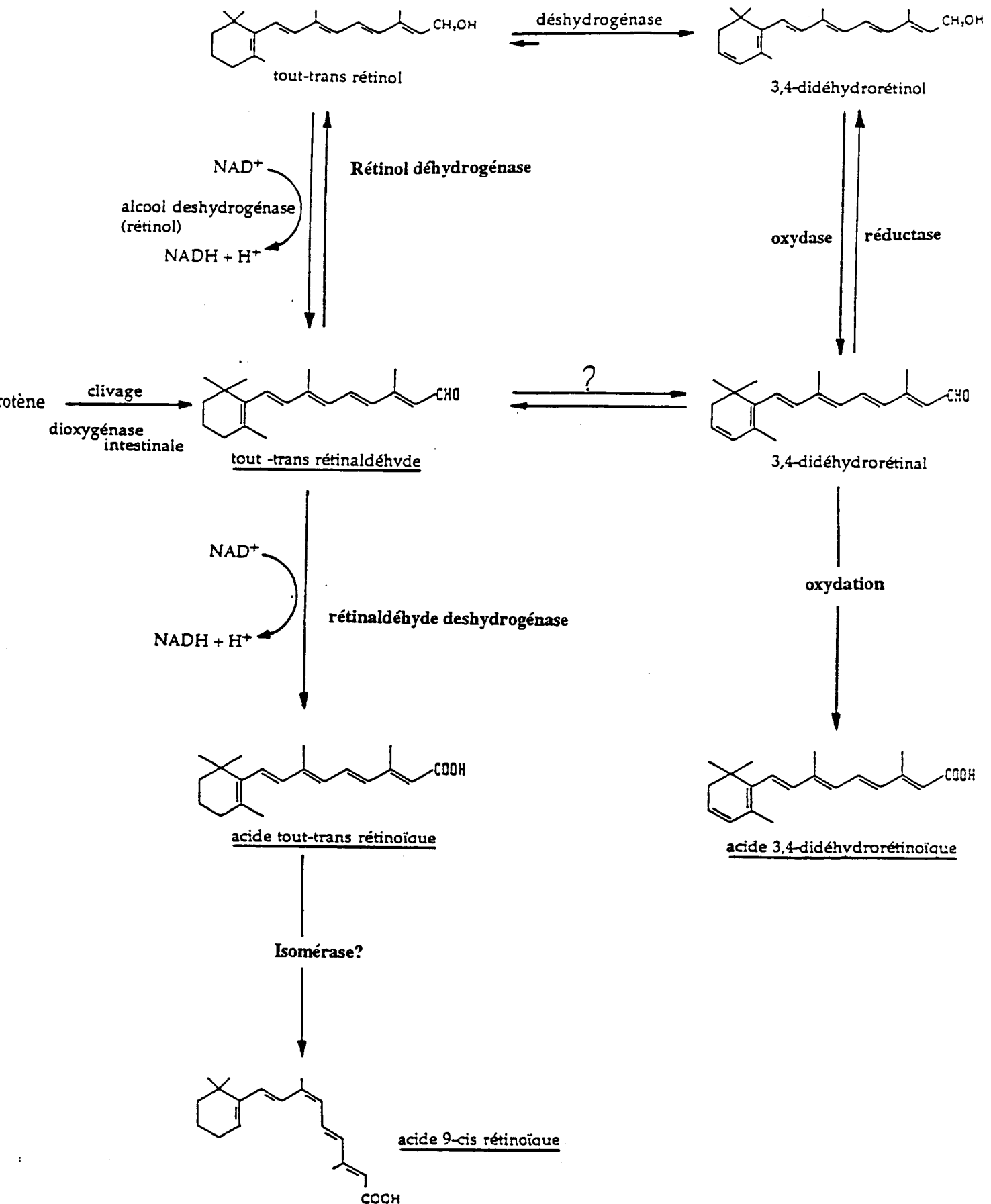


Figure 3 : Synthèse de l'acide tout trans rétinolique et d'autres métabolites actifs de la vitamine A

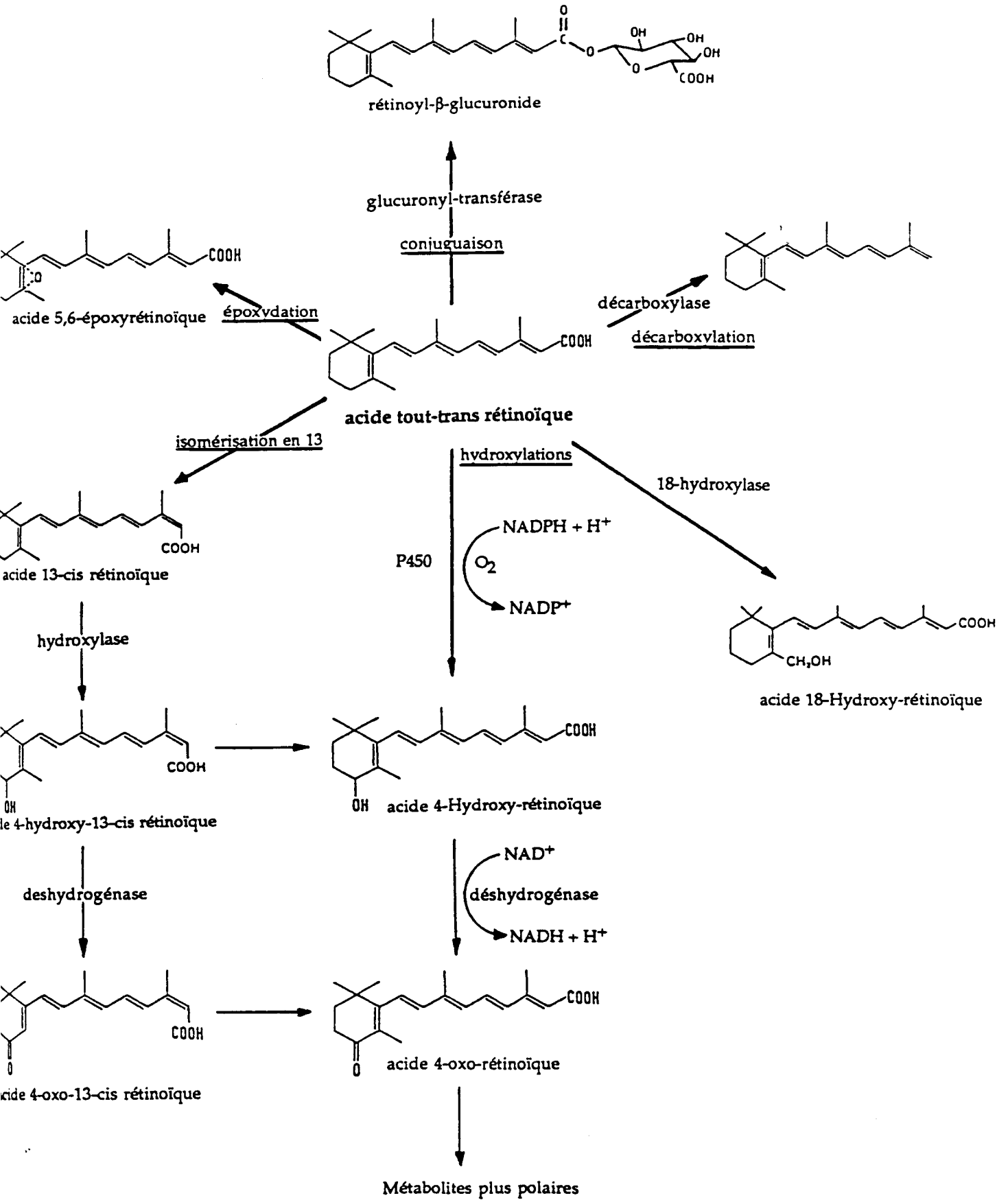


Figure 4 : Catabolisme de l'acide tout trans rétinolique

3.4.2 Le catabolisme de l'acide rétinoïque

La principale voie est oxydative (Roberts, 1979, 1980 ; Blomhoff *et al.*, 1992), elle se tient dans les microsomes hépatiques et aboutit à la formation de dérivés plus polaires. Ce processus nécessite l'intervention du cytochrome P450 (Van den Bossche et Willensens., 1991). Elle s'accompagne d'hydroxylations diverses essentiellement en 4 et en 18 (Blomhoff *et al.*, 1992) :

- l'acide 4-hydroxyrétinoïque,
- l'acide 4-oxorétinoïque,
- l'acide 18-hydroxyrétinoïque.

Les autres voies métaboliques sont :

- l'isomérisation : l'acide 13 trans rétinoïque est isomérisé en acide 13 cis rétinoïque, produit métabolisé à son tour en 4-oxo-13 cis rétinoïque.

- la décarboxylation

- l'époxydation : un seul métabolite est actuellement connu, l'acide 5-6 époxyrétinoïque.

- la conjugaison hépatique, elle s'effectue à l'aide de l'acide β - glucuronique ou de la taurine, 3 composés ont été identifiés :

- le rétinoyl β -glucuronide (sous sa forme tout trans),
- le 13 cis β -glucuronide,
- la rétinotaurine.

L'élimination des composés est effectuée par voie urinaire comme pour le rétinoyl β -glucuronide ou par les fèces, comme pour l'acide 4-oxorétinoïque, l'acide 18-hydroxyrétinoïque, l'acide époxyrétinoïque et l'acide rétinoïque tout trans.

4 - LES EFFETS BIOLOGIQUES DE L'ACIDE RETINOIQUE

Les effets biologiques de l'acide rétinoïque sont multiples. Chez l'adulte, ils participent au contrôle de l'homéostasie tissulaire. Celle-ci résulte d'un subtil équilibre entre prolifération, différenciation et apoptose. Il serait illusoire de présenter l'action des rétinoïdes de manière exhaustive. Aussi, parmi ces différents effets nous nous intéresserons au rôle de l'acide rétinoïque dans l'embryogenèse, processus biologique essentiel, dans la différenciation épithéliale cutanée du fait de son intérêt dans l'étude pharmacologique des rétinoïdes. Enfin, nous aborderons la différenciation des cellules cancéreuses.

4.1 Action sur la morphogénèse

Au cours de l'évolution, les êtres vivants ont atteint un niveau d'organisation croissant. Les cellules se sont diversifiées dans un premier temps en deux types cellulaires, animaux diploblastiques, puis trois, animaux triploblastiques. Avec l'apparition de la reproduction sexuée sont apparus les premiers embryons. Les premières cellules initialement totipotentes sont alors sujettes à une rigoureuse "chorégraphie" tridimensionnelle coordonnant différenciation cellulaire, contrôle de la croissance cellulaire et communication intercellulaire (Tabin, 1991). De nombreux auteurs ont étudié la morphogénèse du tube neural des oiseaux et des amphibiens. Nous nous focaliserons sur la formation du bourgeon de membre, un modèle particulièrement étudié par les embryologistes et plus spécialement chez le poulet, en effet ce modèle est aisément accessible à l'expérimentateur.

4.1.1 Formation du bourgeon d'aile chez le poulet

Le développement complet de l'embryon dure vingt et un jours. Dès le troisième jour, le membre apparaît comme un bourgeon sur les flancs de l'embryon. Le bourgeon est constitué de cellules mésenchymateuses au centre, entourées de cellules épithéliales. Au sixième jour, le mésenchyme se différencie et au dixième jour l'organisation spatiale du membre est définitivement mise en place (Eichele, 1989 ; Tabin, 1991).

Le mésenchyme induit alors l'épithélium à s'épaissir au niveau du bourgeon. Celui-ci s'allonge rapidement et après quelques jours le mésenchyme se différencie de façon étroitement coordonnée pour donner différentes structures, telles que le cartilage, les os, les muscles (Figure 5).

Nous allons tenter de voir comment une structure aussi complexe se met en place et quel peut être le rôle de l'acide rétinoïque dans ces différents phénomènes.

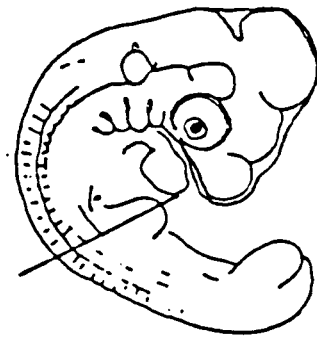
4.1.2 Zone d'activité polarisante

Au niveau de la région postérieure du bourgeon de membre, il existe une zone appelée zone d'activité polarisante ou "Zone of Polarising Activity" découverte à la fin des années soixante (Figure 6a). En effet, si on transplante une partie de cette zone, sur la région antérieure d'un greffon du même âge on obtient des structures surnuméraires qui se superposent en miroir avec les structures "normales" (Figure 6b).

L'interprétation généralement admise est que cette zone diffuserait un gradient de substance capable d'induire la formation de structures suivant l'axe antéro-postérieur. Lors de la greffe, les deux gradients vont se superposer en miroir pour engendrer l'image

A

Bourgeon de membre



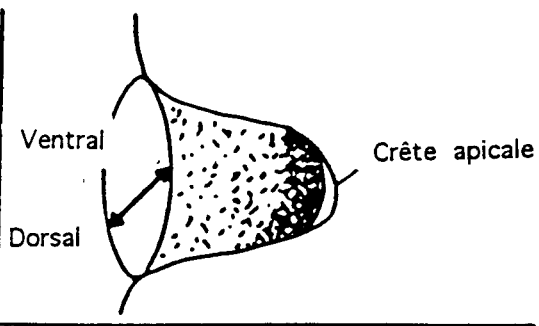
B

Anterieur

1

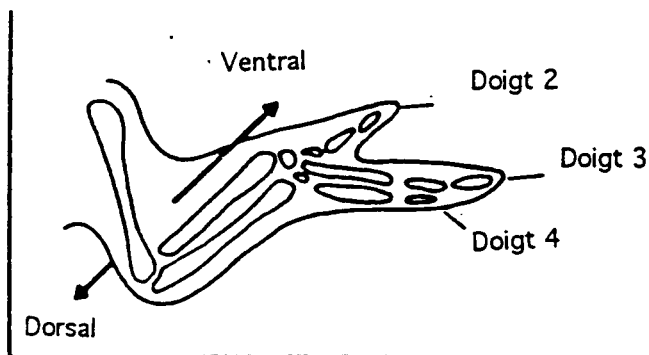


Posterieur



Proximal ↔ distal

2



3



Figure 5 A : Représentation schématique d'un embryon de poulet à 20 jours

5 B : Développement d'une aile de poulet

1- Représentation au 3ème jour

2- Représentation au 6ème jour

3- Photo au 10ème jour

(D'après Tabin, 1991 et Duboule, 1992)

dupliquée des structures. Cette substance produite par la zone d'activité polarisante est dite morphogène.

Son identité est restée longtemps mystérieuse. Maden soupçonna le premier qu'il pouvait s'agir de l'acide rétinoïque (Maden, 1982). Par la suite, plusieurs auteurs montrèrent que l'application de l'acide rétinoïque sur le côté antérieur du bourgeon de membre crée un gradient antéro-postérieur capable de mimer l'action d'une greffe de Z.P.A. Ceci est parfaitement cohérent avec la théorie du gradient (Thaller et Eichele 1987, Slack, 1987) (Figure 6c).

Cependant, tout n'est pas aussi simple. Par exemple, l'acide rétinoïque n'est pas le seul rétinoïde formé dans le bourgeon de membre. Ses deux précurseurs immédiats, le rétinol et le rétinol, sont également présents (Eichele, 1989) ainsi que l'acide 3-4 didéhydrorétinoïque. De plus le gradient de concentration de l'acide rétinoïque le long de l'axe antéro-postérieur est faible (2,5 environ). Comment expliquer qu'un gradient si faible puisse transmettre une information de position si précise ?

C'est pourquoi Brookes (1991) remet en cause le mécanisme proposé par Eichele et suggère que l'acide rétinoïque aurait un rôle dans la mise en place du gradient hypothétique, mais ne serait pas le morphogène direct. Plusieurs expériences confirment cette hypothèse.

Wanek montre qu'après application d'une source d'acide rétinoïque dans la région antérieure d'un bourgeon de membre de 3 jours et transplantation du tissu sur un nouveau receveur on obtient alors une nouvelle Z.P.A. Cependant, celle-ci n'apparaît qu'après 16 à 18 heures suivant la transplantation et les cellules greffées ne présentent plus alors de rétinoïdes (Wanek *et al.*, 1991, Tabin, 1991). De plus Noji a montré que les concentrations endogènes d'acide rétinoïque ou d'acide 3-4 didéhydrorétinoïque ne sont pas suffisantes dans la zone d'activité polarisante pour induire directement la formation du bourgeon de membre (Noji *et al.*, 1991). Ces résultats suggèrent un modèle en deux étapes pour expliquer le mécanisme d'action de l'acide rétinoïque endogène. Dans un premier temps les cellules mésenchymateuses seraient converties par les rétinoïdes endogènes en cellules capables d'induire l'activité polarisante. Puis ces cellules produiraient alors le véritable morphogène. Le taux de rétinoïdes contrôlerait le nombre de cellules transformées.

La découverte des gènes HOX est une étape importante dans l'élucidation de ce processus.

4.1.3 Les gènes Hox et l'acide rétinoïque

Ces gènes homéotiques ont été découverts chez les vertébrés grâce à leurs homologies de séquence avec les gènes de la drosophile appartenant aux complexes Bithorax et Antennapedia (Kessel et Gruss, 1990). Ces gènes codent des facteurs de transcription

EMBRYON DE POULET A TROIS JOURS

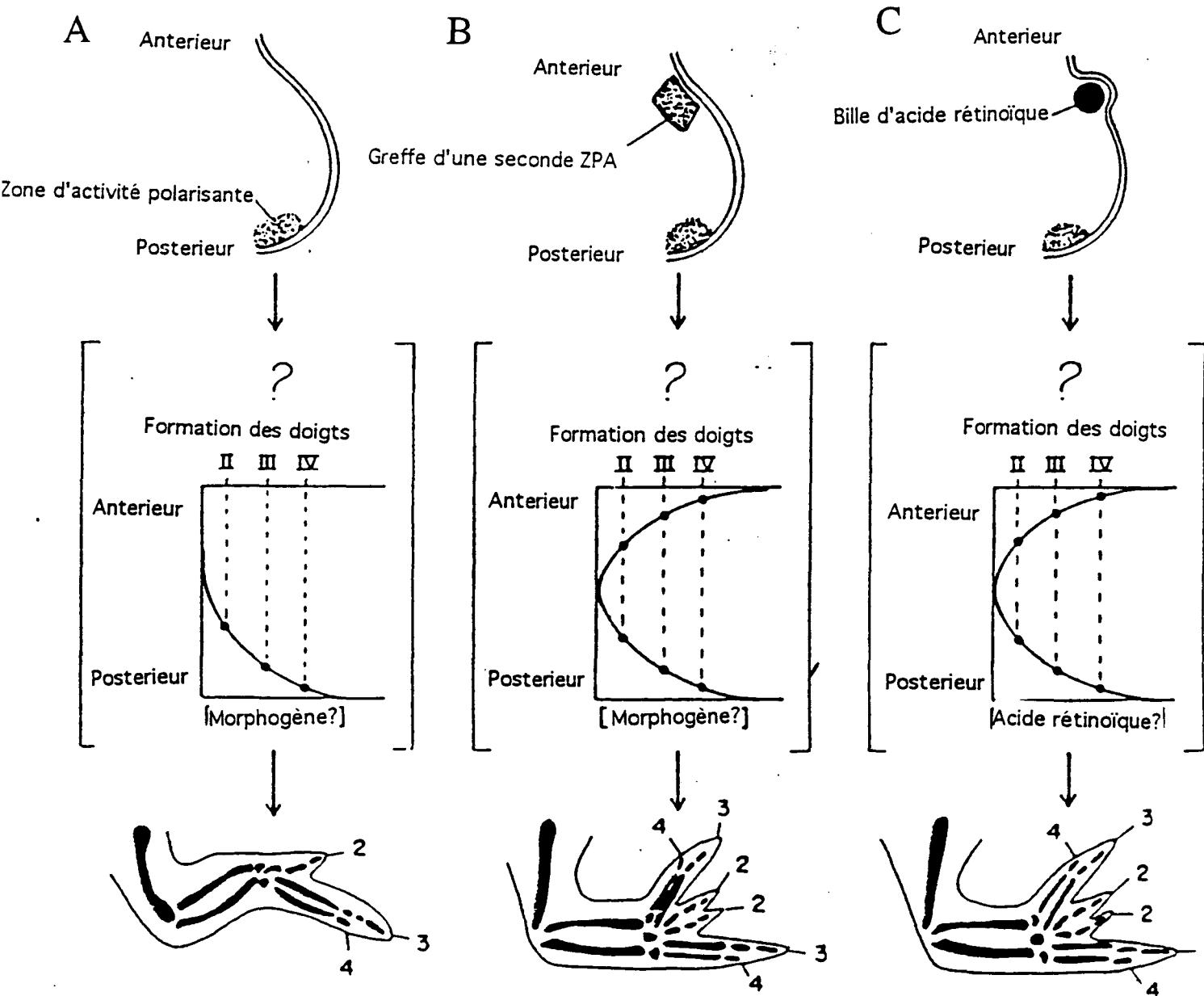


Figure 6 A : La ZPA induit l'axe antéro-postérieur du bourgeon de membre de poulet à l'aide d'un gradient de substance

6 B : La transplantation de la ZPA sur la région antérieure d'un greffon du même âge induit la formation de structures surnuméraires

6 C : L'introduction d'une bille contenant de l'acide rétinoïque mime l'action d'une greffe de ZPA
(D'après Tabin., 1991)

Comme chez la drosophile, ils sont présents sous forme de complexes chez les vertébrés. Ces complexes sont au nombre de quatre, dénommés Hox 1, Hox 2, Hox 3, Hox 4. Ces gènes fournissent à l'embryon des informations de positionnement le long de l'axe antéro-postérieur. Ils possèdent l'étonnante particularité d'être disposés sur leur chromosome dans l'ordre de leur expression dans l'axe antéro-postérieur de l'embryon. C'est-à-dire qu'un gène situé en 3' au sein du complexe sera exprimé avant un gène situé en 5' (Kessel et Gruss, 1990 ; Boncinelli *et al.*, 1991 ; Beardsley *et al.*, 1992 ; Duboule, 1992) (Figure 7). Cette expression spatio-temporelle permet aux produits des gènes de s'emboîter les uns après les autres (Figure 7). Ainsi, parmi les gènes Hox exprimés dans le bourgeon de membre, Hox 4 est particulièrement intéressant. En effet, les gènes Hox 4.4, 4.5, 4.6 et 4.7 forment un très intéressant gradient d'expression antéro-postérieur.

De plus *in vitro* certains de ces gènes sont régulés par l'acide rétinoïque pour des concentrations variables. Ainsi les gènes en 3' du complexe Hox 2 nécessitent 10nM d'acide rétinoïque pour leur expression alors qu'en 5' ils nécessitent 10 μ M (De Robertis *et al.*, 1991 ; Boncinelli *et al.*, 1991 ; Tabin *et al.*, 1991). *In vivo*, l'expression de ces homéogènes chez la souris est modifiée par l'introduction de doses tératogènes d'acide rétinoïque (Kessel et Gruss, 1991). Ces expériences permettent de relier le gradient de concentration de l'acide rétinoïque et l'expression des gènes Hox. Son implication directe dans la morphogenèse du membre reste cependant encore à démontrer.

En effet, cette situation reste encore très controversée. Il semble que l'acide rétinoïque n'induirait pas directement ces gènes. Néanmoins dans le modèle cellulaire carcinoembryonnaire F9 (cellules de vertébrés supérieurs) de nombreux gènes Hox sont sous la dépendance du récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque (Gudas, 1991).

4.1.4 Conclusion

L'acide rétinoïque n'est pas "le" morphogène direct, mais il semble impliqué dans la mise en place d'un hypothétique morphogène direct. L'un des mécanismes qui sous-tendent cet effet pourrait être la régulation de gènes de développement, comme les gènes Hox. Le mécanisme intime de cette régulation reste cependant encore obscur.

4.2 La différenciation cellulaire

4.2.1 La différenciation des épithélia cutanés

Les premières études sur l'effet de l'acide rétinoïque dans les processus de différenciation cellulaire ont été menées *in vivo*. Il y a maintenant près de 70 ans que

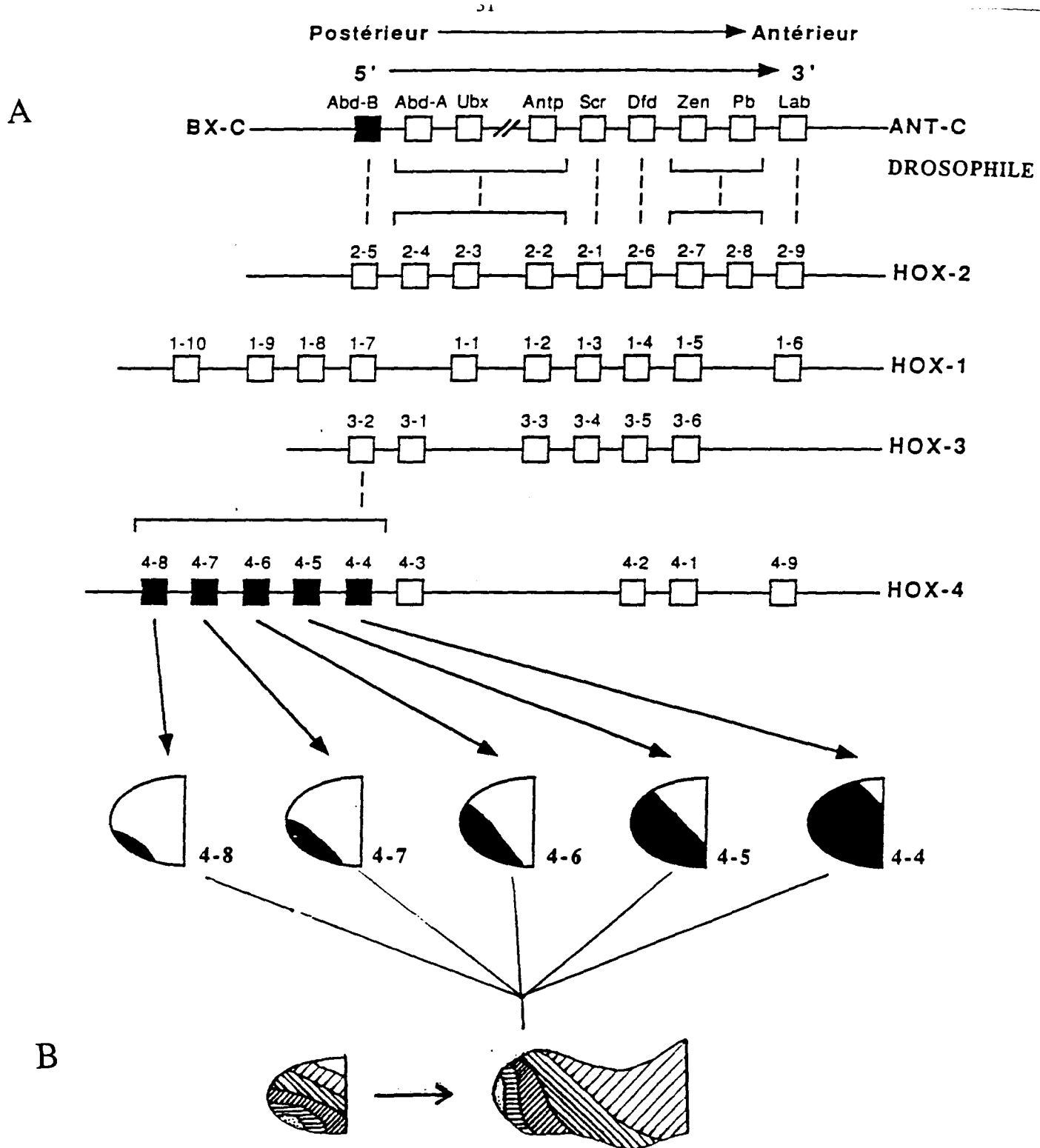


Figure 7 : Les complexes des gènes Hox chez la souris et l'expression des gènes de la série Hox 4-8 à Hox 4-4 dans les stades précoces du bourgeon de membre

7 A : L'expression de chaque gène du complexe Hox 4 dans le bourgeon de membre précoce induit un gradient d'expression antéro-postérieur des gènes Hox 4-8 à Hox 4-4

7 B : L'expression spatio-temporelle des gènes Hox 4 permet au produit de ces gènes de s'emboîter les un après les autres à la manière des "poupées russes".
(D'après Tabin.,1991)

Wolbach établit que la carence alimentaire en vitamine A était source de métaplasies des cellules squameuses et d'une hyperkératinisation des cellules épithéliales (Wolbach et Howe, 1925).

L'utilisation de modèles cellulaires en culture a permis de clarifier certains points du mécanisme d'action de l'acide rétinoïque et montrent que ce sont les kératinocytes eux-mêmes qui sont les cibles de l'acide rétinoïque (Sporn, 1973 ; Christopher, 1974). Les cellules basales indifférenciées se transforment en kératinocytes. Par la suite, elles s'engagent dans le programme d'apoptose (voir la revue de Haake et Polakowcha, 1993). Un excès d'acide rétinoïque inhibe leur différenciation terminale et leur apoptose, néanmoins la morphogenèse normale de l'épiderme nécessite des concentrations physiologiques d'acide rétinoïque (Figure 8).

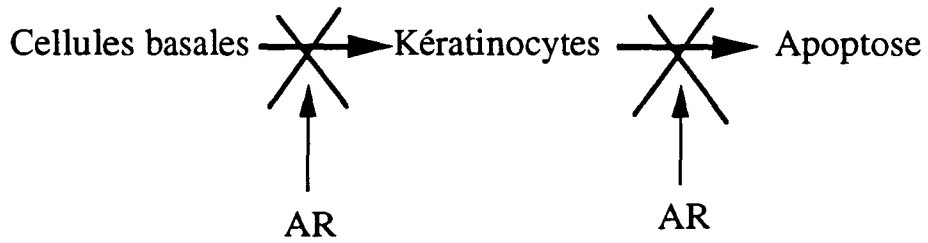
Des études réalisées sur les kératinocytes cultivés sur tissus et sur épiderme reconstitué (Regnier et Darmon, 1989) ont permis de caractériser certaines modifications morphologiques et biochimiques induites par un excès d'acide rétinoïque. Ainsi des marqueurs de différenciation précoces comme les kératines K1 et K 10 ainsi que l'antigène KF2 (Asselinau *et al.*, 1989) ne sont plus exprimés. L'expression de la transglutaminase épidermique est également inhibée. Il semble que l'inhibition de la différenciation des kératinocytes est liée à la diminution du taux d'ARNm intracellulaire, d'un facteur de croissance TGF β et de l'activité de la transglutaminase membranaire. Le taux d'EGF semble lui aussi être perturbé.

4.2.2- La différenciation des cellules cancéreuses

L'acide rétinoïque bloque ou retarde la progression dans le cycle cellulaire de nombreuses cellules malignes (Sachs, 1978). Il induit par exemple la différenciation de cellules F9 de carcinome embryonnaire de souris (Strickland *et al.*, 1978) en endoderme viscéral (Figure 8). Ces cellules sont d'ailleurs très utilisées comme modèle pour l'étude de la différenciation embryonnaire. De nombreuses modifications de l'expression des gènes accompagnent les modifications morphologiques, lors de la différenciation induite par l'acide rétinoïque. Ainsi, la synthèse de l'activateur du plasminogène est augmentée et l'expression des gènes Hox 3 et Era-1 est stimulée (La Rosa et Gudas, 1988 ; Gudas, 1991). Des études de cinétiques suggèrent qu'il s'agit bien de réponses primaires. D'autres gènes, comme celui de la laminine B1 et du collagène IV sont également induits, mais de façon indirecte ; ce sont des réponses secondaires (Gudas, 1990).

Un autre exemple fascinant est celui de l'induction de la différenciation de cellules leucémiques humaines, promyélocyaires, (HL 60, U937...), ou d'érythroleucémie (HEL) (Figure 8). Dans ces cellules, l'acide rétinoïque active l'expression de la transglutaminase

1) Différenciation des cellules normales: épiderme cutané



2) Différenciation des cellules cancéreuses

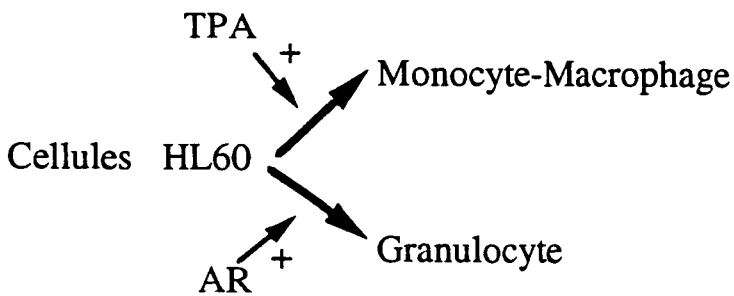
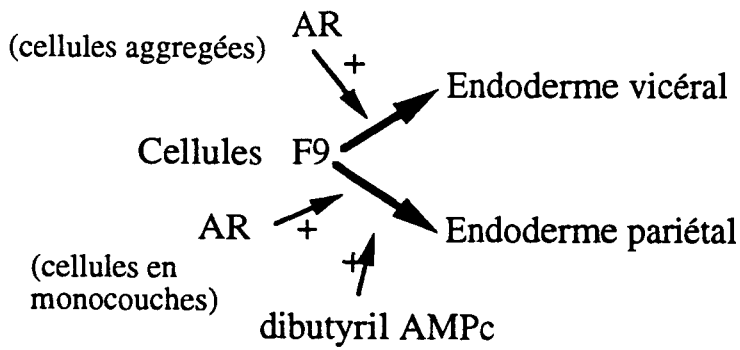


Figure 8 : Effets biologiques de l'acide rétinoïque sur quelques modèles cellulaires

de tissu, un marqueur de l'apoptose (Davies *et al.*, 1985) et d'oncogènes tels que myc (Collin *et al.*, 1987).

La diversité des cibles de l'acide rétinoïque lors du contrôle de la différenciation cellulaire laisse entrevoir l'utilisation croissante des rétinoïdes en thérapeutique.

5 - UTILISATION THERAPEUTIQUE DES RETINOIDES

Les observations *in vivo* et les études réalisées *in vitro* sur les effets différenciateurs des rétinoïdes ont suscité très tôt un grand intérêt chez les médecins.

5.1 Traitement curatif

Les rétinoïdes ont tout d'abord été utilisés en dermatologie, notamment dans le traitement de l'acné (Pochi, 1979 ; Layton *et al.*, 1992), des formes sévères du psoriasis (Fritsch, 1981, 1992) et dans le traitement du vieillissement cutané lié aux expositions solaires (voir la revue de Sendogorta *et al.*, 1992).

Plus récemment, l'introduction des rétinoïdes dans le traitement de certains cancers a constitué un apport considérable. Ils offrent une alternative aux traitements de chimiothérapie et curiethérapie classiques. Il est utilisé avec succès dans le traitement de lésions cutanées pré malignes, de troubles épithéliaux hyperprolifératifs (Lupulescu, 1990) (Tableau 1) et dans la leucémie à promyélocytes (Chomienne *et al.*, 1989 ; Degos *et al.*, 1990 ; Fenaux, 1993). Cependant, des rechutes ont été observées en moyenne après 8 mois de traitement. Une voie d'avenir est très certainement l'association de l'acide rétinoïque à d'autres agents contrôlant la prolifération et/ou la différenciation des cellules tumorales, comme le montrent les essais de traitement actuellement menés sur un nombre croissant de tumeurs. Des résultats très significatifs ont été publiés sur ce plan, tant dans les modèles cellulaires que chez l'homme. Une association très prometteuse est celle de l'acide 13 cis rétinoïque (un rétinoïde de synthèse) et de l'interféron α dans le traitement des carcinomes cutanés et du col utérin (Di Giovanna, 1992). En outre, pour le myélome multiple des os la médiane de survie initialement de trois ans a pu être prolongée par ce type d'association. Dans le domaine des hémopathies, des essais récents montrent l'intérêt potentiel de ce type de traitement pour les syndromes myélodysplasiques et la leucémie myélomonocytaire chronique de l'enfant (Smith *et al.*, 1992). Des résultats préliminaires très encourageants ont également été obtenus avec l'acide 13 cis rétinoïque seul, sur un petit groupe de malades (Hong *et al.*, 1990) mais ces résultats ne sont pas confirmés avec un autre rétinoïde de synthèse, l'étrétinate.

Cancers	Rétinoïdes
Leucémies aiguës à promyélocytes	Acide tout trans rétinoïque
Leucémies myéloïdes	Isotrétinoïne Trétinoïne
Carcinome baso-cellulaire	Isotrétinoïne Etrétinate
Carcinome squameux cellulaire	Isotrétinoïne Etrétinate Arorétinoïdes
Mélanome malin	Acide tout trans rétinoïque Etrétinate
Carcinome épidermoïde de la tête et du cou	Isotrétinoïne

Tableau 1 : Quelques exemples d'utilisations des rétinoïdes en thérapeutique anticancéreuse

5.2 Traitement préventif

Ces traitements sont destinés aux personnes présentant une prédisposition à développer un cancer soit par une altération génétique soit par l'exposition à des agents carcinogènes.

D'importants programmes de recherches sont actuellement menés, notamment aux Etats Unis (Hill et Grubbs, 1992). Des essais, réalisés sur les animaux et chez l'homme montrent l'activité protectrice des dérivés de synthèse sur un grand nombre de tumeurs pré-cancéreuses. Ainsi, des modèles animaux montrent l'efficacité des rétinoïdes de synthèse dans la prévention des tumeurs cutanées, de la glande mammaire, de la vessie et des poumons (Verma *et al.*, 1980 ; Hill et Grubbs, 1992). Des résultats très intéressants ont été obtenus avec un rétinoïde de synthèse, l'étrétinate, sur un groupe de patients "gros fumeurs" présentant des métaplasies bronchiques, celles-ci ont été fortement réduites après traitement (Gouveia *et al.*, 1982). L'étrétinate donne également de bons résultats pour le traitement des lésion pré-cancéreuses de la vessie chez l'homme (Studer *et al.*, 1984).

Cependant, les rétinoïdes actuels présentent un indice thérapeutique très faible qui limite sérieusement leur utilisation aussi bien dans leur utilisation préventive que curative. Ils sont hautement tératogènes, parfois jusqu'à deux ans après l'arrêt du traitement (Pinnock et Alderman, 1992). De plus une hypervitaminose chronique peut entraîner des complications sévères au niveau du foie, des os et surtout du système nerveux central.

II - MECANISME D'ACTION DE L'ACIDE RETINOIQUE

Alors que le recours à l'acide rétinoïque en thérapeutique anticancéreuse s'intensifie, les bases moléculaires de son mécanisme d'action commencent seulement à être élucidées.

Ses effets biologiques sur le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire sont principalement liés à la régulation transcriptionnelle de gènes spécifiques.

Globalement, dans les cellules cibles le rétinol et l'acide rétinoïque sont pris en charge par des protéines navettes hautement spécifiques, respectivement les CRBPs et les CRABPs. Le complexe migre alors vers le noyau. Là, l'acide rétinoïque libre se fixe à des récepteurs nucléaires spécifiques, les RARs. Ces derniers se comportent comme des facteurs de transcription inductibles. Ils s'associent soit sous forme d'homodimères, soit sous forme d'hétérodimères avec d'autres récepteurs nucléaires, le plus souvent les RXRs. Le complexe active alors l'expression de gènes cibles, au niveau des séquences spécifiques, les RAREs (Retinoic Acid Responsive Element) (Figure 9).

Nous allons étudier maintenant, les différents partenaires et comment fonctionnent dans le détail, les récepteurs nucléaires pour transmettre le message hormonal.

1 - LES PROTEINES LIANT LES RETINOIDES

1.1 Les protéines cytoplasmiques

Plusieurs protéines cytoplasmiques spécifiques lient l'acide rétinoïque et ses précurseurs au niveau de leurs cellules cibles. Les CRBPs (Cellular Retinol Binding Protein) fixent le rétinol (Ong et Chytil, 1978, 1984 ; Ii *et al.*, 1986) et les CRABPs (Cellular Retinoic Acid Binding Protein) lient l'acide rétinoïque (Chytil et Ong, 1984 ; Aström *et al.*, 1991 ; Eilers *et al.*, 1992). Ces protéines sont de petite taille, 100 à 160 acides aminés et fixent leur ligand avec une bonne affinité (Levin *et al.*, 1988 ; Mac Donald *et al.*, 1987 ; Blomhoff, 1990). Leur fonction exacte n'est pas clairement élucidée. Les CRBPs en fixant le rétinol, formeraient une réserve de rétinol intracellulaire inactif et rapidement mobilisable (Harrison *et al.*, 1987 ; Ross, 1993a). Elles déterminent également les voies métaboliques du rétinol (Ross, 1993b).

Parmi les CRABPs, la CRABPI pourrait réguler également la concentration d'acide rétinoïque libre et intervenir sur le métabolisme de l'acide rétinoïque (Boylan et Gudas, 1991) tandis que la CRABPII interviendrait préférentiellement dans la translocation nucléaire des rétinoïdes. Ces protéines servent de navettes en favorisant le transport du ligand vers le noyau. Celui-ci alors serait plus facilement pris en charge par le récepteur nucléaire responsable de l'effet transcriptionnel (Lohnes *et al.*, 1992). Toutefois,

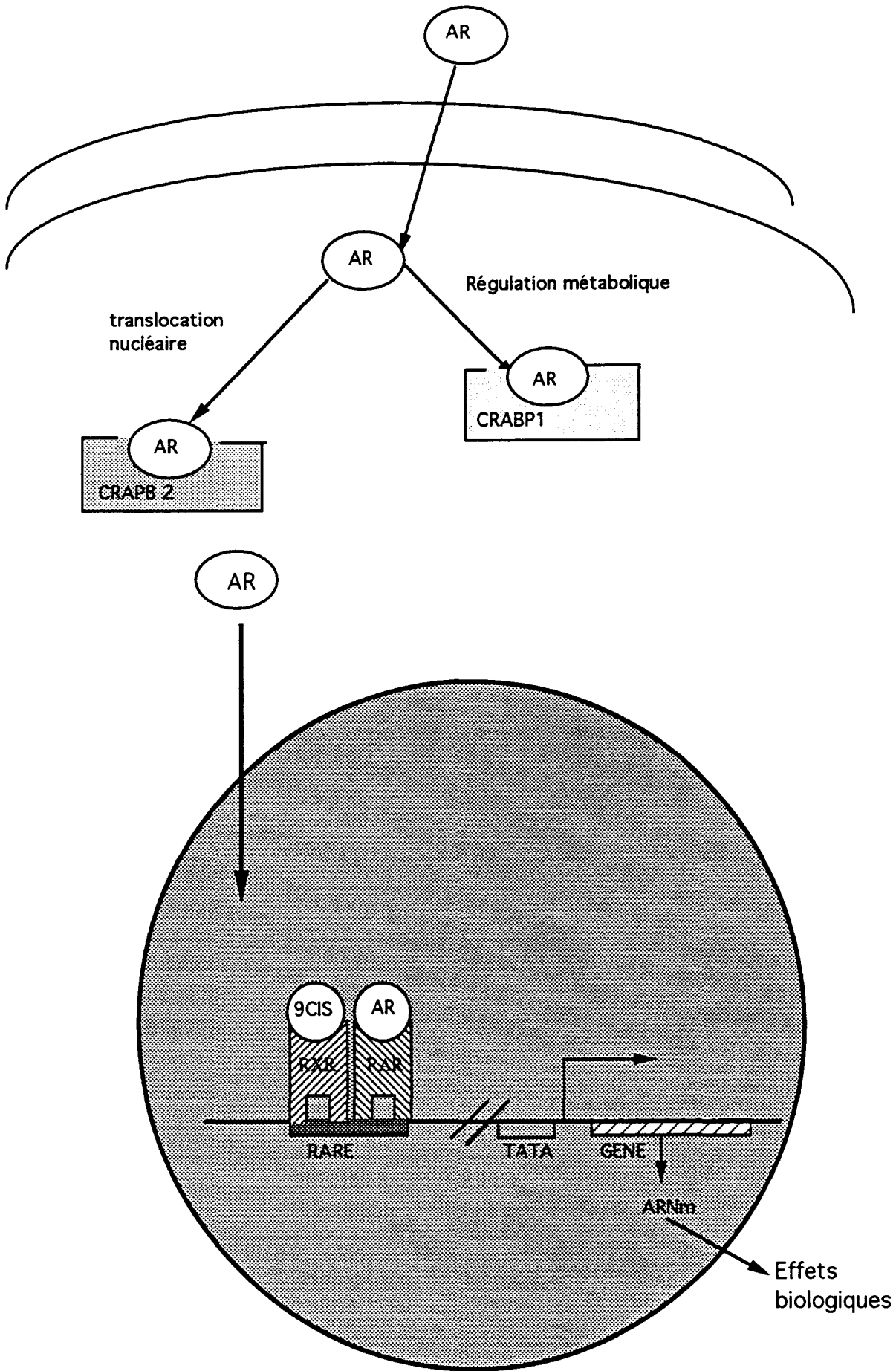


Figure 9 : Mécanisme d'action de l'acide rétinoïque

ces protéines ne sont pas indispensables au fonctionnement normal des récepteurs nucléaires. De nombreuses lignées cellulaires sont dépourvues de ces protéines et répondent parfaitement aux traitements par l'acide rétinoïque (Jetten *et al.*, 1987). Le tableau 2 présente les principales protéines liant les rétinoïdes (Blomhoff *et al.*, 1990). Il est à noter que l'expression de certaines de ces protéines est régulée par l'acide rétinoïque lui-même (Smith *et al.*, 1991 ; Adamson *et al.*, 1993). Un tel rétrocontrôle pourrait empêcher un excès de ligand libre d'induire la transcription inappropriée de gènes notamment lors de la morphogenèse (Tabin *et al.*, 1991).

Protéines	Masse Kd	ligand principal	Fonctions connues
CRBP (I)	16	Rétinol	Donneur pour estérification, protéine de transport intracellulaire
CRBP (II)	16	Rétinol	Donneur pour estérification
CRBP (III) yeux de poissons	15	Rétinol	
CRABP (I)	16	Acide rétinoïque	Régulateur de l'acide Rétinoïque libre
CRABP (II) rat nouveau né	15	Acide rétinoïque	Protéine de transport intracellulaire
CRABP (II) embryon de poulet	16	Acide rétinoïque	Protéine de transport intracellulaire
RAR α	46	Acide rétinoïque	Facteur de transcription inductible par le ligand
RAR β	44	Acide rétinoïque	Facteur de transcription inductible par le ligand
RAR γ	45	Acide rétinoïque	Facteur de transcription inductible par le ligand
RXR α, β, γ	48	Acide 9 cis rétinoïque	Facteur de transcription inductible par le ligand

Tableau 2 : Protéines liant les rétinoïdes et leurs fonctions
(D'après Blomhoff et *al.*, 1990)

1.2 Les protéines nucléaires.

1.2.1) Les récepteurs de l'acide rétinoïque

a) La découverte

Malgré les efforts de nombreux auteurs, la mise en évidence des récepteurs de l'acide rétinoïque n'a abouti que très récemment. Dès 1974, plusieurs chercheurs ont suspecté l'existence de récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque sur les bases des analogies de structure et de mécanisme probable d'action entre les hormones stéroïdiennes et l'acide rétinoïque (O'Malley et Means, 1974). Les biochimistes ont d'abord cherché à caractériser ces récepteurs, mais en vain (Chytil, 1984). Les raisons majeures de cet échec sont liées à la trop faible quantité de récepteurs endogènes, de 500 à 1500 sites par cellule, et surtout à la présence de la CRABP à des concentrations élevées dans de nombreux types cellulaires. Une avancée décisive a été effectuée par deux équipes indépendantes qui ont cloné en 1987, l'ADNc d'un premier récepteur (Petkovich *et al.*, 1987 ; Giguère *et al.*, 1987). Cette découverte marqua le début de l'élucidation du mécanisme moléculaire d'action de l'acide rétinoïque. Les séquences d'ADNc de ce gène ont pu être identifiées grâce à leurs homologies de structure avec celle de la famille des récepteurs stéroïdiens. Les équipes de P. Chambon et R. Evans ont utilisé des techniques similaires. Des banques d'ADNc établies à partir de 2 lignées cellulaires MCF-7 et Y47P furent criblées à l'aide d'une sonde oligonucléotidique contenant une séquence consensus de la région codant le domaine de liaison à l'ADN des récepteurs stéroïdiens. La démonstration que les clones isolés correspondaient au récepteur de l'acide rétinoïque fut établie grâce à deux types d'expériences. D'une part, l'expression des séquences clonées dans les cellules HeLa a permis de montrer la forte affinité de la protéine produite pour l'acide rétinoïque. D'autre part, l'utilisation de récepteurs chimères a permis de mettre en évidence l'activité transactivatrice de la protéine induite par l'acide rétinoïque (Figure 10). Le recours à de tels récepteurs chimères, dont le domaine de liaison à l'ADN est substitué par celui des récepteurs stéroïdiens, était alors indispensable. En effet, en 1987, aucune séquence oligonucléotidique régulant l'expression de gènes cibles contrôlés par l'acide rétinoïque n'avait été identifiée. Ces récepteurs chimères furent alors cotransfectés avec un gène indicateur codant la CAT (Chloramphénicol Acyl Transferase) sous le contrôle spécifique d'un élément de réponse aux oestrogènes ou aux glucocorticoïdes. L'induction puissante du gène CAT en présence d'acide rétinoïque acheva de démontrer que l'ADNc cloné, codait effectivement un récepteur de l'acide rétinoïque.

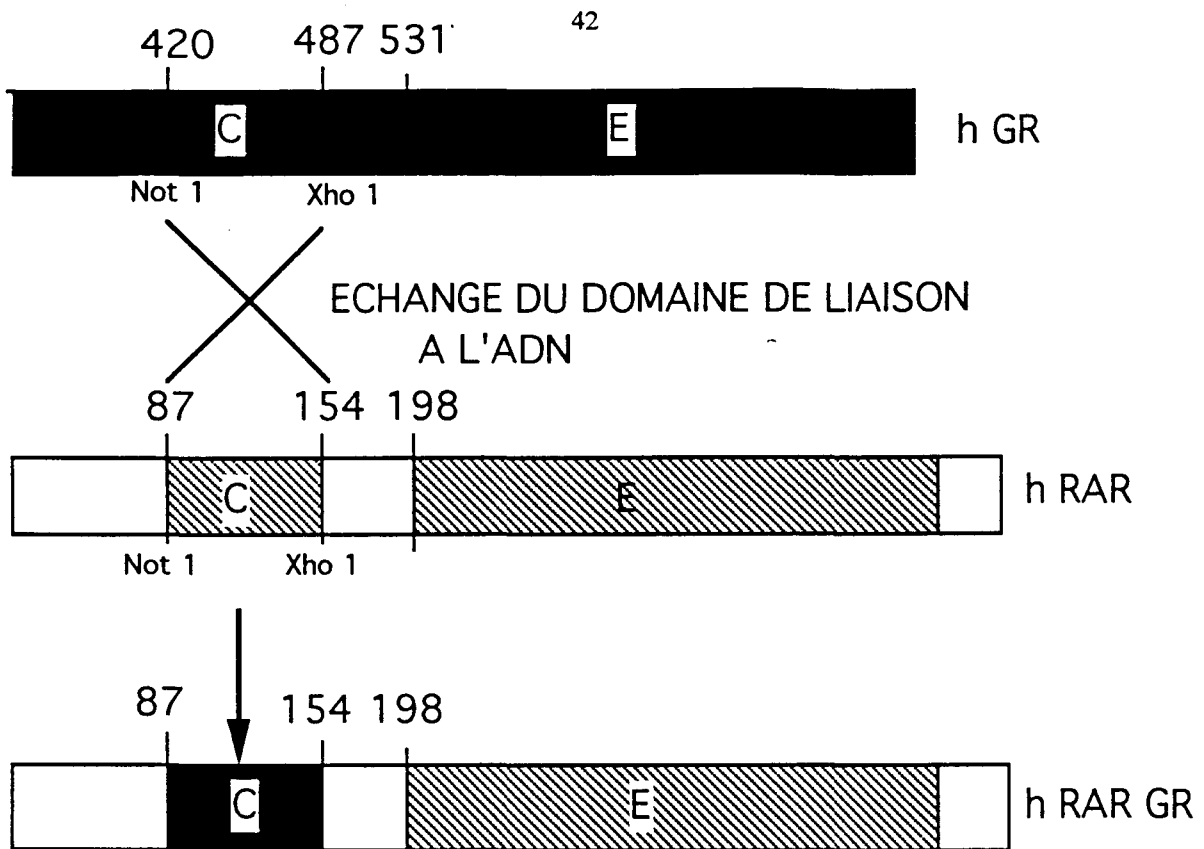


Figure 10 : Principe de la technique d'échange de domaines qui à permis la découverte de RAR α et β .
Le domaine de liaison à l'ADN des glucocorticoïdes (ou des estrogènes) est échangé avec celui du récepteur répondant aux glucocorticoïdes (ou aux estrogènes) en présence d'acide rétinoïque.

Avant même la découverte de ce premier récepteur, A. Dejean avait montré que l'ADN du virus de l'hépatite B (HBV) était inséré dans un gène cellulaire d'un hépatocarcinome humain (Dejean *et al.*, 1986 ; Tiollais *et al.*, 1990). En 1987, le même groupe clona l'ADNc du site d'intégration du virus de l'hépatite B et l'analyse de la séquence oligonucléotidique révéla que la structure du gène cellulaire dénommé hap était similaire à celle du domaine de liaison à l'ADN des hormones stéroïdes (de Thé *et al.*, 1987). Afin de caractériser la protéine, ces auteurs exprimèrent l'ARNm du gène hap. Une protéine de 51 KDa fut produite mais H. de Thé ne parvint pas à mettre en évidence de liaison spécifique à l'acide rétinoïque. Des travaux conduits conjointement avec l'équipe de P. Chambon et de P. Tiollais démontrèrent que le gène hap était en fait un deuxième RAR, nommé RAR β (Brand *et al.*, 1988). Ces résultats furent obtenus en ayant recours une nouvelle fois à la capacité transactivatrice de récepteurs chimères. Des résultats similaires ont été obtenus indépendamment par Benbrook (Benbrook *et al.*, 1988). Des recherches visant à caractériser ces gènes chez la souris ont conduit à l'identification d'un troisième récepteur, le récepteur RAR γ (Zelent *et al.*, 1989). Son homologue humain a été décrit par le groupe de P Chambon (Krust *et al.*, 1989). Enfin un récepteur apparenté au récepteur RAR γ a été découvert chez le triton, RAR δ (Ragsdale *et al.*, 1989).

Les premiers résultats de caractérisation et de purification des récepteurs commencent à apparaître, en ayant recours le plus souvent à des ligands synthétiques plus stables que le ligand naturel (Hashimoto *et al.*, 1989 ; Nervi *et al.*, 1989 ; Sani *et al.*, 1990 ; Bourguet *et al.*, 1992 ; Reddy *et al.*, 1992).

b) Structure des RARs

Les gènes des trois récepteurs RAR α , β , γ codent des protéines de tailles voisines respectivement 462, 448 et 454 acides aminés (Giguère *et al.*, 1987 ; Petkovitch *et al.*, 1987 ; de Thé *et al.*, 1987 ; Brand *et al.*, 1988 ; Krust *et al.*, 1989) (Figure 11). Ils appartiennent à une famille homogène de protéines capables de réguler la transcription de gènes cibles après fixation d'un ligand spécifique, dont font partie les récepteurs stéroïdiens et thyroïdiens. Cette famille est décrite tableau 3. Pour un certain nombre de ces protéines la nature et même l'existence d'un ligand restent à définir (Laudet *et al.*, 1992). Les RARs présentent une organisation bien décrite chez les récepteurs nucléaires. Ils sont organisés en 6 domaines fonctionnels nommés A/B, C, D, E, F de conformation et de fonctions différentes (Figure 12). Ces domaines sont interchangeables d'un type de récepteur à l'autre comme on l'a vu précédemment.

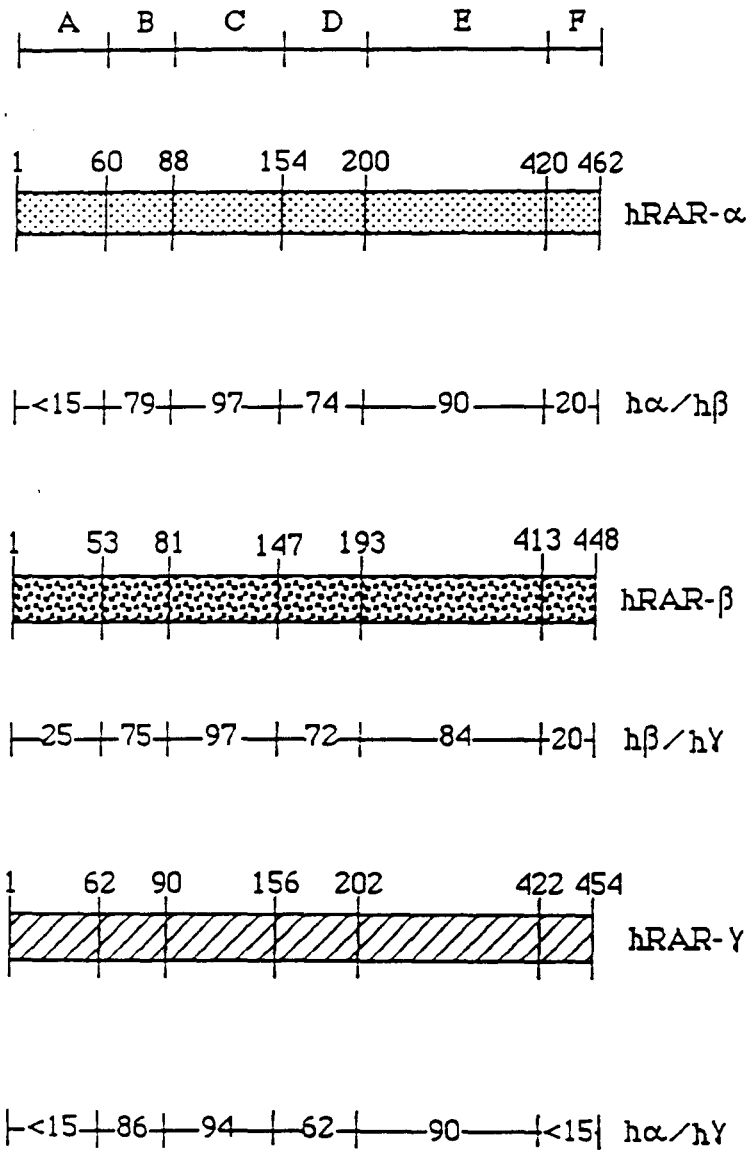


Figure 11 : Homologies de structure entre les différents récepteurs de l'acide rétinoïque

Tableau 3 : Liste des récepteurs nucléaires

Abréviation	Nom	Espèce	Références
AR	Androgen Receptor	Human	Tilley et al., 1989
ARP-1	(Orphan receptor)	Human	Ladias and Karathanasis, 1991
COUP	= ear 3 (Orphan receptor)	Human	Wang et al., 1989, Miyajima et al., 1988
E75	(Orphan receptor)	Drosophila	Segraves and Hogness, 1990
EAR1	= Rev-ErbA (Orphan receptor)	Human	Miyajima et al., 1989 ; Lazar et al., 1989
EAR2	(Orphan receptor)	Human	Miyajima et al., 1988
ECR	Ecdysone receptor	Drosophila	Koelle et al., 1991
EGON	(Orphan receptor)	Drosophila	Rothe et al., 1989
ER	Estrogen Receptor	Human	Green et al., 1986
ERR1	(Orphan receptor)	Human	Giguère et al., 1988
ERR2	(Orphan receptor)	Human	Giguère et al., 1988
FTZ-F1	(Orphan receptor)	Drosophila	Lavorgna et al., 1991
GR	Glucocorticoid Receptor	Human	Hollenberg et al., 1985
H2RIIBP	(Orphan receptor)	Mouse	Hamada et al., 1989
HNF4	(Orphan receptor)	Rat	Sladek et al., 1990
KNI	Knirps (Orphan receptor)	Drosophila	Nauber et al., 1988
KNRL	Knirps-related (Orphan receptor)	Drosophila	Oro et al., 1988
MR	Mineralocorticoid Receptor	Human	Arriza et al., 1987
NGF1B	= nur 77 = N10 (Orphan receptor)	Rat	Milbrandt, 1988 ; Ryseck et al., 1989 ; Hazel et al., 1988
PPAR	(Orphan receptor)	Mouse	Issemann and Green, 1990
PR	Progesterone Receptor	Human	Misrahi et al., 1987
RARA	Retinoic acid receptor α	Human	Petkovich et al., 1987 ; Giguere et al., 1987
RARAX	Retinoic acid receptor α	Xenopus	Ragsdale et al., 1989
RARB	Retinoic acid receptor β	Human	De Thé et al., 1987
RARG	Retinoic acid receptor γ	Mouse	Zelent et al., 1989
RARGX	Retinoic acid receptor γ	Xenopus	Ragsdale et al., 1989
RXR	(Orphan receptor)	Human	Mangelsdorf et al., 1990
SVP	Sevenup (Orphan receptor)	Drosophila	Mlodzik et al., 1990
TLL	Tailless (Orphan receptor)	Drosophila	Pignoni et al., 1990
TR2	(Orphan receptor)	Human	Chang and Kokontis, 1988 ; Chang et al., 1989
THRA	Thyroid hormone Receptor α (= <u>c-erbA-1</u>)	Human	Thompson et al., 1987 ; Laudet et al., 1991
THRAC	Thyroid hormone Receptor α (= <u>c-erbA-1</u>)	Chicken	Sap et al., 1986
THRAXA	Thyroid hormone Receptor α (= <u>c-erbA-1</u>)	Xenopus	Yaoita et al., 1990
THRAXB	Thyroid hormone Receptor α (= <u>c-erbA-1</u>)	Xenopus	Yaoita et al., 1990
THRBC	Thyroid hormone Receptor β (= <u>c-erbA-2</u>)	Human	Weinberger et al., 1986
THRBC	Thyroid hormone Receptor β (= <u>c-erbA-2</u>)	Chicken	Forrest et al., 1990
THRBXA	Thyroid hormone Receptor β (= <u>c-erbA-2</u>)	Xenopus	Yaoita et al., 1990
THRBBX	Thyroid hormone Receptor β (= <u>c-erbA-2</u>)	Xenopus	Yaoita et al., 1990
USP	Ultraspiracle = 2C1-3 = CF1 (Orphan receptor)	Drosophila	Oro et al., 1990 ; Henrich et al., 1990 ; Shea et al., 1990
VERBA	<u>v-erbA</u> gene of Avian Erythroblastosis Virus	Chicken	Debuire et al., 1984 ; Damm et al., 1987
VDR	Vitamine D Receptor	Human	Baker et al., 1988

(Pour les Mammifères, seule une espèce a été mentionnée)

(D'après Laudet et al., 1992)

Le domaine A/B

C'est le domaine le moins conservé des différentes classes de récepteurs de cette superfamille (15% d'homologie entre les récepteurs nucléaires). Au niveau du récepteur de l'acide rétinoïque c'est essentiellement la région A qui varie, 15 à 25% d'homologie entre les différents RARs, contre 75 à 86% pour la région B.

Ce domaine participe à la modulation de l'activité transactivatrice du récepteur. Il contient une région dénommée AF1 responsable de la part constitutive de cette activité (Allenby *et al.*, 1992 ; Nagpal *et al.*, 1992, 1993).

La région A : cette région est le siège de nombreux épissages alternatifs aboutissant à plus de 10 isoformes chez l'homme et 17 chez la souris (Chambon *et al.*, 1991 ; Leid *et al.*, 1993). La variabilité de cette région pourrait donc être à l'origine d'effets transcriptionnels différents spécifiques de chaque récepteur, voire de chaque isoforme.

La région B : cette région est codée par un exon différent et elle est d'ailleurs beaucoup mieux conservée d'un récepteur à l'autre.

Le domaine C

Le domaine C est responsable de la reconnaissance et de la fixation à l'ADN. C'est la région la plus conservée et la mieux connue des récepteurs nucléaires (94% d'homologie entre les trois RARs et près de 50% d'homologie entre les différents membres de la famille des récepteurs stéroïdiens et thyroïdiens.)

- Structure

En analysant la séquence de ce domaine pour le récepteur des glucocorticoïdes, les groupes de P. Chambon et de R. Evans ont montré l'existence de cystéines conservées et répétées d'une façon régulière (Weinberger *et al.*, 1985 ; Krust *et al.*, 1986). Les fortes homologies entre les différentes séquences de ce domaine chez de nombreuses protéines nucléaires ont permis de faire un rapprochement entre les récepteurs nucléaires et les facteurs de transcription comportant des structures dites en doigt de zinc, comportant des cystéines et des histidines répétées (Klug et Rhodes, 1987). L'exemple type de cette famille est le facteur de transcription TF III A, qui possède 9 de ces doigts de zinc (Ginsberg *et al.*, 1984 ; Miller *et al.*, 1985). Ces doigts sont organisés en boucles maintenues en place par liaison de coordinence, soit entre 4 cystéines, soit entre 2 histidines et 2 cystéines et un atome de zinc. Les récepteurs nucléaires ne comportent que deux doigts de zinc qui présentent une organisation structurale différente, avec quatre cystéines complexant le zinc.

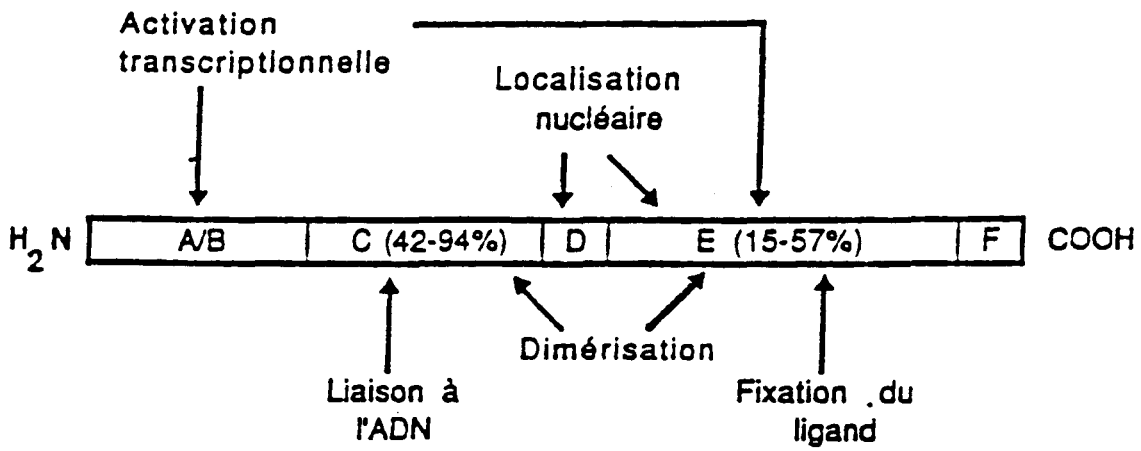


Figure 12 : Organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires.

Le doigt C1 est plus riche en acides aminés hydrophobes et C2 est plus riche en acides aminés basiques. La conformation tridimensionnelle du récepteur β de l'acide rétinoïque en solution a été analysée récemment par RMN (Knegtel *et al.*, 1993) (Figure 13 et 14). La structure générale est déterminée par les caractéristiques suivantes :

Le domaine peut-être séparé en deux modules correspondant aux doigts de zinc. Chaque module est constitué d'une zone de nucléation du zinc et d'une hélice α amphipatique immédiatement adjacente. Les deux modules s'imbriquent l'un à l'autre pour former un seul domaine globulaire. Les hélices α de chaque module se disposent perpendiculairement et se stabilisent l'une l'autre par des interactions hydrophobes. Nous avons vu globalement la structure du domaine C, nous allons voir maintenant comment il reconnaît l'ADN.

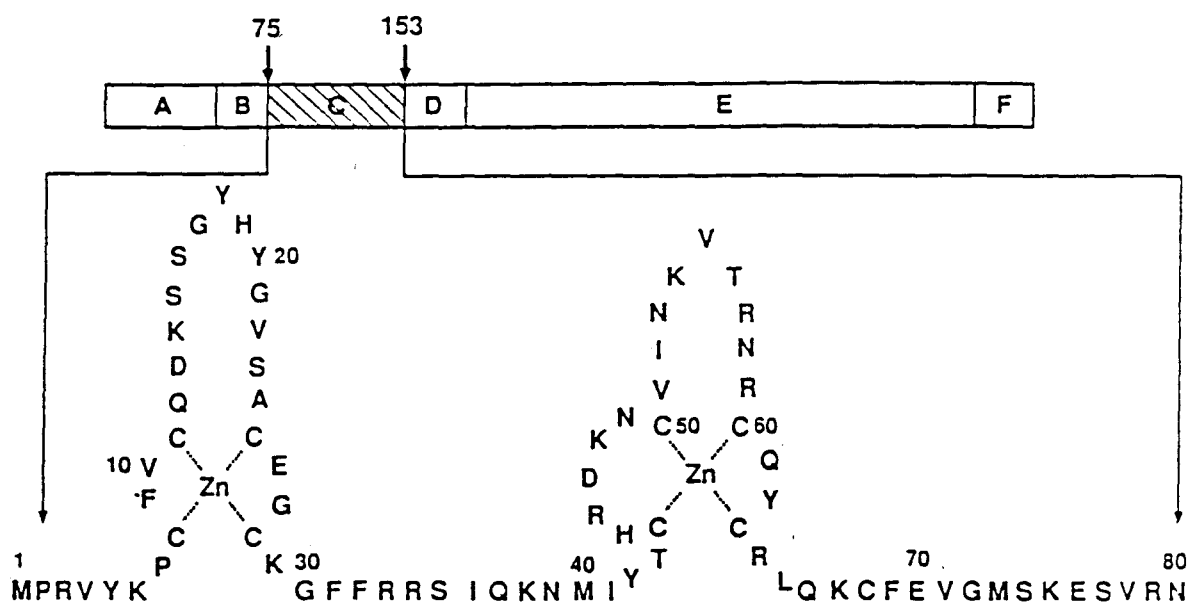


Figure 13 : Structure des doigts de Zinc des récepteurs de l'acide rétinoïque
 Application à la séquence du récepteur β de l'acide rétinoïque. Les
 flèches délimitent le domaine C.
 (D'après Knegt et *al.*, 1993)

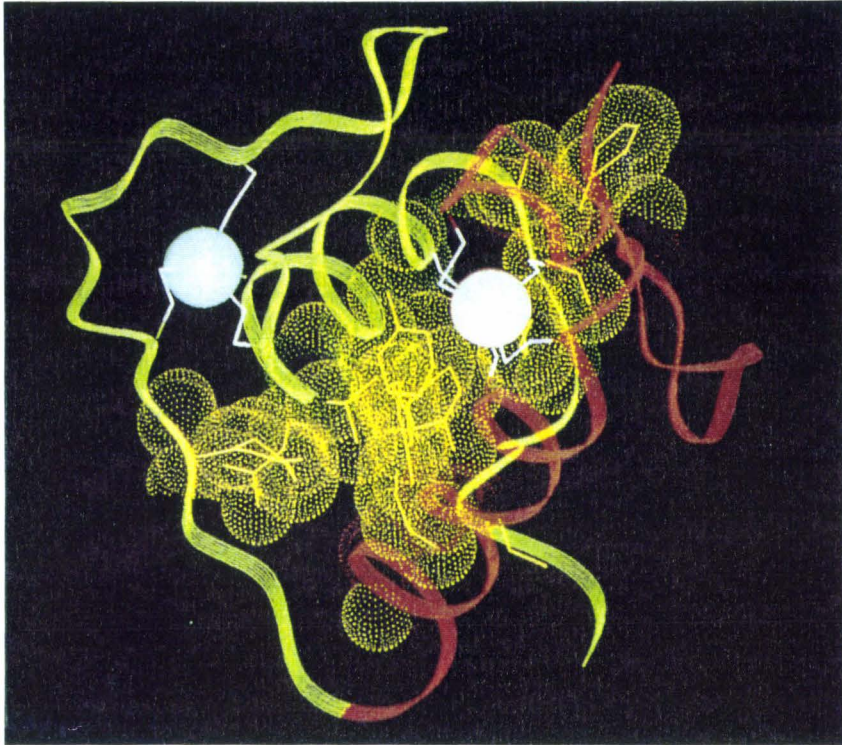


Figure 14 : Structure tridimensionnelle du domaine de liaison à l'ADN du récepteur de l'acide rétinoïque.
Les deux doigts de zinc sont respectivement en rouge et en vert.
(D'après Knegtel et *al.*, 1993)

– Reconnaissance de l'ADN

Les études visant à montrer la fonction spécifique de chacun des doigts de zinc ont été conduites sur les premiers récepteurs découverts ; ceux des glucocorticoïdes et des oestrogènes. Pour cela les équipes de P. Chambon et W. Wahli ont préparé des récepteurs chimères formés du doigt C1 du récepteur des glucocorticoïdes et du doigt C 2 du récepteur des oestrogènes. Le doigt C 1 est directement impliqué dans la fixation à l'ADN, tandis que le doigt C2 possède un rôle de "soutien" en étant impliqué dans des liaisons non spécifiques avec l'ADN (Green *et al.*, 1988). Ces expériences ont été confirmées par les travaux de M. Leid pour le récepteur de l'acide rétinoïque (Leid *et al.*, 1992).

Deux régions ont été clairement identifiées pour la spécificité de reconnaissance à l'ADN, par des expériences de mutagenèse dirigée : la boîte distale (D) et la boîte proximale (P) (Mader *et al.*, 1989 ; Danielsen, 1989 ; Umesomo., *et al.*, 1989) (Figure 15). La boîte P est essentielle à la spécificité de la liaison, la boîte D joue également un rôle. Une troisième région spécifique des récepteurs de l'acide rétinoïque serait également impliquée (DR) (Perlman *et al.*, 1993).

Outre la reconnaissance et la fixation à l'ADN, le domaine C peut intervenir dans d'autres fonctions.

– Fonction de dimérisation

Il est maintenant clair que les récepteurs de l'acide rétinoïque se fixent à l'ADN sous forme de dimères comme tous les récepteurs nucléaires (Kumar et Chambon, 1988 ; Tsai *et al.*, 1988 ; Forman et Samuels, 1990 ; Nagpal *et al.*, 1993). La région responsable de la dimérisation dans le domaine est la boîte D. Des expériences de délétion et de liaison à l'ADN *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'ils pouvaient s'associer sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère (Yu *et al.*, 1991 ; Bugge *et al.*, 1992 ; Nagpal *et al.*, 1993). Dans le processus d'hétérodimérisation une troisième région, est impliquée, cette région située dans le premier doigt de zinc interagit avec la région D du deuxième doigt de zinc de la protéine associée (Perlman *et al.*, 1993). Nous détaillerons l'aspect fonctionnel de cette interaction lors du chapitre portant sur le mécanisme de la transactivation par le récepteur.

Le domaine D

Ce domaine est relativement bien conservé, 61 à 74% d'homologie entre les différents récepteurs. Il contient une courte séquence basique : Arg-Asn-Lys-Lys-Lys-Lys, séquence qui constitue un signal potentiel de transfert nucléaire. En effet, les récepteurs de l'acide rétinoïque comme tous les récepteurs nucléaires par définition, présentent une localisation

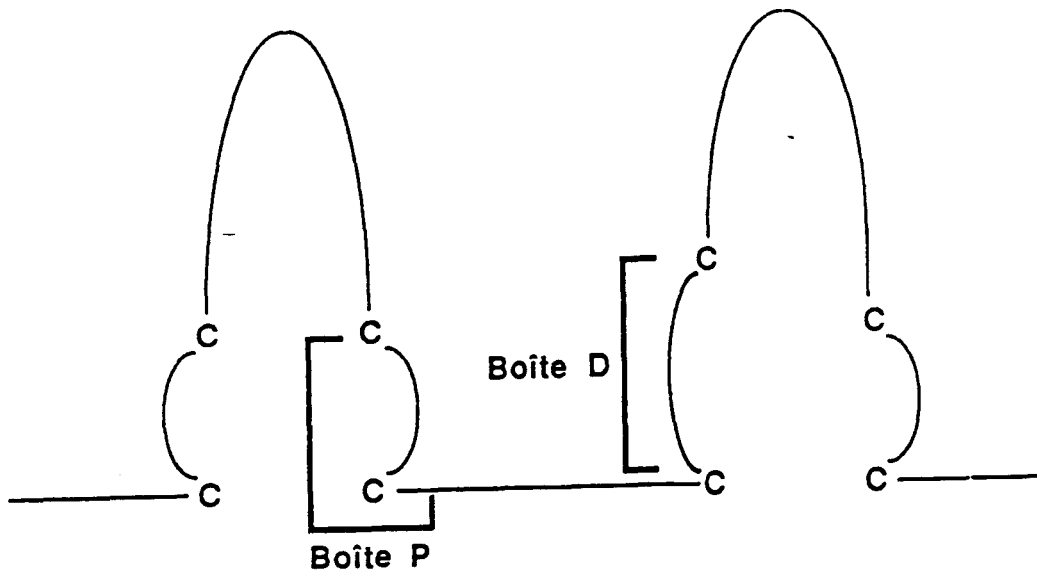


Figure 15 : Localisation des boîtes distales (D) et proximales (P) sur les doigts de zinc des récepteurs nucléaires.

nucléaire. Ceci reste vrai même en l'absence de ligand contrairement aux récepteurs stéroïdiens. Etant donné leur taille, il y a vraisemblablement un mécanisme actif de transfert vers le noyau. Un tel mécanisme nécessite logiquement des signaux de reconnaissance. Ces signaux ont été identifiés en 1987 par Picard et Yamamoto dans le récepteur des glucocorticoïdes, grâce à la construction de mutants de délétion et de protéines de fusion entre le récepteur muté et la β -galactosidase (Picard *et al.*, 1987). De tels signaux ont été retrouvés chez tous les récepteurs nucléaires. Ils sont constitués d'une courte séquence basique analogue au signal de translocation nucléaire de l'antigène T de SV40 (Kalderon *et al.*, 1984).

Le domaine E

Le domaine E est le plus grand domaine des récepteurs de l'acide rétinoïque. Il comprend de 220 à 222 acides aminés suivant le type de récepteur. Les acides aminés sont majoritairement hydrophobes, ce qui est logique du fait de son rôle de fixation d'une molécule globalement hydrophobe. Il est admis depuis longtemps que ce domaine est responsable de la liaison au ligand. Cependant les progrès spectaculaires dans l'étude des récepteurs thyroïdiens, de la vitamine D et de l'acide rétinoïque ont permis d'attribuer de nouvelles fonctions à cette région. Une des fonctions les plus remarquables de ce domaine est sa capacité de moduler puissamment l'activation transcriptionnelle de gènes cibles de manière dépendante du ligand (région AF2) contrairement au domaine A/B responsable de l'activité constitutive (AF1). Le site de cette activité n'est pas précisément cartographié dans le domaine E. Il n'est vraisemblablement pas confiné dans une séquence spécifique mais serait plutôt formé au niveau de la structure tridimensionnelle du récepteur par la mise en contact de différentes régions du domaine E (Webster *et al.*, 1989 ; Lees *et al.*, 1989). Outre cette région AF1, on a localisé quatre régions fortement impliquées dans les différentes fonctions du domaine E, respectivement de l'extrémité N terminale vers l'extrémité C terminale : Les régions L1; Ti ; DM et L2 (Forman et Samuels, 1990 a et b).

La région L1 : Elle est directement impliquée dans la fixation du ligand et diffère très fortement d'un type de récepteur à l'autre.

La région Ti : Elle est responsable de la régulation de la transcription ligand dépendante. Cette région a été à l'origine dénommée Ti comme "transcription inhibition" à l'image de son rôle chez les récepteurs stéroïdiens (Godowski *et al.*, 1987 ; Forman et Samuels, 1990a et b). Son rôle exact pour les récepteurs de l'acide rétinoïque n'est pas précisément établi. Elle interviendrait dans les processus de dimérisation avec la région DM.

La région de dimérisation (DM) : Cette région est avec la région Ti la seule zone conservée entre presque tous les récepteurs nucléaires. C'est l'une des deux régions, avec la région C, impliquée dans la dimérisation des récepteurs nucléaires grâce à une répétition de neuf heptades d'acides aminés hydrophobes, repliée au sein d'une hélice α classique (Forman et Samuels, 1990). On sait que de telles séquences sont favorables à la formation de dimères entre molécules, comme l'illustrent bien les modèles de protéines à "leucine zipper" ou à motif "hélice-boucle-hélice" (Busch et Sassone-Corsi, 1990). Le groupe de Samuel a montré par la suite, que des mutants de délétion de la neuvième heptade des RARs perdent leurs capacité à hétérodimériser (Au-Fliegner *et al.*, 1993)

La région L2 : Cette région est avec L1, responsable de la fixation au ligand. Ces deux zones devraient se retrouver associées par des repliements de la structure primaire des récepteurs pour former une "poche hydrophobe". Cette hypothèse est formulée par homologie aux récepteurs stéroïdiens car jusqu'à présent aucune structure tridimensionnelle du récepteur n'a pu être déterminée. En effet, la taille importante et la structure hydrophobe du récepteur rendent difficiles de telles études.

Le domaine F

Ce domaine est peu conservé d'un récepteur à l'autre et sa fonction reste encore mal définie. Il ne comprend que 16 à 23% d'homologie (Green et Chambon, 1988) ce qui a permis l'obtention d'anticorps spécifiques (Gaub *et al.*, 1989 ; Ali *et al* 1992 ; Sablonnière *et al* 1994).

c) Les isoformes des RARs

- Structure

Les différents récepteurs de l'acide rétinoïque présentent de nombreuses isoformes divergeant uniquement dans la région 5' non traduite et/ou dans le domaine A. Les isoformes, issues d'un même gène, résultent soit de l'épissage alternatif des exons du domaine A (Leroy *et al.*, 1991), soit de l'utilisation d'un deuxième promoteur (Giguère *et al.*, 1990). Les différentes isoformes sont bien conservées d'une espèce à l'autre (Lohnes *et al.*, 1992).

On a longtemps pensé que les multiples isoformes avaient un rôle distinct et spécifique. Elles présentent une répartition spatio-temporelle différente, et de plus une très forte conservation interspécifique.

- Expression

Des analyses en Northern Blot ont permis de déterminer la répartition des RARs et de certaines de leurs isoformes . Ces dernières présentent une répartition élective au cours de l'embryogenèse.

L'embryogenèse

L'expression de la plupart des isoformes est tissu-spécifique et varie dans le temps. RAR α 1 fait exception à cette règle car cette protéine est ubiquitaire et son taux d'expression reste constant (Brand *et al.*, 1990 ; Leroy *et al.*, 1991). RAR β 1, β 2, β 3 sont particulièrement abondants dans le cerveau embryonnaire et ils pourraient jouer un rôle dans le développement du système nerveux central. Les transcrits RAR γ 1 et 2 sont très fortement exprimés dans le précartilage embryonnaire et pourraient jouer un rôle dans la chondrogenèse (Dollé *et al.*, 1989, 1990).

L'adulte

RAR α 1 est également ubiquitaire chez l'adulte. Cette répartition de RAR α 1 suggère que RAR α pourrait avoir un rôle de protéine domestique (Brand *et al.*, 1990 ; Leroy *et al.*, 1991 ; Lohnes *et al.*, 1992). RAR α 2 est fortement exprimé dans l'intestin, les poumons, le foie et les reins. Les transcrits RAR β 1, β 2, β 3 sont hautement exprimés dans le cerveau comme lors de l'embryogenèse, ils sont également abondants dans la peau et les poumons. RAR γ 1 et 2 sont présents presque exclusivement dans les tissus cutanés et cartilagineux.

La haute conservation interspécifique des différentes isoformes suggère un rôle spécifique de chacune de ces isoformes. De manière surprenante, des études récentes menées sur des souris transgéniques montrent une redondance fonctionnelle des isoformes, ainsi la perte de l'expression de RAR α 1 et RAR γ 1 peut être supplée par les autres isoformes (Li *et al.*, 1993 ; Lohnes *et al.*, 1993). Ce n'est qu'en cas de knock-out de l'ensemble des isoformes d'un RAR qu'apparaissent des troubles du développement.

1.2.2 Une nouvelle classe de récepteurs de l'acide rétinoïque : Les RXRs

a) Découverte

Le travail de D. Mangelsdorf a permis la mise en évidence d'une nouvelle classe de récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque avec la découverte d'un premier membre de cette

famille, RXR α (Mangelsdorf *et al.*, 1990). C'est la démonstration que les récepteurs de l'acide rétinoïque, de la vitamine D et de l'hormone thyroïdienne étaient associés à des protéines annexes pour augmenter leur affinité vis à vis de l'ADN, qui est à la base de cette recherche (Burnside *et al.*, 1990 ; Lia *et al.*, 1990).

Ainsi par une approche séduisante basée sur la production de mutations ponctuelles dans le sous domaine Ti du récepteur β des hormones thyroïdiennes, O'Donnel et Koenig proposent qu'un facteur nucléaire serait capable de se fixer sur cette région et de réguler la transcription de gènes cibles. Cette protéine nommée TRAP (Thyroid Hormone Receptor Auxiliary Protein) a été caractérisée (Burnside *et al.*, 1990 ; Lazar et Berrodin, 1990 ; Beebe *et al.*, 1991 ; O'Donnell *et al.*, 1991 ; Darling *et al.*, 1991). Elle est capable d'augmenter la capacité de fixation des récepteurs des hormones thyroïdiennes à l'ADN, de se fixer elle-même sur l'ADN, *via* un élément de réponse proche structuralement d'un TRE et d'interagir avec les récepteurs des hormones thyroïdiennes. L'équipe de M. Rosenfeld en cherchant à caractériser de telles protéines, a mis en évidence l'existence d'un deuxième récepteur, RXR β (Yu *et al.*, 1991). Des résultats tout à fait concordants ont été rapportés ensuite par de nombreuses équipes quant au rôle de ces récepteurs (Yu *et al.*, 1991 ; Kliwer *et al.*, 1992 ; Zhang *et al.*, 1992, Leid *et al.*, 1992). Ils peuvent donc se lier sous forme d'hétérodimères avec les récepteurs de l'hormone thyroïdienne, de la vitamine D ou les RARs et cette liaison est nettement supérieure à celle des homodimères (40 à 50 fois)

Depuis on a découvert un troisième récepteur, RXR γ , chez la souris ainsi que de nombreuses isoformes (Leid *et al.*, 1992 ; voir les revues de Mangelsdorf, 1992 ; Wolf G., 1993). L'existence d'homologues dans de nombreuses autres espèces (Rowe *et al.*, 1991, Blumberg *et al.*, 1992) et de protéines apparentées notamment l'ultraspirale USP de la drosophile (Oro *et al.*, 1990) indique que cette famille de gènes est conservée tout au long de l'évolution. Les récepteurs sont reliés sur le plan de leur structure aux RARs mais diffèrent quant à leur liaison à leur cible d'ADN et à la fixation du ligand.

b) Structure

Les RXRs présentent entre eux un haut degré de conservation, 92% d'homologie au niveau de leur domaine de liaison à l'ADN et 86% au niveau du domaine de liaison au ligand. Par contre, ils ne présentent que peu d'homologie avec les RARs au niveau de la région C (61%) et surtout E (27%). Leur masse est comprise entre 48 et 56 kDa (Leid *et al.*, 1992).

La structure tridimensionnelle du domaine de liaison de RXR α a été élucidée par RMN (Lee *et al.*, 1993) (Figure 16). A l'image des récepteurs nucléaires, le domaine C peut être séparé en deux modules. Chaque module est constitué d'une zone de fixation du zinc et d'une hélice α amphipatique immédiatement adjacente. Les hélices α de chaque

module se superposent perpendiculairement et se stabilisent par des liaisons hydrophobes. Cependant au contraire des récepteurs de l'acide rétinoïque, le domaine de liaison à l'ADN de RXRs comporte une troisième hélice α , située en position C terminale et jouxtant la deuxième hélice α . Cette hélice jouerait un rôle fondamental dans la reconnaissance des séquences cibles d'ADN (Wilson *et al.*, 1992 ; Kurokawa *et al.*, 1993 ; Perlman *et al.*, 1993).

c) Le ligand

De manière très intéressante le ligand physiologique des RXRs, découvert récemment, est un métabolite de l'acide rétinoïque, l'acide 9 cis rétinoïque, produit d'isomérisation *in vivo* de l'acide rétinoïque. C'est un bon activateur des RARs où, il a la même activité que l'acide tout trans rétinoïque mais il est 40 fois plus actif que ce dernier sur les RXRs (Levin *et al.*, 1992).

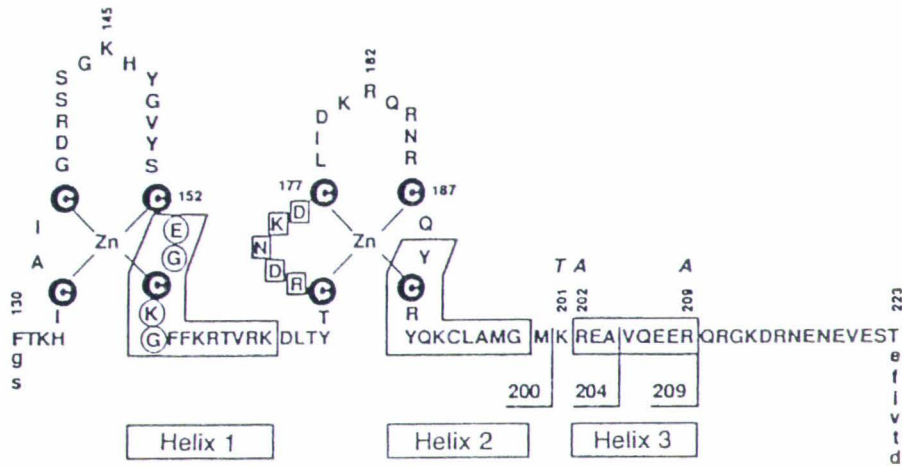


Figure 16 : Structure des doigts de zinc des récepteurs RXRs.
Application à la séquence du récepteur α .
(D'après Lee *et al.*, 1993)

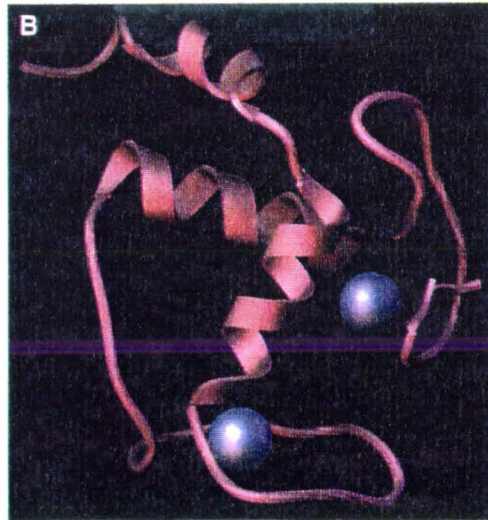


Figure 16b : Structure tridimensionnelle du domaine de liaison à l'ADN des RXRs.
Les trois hélices α sont représentées en rouges.
(D'après Lee *et al.*, 1993)

2 - LA REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE

2.1 Les éléments de réponse

Le contrôle transcriptionnel qu'exercent des récepteurs de l'acide rétinoïque sur les gènes nécessite la reconnaissance et la fixation à des séquences signal régulant l'expression de gènes spécifiques. Nous avons vu la structure des récepteurs dans les chapitres précédents, nous allons maintenant étudier, les séquences cibles sur l'ADN qui leur sont spécifiques.

Les sites reconnus par les membres de la superfamille des récepteurs stéroïdiens s'appellent les H.R.E. (hormone responsive element). Ils se présentent sous forme palindromique, hémipalindromique, ou en répétition directe. La séquence consensus reconnue par les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR et RXR) est commune aux récepteurs de l'hormone thyroïdienne et de la vitamine D. Elle comporte 6 paires de bases : AGGTCA plus ou moins dégénérées, (Umesono *et al.*, 1988-1991 ; Näär *et al.*, 1991 ; Carlberg *et al.*, 1993 ; Tini *et al.*, 1993).

Les éléments de réponse spécifiques de l'acide rétinoïque sont dénommés RARE "Retinoic acid responsive element" ou RXRE pour les récepteurs RXRs.

Le premier RARE a été localisé en amont du promoteur du gène codant RAR β (de Thé *et al.*, 1990). Il est caractérisé par l'existence de deux répétitions directes de séquences proches de AGTTCA.

D'autres séquences RAREs ont été localisées en amont de nombreux gènes régulés par l'acide rétinoïque. Le premier RXRE, quant à lui, a été identifié dans la région promotrice de la CRBPII (Mangelsdorf *et al.*, 1991) (Tableau 4). Nous avons vu la structure des éléments de réponse à l'ADN, nous allons voir maintenant leur spécificité vis à vis des différents récepteurs.

2.2 Spécificité des éléments de réponse.

C'est l'espacement et l'orientation des motifs qui favorisent la fixation d'un type donné de récepteurs. Ainsi, la forme palindromique autorise la fixation des quatre types de récepteurs. Par contre, il n'en est pas de même pour la répétition directe. L'espacement des motifs par 2 ou 5 paires de bases lui confère les propriétés d'un RARE (élément de réponse de l'acide rétinoïque par les RARs). Si les motifs sont séparés par 3 paires de bases, on obtient un VDRE (élément de réponse à la vitamine D). Enfin les RXR et les TR se fixent sur les motifs espacés de 1 paire de base et 4 paires de base respectivement (Näär *et al.*, 1991 ; Rottman *et al.*, 1991, Umesono *et al.*, 1991 ; Mangelsdorf, 1991 ; Durand *et al.*,

<u>GGTTCA</u> CCGAA <u>AGTTCA</u>	mRAR β	RARE (Sucov <i>et al.</i> , 1990)
<u>GGTTCA</u> CCGAA <u>AGTTCA</u>	hRAR β	RARE (de Thé <i>et al.</i> , 1990)
<u>AGGTCA</u> CTGAC <u>AGG CA</u>	mCP-H	RARE (Munos-Carores <i>et al.</i> , 1990)
<u>GGGTCA</u> TTCAG <u>AGTTCA</u>	hADH-3	RARE (Duester <i>et al.</i> , 1991)
CCAGAC <u>AGGTTGACCCTT</u> - TTTCTA <u>AGGGCTTAACCTA</u> - <u>GCTCACCTC</u>	mLamB1	RARE (Vasios <i>et al.</i> , 1989)
<u>TGACCTTTGGCGTGGGA</u>	rPEPCK	RARE (Lucas <i>et al.</i> , 1991)
GCTGTCA C <u>AGGTCA</u> C <u>AGGTCA</u> C <u>AGGTCA</u> C <u>AG</u> - <u>GTCA</u>	rCRBP II	RXRE (Mangelsdorf <i>et al.</i> , 1991)
<u>ATGAGTCAGTTTGC</u> GGG- <u>TGACTCT</u>	STR1	RARE (Nicholson <i>et al.</i> , 1990)

Tableau 4: Quelques éléments de réponse de l'acide rétinoïque. m RAR β : promoteur du gène RAR β de souris. hRAR β : promoteur du gène du récepteur RAR β humain. m CP-H : promoteur du gène du complément H de souris. h ADH-3 : promoteur du gène de l'alcool déshydrogénase humaine. MLam B1 : promoteur de la laminine B1. rPECK : promoteur du gène de la phosphoénolpyruvate carboxypeptidase; r CRBP II : promoteur du gène de la CRBP II de rat. STR1 : promoteur du gène de la stromélysine

1992). Cette loi dite du 1-2-3-4-5 est cependant loin d'être absolue. Ainsi, l'élément de réponse de la vitamine D, en amont du gène humain de l'ostéocalcine est constitué de trois répétitions directes séparées par 6 paires de bases (DR 6), par contre la dernière répétition est imparfaite et elle est séparée de la précédente par 3 paires de bases (Carlberg *et al.*, 1993 ; Green *et al.*, 1993) (Tableau 5).

2.3 Le mécanisme de l'activation transcriptionnelle

La transcription d'un gène eucaryote est initiée par la reconnaissance et la fixation sur son promoteur du facteur de transcription. La séquence consensus du promoteur, généralement une boîte TATA, fixe le complexe de transcription et elle est responsable de l'expression basale du gène. Le complexe de transcription est soumis à toute une régulation par des protéines nucléaires dont les récepteurs nucléaires.

Le mécanisme de la régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires, et en particulier par les RARs, dépend d'un mécanisme complexe et combinatoire. Le mécanisme d'action des récepteurs de l'acide rétinoïque, de la vitamine D et de l'hormone thyroïdienne est un peu plus particulier. En effet, ces récepteurs s'associent préférentiellement aux RXRs pour activer la transcription des gènes, contrairement aux récepteurs stéroïdiens qui ne se présentent que sous la forme homodimérique. Les hétérodimères reconnaissent plus particulièrement les répétitions directes (Kurokawa *et al.*, 1993 ; Perlman *et al.*, 1993). Cette hétérodimérisation augmente considérablement leur affinité pour l'ADN (Leid *et al.*, 1992).

Outre l'ADN et les récepteurs, l'intervention d'un troisième partenaire, le ligand, est capitale, dans le mécanisme d'activation transcriptionnelle. En effet suivant la nature et la concentration du ligand, le niveau d'activation et les gènes régulés seront différents. Les RARs sont aussi bien activés par l'acide 9 cis rétinoïque que par l'acide rétinoïque tout trans (Allenby *et al.*, 1993). Un hétérodimère RAR/RXR peut fixer soit deux molécules de l'acide 9 cis rétinoïque soit une molécule d'acide rétinoïque tout trans et une molécule d'acide 9 cis rétinoïque. Rappelons à ce niveau que le domaine E, responsable de la liaison au ligand, comporte une région transactivatrice ligand-dépendante. Cette combinaison de ligands permet vraisemblablement une subtile régulation de la transcription. Avant même la fixation du ligand, la concentration de celui-ci influence la nature des gènes régulés. Ainsi en présence de concentrations nanomolaires d'acide 9 cis rétinoïque, seuls des homodimères RXR/RXR se forment. Ces homodimères sont responsables de la transcription de gènes spécifiques le plus souvent différents des gènes contrôlés par les hétérodimères RAR/RXR (Yu *et al.*, 1991 Leid *et al.*, 1992). Nous reviendrons sur l'importance du ligand dans le paragraphe suivant.

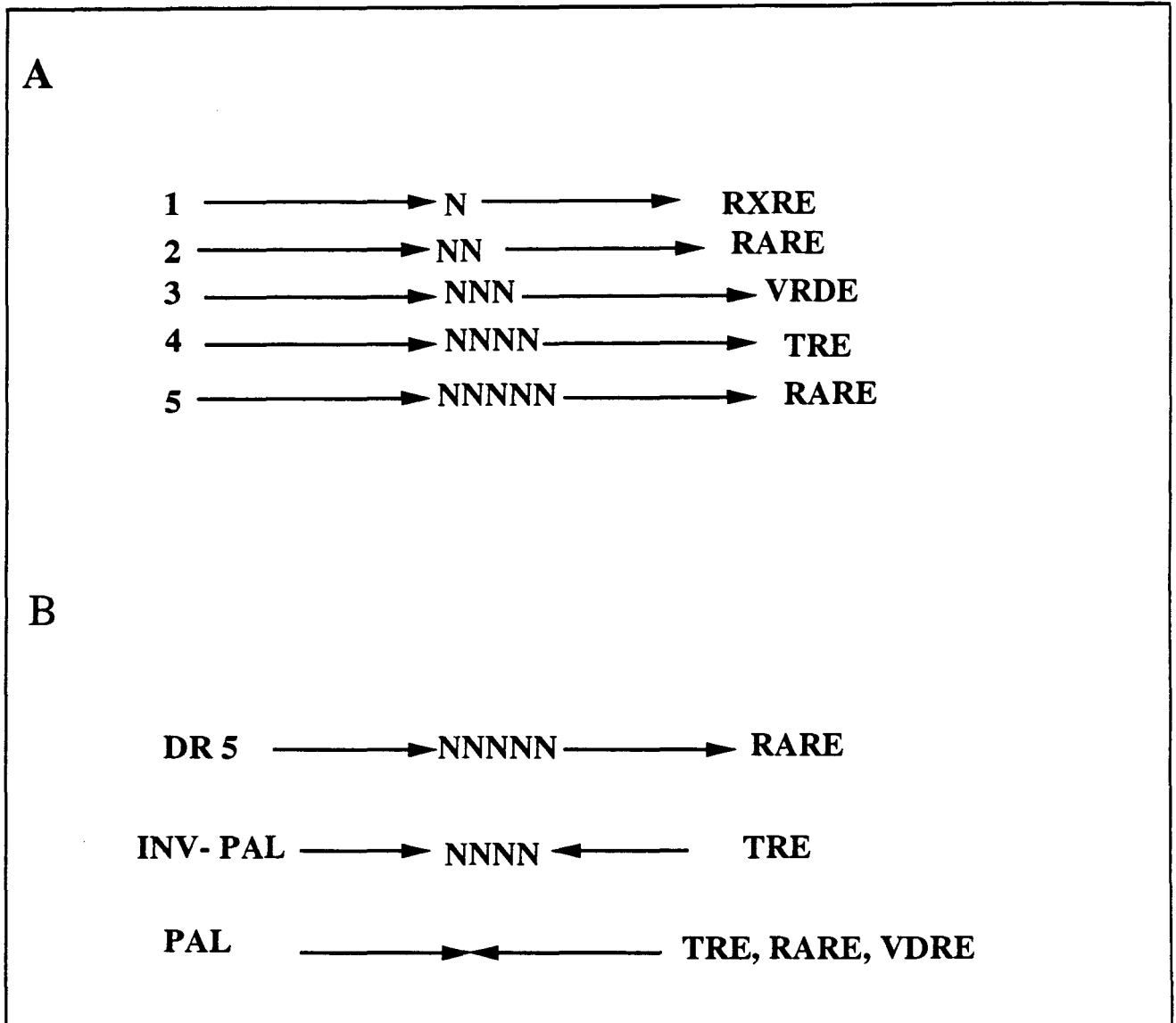
MOTIF REPETE : AGGTCA

Tableau 5 : Etude de la spécificité des éléments de réponse de l'acide rétinoïque par modifications des espacements entre les motifs du palindrome.

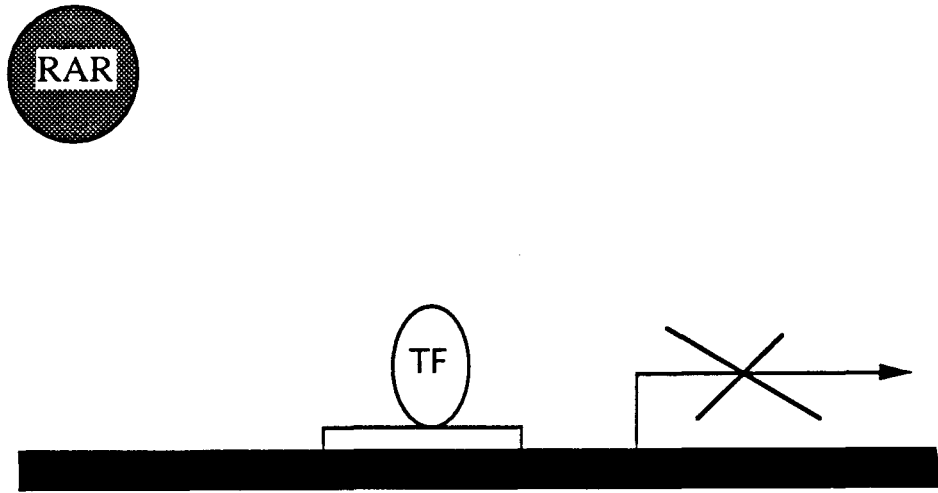
A : Règle du 1-2-3-4-5 : Elle permet de prédire la spécificité d'un élément de réponse à répétition directe.

B : Analyse de l'effet des orientations des différents éléments de réponse.

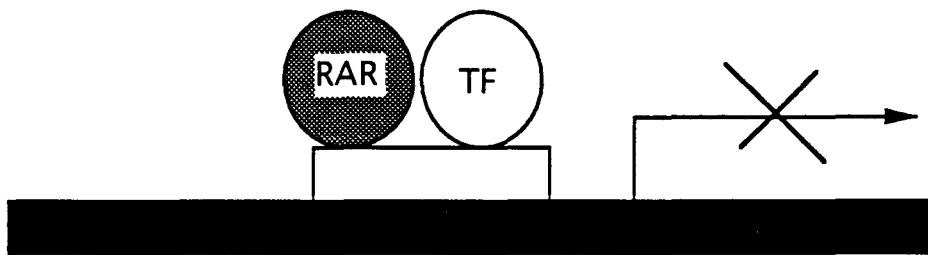
Les récepteurs de l'acide rétinoïque peuvent également interférer avec d'autres facteurs de transcriptions soit par compétition sur un site de liaison à l'ADN soit par interaction protéine-protéine (Figure 17).

A

64



B



C

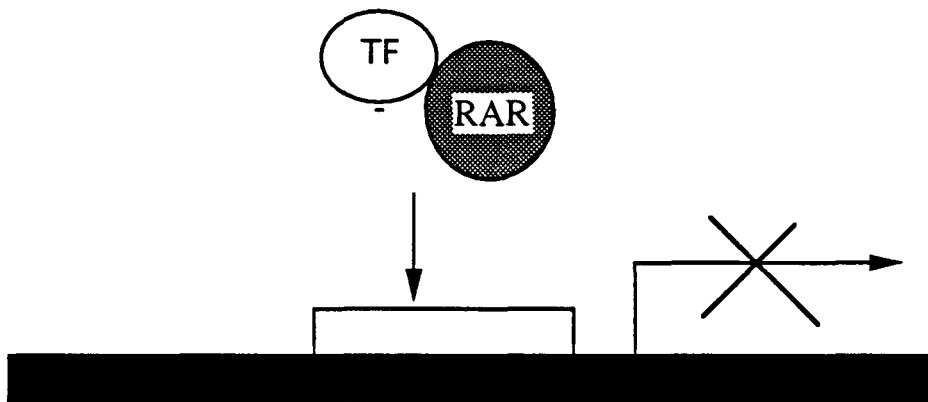


Figure 17 : La répression transcriptionnelle

17 A : Compétition pour un même site sur l'ADN

17 B : Interaction protéine -protéine, co-occupation d'un même site

17 C : Interaction protéine-protéine, séquestration

TF : Facteur de transcription

2.4 Les mécanismes de la répression transcriptionnelle

2.4.1) Fixation sur les mêmes sites d'ADN

Le cas le mieux décrit de compétition pour la fixation sur un même site d'ADN est celui de l'ostéocalcine (Schüle *et al.*, 1990). Cette protéine de minéralisation des os en formation, est produite par les ostéoblastes mûrs qui ne prolifèrent plus. Le gène de l'ostéocalcine est régulé positivement par les récepteurs de l'acide rétinoïque et de la vitamine D3 *via* une séquence nommée RARE ou VDRE au choix. De manière surprenante le complexe Jun/fos c'est-à-dire le facteur AP 1 est capable de se fixer également sur cette séquence. Il s'agit en effet d'un VDRE un peu particulier qui combine un site AP 1 et le HRE palindromique classique (Figure 18). La fixation du complexe jun-fos à ce site inhibe l'expression du gène de l'ostéocalcine. Si une protéine est fixée, elle empêche la fixation de l'autre. Un mécanisme subtil de compétition va donc conduire à une modulation fine de l'expression de ce gène.

2.4.2) Interaction protéine-protéine

Il s'agit soit d'interactions entre récepteurs nucléaires (RAR, RXRs) soit d'associations entre récepteurs de l'acide rétinoïque et facteurs de transcription.

L'un des exemples les plus spectaculaires de régulation génique par hétérodimères RAR/RXR est celui de la CRBP II (Mangelsdorf *et al.*, 1991). Rappelons que cette protéine de liaison du rétinol constitue un élément clé de la régulation métabolique de l'acide rétinoïque. Son niveau d'expression dépend à la fois du type de HRE, de la quantité et de la nature du ligand endogène, et enfin de la nature des dimères de récepteurs (Figure 19).

La présence d'acide 9 *cis* rétinoïque à des concentrations nanomolaires induit la formation d'homodimères RXR. Fixés sur un DR1, ils régulent positivement le gène de la CRBP II, par contre fixés sur un DR2 la transcription est inhibée. A l'inverse si l'acide rétinoïque est le ligand le plus abondant, les hétérodimères se forment préférentiellement. Ceux-ci liés à un DR1 répriment la transcription, associés à un DR2 ils activent le gène. Ainsi l'expression de la CRBP II est rétrocontrôlée par des ligands dont elle contrôle plus ou moins directement les effets biologiques.

Cet exemple de co-occupation d'un même site est particulièrement remarquable, il montre le haut niveau de régulation du taux d'acide rétinoïque et donc de son mécanisme d'action.

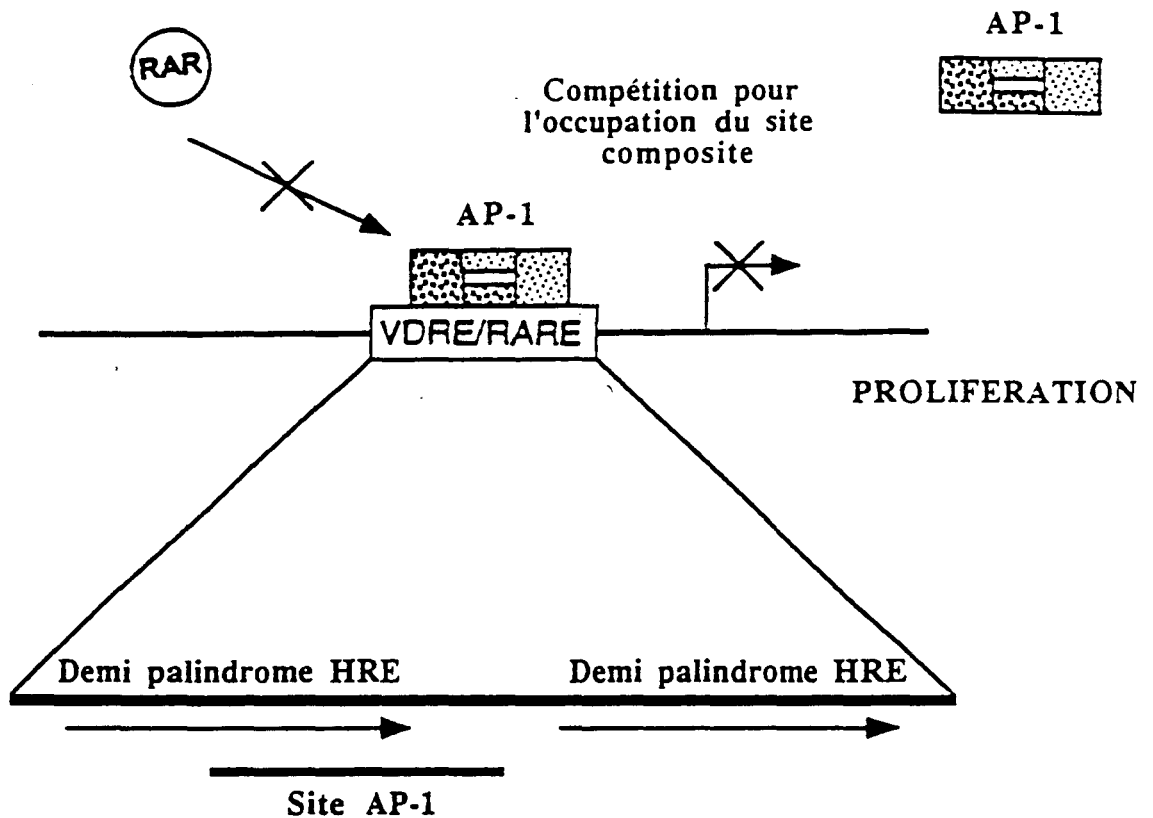


Figure 18 : Un exemple de compétition entre le récepteur de l'acide rétinoïque et un facteur de transcription AP1 : la régulation de la transcription du gène de l'ostéocalcine.

Les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) et de la vitamine D reconnaissent le même élément de réponse VRDE/RARE. Ce dernier est un HRE composite qui contient également un site de fixation AP1.

(D'après Schüle et *al.*, 1990)

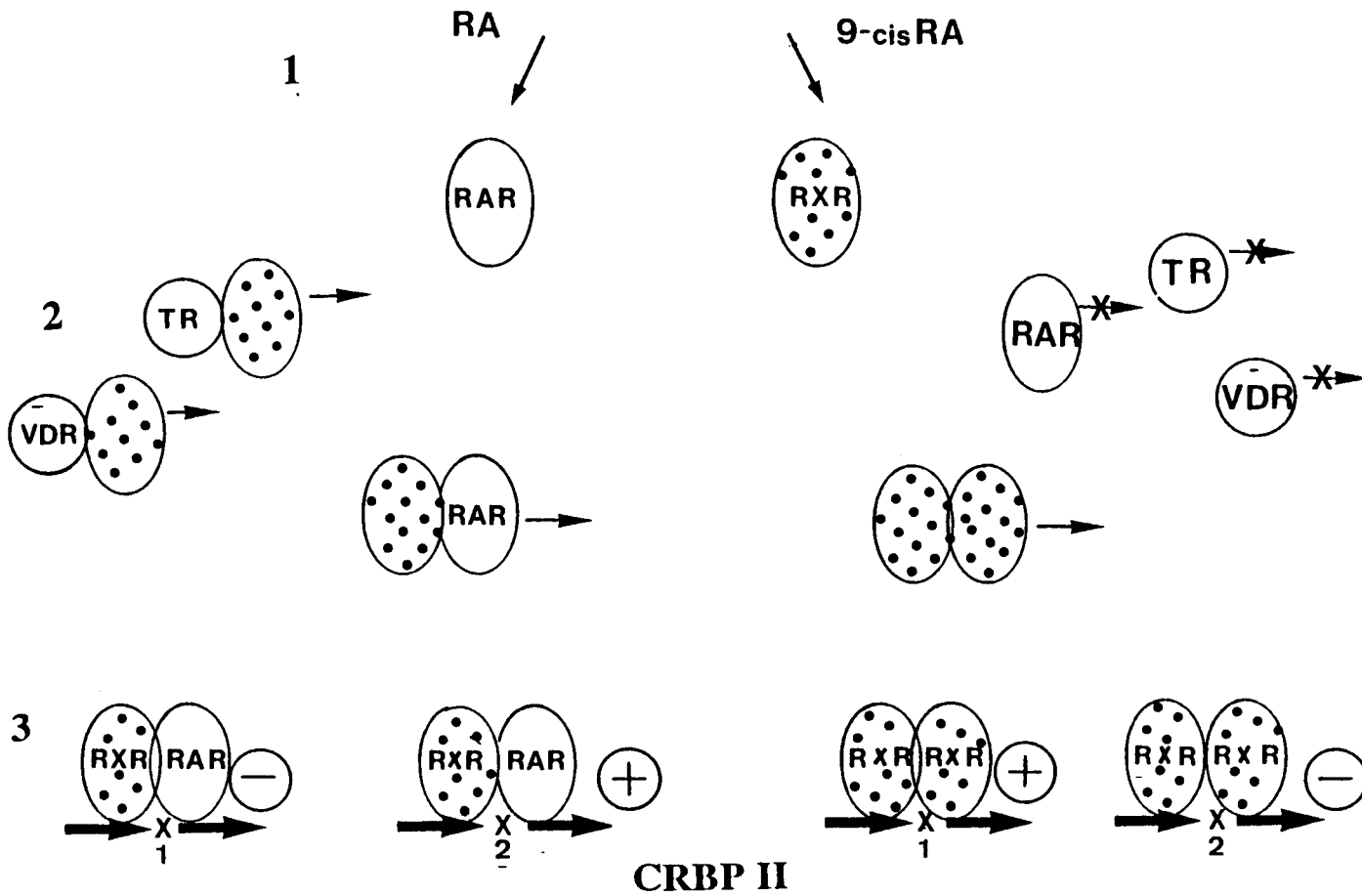


Figure 19 . Régulation de la transcription du gène de la CRPB II : un exemple d'interaction protéine - protéine.
(D'après Mangelsdorf et *al.*, 1991)

Des interactions directes avec des facteurs de transcription ont été évoquées depuis peu pour les récepteurs de l'acide rétinoïque mais également pour d'autres membres de la famille des récepteurs nucléaires tel le récepteur des glucocorticoïdes (Lucibello *et al.*, 1990), de l'hormone thyroïdienne (Zhang *et al.*, 1991) pour le facteur AP 1 mais également pour d'autres facteurs de transcription NF-1 ou CREB (Martinez *et al.*, 1991 ; Chatterjee *et al.*, 1991).

C'est l'étude de la régulation de toute une série de gènes codant pour des métalloprotéases (collagénase et stromélysine) impliquées dans la dégradation des protéines du collagène et des membranes basales qui a permis de mettre en évidence ces interactions au niveau du récepteur de l'acide rétinoïque (Nicholson *et al.*, 1990 ; Schüle *et al.*, 1991). Le gène de la collagénase est réprimé par des récepteurs de l'acide rétinoïque. De plus des séquences régulatrices AP 1 sont présentes en amont du site promoteur. La fixation du complexe protéique jun-fos active fortement ce gène. Il semble que c-jun forme un hétérodimère spécifique avec RAR, hétérodimère inactif sur la transcription du gène de la collagénase (Schüle *et al.*, 1991). RAR agit donc ici en séquestrant la protéine AP1. Des études utilisant des mutants de délétion ont mis en évidence que cette dimérisation implique à la fois les domaines C et E du récepteur de l'acide rétinoïque.

Toutes ces études montrent bien la possibilité d'interactions multiples impliquant des éléments qui intègrent au niveau transcriptionnel des stimuli appartenant à des voies très différentes (Nous reverrons de tels mécanismes lors de la présentation des résultats).

2.5 Conclusion

On en arrive à une situation d'une grande complexité qui montre bien la plasticité du système de régulation transcriptionnelle. Des aspects importants, tels le nombre de récepteurs et d'isoformes, la formation d'homo ou hétérodimères, la nature du ligand, l'intervention d'autres protéines et l'organisation structurale des RAREs permettent d'aboutir à l'extraordinaire variété d'effets biologiques observés *in vivo*.

Ces études posent les bases moléculaires pour expliquer le rôle thérapeutique de l'acide rétinoïque dans de nombreux processus tumoraux, notamment en exploitant un possible effet de balance entre oncogènes (AP 1) responsables de la prolifération cellulaire et récepteurs de l'acide rétinoïque responsables de la différenciation cellulaire. Cependant il faut se méfier des conclusions hâtives et bien mesurer la difficulté de généraliser des

résultats obtenus sur quelques lignées cellulaires, comme nous le reverrons lors de la présentation d'autres activations combinatoires lors de nos résultats.

2.4 Pathologie

Le plus bel exemple de cette interaction est celui de la leucémie aiguë à promyélocytes. Cette maladie est une forme de leucémie myéloïde aiguë qui se caractérise au niveau moléculaire par la présence d'une translocation chromosomique spécifique des bras longs des chromosomes 15 et 17:t(15;17) (Rouley *et al.*, 1977 ; Degos *et al.*, 1991). L'équipe de Anne Dejean montra que cette translocation induisait la formation d'un ARNm hybride codant une protéine de fusion à partir d'un locus situé sur le chromosome 15 appelé PML et le gène codant pour RAR α (de Thé *et al.*, 1990a ; Pandolfi *et al.*, 1991). La protéine de fusion s'appelle PMLRAR α . Elle présente un poids moléculaire de 103 KDa et elle contient les 3/4 de la partie N terminale de la protéine PML normale ainsi que les domaines BCDE de RAR α (Figure 20).

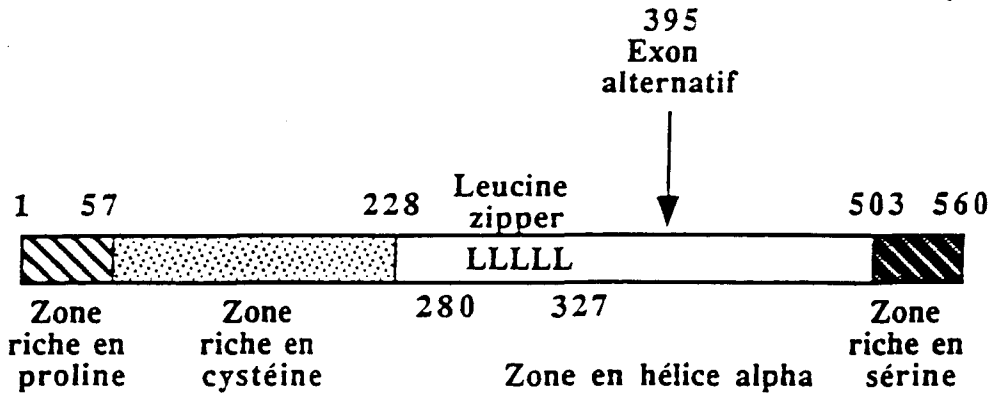
La protéine PML est un facteur de transcription appartenant à la vaste famille de protéines comportant des doigts de zinc (de Thé *et al.*, 1991 ; Kastner *et al.*, 1992 ; Freemont *et al.*, 1991).

Les mécanismes qui pourraient conduire cette protéine à être leucémogène sont multiples. Jusqu'à présent deux mécanismes ont été évoqués, ils procèdent tous deux des propriétés transactivatrices combinatoires des RARs.

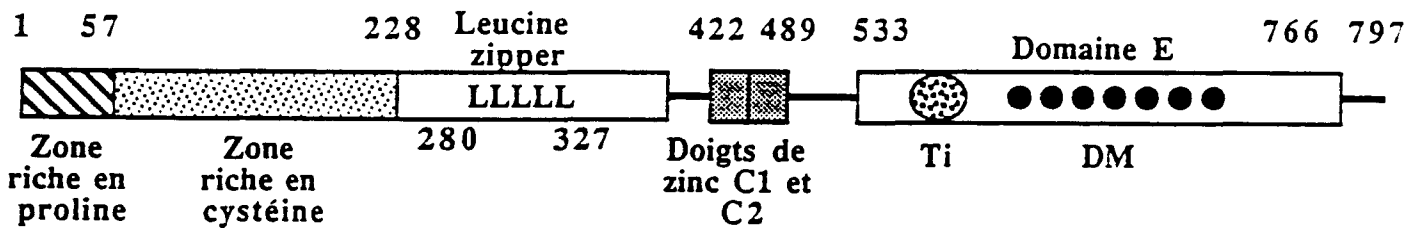
Cette protéine hybride peut dimériser, soit avec les protéines normales RAR α , PML, RXR et les facteurs de transcription nucléaire soit avec la protéine hybride elle-même. Les hétérodimères hybrides interfèrent avec les fonctions normales des dimères. La transcription en est profondément altérée. Certains gènes sont totalement inhibés alors que d'autres sont surexprimés. Si on associe RAR α et la protéine de fusion, on constate que cette dernière agit comme un régulateur négatif dominant de RAR α (Kakizuka *et al.*, 1991 ; de Thé *et al.*, 1991). De plus, des études récentes montrent que la protéine chimère peut s'associer avec c-Jun ou c-Fos pour stimuler la transcription de gènes indicateurs placés sous le contrôle du promoteur de la collagénase et que cet effet antagonise l'action normale de la protéine RAR α (Doucas *et al.*, 1993).

Un deuxième mécanisme d'action qui découle du premier intervient également. La protéine hybride en excès séquestre les RXRs. Ils ne sont alors plus libres pour interagir avec les autres récepteurs nucléaires notamment le VDR (Perez *et al.*, 1993). Ce qui expliquerait les effets différenciateurs de la vitamine D sur les cellules leucémiques promyélocytaires (De Lucas *et al.*, 1988 pour revue).

PROTEINE PML NORMALE



PROTEINE DE FUSION PML-RAR ALPHA.



RAR ALPHA NORMAL

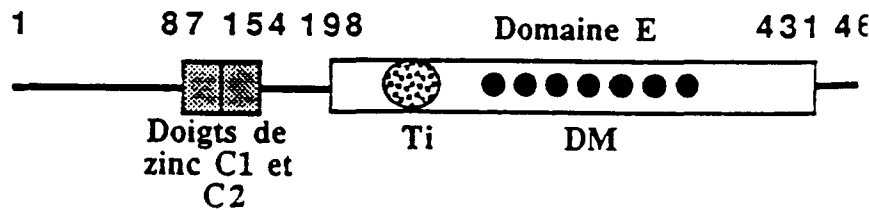


Figure 20 : La translocation t(15-17) présente dans les leucémies aigües à promyélocytes entraîne la fusion de RAR α et d'un facteur de transcription nommé PML. (D'après De Thé *et al.*, Kakizura *et al.*, 1991).

3 - AUTRES MECANISMES D'ACTION

3.1 Les protéines kinases

Les effets biologiques de l'acide rétinoïque peuvent s'exercer par des mécanismes d'action indépendants des récepteurs de l'acide rétinoïque. Des systèmes de transduction utilisant des messagers secondaires tels que l'AMPc ou le diacylglycérol (DAG) sont sollicités. Les cibles de ces messagers secondaires sont des protéines kinases. Ainsi des variations dans l'activité de la pKA ont été observées dans plusieurs types cellulaires après adjonction d'acide rétinoïque (Evain Brion *et al.*, 1991). Au cours de la différenciation vers la voie granulocytaire des cellules de leucémie aiguë myéloblastique et promyélocytaire HL 60, l'activité de la pKA est fortement stimulée indépendamment des récepteurs de l'acide rétinoïque (Olsson *et al.*, 1982).

Les protéines kinases pourraient phosphoryler et activer des protéines nucléaires qui à l'image des facteurs de transcription réguleraient l'expression de gènes. La CREBP (cyclic AMP responsive element binding protein) serait l'un de ces facteurs. On sait qu'il se lie à un véritable élément de réponse nommé CRE (cyclic AMP responsive element) détecté dans les régions promotrices de certains gènes.

3.2 Les effets post-transcriptionnels

Des effets biologiques membranaires ont également été invoqués, notamment des modifications des glycoprotéines de surface. Ces dernières ont un rôle clé dans les phénomènes d'adhérence et de croissance cellulaire. Or, les cellules néoplasiques perdent justement cette capacité d'adhésion. Les protéines de surface influencent également l'activité des sites récepteurs en modifiant leur accessibilité notamment vis à vis des hormones et des facteurs de croissance. Il augmente notamment la syalidation des glycoprotéines. Par ailleurs Lotan a établi l'existence d'une corrélation entre l'augmentation de l'incorporation des sucres et l'inhibition de la croissance (Lotan *et al.*, 1987).

Des effets membranaires ont également été invoqués pour le rôle thérapeutique de certains rétinoïdes de synthèse. Ainsi l'étrétinate normaliserait la glycosylation des kératinocytes issus de patients atteints de psoriasis (Geiger *et al.*, 1986). Ces kératinocytes pathologiques possèdent en effet d'importantes anomalies au niveau des protéines de surface.

Enfin l'acide rétinoïque est capable de se lier de manière covalente à certaines protéines par une liaison thioester, ce processus est nommé rétinoylation. Dans les cellules

leucémiques HL 60 plus d'une vingtaine de protéines ainsi rétinoylées ont été découvertes. Ce phénomène altère considérablement leurs propriétés (Takashahi *et al.*, 1992).

De tels mécanismes d'action restent cependant largement minoritaires en regard de l'activité transcriptionnelle des récepteurs des rétinoïdes.

III ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE DES RETINOIDES DE SYNTHESE

Les rétinoïdes de synthèse actuels sont des molécules très éloignées d'un point de vue structural de l'acide rétinoïque, aussi on définit maintenant les rétinoïdes comme des substances capables d'induire des réponses spécifiques en se liant aux récepteurs de l'acide rétinoïque (Sporn et Roberts, 1985). Comme nous l'avons vu précédemment, les rétinoïdes actuellement utilisés en thérapeutique présentent une importante toxicité, aussi l'un des enjeux majeurs de la pharmacochimie des rétinoïdes est de concevoir des molécules moins toxiques. Nous développerons ce dernier chapitre de notre revue générale autour des relations structure-activité des rétinoïdes de synthèse et des modèles pharmacologiques utilisés pour ces études.

La plupart de ces composés ont été synthétisés par 4 grandes équipes, appartenant à des laboratoires universitaires, celui de M. Dawson (Dawson *et al.*, 1981, 1983, 1985, 1989) et celui de K. Shudo (Jetten *et al.*, 1987 ; Kagechika *et al.*, 1988, 1989 a b c ; Yamakawa *et al.* 1990), ou industriels, Hoffman La Roche (Bollag et Hartman 1983 ; Loeliger *et al.*, 1980 ; Crettaz *et al.*, 1990), et le CIRD en France (Delecluse *et al.*, 1991 ; Cavey *et al.*, 1992 ; Martin *et al.*, 1992 ; Bernard *et al.*, 1992 ; Asselineau, 1992).

Dans un premier temps, les rétinoïdes ont été classés sur la base de réponses biologiques. De telles études étaient alors les seules à même d'informer les chercheurs sur les relations structure-activité des rétinoïdes. De nombreux tests ont été standardisés aussi bien *in vitro* qu' *in vivo*. Récemment, une avancée majeure dans l'étude des rétinoïdes a résulté de l'utilisation des récepteurs recombinants, après le clonage de l'ADNc des RARs, de 1987 à 1990. Celle-ci a permis l'étude des paramètres de liaison de chaque récepteur ainsi que la caractérisation d'activités sélectives, caractérisation auparavant impossible dans les modèles d'étude biologiques.

1. LES ETUDES MENEES SUR LES RECEPTEURS NATURELS

L'étude de l'activité de liaison des récepteurs naturels vis-à-vis des rétinoïdes n'a été réalisée avec succès que par un très petit nombre d'équipes (Darmon *et al.*, 1988 ; Hashimoto *et al.*, 1988, 1989, 1990 ; Nervi *et al.*, 1989).

En effet, ces études se heurtent à plusieurs difficultés majeures dont la présence de CRABP dans la plupart des tissus et des types cellulaires et la faible quantité de récepteurs endogènes (500 à 1500 sites par cellule) ce qui entraîne un rapport signal/ bruit très faible.

C'est l'équipe de K. Shudo qui la première caractérisa l'activité de liaison de deux protéines nucléaires RSBP 1 ET 2 dans les cellules leucémiques HL 60, cellules qui justement ne contiennent pas de CRABP (Hashimoto *et al.*, 1988). Il s'avéra que ces

protéines correspondaient respectivement aux formes dimériques de RAR α et RAR β (Hashimoto *et al.*, 1988 ; 1989 ; 1990). La spécificité de la liaison à l'acide rétinoïque et à deux rétinoïdes de synthèse Am 80 et Ch 55 fut établie, cependant les constantes de dissociation ne purent être mesurées. M. Darmon, en utilisant les cellules F9 de tératocarcinome réalisa les premières mesures grâce à un ligand radioactif, le CD 367, mis en compétition avec un excès de rétinoïde non radiomarqué. Dans cette étude plusieurs rétinoïdes montrent une forte affinité pour les récepteurs endogènes dont le CD 367 (0,8 nM) et le TTNN (12 nM) (Darmon *et al.*, 1988). Par la suite, Nervi *et al* complétèrent cette étude sur les récepteurs endogènes des cellules HL 60, où ils confirmèrent notamment la forte affinité du composé Ch 55 (6,5 nM) dans ces cellules.

Une étude systématique des relations structure - activité sur le récepteur endogène s'avère cependant extrêmement délicate. En effet, ces études nécessitent une étape de fractionnement du récepteur en HPLC, étape particulièrement lourde. De plus, la diversité des récepteurs endogènes ne permet pas d'étudier la sélectivité des composés. Aussi, la plupart des études de relations structure-activité sont menées soit sur des modèles biologiques soit sur des récepteurs recombinants, modèles que nous allons examiner.

2. RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE DES RETINOIDES SUR LA BASE DE LEURS ACTIVITES BIOLOGIQUES

2.1. Tests biologiques utilisés

2.1.1) *In vitro*

a) Culture d'organes :

La première méthode fut élaborée par Fell et Mellanby (1952). Ils étudièrent l'effet des rétinoïdes sur la suppression de la kératinisation et l'induction de la métaplasie dans la peau d'embryon de poulet. Peu après, Lasnitzki (1955) travaillant toujours sur la différenciation cellulaire mit en évidence le rôle anticarcinogène des rétinoïdes, en utilisant des cellules prostatiques prénéoplasiques de souris.

Parallèlement à ces techniques basées sur la suppression ou l'inversion des effets d'agents carcinogènes, d'autres méthodes ont été développées. Elles sont sélectionnées en raison de leur sensibilité, mais aussi de leur précision et de leur simplicité d'emploi. Le test le plus utilisé est la redifférenciation des kératinocytes en cellules épithéliales de type muco-sécrétant, dans la trachée de hamster (Sporn *et al.*, 1975, 1976). Cette méthode, largement employée pour les études de relations structure-activité mesure une induction physiologique de la différenciation cellulaire dans un système sans sérum ni rétinoïdes endogènes (Dawson

et al., 1989). De plus des méthodes basées sur la toxicité osseuse et cartilagineuse permettent d'étudier la toxicité des rétinoïdes testés (Roberts *et al.*, 1984).

Les études menées sur culture d'organes présentent cependant d'importants inconvénients; la difficulté de mise en oeuvre, l'utilisation presque exclusive de tissus épithéliaux. Enfin, le point le plus délicat est l'hétérogénéité des populations cellulaires utilisées pour un même échantillon. Ceci rend très difficile voire impossible la compréhension du mécanisme moléculaire d'action des rétinoïdes.

a) Culture cellulaire :

Le recours aux cultures cellulaires a permis d'explorer les effets biologiques des rétinoïdes dans des types cellulaires variés (mais le plus souvent homogènes), contrairement aux cultures d'organes. Les principaux modèles utilisés sont l'augmentation du taux d'ADN et d'ARNm induit par les rétinoïdes dans les cellules de souris nouveau-né BALB/C (Sporn *et al.*, 1975, 1976), l'inhibition de la croissance des cellules de mélanome de souris : lignées B 16 et S 91 (Lotan *et al.* 1977, 1978), la suppression de la transformation néoplasique des fibroblastes de souris (Adamo *et al.*, 1978). Les autres tests sont basés sur l'induction de la différenciation. Citons la différenciation terminale des cellules de tératocarcinome humain F9 (Strickland *et al.*, 1978) et celle des cellules leucémiques myéloblastiques et promyélocyaires HL 60 (Hashimoto *et al.*, 1989).

Le niveau de différenciation est un critère difficilement quantifiable, il doit donc être analysé à la fois au niveau morphologique et au niveau fonctionnel. Pour cela on peut étudier l'apparition de marqueurs de différenciation, un exemple classique est le taux d'activateur du plasminogène chez les cellules F9. Une alternative est d'étudier l'acquisition de propriétés biologiques spécifiques de l'état différencié, chez les cellules HL 60: l'apparition de la capacité de phagocytose peut être quantifiée par le test du bleu de tétrazolium.

Ces modèles sont proches des modèles d'études *in vivo* et ils rendent compte des effets physiologiques dans un contexte précis. Cependant la différenciation cellulaire est un phénomène complexe, régulé par de nombreux mécanismes utilisant des facteurs de transcription et des messagers des diverses voies de transduction. En outre, le mécanisme intime de la différenciation cellulaire varie d'un modèle à l'autre, voire d'un sous clone à l'autre pour un même modèle cellulaire.

De tels modèles sont très intéressants pour étudier le mécanisme d'action des rétinoïdes et leurs relations structure-activité, cependant l'interprétation des résultats est très délicate. Afin de s'assurer que les effets biologiques induits par les rétinoïdes sont directement liés à l'effet transactivateur des récepteurs spécifiques, des études de réponses précoces voire primaires ont été développées.

Nous décrivons ici le modèle des transglutaminases. Ces enzymes interviennent dans la liaison entre protéines intra-cellulaires.

La transglutaminase épidermique située dans les kératinocytes est inhibée par les rétinoïdes. Cette enzyme est en outre un marqueur de différenciation.

Par contre, la transglutaminase de tissus exprimée dans la plupart des cellules est induite par les rétinoïdes. Elle est très active sur les cellules en différenciation évoluant vers l'apoptose.

Les résultats des études menées sur ces réponses biologiques continuent à être utilisés actuellement. Ils permettent d'étudier les relations structure-activité sur des modèles proches de la physiologie, mais moins complexes. Cependant, l'activité des rétinoïdes varie suivant le test utilisé, aussi celle-ci doit être mesurée sur une large gamme de réponses biologiques.

2.1.2) *in vivo*

La plupart des études de relation structure-activité des rétinoïdes sont réalisées *in vitro*. Les méthodes réalisées *in vivo* demeurent néanmoins capitales car elles constituent le modèle pharmacologique le plus proche de la pathologie. Ces études sont réalisées essentiellement sur les rongeurs. Les méthodes basées sur l'étude de la croissance, du stockage hépatique ou encore sur la dédifférenciation des kératinocytes en cellules épithéliales vaginales chez le rat sont très utilisées. Le hamster quant à lui est utilisé pour la différenciation sébacée. Parmi cette large "batterie de tests", c'est l'étude de l'influence des rétinoïdes sur le développement initial, la croissance et la progression néoplasique des papillomes de la peau de souris qui est la plus répandue. Ces tumeurs sont préalablement initiées par le DMBA (7.12 diméthylbenzanthracène) et la phase de promotion est conduite par le TPA (12.0 tétradécanoylphorbol 13 acétate).

D'autres modèles utilisant l'induction de tumeurs mammaires chez le rat ont été utilisés pour mettre en évidence le rôle chimioprotecteur des rétinoïdes (Hill et Grubbs, 1992).

Cependant l'efficacité des analogues de synthèse varie selon le test utilisé. Ainsi l'efficacité de l'acide 13 cis rétinoïque est très faible dans ce modèle alors qu'il est très actif dans d'autres systèmes (Bollag *et al.*, 1979). Cet exemple de faux négatif montre bien la difficulté à extrapoler les résultats. Des méthodes alternatives ont été développées utilisant

des tests en association. Par exemple le blocage de l'induction de l'ornithine décarboxylase induite par les esters de phorbol, en corrélation avec le test du papillome.

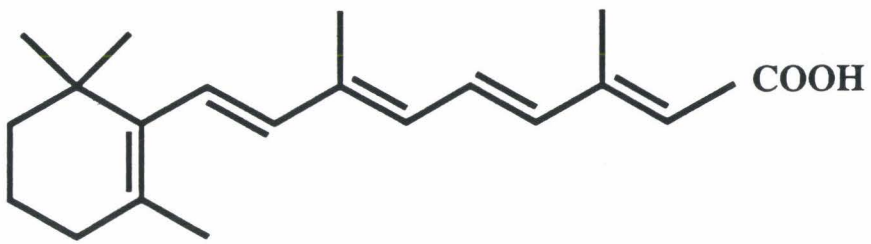
2.2 Les résultats

2.2.1 Les rétinoïdes de première génération

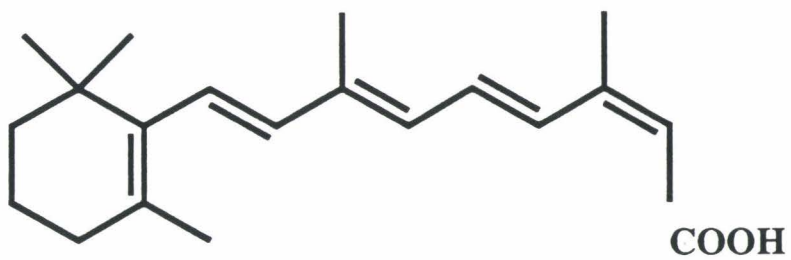
Ces dérivés résultent essentiellement de la modification de l'extrémité polaire de la chaîne latérale polyénique de l'acide rétinoïque. De nombreux rétinoïdes ont été synthétisés, qui se distinguent par la nature des groupements fonctionnels (alcools, aldéhydes, acides, esters, amides, amines ou éthers). La chaîne latérale a été également modifiée dans sa longueur, ainsi que dans la position et le nombre des doubles liaisons et des substituants méthyles. De nombreux isomères ont été synthétisés. Les analogues n'apparaissent que modérément actifs, voire inactifs si leur métabolisme ne permet pas de dégager la fonction carboxylique libre (Frolik *et al.*, 1981). De ces études est sorti le premier rétinoïde utilisé en thérapeutique, l'acide 13 cis rétinoïque ou isotrétinoïne (Figure 21). Ce rétinoïde est moins actif que l'acide rétinoïque mais il est également moins toxique. Cependant il est à noter que s'il est très actif sur de nombreux tests biologiques comme la dédifférenciation des kératinocytes dans les cultures de trachées de rats, ou l'inhibition de l'ornithine décarboxylase, il est quasiment inactif sur le test du papillome cutané chez la souris (Tableau 6). L'acide 13 cis rétinoïque est largement utilisé dans le traitement de l'acné, son activité est néanmoins plus faible que celle de l'acide rétinoïque tout trans, et il n'est pas efficace dans le traitement des leucémies promyélocyaires (Chomienne *et al.*, 1989).

2.2.2 Les rétinoïdes de deuxième génération

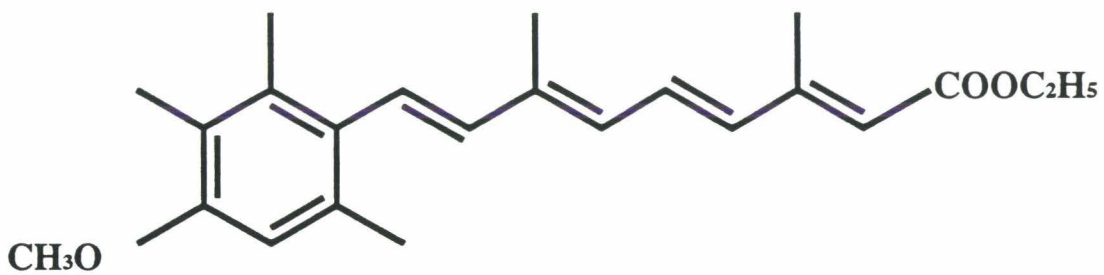
Ils ont été obtenus essentiellement en remplaçant l'extrémité cyclique de l'acide rétinoïque par une série de cycles divers, substitués ou non, même par des hétérocycles. Les dérivés les plus intéressants de cette série sont ceux comportant un cycle aromatique substitué avec des méthyles, des méthoxy ou des halogènes. L'analogue para-méthoxy-triméthylphényle (TMMP) de l'acide rétinoïque est un composé très actif dans le modèle du papillome cutané mais inactif dans certains tests *in vitro*. L'étrétinate, ester éthylique, du TMMP, est particulièrement utilisé dans le traitement du psoriasis et des dermatoses kératinisantes (Figure 21).



acide rétinoïque 13 trans (trétinoïne)



acide rétinoïque 13 cis (isotrétinoïne)



Etrétinate

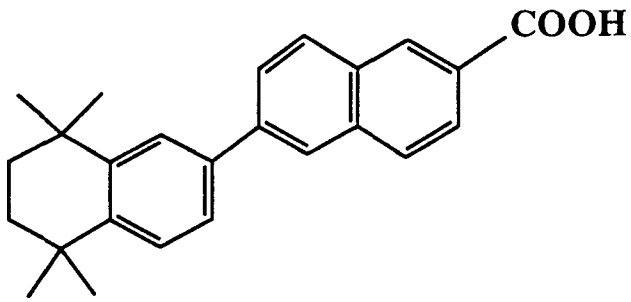
Figure 21 : Rétinoïdes de synthèse de première et deuxième génération

2.2.3 Les rétinoïdes de troisième génération

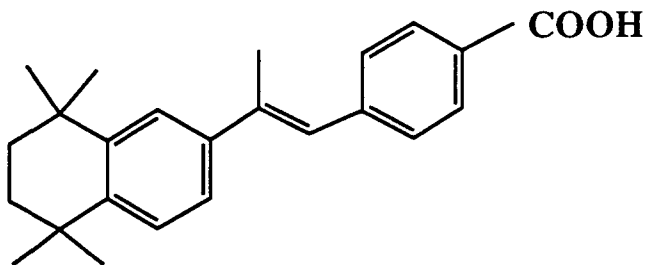
Ils constituent la plus grande famille de dérivés et sont en constante évolution. Ils résultent de l'incorporation de cycles de formes variées dans la chaîne polyénique, ce qui confère à la molécule une structure plus rigide. Le connecteur reliant l'extrémité cyclique insaturée apolaire au noyau aromatique ne peut varier que légèrement dans sa longueur. Jusqu'à présent, c'est la série des arétinoïdes qui s'est révélée la plus active (Loeliger *et al.*, 1980). Son chef de file est le TTNPB (Ro 13.7410). Cette molécule serait, sous sa forme ester, 8000 fois plus active que l'acide rétinoïque et seulement 800 fois plus toxique. Cependant l'efficacité de ce produit varie suivant les réponses utilisées (Tableau 6) (Dawson *et al.*, 1985, 1989). Il est ainsi 100 fois plus actif que l'acide rétinoïque sur la différenciation des cellules de tératocarcinome F9 et cependant moins actif que celui-ci sur la différenciation des cellules HL 60 (Strikland *et al.*, 1983). Sa haute toxicité explique qu'il ne soit pas utilisé en thérapeutique. Dans cette série, un noyau aromatique peut être placé à l'extrémité polaire de la molécule et donner des dérivés actifs mais toujours à condition que le groupement carboxylique soit situé en para de la chaîne polyénique (Dawson *et al.*, 1983). La faible activité biologique du TTNN en regard du CD 367 montre néanmoins que le remplacement à l'extrémité polaire du groupement benzoïque par un groupement naphthoïque est défavorable (Keidel *et al.*, 1993) (Tableau 6, figure 22). Le connecteur reliant l'extrémité cyclique apolaire au noyau aromatique peut varier légèrement dans sa longueur. La nature et la géométrie du connecteur reliant le cycle naphthalénique au cycle benzoïque sont importantes. Le connecteur générant la plus forte activité est une chaîne propényle. La chaîne polyénique peut être complètement supprimée ou être insérée dans un cycle comme c'est le cas pour le CD 367.

De plus, Keidel a montré que la fonction 5, 6, 7, 8,-tétrahydro 5, 5, 8, 8, tétraméthyl-2 naphthalényl de l'extrémité apolaire était plus importante que la fonction benzoïque portant la fonction carboxylique libre, pour l'activité biologique (Keidel *et al.*, 1993). Une propriété très remarquable de ces composés est leur stabilité élevée par rapport aux familles de dérivés précédentes. Dans toutes ces séries l'introduction d'un hétéroatome dans le cycle de l'extrémité polaire conduit à des dérivés nettement moins actifs que les dérivés de référence (Dawson *et al.*, 1985 ; Spruce *et al.*, 1987 ; Waugh *et al.*, 1987).

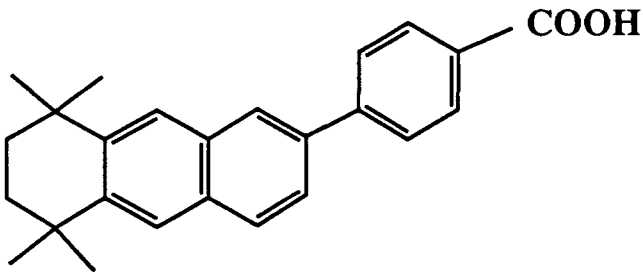
Les acides rétinoïques forment une classe très importante des arétinoïdes. Ils ont été essentiellement décrits par le groupe de Shudo (Kagechika *et al.*, 1988, Kagechika *et al.*, 1989 a b c ; Yamakawa *et al.*, 1990) (Figure 23). Les plus actifs de ces composés sont ceux qui présentent une structure type Amide (Am 80) ou Chalcone (Ch55). Ce dernier composé est particulièrement actif dans les modèles biologiques de différenciation.



TTNN acide tétrahydotétraméthyl-naphtalénylnaphtoïque



TTNPB acide tétrahydotétraméthyl-naphtanélénylpropénylbenzoïque



CD 367 ou TTAB acide tétrahydotétraméthylantracénylbenzoïque

Figure 22 Les rétinoïdes de synthèses de troisième génération

Valeurs des concentrations efficaces à 50% pour divers tests de mesure de l'activité biologique de quelques rétinoïdes.

rétinoïdes	1	2	3	4	5	6	7
AR	0,1	15	5	0,04	0,37	1	30
TTNPB (ester)	0,002	1	1	1	0,03		30
CD 367	0,01	14	2	0,037	0,3		0,03
Ch55		0,02	0,2		0,26	0,04	
Ch30		4	0,5		0,8	0,18	
Am580	1	> 100			0,38		
Am 80	0,4	0,1			0,6	0,4	

1 : inversion de la kératinisation de la trachée de rat *in vivo*

2 : Inhibition de la transglutaminase épidermique

3 : Taux de cholestérol sulfate

4 : Inhibition de l'ornithine décarboxylase

5 : Activateur de plasminogène (différenciation des cellules F9)

6 : Réduction du bleu de tétrazolium (différenciation des cellules HL 60)

7 : Ostéoporose chez le rat (toxicité osseuse) en mg/kg/jour

Tableau 6 : Quelques exemples d'activités biologiques de rétinoïdes.

(Adapté d'après Dawson *et al.*, 1989 ; Jetten *et al.*, 1989 ; Bouclier *et al.*, 1989)

L'activité de ces rétinoïdes est fonction des éléments suivants :

1- La présence de substituants hydrophobes en position 3 et/ou 4 ou en 3 et 5. Différents substituants peuvent être utilisés y compris Si (CH₃)₃ ou Ge (CH₃)₃ (Yamakawa *et al.*, 1990).

2- Un grand choix de connecteurs peut être utilisé, cependant les connecteurs CH₂-CH₂, -N=N et SO₂NH sont les moins bons, les meilleurs sont les connecteurs propényles, amides et chalcones (Am80, Am580, Ch30, Ch55, tableau 6).

3- La position para de la fonction carboxylique portée par le cycle benzène. En outre, l'efficacité des analogues peut être diminuée par l'estérification ou l'amidification si les modèles d'études ne contiennent pas l'équipement enzymatique nécessaire à l'hydrolyse de ces liaisons, ou le remplacement par un groupement polaire bioisostère (sulfonique, aminosulfonique, amidine ou tétrazolyle) de cette fonction carboxylique.

L'étude cristallographique de certains acides rétinobenzoïques révèle que les dimensions de ces molécules actives étaient la plupart du temps identiques à celles de l'acide rétinolique tout-trans (Strickland *et al.*, 1983) et la superposition des deux montre des correspondances entre les différents groupements, en particulier les groupements volumineux de type isopropyl ou de type tertibutyl en position 2 et 4 des dérivés chalcones (Ch55), le noyau tétrahydro-tétraméthyl-naphtalénique des dérivés type stilbène (TTNPB), le groupement hydrophobe aliphatique des dérivés amines comme l'Am80 avec le groupement diméthyle de l'acide rétinolique.

Au total les tests biologiques ont permis l'étude et la classification des rétinoïdes. Cependant les mécanismes biologiques sont des phénomènes complexes, variables d'un test à l'autre. Ils comportent des composantes multiples comme la métabolisation du composé, la diversité des cibles des rétinoïdes (récepteurs nucléaires, voies de transductions...), les différents mécanismes d'action de ceux-ci (hétérodimérisation des récepteurs). De plus, le nombre de récepteurs RARs interrogés et l'implication de la nouvelle classe de récepteurs RXRs varient d'un modèle biologique à l'autre. Tous ces éléments font que l'activité biologique d'un même rétinoïde peut être très variable d'une réponse biologique à l'autre (Tableau 6). Ces résultats, intéressants du point de vue physiologique, sont difficilement interprétables en termes d'interactions moléculaires spécifiques avec chacun des récepteurs.

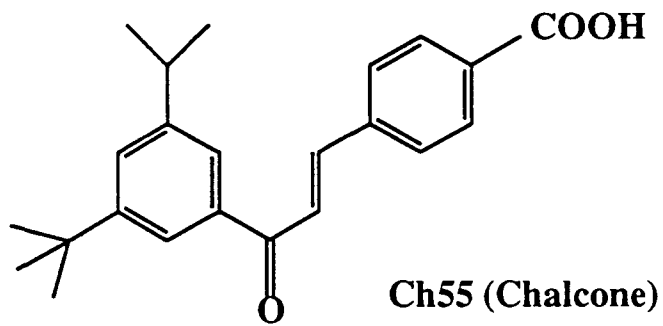
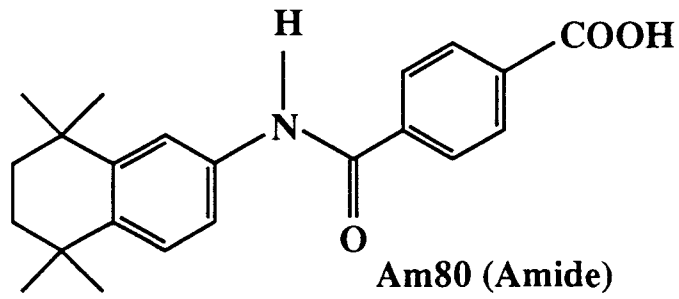
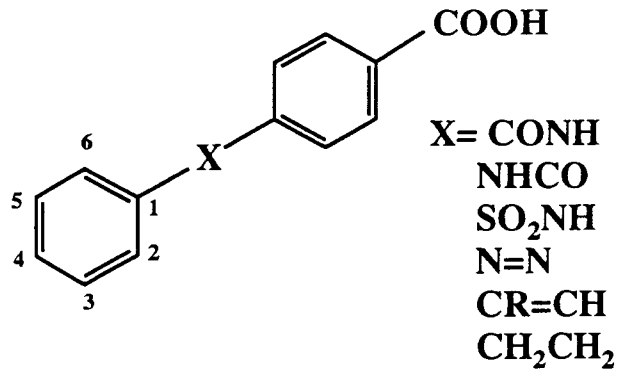


Figure 23 : Les acides rétinobenzoïques

3. RELATION STRUCTURE-ACTIVITE DES RETINOIDES ET RECEPTEURS RECOMBINANTS

Pour une bonne évaluation de l'activité d'un ligand, d'un point de vue moléculaire, il faut à la fois mesurer l'activité de liaison au récepteur et analyser l'aspect fonctionnel de cette interaction. Généralement on étudie la capacité de transactivation.

3.1 Etude de la liaison ligand-récepteur

3.1.1 Modèles d'étude de la liaison récepteur-ligand

Les récepteurs recombinants peuvent être exprimés dans différents systèmes d'expression. Ces systèmes peuvent être procaryotes comme les bactéries *E.coli*, mais également eucaryotes comme les cellules Cos 7, HeLa ou SF9.

L'activité de liaison est mesurée par l'étude de la constante d'association à l'équilibre. Pour cela le récepteur doit être produit en grande quantité, plusieurs systèmes d'expression sont utilisés. Ils présentent des intérêts divers.

a) Les systèmes procaryotes

Le récepteur peut être exprimé sous forme entière ou restreinte au domaine E. La production de petits fragments est néanmoins plus facile car elle limite le problème de la solubilité et de la stabilité du récepteur, inconvénient majeur des systèmes d'expression procaryotes. L'expression de l'extrémité C-terminale de la protéine a été obtenue avec des vecteurs d'expression inductibles par l'isopropylthiogalactoside (IPTG), (Schüle *et al.*, 1990). Le recours à des protéines de fusion a permis d'améliorer la stabilité et la solubilité du récepteur. Elles offrent de plus la possibilité d'une purification plus facile. La fusion a été aussi réalisée entre six résidus constitutifs d'histidine et les récepteurs de l'acide rétinoïque (Crettaz *et al.*, 1990).

Ces systèmes sont particulièrement performants au niveau du taux d'expression, jusqu'à 10mg de récepteurs par litre de culture. Cependant de tels systèmes ne réalisent pas l'ensemble des étapes de maturation des protéines eucaryotes (glycosylations, phosphorylations).

b) Les systèmes d'expression eucaryotes

- Expression dans les cellules SF9 infectées par Baculovirus

La production de protéines recombinantes dans les cellules eucaryotes d'insectes (cellules SF9) sous le contrôle du Baculovirus est un système largement répandu car il permet la production abondante de protéines recombinantes, procaryotes ou eucaryotes, qui possèdent des propriétés antigéniques, immunologiques et fonctionnelles identiques à celles des protéines naturelles. Il est utilisé pour la production des récepteurs nucléaires et en particulier de l'acide rétinoïque (Jänne *et al.*, 1993 ; Reddy *et al.*, 1992).

- Les cellules transfectées

Le taux de récepteur produit est plus faible que dans les systèmes procaryotes, de 10 000 à 100 000 sites par cellule, c'est à dire 10 à 100 fois plus que dans les cellules non transfectées. Les systèmes d'expression eucaryotes sont principalement utilisés pour mesurer l'effet transactivateur.

3.1.2. Les résultats

L'étude des paramètres de liaison a permis d'étudier la sélectivité des composés. Des produits spécifiques d'un seul récepteur sont très prometteurs pour une utilisation thérapeutique, car ils pourraient limiter les effets secondaires rencontrés dans les traitements actuels.

En général la sélectivité pour les récepteurs β et γ est nettement plus fréquente que pour les récepteurs α et β ou pour les récepteurs α et γ . La sélectivité pour le récepteur α est favorisée par l'insertion de groupements capables de former des liaisons hydrogènes comme c'est le cas pour l'Am 80, l'Am 580, le TTNPB et les dérivés 3 et 12 (Tableaux 7a et 7b). Les ligands plus spécifiques de RAR β ou RAR γ sont globalement plus hydrophobes (ex TTNN, CD417). La sélectivité pour RAR β ou RAR γ peut également être orientée. Ainsi, le CD437 spécifique de RAR γ ne diffère que faiblement du CD271 ; le groupement méthoxyle du CD271 est remplacé par un groupement hydroxyle. Cette faible modification induit un glissement de la sélectivité du récepteur β vers le récepteur γ . Ces résultats sont confirmés pour d'autres composés comme le CD1530 et le CD666, qui comportent également un hydroxyle dans la partie proximale de la molécule et qui sont également sélectifs de RAR γ . Cette sélectivité pour les récepteurs β et γ peut être liée à une perte d'affinité pour RAR α et non à un accroissement propre de l'affinité vis-à-vis de RAR β et RAR γ . Par exemple, un motif encombrant au centre de la molécule fait chuter l'affinité pour RAR α (ex : le composé 5 qui dérive du CD367). Il faut noter que ces premiers

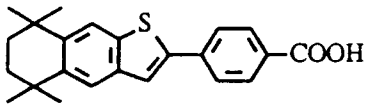
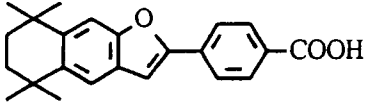
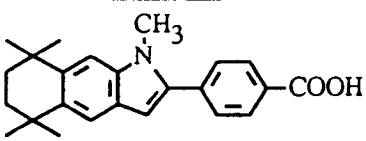
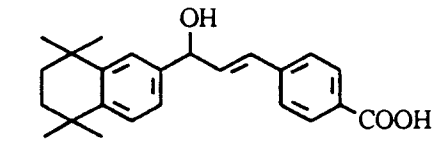
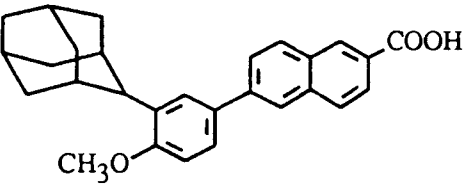
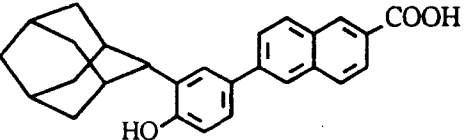
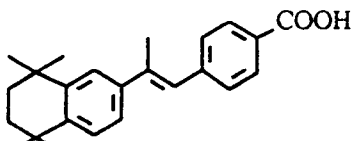
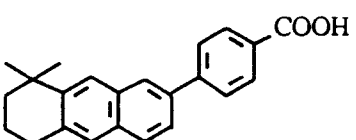
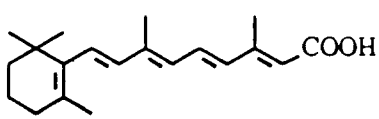
		Ki (nM)		
		hRAR alpha	hRAR béta	hRARgamma
	10	665	62	14
	CD495	32	6,5	4,5
	12	27000	260	108
	CD666	2240	2300	68
	CD271	1100	34	130
	CD437	6500	2480	77
	TTNPB	20	2	1
	CD367	5	2,5	3
	AR	13	5,5	3,5

Tableau 7a : Affinité de quelques rétinoïdes pour les RARs

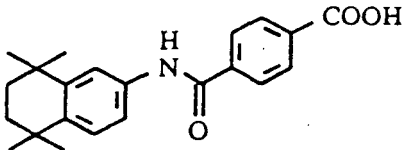
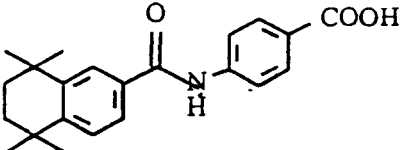
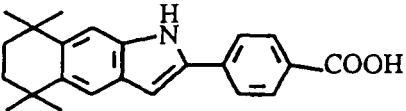
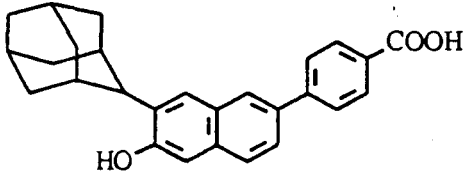
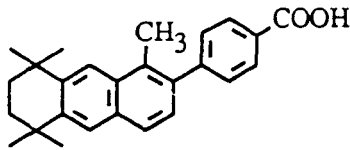
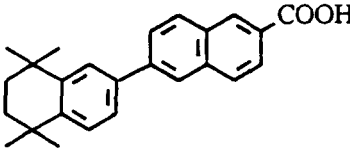
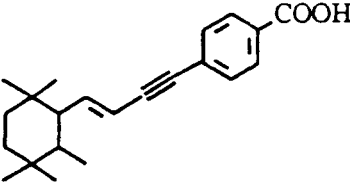
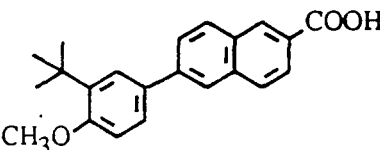
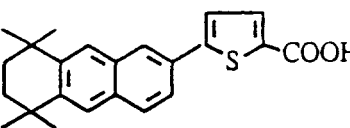
		Ki (nM)		
		hRAR alpha	hRAR bêta	hRAR gamma
	Am80	22	280	1720
	Am580	6	130	827
	3	11	90	62
	CD1530	2750	1500	150
	5	2800	350	540
	TTNN	460	26	190
	AGN 190121	1000	2,5	5
	CD417	6500	36	426
	9	1600	35	21

Tableau 7b : Affinité de quelques rétinoïdes pour les RARs

éléments de relations structure-activité sont obtenus grâce à la synthèse de nouvelles molécules de conformation plus rigide. En effet, elles possèdent un degré de liberté moindre. Elles permettent d'obtenir des informations plus précises sur la géométrie du site de liaison au ligand que les composés naturels, molécules très flexibles. Nous verrons lors de la présentation de nos résultats que de nouvelles molécules sont capables d'être sélectives pour les récepteurs α et β .

3.2 Mesure de l'effet transactivateur

3.2.1 Le principe

On mesure la capacité du récepteur à transactiver spécifiquement un gène sous l'effet d'un rétinol. Ces expériences sont menées uniquement sur des cellules eucaryotes, principalement dans les cellules CV1, Cos, HeLa.

Le principe est le suivant :

Un vecteur d'expression contenant l'ADNc d'un des récepteurs de l'acide rétinoïque est transfecté de manière transitoire dans une lignée cellulaire. En parallèle un deuxième plasmide "reporter" contenant un élément de réponse de l'acide rétinoïque est cotransfecté. Le récepteur produit va alors activer spécifiquement, sous l'effet des rétinoïdes, l'élément de réponse et induire l'expression du gène indicateur CAT. Ces gènes indicateurs codent des protéines facilement dosables, généralement la Chloramphénicol Acyl Transférase ou la luciférase.

Ce test permet non seulement d'évaluer l'activité d'un rétinol, sa sélectivité mais aussi son éventuel pouvoir antagoniste. Cependant il ne traduit pas nécessairement l'efficacité des rétinoïdes *in vivo*. Ils doivent donc être corrélés avec les tests physiologiques, que sont les réponses cellulaires.

3.2.2 Les résultats

L'effet transactivateur de près d'une quarantaine de produits a été mesuré (Lehmann *et al.*, 1991 ; Graupner *et al.*, 1991 ; Martin *et al.*, 1992., Bernard *et al.*, 1992). Les valeurs obtenues ne sont toutefois pas toujours comparables suivant les auteurs. En effet, certaines mesures ont été établies de manière semi-quantitative (Lehmann *et al.*, 1991), de plus les modèles utilisés diffèrent. En effet, afin d'éliminer l'activité transactivatrice résultant des récepteurs endogènes, deux options ont été choisies. Soit l'utilisation de récepteurs chimères (Lehmann *et al.*, 1991 ; Graupner *et al.*, 1991), soit l'utilisation d'un élément de réponse peu sensible (Martin *et al.*, 1992., Bernard *et al.*, 1992). Le récepteur

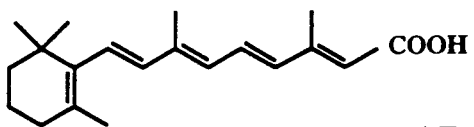
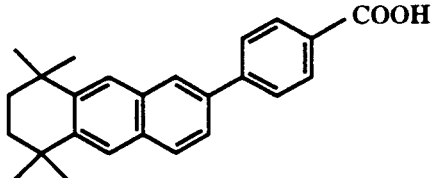
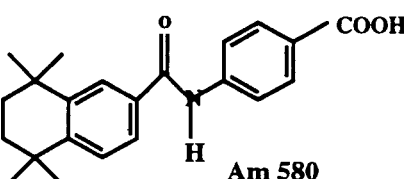
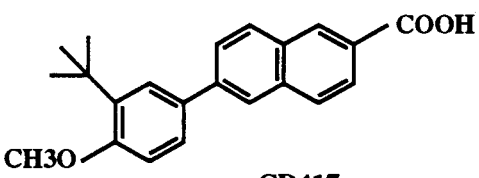
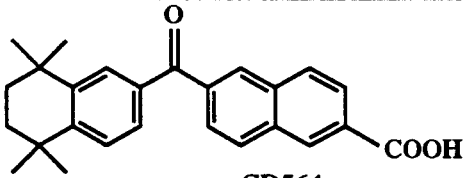
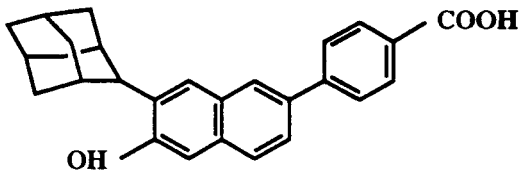
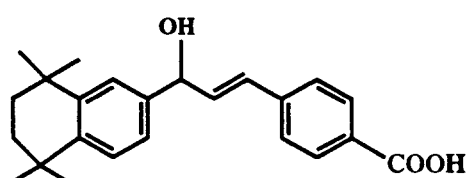
	EC 50 (nM)		
	hRAR α	h RAR β	h RAR γ
 AR	15	4,5	3
 CD 367	0,23	0,37	0,25
 Am 580	8	131	450
 CD417	6500	36	426
 CD564	530	9	7
 CD1530	2750	1500	150
 CD666	2240	2300	68

Tableau 8 Quelques exemples d'activité transactivatrice de rétinoïdes sélectifs.

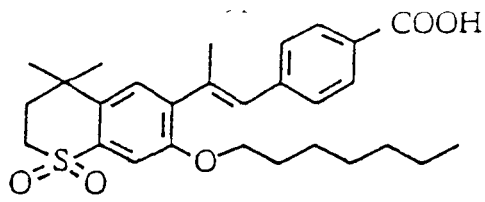
chimère contient le domaine de liaison à l'ADN des récepteurs aux oestrogènes et transactive spécifiquement, sous l'effet des rétinoïdes, le gène CAT placé sous le contrôle d'un élément de réponse aux oestrogènes. L'autre alternative consiste à utiliser un élément de réponse TREpal qui n'est pas réceptif aux récepteurs endogènes. De ce fait certains produits, dont l'Am80 et l'Am 580, voient leur activité varier jusqu'à 140 fois pour le même type de récepteur en suivant le modèle utilisé. Les études de relations structure-activité confirment les résultats obtenus par l'étude des paramètres de liaison pour ce qui concerne la sélectivité des composés (Tableaux 7a et 7b). Cependant, une importante discordance apparaît pour de nombreux rétinoïdes entre leur affinité et l'efficacité de l'effet transactivateur. Celle ci peut atteindre un facteur 100 (CD 417, CD 1530 ; tableaux 7, 8, 9, 10). Cette discordance a été observée par d'autres auteurs pour l'acide 9 cis rétinoïque (Allenby *et al.*, 1993), mais aussi pour le Ch 55 sur d'autres réponses biologiques, pour ce dernier dérivé la discordance atteint un facteur 1000 avec la liaison au récepteur RAR α procaryote (Keidel *et al.*, 1993). Les bases moléculaires de ces discordances ne sont pas encore connues mais plusieurs hypothèses peuvent être formulées, comme la métabolisation des composés ou l'intervention d'hétérodimères de natures différentes, nous en reparlerons à propos de nos résultats.

3.5 Les ligands antagonistes

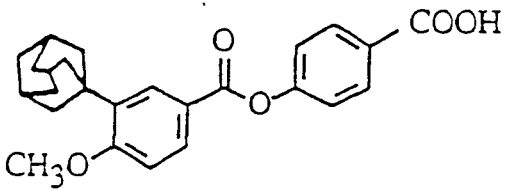
Des ligands antagonistes et si possible spécifiques de chaque récepteur constituent des sondes pharmacologiques tout à fait indispensables à l'étude des récepteurs de l'acide rétinoïque et de leurs rôles respectifs, de plus l'utilisation thérapeutique de telles molécules pourraient peut-être permettre de limiter certains des effets toxiques des rétinoïdes actuels.

Les premiers rétinoïdes présentant une activité antagoniste ont été conçus sur le modèle des antihormones stéroïdiennes (Apfel *et al.*, 1992 ; Eyrolles *et al.*, 1992). L'hypothèse de départ est d'occuper une poche hydrophobe vacante, du domaine E, par un groupement volumineux. Les résultats les plus intéressants ont été obtenus avec le Ro 41.5253. C'est un antagoniste pur, spécifique de RAR α . Il inhibe la différenciation des cellules HL 60 induite par l'acide rétinoïque (Figure 24).

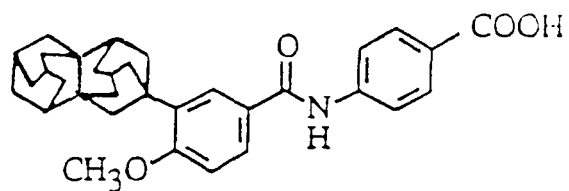
Le groupe de Shudo a présenté des composés antagonistes partiels, développés selon le même principe (TD650 TD 550). Cependant, il n'ont que des activités très faibles. Le TD 650 et le TD 550 sont des antagonistes partiels qui possèdent une sélectivité marquée pour RAR α et RAR β . D'autres composés, dérivés de ces molécules, BiPh et BiBn présentent également une faible activité antagoniste (Eyrolles *et al.*, 1992).



Ro 41-5253

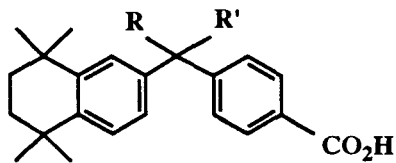


TD 650

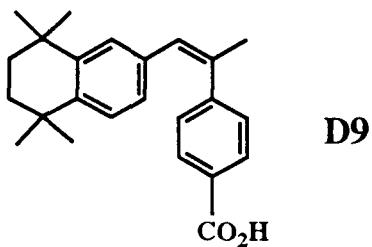


TD 550

Figure 24 : Quelques antirétinoïdes de synthèse actuellement connus



SR11217 R,R' = $(\text{CH}_3)_2\text{C}$
 SR11237 R,R' = $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$



D9

Figure 25 : Quelques ligands spécifiques des RXRs

3.6 Les ligands spécifiques des RXRs

L'équipe de M. Dawson a décrit les premiers ligands de ce type (Lehmann *et al.*, 1992). La structure de ces composés, SRI 11 217 et 11237, décrite figure 25, est superposable avec celle de l'acide 9 cis rétinolique. Seule la formation d'homodimères RXRs est induite par ces ligands contrairement ce à qui se passe avec l'acide 9 cis rétinolique. Un troisième ligand RXR spécifique a été récemment décrit (Jong *et al.*, 1993).

Ces travaux ouvrent un champ d'investigations nouveau est sera très certainement suivi par la conception de nombreuses autres molécules.

**RESULTATS
ET
DISCUSSION**

Notre travail est organisé autour de deux thématiques développées au laboratoire ; l'étude de la structure des récepteurs de l'acide rétinoïque et des effets biologiques des rétinoïdes.

Nous avons tout d'abord participé à la caractérisation biochimique des récepteurs de l'acide rétinoïque au niveau de leur activité de liaison. Pour cela, nous avons construit et surexprimé des récepteurs recombinants eucaryotes, modèle que nous avons implanté au laboratoire lors de notre DEA.

Notre travail s'est alors orienté vers l'étude des relations structure-activité de rétinoïdes de synthèse en collaboration avec le groupe de Jean-Pierre Hénichart.

La première étape fut de comparer différents systèmes de surexpression des récepteurs, eucaryotes, bactériens ou viraux, afin de déterminer le modèle d'étude adéquat. Nous avons sélectionné les récepteurs produits dans les systèmes eucaryotes.

Les études de relation structure-activité ont été menées à deux niveaux complémentaires :

1 - Evaluation de l'activité de liaison par compétition des rétinoïdes de synthèse vis-à-vis de l'acide rétinoïque.

2 - Mesure de l'effet transactivateur induit par les rétinoïdes.

Pour cela, nous avons cotransfecté un vecteur d'expression contenant la séquence codante de l'un des RARs avec un vecteur exprimant un gène indicateur régulé par un élément de réponse à l'acide rétinoïque. Le niveau d'expression du gène indicateur est proportionnel à l'activité des rétinoïdes. Ces expériences sont essentielles pour préciser le caractère sélectif et/ou antagoniste d'une molécule.

Il nous est alors apparu nécessaire de compléter nos investigations au travers de réponses biologiques. En effet, *in cello* la réponse transcriptionnelle est régulée par de nombreux facteurs de transcription et aussi par les messagers des diverses voies de transduction. Ce phénomène, appelé "cross talk", ne peut se manifester normalement dans les modèles artificiels que sont les cellules transfectées. Ces réponses permettent de se rapprocher de l'effet de ces rétinoïdes *in vivo*. Nous avons évalué, avec d'autres, l'activité des rétinoïdes les plus prometteurs dans la lignée leucémique humaine HL 60. C'est un modèle de référence, qui se différencie sous l'effet des rétinoïdes.

Nous avons étudié deux réponses biologiques :

1) L'induction de la différenciation

2) L'induction d'un gène régulé par les rétinoïdes, celui de la transglutaminase de tissu

Parallèlement à cette étude qui a constitué la plus grande partie de notre travail de thèse, nous nous sommes intéressé à la régulation transcriptionnelle du gène de la transglutaminase de tissu dans deux lignées cellulaires très proches : HL 60 et HEL. En effet, l'expression de cette enzyme est soumise à une régulation "croisée" entre les récepteurs de l'acide rétinoïque et des glucocorticoïdes. Notre contribution à ce travail réalisé en collaboration avec D. Manechez et C. Richard-Méreau, a été de répondre à un certain nombre de questions posées par une régulation différente de la transglutaminase dans ces lignées pourtant très proches. Pour cela nous avons mis au point une technique d'électroporation de ces deux lignées cellulaires.

Partie I

**Etude des relations structure-activité
de nouveaux rétinoïdes de synthèse.**

Ce chapitre ne prétend pas traiter l'ensemble des relations structure-activité, mais plutôt établir l'élaboration des différentes étapes de la conception rationnelle et de l'analyse de ces composés tant au niveau chimique que pharmacologique.

I - PRESENTATION DES MOLECULES

Les rétinoïdes originaux ont été conçus et synthétisés au sein de l'équipe de Jean-Pierre Hénichart, par William Bourguet et Jean-Luc Bernier. Les composés 1, 2 et 3 ont été développés dans le but de purifier les récepteurs de l'acide rétinoïque par chromatographie d'affinité. Les composés 4, 5, 6, 7 et 8 ont été conçus dans l'espoir d'obtenir des dérivés potentiellement antagonistes.

1- LIGANDS DESTINES A LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

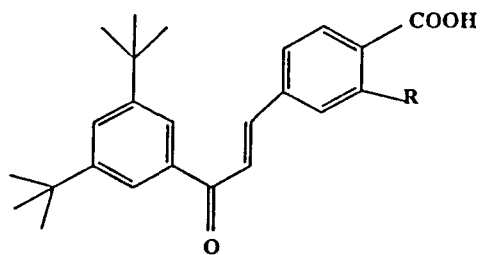
1.1 Structure chimique des rétinoïdes de synthèse

Le composé Ch55 est un acide rétinobenzoïque, il présente en effet deux cycles reliés par un connecteur, dans ce cas c'est une chalcone (Tableau 9). Ce produit est le chef de file des produits que nous avons étudiés. Les ligands 1, 2, 3, dérivent de cette molécule ; ils sont substitués en ortho de la position carboxylique. Le produit 1 est le premier de cette série de ligand, c'est un dérivé hydroxylé de Ch55. Il a été synthétisé afin de savoir si l'introduction d'un groupement en ortho proche de la fonction carboxylique diminuait notablement l'activité de la molécule. Le composé 2 est un intermédiaire de synthèse de la molécule 3. Cette dernière possède un groupement amino-3-propanoyle en ortho du carboxyle. La fonction amine permet le greffage de la molécule sur le gel d'affinité.

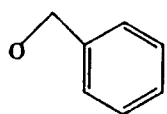
Il est important de noter que ces produits préservent le groupement carboxylique libre, indispensable à l'activité biologique et à la liaison au récepteur.

1.2 Conception de ces ligands

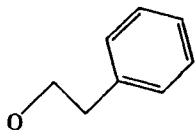
Il y a deux ans, l'un des objectifs prioritaires de notre laboratoire était de purifier les récepteurs de l'acide rétinoïque. En effet, cette étape conditionne la caractérisation complète de ces protéines. Pour cela, la chromatographie d'affinité est une méthode de choix, car elle permet de séparer de façon sélective une protéine particulière d'un mélange complexe de



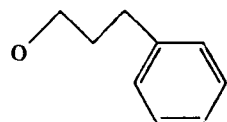
R	COMPOSE
H	Ch55
OH	1
$O(CH_2)_3NHCOO(CH_3)_3$	2
$O(CH_2)_3NH_2TFA$	3



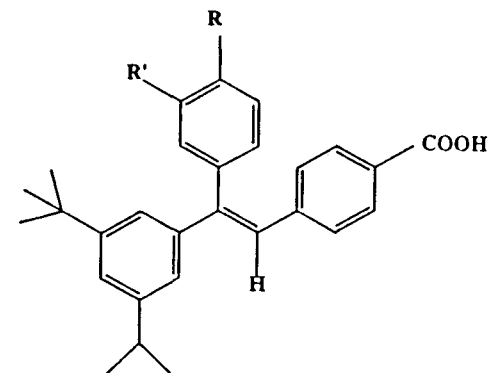
4



5



6



R	R'	COMPOSE
OCH_3	OCH_3	7
$O(CH_2)_3N(CH_3)_2$	H	8

86

Tableau 9 : Dérivés chalcones et triphényléthylénique

plusieurs centaines de biomolécules avec un taux de purification bien supérieur à celui des autres techniques de chromatographie. Le ligand doit être pourvu d'une grande sélectivité et d'une forte affinité vis-à-vis des récepteurs.

L'équipe de Shudo s'est particulièrement distinguée dans ce domaine (Kagechika *et al.*, 1988 ; Kagechika *et al.*, 1989a, Kagechika *et al.*, 1989b ; Kagechika *et al.*, 1989c). Parmi leurs composés, à cette époque le plus actif sur la différenciation des cellules HL 60 et F9 était le dérivé Ch55. La concentration capable d'induire la différenciation de 50% des cellules F 9 et HL 60 est respectivement de 0,26 et 0,04nM. En outre, il possède la caractéristique très intéressante de lier très faiblement la CRABP. Enfin, l'étude de l'activité de liaison dans les cellules HL 60 montre que Ch55 possède une meilleure affinité pour les RARs que l'acide rétinoïque lui même.

Toutes ces caractéristiques ont conduit W. Bourguet et J.L Bernier à choisir cette molécule comme base pour l'élaboration de la chromatographie d'affinité. La synthèse de la molécule 3 a alors été entreprise. La molécule a ensuite été greffée par l'intermédiaire de sa fonction amine, à l'extrémité du bras espaceur du gel d'affinité. Les composés 1 et 2 sont des intermédiaires de synthèse (Bourguet *et al.*, 1992 a et b).

2 - CONCEPTION D'ANTAGONISTES POTENTIELS

Les molécules antagonistes ont la propriété de se lier aux récepteurs, sans toutefois provoquer de réponse biologique observable. Ces molécules entrent alors en compétition avec le ligand agoniste et leur liaison induit une conformation, partiellement ou totalement, inactive. Ce phénomène est bien décrit pour les récepteurs des glucocorticoïdes. La plupart de ces molécules n'ont cependant qu'un effet incomplet et on parle alors d'antagonistes partiels.

Disposer de telles molécules antagonistes serait très intéressant pour mieux comprendre le mécanisme de la régulation transcriptionnelle par les RARs, en particulier à l'aide de molécules sélectives capables d'explorer le rôle spécifique de chaque récepteur. Ces composés pourraient également nous apporter des renseignements très intéressants sur la conformation du domaine E. En outre, ils présentent un intérêt thérapeutique évident car ils pourraient limiter les effets nocifs des rétinoïdes.

Les molécules réalisées au laboratoire dans ce cadre, ont été conçues à partir de deux hypothèses se basant sur la présence éventuelle d'une poche hydrophobe située au sein du domaine E des récepteurs de l'acide rétinoïque. En effet, l'analyse des séquences primaires montre que ce domaine présente de nombreux acides aminés hydrophobes. Par analogie aux autres récepteurs nucléaires, on peut penser qu'ils sont étroitement associés à la fonction de liaison au ligand.



2.1 Structure chimique des rétinoïdes de synthèse

Deux familles de dérivés ont été conçues dans cette optique (Tableau 9). La première comprend les composés 4, 5 et 6. Ce sont des acides rétinobenzoiques dérivés de Ch55. Ils sont substitués en ortho du groupement carboxylique par un groupement phénylalkyloxy de longueur variable.

La deuxième famille de rétinoïdes comporte des dérivés de la série triphényléthylénique, les composés 7 et 8, ils diffèrent respectivement par une substitution méthoxy ou diméthylaminopropyloxy.

Enfin, pour l'ensemble de ces molécules la fonction carboxylique libre est conservée.

2.2 Stratégie de mise en oeuvre

2.2.1 Les composés chalcones

L'hypothèse de départ est que les groupements aromatiques du domaine E pourraient former une poche hydrophobe et stabiliser des liaisons salines entre le ligand et certains acides aminés chargés du site actif.

Or il est clair que l'ion carboxylate est indispensable à l'activité biologique des rétinoïdes (Kagechika *et al.*, 1990). Il pourrait justement se lier avec un résidu basique (Arg, Lys) du domaine E du récepteur. Cette liaison saline pourrait être stabilisée par un système de noyaux aromatiques présents dans le domaine E, dont le mouvement entraînerait alors la transmission du signal induit par le ligand. Des travaux visant à caractériser la présence d'une telle arginine essentielle sont en cours dans notre laboratoire.

La synthèse de composés possédant un noyau aromatique à proximité de la fonction carboxylique a été entreprise. Ce noyau pourrait en effet se placer de manière favorable pour former une liaison par empilement avec les chaînes latérales des résidus aromatiques présents dans le domaine E des RARs (Tyr 208, Trp 225, Phe 228, Phe 242, Tyr 277, Phe 302, Phe 310, Phe 312, Tyr 362, Phe 374). Cette interaction pourrait alors perturber l'étape d'activation du récepteur. Cette hypothèse a été proposée par W. Bourguet et J.L. Bernier au laboratoire.

Le noyau aromatique a été greffé sur un connecteur (une chaîne aliphatique) de longueur variable (molécules 4, 5, 6) de manière à explorer plusieurs positionnements possibles dans le site de liaison du récepteur.

2.2.2 Les composés triphényléthyléniques.

La structure des dérivés triphényléthyléniques, dont la synthèse a été proposée par W. Bourguet et J.L. Bernier, a été directement inspirée de l'exemple des antihormones stéroïdiennes et en particulier des antioestrogènes (Figure 26). Nous avons évoqué lors de la revue générale les analogies entre les différents récepteurs nucléaires, tant du point de vue fonctionnel que structural. De même, certains ligands présentent des similitudes structurales. Le TTNPB, un des rétinoïdes les plus puissants a une structure générale assez proche de celle du DES (Diéthylstilbestrol) (Loeliger *et al.*, 1979). Certains de ses analogues triphénylés sont de puissants antioestrogènes, comme le tamoxifène, molécule largement utilisée en thérapeutique anticancéreuse, en particulier dans le traitement du cancer du sein hormono-dépendant (Harper et Walpole, 1966). Le mécanisme d'action antitumoral résulte d'une inhibition de l'interaction des oestrogènes avec leur récepteurs (Rocheffort *et al.*, 1984).

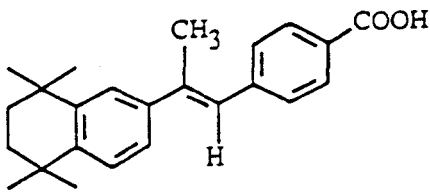
Le mécanisme d'action hypothétique des antioestrogènes non stéroïdiens est le suivant:

Lors de leur fixation, les oestrogènes induisent une transconformation du récepteur. Celui-ci sous forme active transmet alors le message hormonal. Par contre, lors de la liaison des molécules antagonistes comme le tamoxifène, leur chaîne stériquement encombrante type alkylaminoéthoxyle occupe une poche hydrophobe proche du site de liaison. Cela empêche vraisemblablement le récepteur d'acquérir la conformation active nécessaire à la réponse biologique.

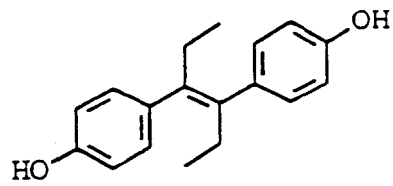
Plusieurs molécules antagonistes agissant déjà suivant ce principe ont été décrites (Figure 26). Le RO41-5253 et les produits développés par l'équipe de Shudo (TD550, TD650, BiPh et BIBn) présentent un axe de symétrie horizontal. Si on fait pivoter les molécules suivant cet axe en plaçant les groupements encombrants phényles, benzyles ou la chaîne aliphatique vers le haut, on remarque que ces groupements hydrophobes peuvent se placer dans la poche que nous avons décrite.

En s'inspirant des modifications de structures qui permettent de passer d'un agoniste à un antagoniste au niveau des oestrogènes, les composés 7 et 8 ont été synthétisés. Ils dérivent du TTNPB et le groupement méthyle central a été substitué par un noyau aromatique.

AGONISTES

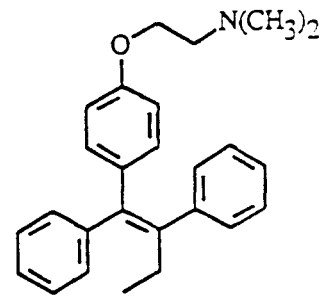
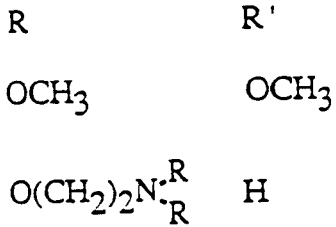
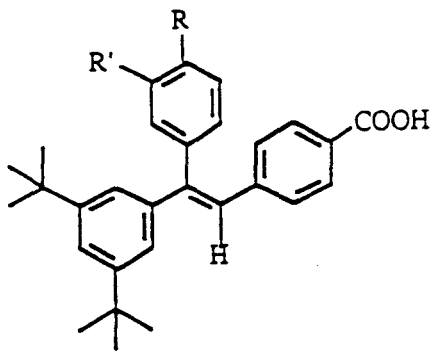


TTNPB



Diéthylstilbestrol (DES)

ANTAGONISTES



TAMOXIFEN

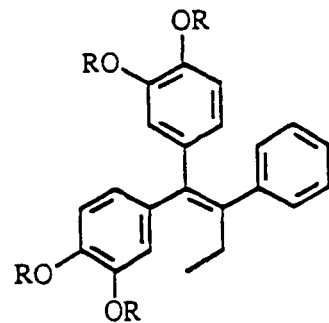


Figure 26 : La conception de molécules antagonistes : hypothèse basée sur la similitude rétinoides/oestrogènes non stéroïdiens

II - ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE

1- DIFFERENTES ETAPES EMPLOYEES POUR L'ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE DES RETINOIDES

Nous avons vu que les méthodes *in vitro* étaient les plus appropriées à l'étude des relations structure-activité des rétinoïdes. Logiquement nous avons suivi une démarche similaire qui prend en compte l'évaluation de la molécule à différents niveaux de son mécanisme moléculaire d'action (Figure 27).

- 1 - Relations structure-affinité : étape 1
- 2 - Mesure de l'effet transactivateur : étape 2
- 3 - Effets biologiques des rétinoïdes : étape 3

Après avoir déterminé la démarche méthodologique, le choix du modèle est capital. Il doit répondre précisément aux questions des chercheurs sur l'activité des composés testés (recherche agoniste et/ou antagoniste, sélectivité, affinité...)

Le modèle doit être ensuite validé, comme tout choix de modèle expérimental, il résulte du compromis entre la sensibilité, la précision, la reproductibilité de la méthode. Des aspects importants tels que le coût et la facilité d'exécution sont à prendre également en considération.

2 - ETUDE DE L'ACTIVITE DE LIAISON DES RETINOIDES

L'étude de l'activité de liaison des différents rétinoïdes vis-à-vis des RARs nécessite de disposer de quantités importantes de récepteurs. La présence de CRABP et la faible quantité de récepteurs endogènes dans la plupart des modèles tissulaires ou cellulaires nous ont conduit à utiliser des récepteurs recombinants pour cette étude. Un deuxième critère essentiel pour l'étude de l'activité de liaison, est la stabilité du récepteur produit.

L'étape préliminaire à cette étude a donc été de choisir un modèle expérimental, pour cela nous avons comparé différents systèmes de production des récepteurs.

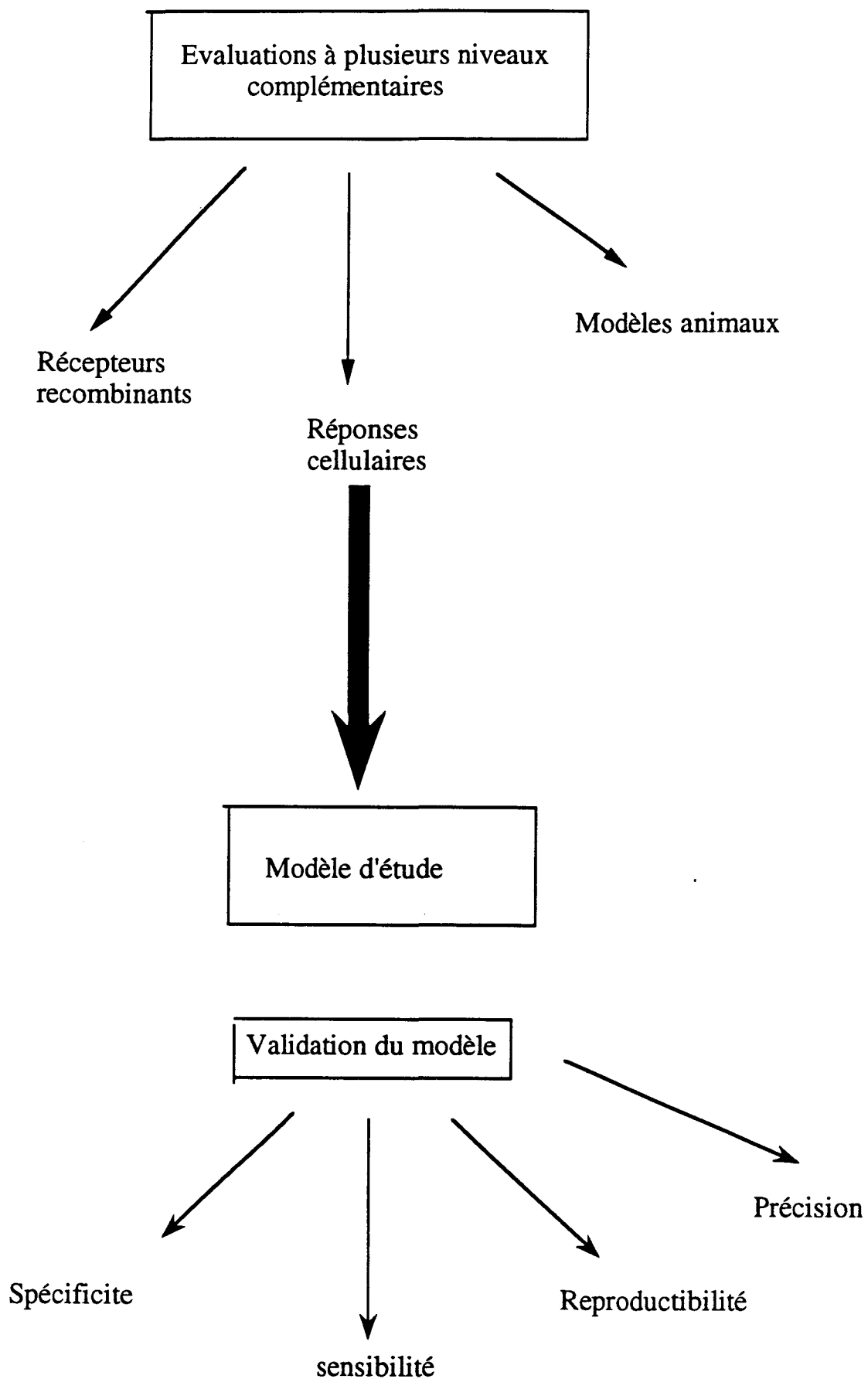


Figure 27 : Evaluation de l'activité d'un ligand

2.1 Choix du récepteur recombinant

2.1.1 Récepteurs recombinants eucaryotes produits dans des cellules transfectées

a) Présentation du modèle

Vecteur d'expression

Nous avons construit des récepteurs recombinants de hRAR α et hRAR β à partir d'un vecteur d'expression eucaryote bien décrit dans la littérature pSVMdhfr (Lee *et al.*, 1981). La figure 28 présente les deux vecteurs recombinants. Pour cela nous avons inséré la séquence d'ADNc correspondant aux gènes des récepteurs hRAR α (Giguère *et al.*, 1987) et hRAR β (Brand *et al.*, 1988) sous le contrôle de deux promoteurs forts. Le premier est le promoteur viral constitutif du virus simien SV40 et le second est un promoteur inducible par les glucocorticoïdes le LTR du MMTV (Virus mammotrope de souris).

En outre, les vecteurs contiennent :

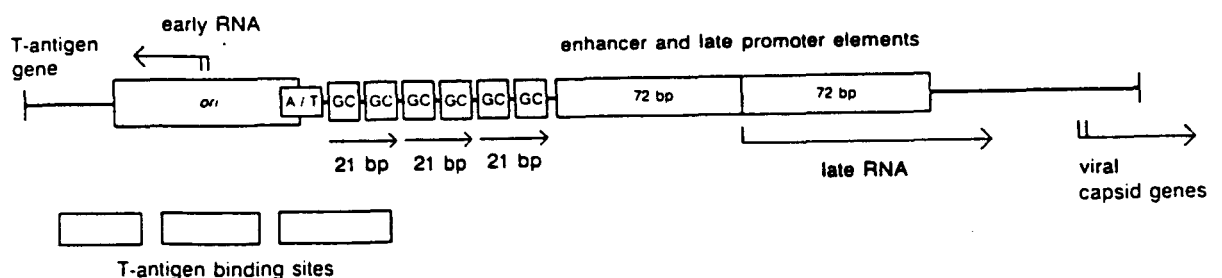
- des séquences régulatrices procaryotiques nécessaires à la réplication et l'amplification dans les bactéries,
- un gène de résistance à l'ampicilline, nécessaire à la sélection du plasmide en milieu bactérien,
- des séquences régulatrices eucaryotes nécessaires à la réplication, l'amplification du plasmide ainsi qu'à la transcription et à la traduction des récepteurs.

Les cellules

Les récepteurs recombinants sont exprimés dans les cellules Cos7, par transfection transitoire. Cette lignée correspond à des cellules épithéliales de rein de singe CV1 transformées par un mutant du virus simien SV40. Cette propriété confère aux cellules la capacité d'accroître considérablement le niveau d'expression des vecteurs contenant une origine de réplication virale SV40. Ce sont ces propriétés qui nous ont amené à choisir ce modèle cellulaire.

Le principe d'amplification est le suivant :

Figure 29 :



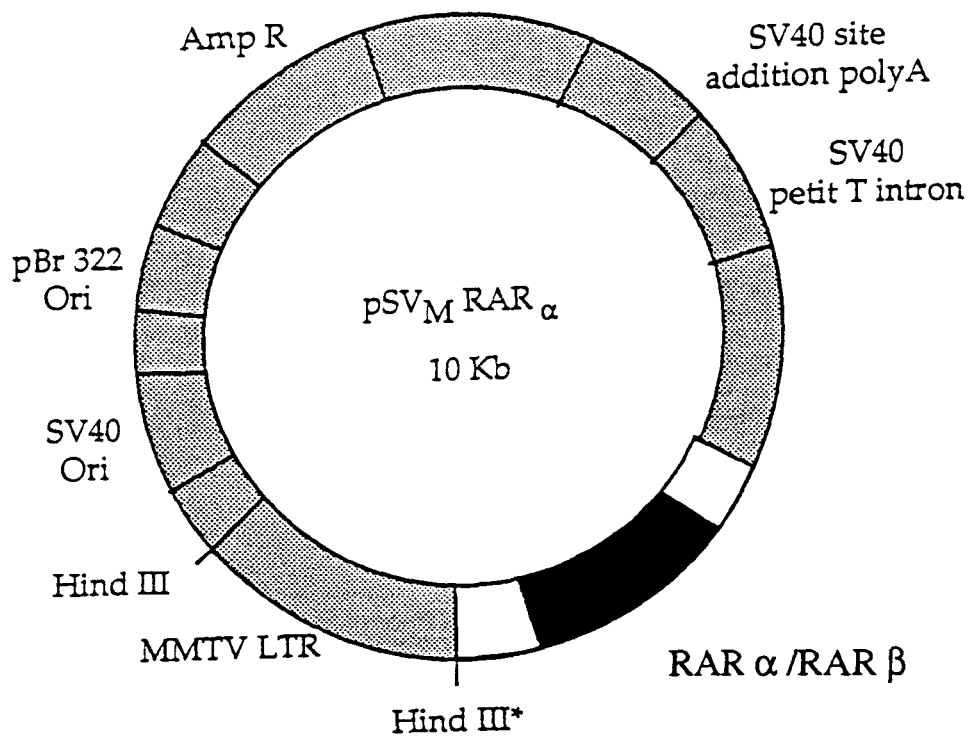


Figure 28 : Vecteurs d'expression de RAR α et de RAR β dans les cellules Cos.

Les cellules Cos expriment constitutivement l'antigène T du virus SV40. Celui-ci s'attache aux trois sites de liaison à l'antigène T inclus dans SV40 ori, il s'ensuit une forte activation de l'origine de réplication .

Après avoir décrit les vecteurs d'expression, les modèles cellulaires, nous allons nous intéresser à l'obtention des récepteurs recombinants.

b) Principe de la production de la protéine recombinante

Les vecteurs d'expression de RAR α ou β sont transfectés transitoirement dans les cellules Cos. Ces cellules ne contiennent pas de récepteurs endogènes des glucocorticoïdes en quantités mesurables, on doit donc cotransfecter également un vecteur d'expression des glucocorticoïdes, afin de conférer l'inductibilité par ces derniers.

En présence de dexaméthasone, un puissant agoniste des glucocorticoïdes, le récepteur va se fixer sur son élément de réponse situé dans la séquence enhancer MMTV, ce qui va activer l'expression du gène sous son contrôle. L'induction synergique du promoteur de MMTV et de SV 40 permet alors un haut niveau d'expression de la protéine.

L'intérêt le plus évident de ce système d'expression résulte de son double système d'amplification, ce qui permet d'obtenir des taux de récepteurs relativement supérieurs aux systèmes similaires. En effet, on obtient environ 2,8 pmole/mg de protéine, taux qui varie faiblement en fonction des préparations nucléosoliques (Tableau 10).

Ce taux de récepteur est 3 à 10 fois supérieur aux systèmes de transfection simple et 10 fois supérieur au taux de récepteurs endogènes des cellules tumorales HL 60. Le critère du niveau d'expression est visiblement atteint dans ce modèle par rapport aux systèmes similaires similaires. De plus le récepteur produit dans ce système apparaît relativement stable, puisque les extraits nucléosoliques s'avèrent toujours actifs après une congélation de plusieurs mois à -70°C.

Cependant ce modèle présente un inconvénient majeur, il faut en effet plusieurs semaines de culture cellulaire pour obtenir les quantités nécessaires aux expériences de mesure de l'activité de liaison vis-à-vis de l'acide rétinolique. De plus les techniques de culture cellulaire s'avèrent relativement onéreuses.

Cellules HL 60	BEVS*	Cos	<i>E.coli</i>
0,3	5-15	2,8	10-20

*HL 60 : cellules leucémiques promyélocyaires exprimant RAR α et β .

*BEVS : Système d'expression Baculovirus.

Tableau 10 : Mesure du taux d'expression des récepteurs de l'acide rétinoïque dans quatre systèmes différents, utilisés au laboratoire, et exprimé en pmoles/mg de protéines.

2.1.2 Récepteurs recombinants produits dans les cellules SF 9 infectées par Baculovirus : (Baculovirus Expression Vector System : BEVS)

A ce niveau, nous avons bénéficié de l'aide du groupe de P. Chambon qui nous a fourni les trois virus recombinants exprimant hRAR α , hRAR β et hRAR γ . Ce système d'expression a été implanté au laboratoire par B. Sablonnière.

a) Présentation du modèle

La production de protéines recombinantes dans les cellules eucaryotes d'insectes (cellules SF 9) sous le contrôle de Baculovirus permet la production abondante de protéines recombinantes, procaryotes ou eucaryotes, qui possèdent des propriétés antigéniques, immunologiques et fonctionnelles identiques à celle des protéines naturelles (Fihole *et al.*, 1990 ; Jänne *et al.*, 1993 ; Reddy *et al.*, 1992).

b) Principe de la production de la protéine recombinante

Le virus *Autographa Californica* nuclear polydredrosis virus (AcNPV) est le virus prototype de la famille des Baculovirus qui peuvent infecter plus de 30 espèces d'insectes lépidoptères, dont les cellules SF 9, cellules ovariennes provenant de *Spodoptera frugiperda*. Au cours de l'infection, deux formes de virus sont produites par les cellules cibles :

- des particules virales extra cellulaires
- des occlusions virales

Ces dernières sont constituées de la particule virale entourée d'une coque protéique formée en majorité de polyédrine. Dans les cultures de cellules SF9 infectées, la polyédrine (29 kDa) s'accumule jusqu'à des concentrations de l'ordre de 1mg/ml pour 10⁶ cellules infectées, ce qui représente alors plus de 50% des protéines totales de la cellule. Le gène de la polyédrine n'est pas essentiel pour la réplication ou la production de particules virales extra cellulaires. Il est dès lors possible de le modifier par l'insertion de gènes étrangers. Cette insertion est réalisée en aval du promoteur fort du gène de la polyédrine après délétion de la région codant celle dernière.

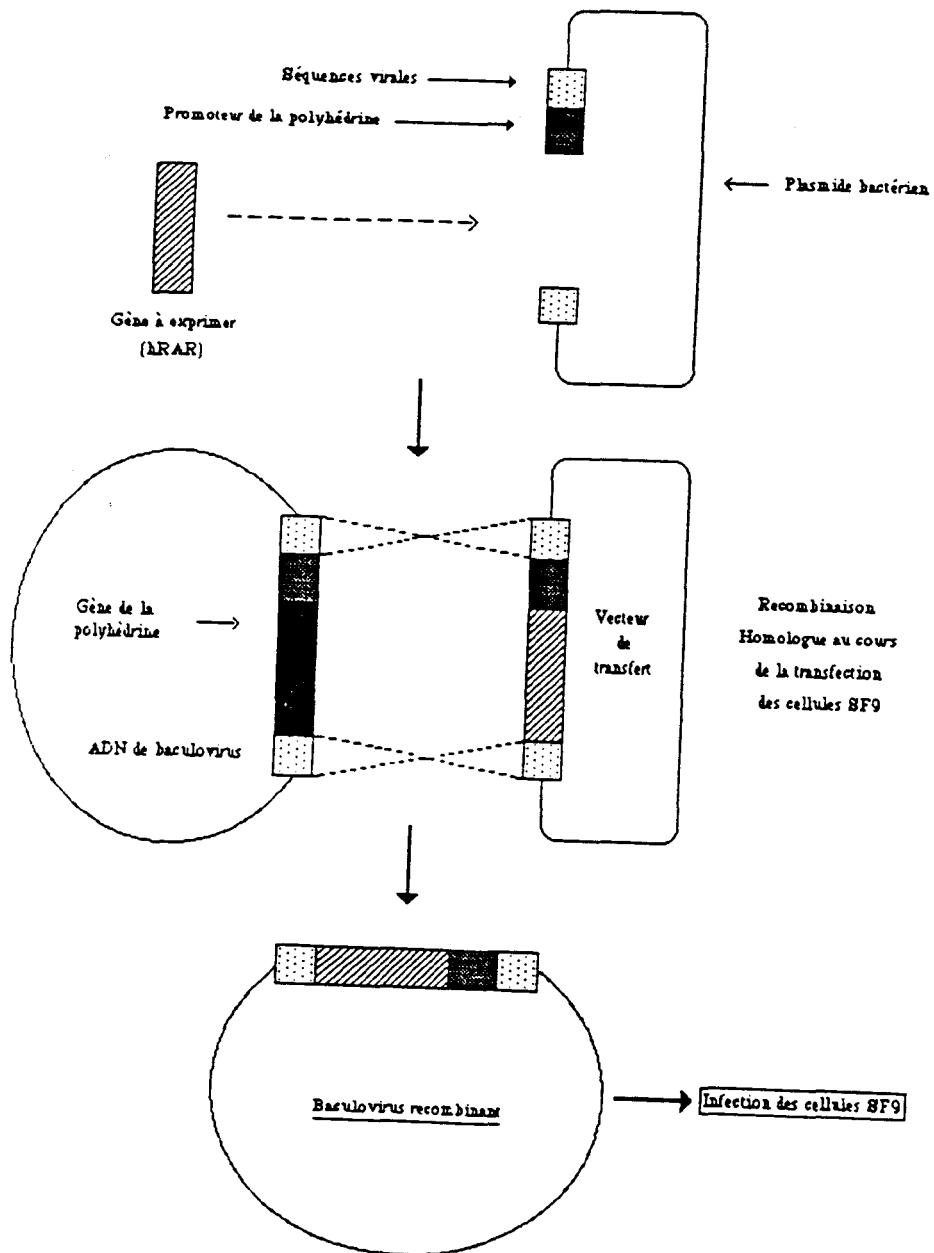


Figure 30 : Système de surexpression par infection cellulaire à l'aide de virus recombinants
(D'après Fihole *et al.*, 1991)

Les virus recombinants sont produits en trois étapes :

1) Insertion du gène à exprimer dans un vecteur de transfert bactérien (PUC8) modifié, entouré de séquences virales encadrant le promoteur de la polyédrine.

2) Cotransfection dans les cellules d'insectes SF9 du Baculovirus et du vecteur de transfert. Au cours de cette étape, une recombinaison homologue peut générer un ADN viral recombinant porteur du gène à exprimer (Figure 30).

3) Cette recombinaison est un événement rare, aussi il est nécessaire de purifier le virus recombinant. Ceci se fait par infections successives des cellules SF9 et identification des plages de lyse sans occlusion. Généralement après 3 ou 4 cycles d'enrichissement le virus sécrété est pur, prêt à être utilisé pour infecter en masse les cellules SF9. La figure 31 illustre l'expression de la protéine RAR α 48 h après la phase d'infection virale.

Les cellules SF9 sont alors cultivées en masse, puis infectées par le virus recombinant. Le récepteur recombinant est obtenu à partir de préparation d'extraits nucléosoliques suivant le principe décrit pour les cellules Cos7.

La quantité de récepteur produit est largement supérieure au système d'expression dans les cellules Cos précédemment décrit. En effet, suivant les récepteurs et les extraits, le taux varie de 5 à 15 pmoles/mg de protéines (Tableau 10). Ce qui représente un taux 3 à 5 fois supérieur à celui des cellules Cos transfectées. De plus, le récepteur apparaît relativement stable. La culture en suspension des cellules SF9 permet en outre la production en masse des cellules. Ce qui permet de stocker rapidement des quantités importantes de récepteurs et par conséquent le problème du temps de culture ne se pose pas dans ce modèle.

2.1.3 Les récepteurs recombinants bactériens

Les vecteurs d'expression nous ont été fournis par le groupe du professeur P. Chambon.

a) Présentation du modèle

Les plasmides utilisés sont de type PET 3 (Studier et Moffat., 1986). Ils contiennent la séquence d'ADNc correspondant à chaque récepteur de l'acide rétinoïque. L'expression de ces derniers est placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'I.P.T.G.

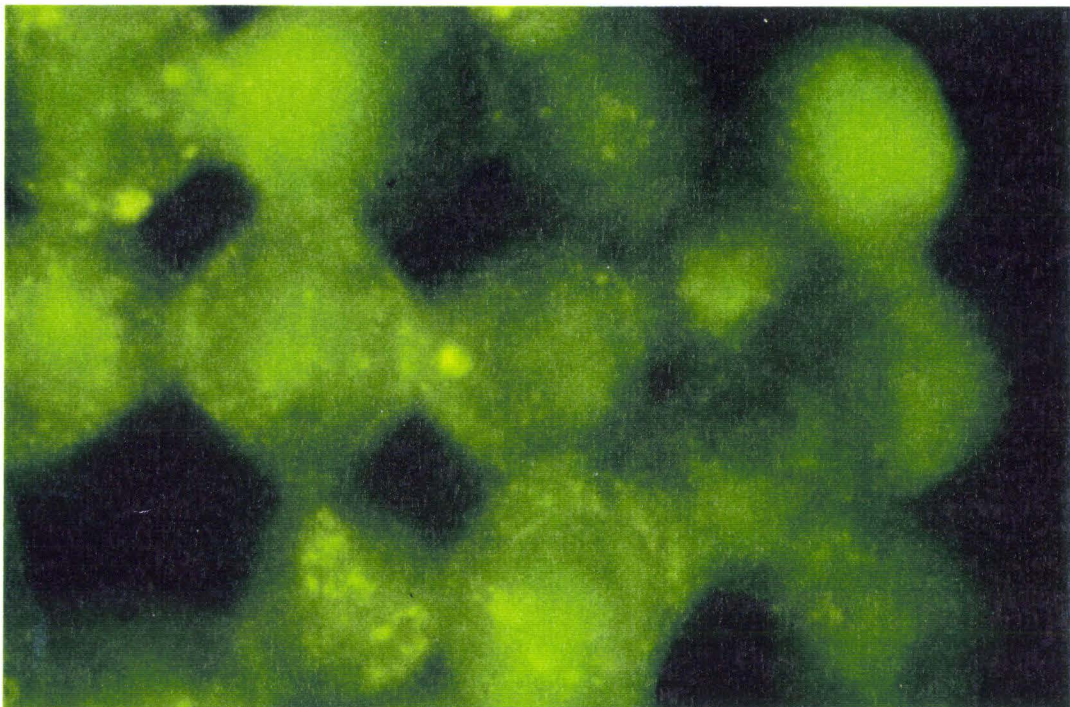


Figure 31 : Détection par immunofluorescence du récepteur RAR α produit dans les cellules SF 9.

Il est exprimé 48 h après l'infection virale. Le marquage est révélé par l'anticorps (IS39)

b) Production de la protéine recombinante

Le récepteur recombinant est obtenu par amplification et expression des plasmides dans des bactéries BEL 21 (*E. coli*). L'induction de l'expression est induite par I.P.T.G et on récupère les protéines recombinantes directement à partir d'extraits totaux.

Le taux de récepteur produit ainsi est de 10 à 20pmoles/ mg de protéines (Tableau 10). Cependant le stockage des récepteurs recombinants s'avère relativement délicat car l'activité de liaison chute de manière importante si on utilise des extraits congelés.

2.1.4 Conclusion

La production de protéines recombinantes nous conduit aux constatations suivantes :

Les niveaux d'expression les plus élevés ont été obtenus dans les systèmes d'expression procaryotes et viraux (Tableau 10). Cependant, les protéines procaryotes apparaissent les plus labiles. Enfin, il nous est apparu tout à fait intéressant de disposer d'un récepteur recombinant présentant des modifications post-traductionnelles proches de celles des protéines eucaryotes. Pour toutes ces raisons nous avons choisi d'étudier l'activité de liaison des rétinoïdes originaux dans le système d'expression Baculovirus.

2.2) Principe de la mesure de l'activité de liaison

2.2.1 Constante de dissociation

a) Définition de la constante de dissociation

L'affinité d'un ligand vis-à-vis de son récepteur est caractérisée par la valeur du K_d . C'est la concentration en ligand libre pour laquelle 50% de récepteurs sont saturés par le ligand. La représentation dite de Scatchard permet de déterminer graphiquement la valeur de K_d , en représentant B/F en fonction de B (Figure 32).

B = ligand lié

F = ligand non lié

La pente de la droite résultante, nous indique la valeur de $-1/K_d$

b) Détermination du K_D

Des quantités croissantes d'acide rétinoïque sont ajoutées à des aliquotes de nucléosol (B_T). Une deuxième série d'aliquotes est incubée en présence d'un excès de ligand non radioactif (B_{NS}). L'incubation est poursuivie jusqu'à l'équilibre. La liaison est alors déterminée par $B_T - B_{NS}$. (cpm obtenus).

2.2.2 Constante d'inhibition

Elle est déterminée par rapport à un ligand de référence tritié ici l'acide rétinoïque, par des expériences de compétition avec le composé à tester. Cette constante permet d'évaluer l'affinité d'un ligand pour son récepteur lorsqu'on ne dispose pas du ligand radioactif.

a) définition

C'est la constante de dissociation apparente

$$K_i = \frac{K_D \times I_{50\%}}{F_{50\%} + K_D}$$

K_D : constante de dissociation de l'acide rétinoïque tritié à l'équilibre.

$I_{50\%}$: concentration en compétiteur pour laquelle 50% d'inhibition de la liaison de l'acide rétinoïque tritié est obtenue.

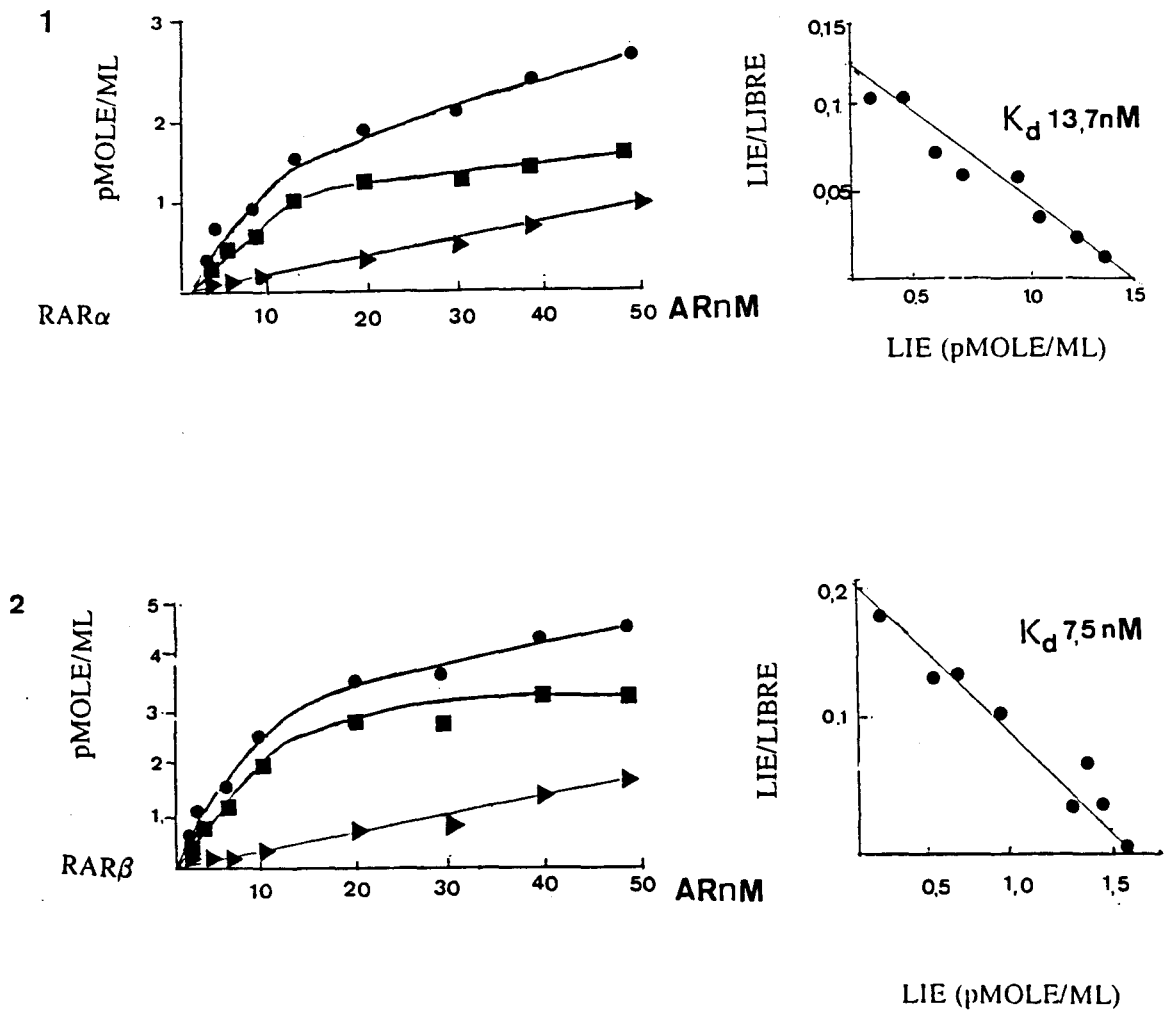
$F_{50\%}$: concentration d'acide rétinoïque tritié non liée au récepteur pour une concentration totale de compétiteur non marqué (I_t) égale à $I_{50\%}$.

b) détermination de la valeur du K_i

Des quantités croissantes de rétinoïdes à tester sont ajoutées à des aliquotes de nucléosol, en présence d'une concentration constante d'acide rétinoïque radioactif. L'incubation est poursuivie jusqu'à l'équilibre. La mesure de la liaison du ligand radioactif en absence (B_0) ou en présence de compétiteur (B) permet de mesurer le degré de compétition. La représentation graphique B/B_0 en fonction du logarithme de la concentration en compétiteur est une sigmoïde. Elle permet de déterminer $I_{50\%}$.

2.3) Etudes de Scatchard

L'affinité de l'acide rétinoïque vis-à-vis des récepteurs recombinants a été mesurée. Les valeurs de K_d ont été calculées (Tableau 11 et figure 32).



Les courbes de saturation, à gauche, et les diagrammes de scatchard, à droite, sont déterminés à partir des récepteurs entiers. Les extraits nucléaires sont incubés en présence d'acide rétinoïque 20nM (3H) et des concentrations notées en abscisse d'acide rétinoïque froid.

- 1 RAR α
 2 RAR β
- Activité de liaison totale
 - ▲ Activité de liaison non spécifique
 - Activité de liaison spécifique

Figure 32 : Activité de liaison aux récepteurs RAR α et RAR β , produits dans les cellules Cos 7, de l'acide rétinoïque (3H).

Systèmes d'expression	K_D (nM)		
	RAR α	RAR β	RAR γ
Cos	13,7 (± 1)	7,5 ($\pm 0,5$)	ND
<i>E. coli</i>	13 ($\pm 0,5$)	10(± 1)	8,7($\pm 0,5$)
BEVS	6,1($\pm 2,2$)	5,3($\pm 1,5$)	4($\pm 1,2$)

Les extraits sont incubés en présence de quantités croissantes d'acide rétinoïque tritié, en présence ou en absence de ligand non radioactif 100 fois en excès.

Tableau 11 : Constantes de dissociation de RAR α , RAR β et RAR γ vis-à-vis de l'acide rétinoïque dans différents systèmes d'expression

Méthodes	Cos	BEVS	E.coli
HPLC	19,5 (Martin <i>et al</i>) 15 (Cavey <i>et al</i>) 15,5(Bernard <i>et al</i>) 13 (Delescluse <i>et al</i>)		
Charbon- dextran	6,1(Crettaz <i>et al</i>) 13,7*	6,1*	0,67 (Keidel <i>et al</i>) 0,21 (Yang <i>et al</i>) 6,2 (Crettaz <i>et al</i>) 13*

Les valeurs de K_D sont exprimées en nM

* Valeurs obtenues lors de notre étude

Tableau 12 : Quelques valeurs des constantes de dissociation des récepteurs produits dans les principaux systèmes d'expression

Les valeurs obtenues sont en accord avec la plupart des données de la littérature. Cependant, les résultats obtenus dans la littérature sont relativement variables. Pour un même récepteur, la valeur de K_D peut être multipliée par 20 (Tableau 12). Plusieurs paramètres sont à prendre en compte pour expliquer cette variabilité.

Un premier critère est la méthode utilisée pour séparer le ligand libre ou lié au récepteur. Deux techniques sont actuellement employées, la séparation par chromatographie d'exclusion de taille à haute performance (HPLC) ou par charbon-dextran (élimination du ligand radioactif en excès par absorption sur le charbon). La technique de séparation par HPLC est une méthode relativement lourde, mais elle donne de bons résultats. Par contre la méthode au charbon-dextran est facilement utilisable mais l'efficacité de la séparation moins bonne.

Le critère important semble être la concentration effective en ligand lors de l'incubation (Sablonnière *et al.*, 1994).

Un troisième critère est le système d'expression du récepteur. Comme nous l'avons vu dans la revue générale, le récepteur recombinant peut être traduit sous forme de protéines de fusion, tronquées ou entière dans un système procaryote ainsi que dans les modèles eucaryotes (cellules transfectées, cellules infectées). Ces modèles permettent des

modification post-traductionnelles différentes. Nos résultats et les données de la littérature (Tableaux 11 et 12), montrent bien que les modifications post-traductionnelles n'influencent pas profondément l'activité de liaison des récepteurs de l'acide rétinoïque, puisque les affinités observées ne dépendent apparemment pas du système d'expression utilisé.

2.4 Compétitions

Dans un premier temps, nous avons étudié l'affinité relative de ces rétinoïdes vis-à-vis de chaque récepteur recombinant. Les valeurs de K_D ont été mentionnées tableau 13. Les valeurs de K_i ont été déterminées par des expériences de compétition contre de l'acide rétinoïque tritié. Nous avons choisi comme ligands de référence deux agonistes bien décrits dans la littérature. Les valeurs de K_i pour CD367 sont en accord avec les valeurs de K_D obtenues dans la littérature (Tableau 7). Cependant il y a des discordances entre l'affinité du composé Ch55 et son activité biologique décrite dans la littérature. La concentration nécessaire pour induire 50% de différenciation des cellules HL 60 est de 0,04nM. (Jetten *et al.*, 1987). Cette discordance a également été mise en évidence par d'autres équipes (Keidel *et al.*, 1992 ; 1993). Ces auteurs montrent que le récepteur RAR α entier, produit dans les bactéries *E.coli* a une activité de liaison pour Ch55 qui ne représente que 5% de celle de l'acide rétinoïque. Ces résultats sont par ailleurs en contradiction avec ceux de l'équipe de Shudo, qui a montré que le Ch55 était un ligand plus affine que l'acide rétinoïque vis-à-vis des récepteurs endogènes α et β des cellules HL 60. Ce phénomène pourrait résulter d'un métabolisme conduisant à un dérivé biologiquement plus actif dans les cellules eucaryotes capables de se lier mieux au récepteur et d'induire une forte activité biologique, alors que le métabolisme des organismes procaryotes ne pourrait permettre de dégager un tel composé. Néanmoins, l'équipe de Shudo a poursuivi ses investigations et rapporte que Ch55 lie les récepteurs entiers de l'acide rétinoïque produits également dans un système de production procaryote avec une bonne affinité pour les récepteurs RAR α et RAR β (Fukasawa *et al.*, 1993). La technique de séparation le ligand libre du ligand lié, diffère, elle résulte de l'utilisation de filtre de nitrocellulose. Aucune conclusion définitive ne peut donc actuellement être déduite des résultats contradictoires des données actuelles de la littérature.

Les dérivés chalcones 1 et 2 présentent une affinité comparable à celle de Ch55 de 0,1 à 0,4 μ M. Le produit 3 quant à lui, est nettement moins affine, avec un K_i 10 à 40 fois supérieur à celui de son intermédiaire de synthèse, le composé 2 et à celui du composé 1. Il présente cependant une affinité suffisamment élevée pour être, après déprotection de sa fonction amine, un bon ligand pour la chromatographie d'affinité. Il a d'ailleurs permis la purification des trois récepteurs (Bourguet *et al.*, 1992a et b). Cependant, dans cette série chalcone, l'introduction d'un groupement phénylalkyloxy en 2' sur un connecteur

Composés	Ki (10 ⁻⁶ M)		
	RAR α	RAR β	RAR γ
AR	0,013	0,0052	0,0034
CD367	0,0048	0,0051	0,0032
Ch55	0,32	0,32	0,32
1	0,24	0,24	0,24
2	0,4	0,14	0,12
3	4,8	1,6	1,2
4	14	14	14
5	42	> 3000	> 3000
6	32	32	32
7	0,36	0,8	4,8
8	7,2	9,6	> 3000

Les valeurs de Ki des différents dérivés utilisés pour les récepteurs de l'acide rétinoïque α , β et γ , ont été obtenues par compétition avec de l'acide rétinoïque tritié. Ces valeurs sont la moyenne de trois ou quatre déterminations.

Tableau 13 : Détermination des valeurs de Ki par compétition contre d'acide rétinoïque.

aliphatique de longueur variable fait chuter considérablement l'affinité (composés 4, 5 et 6), sans doute du fait de l'encombrement stérique introduit.

Les composés triphényléthyéniques quant à eux, ont la propriété très intéressante de présenter une bonne affinité vis-à-vis des récepteurs α et β . Cependant la substitution d'un groupement méthoxy par un groupement diméthylaminopropyloxy fait chuter l'affinité de 12 et 20 fois respectivement pour le récepteur $RAR\alpha$ et $RAR\beta$.

L'activité et la sélectivité des produits a alors été étudiée par la mesure de l'effet transactivateur.

3 - MESURE DE L'EFFET TRANSACTIVATEUR

3.1 Principe

3.1.1 Présentation du modèle

Ces expériences ont été réalisées à l'aide des vecteurs d'expression pSG5 fournis par l'équipe de P. Chambon.

Les vecteurs contenant l'ADNc des récepteurs de l'acide rétinoïque sont cotransfectés avec un plasmide exprimant l'enzyme CAT (Chloramphénicol Acyl Transférase) sous le contrôle spécifique d'un élément de réponse de l'acide rétinoïque (TRE₂-TK-CAT) dans les cellules Cos7. Cette enzyme facilement dosable permet de mesurer l'effet transactivateur induit par chaque rétinoïde. Un troisième vecteur, exprimant la β -galactosidase est également cotransfecté, de manière à normaliser les résultats pour chaque expérience. En effet un aspect délicat des transfections est la variabilité de leur efficacité. Pour avoir un dosage quantitatif il est donc nécessaire d'introduire un paramètre corrigeant ces variations ; le dosage de la β -galactosidase permet de quantifier l'efficacité propre de chaque transfection par un dosage colorimétrique.

Ainsi, la présence d'un rétinoïde actif va permettre au récepteur d'induire l'expression du gène CAT qui est sous le contrôle de l'élément de réponse de l'acide rétinoïque (TRE₂-TK-CAT). L'activité enzymatique CAT est le reflet de l'activité du rétinoïde. Elle est dosée par une méthode quantitative dont le principe est simple :

La CAT est une enzyme bactérienne capable de transférer des groupements acyles sur le chloramphénicol. Le chloramphénicol radioactif est acylé par le butyrylcoenzyme A sous l'action de la CAT. Le chloramphénicol acylé (formes mono et diacylées) est séparé des formes non acylées par extraction organique au xylène. Le niveau d'acylation est proportionnel à l'activité de l'enzyme et peut être quantifié par dosage de la radioactivité de la phase organique. L'activité de chaque rétinoïde est comparée à celle de l'acide rétinoïque.

Enfin, nous avons choisi un l'élément de réponse palindromique car il est insensible au taux de récepteurs endogènes des cellules Cos (500 sites par cellules), contrairement aux RARE en répétitions directes.

3.1.2 Validation du modèle

Nous avons vérifié la spécificité de la réponse enzymatique CAT (Figure 33).

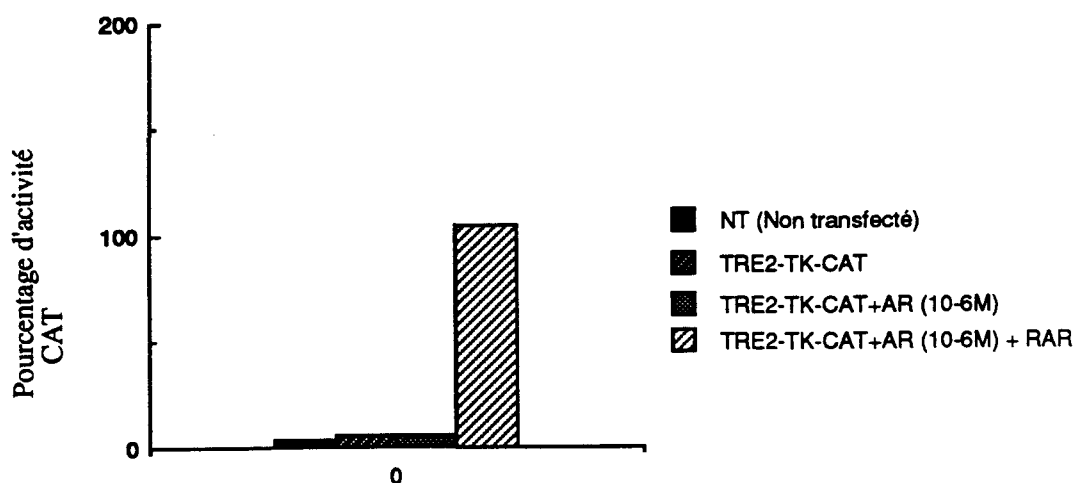


FIGURE 33 : Activité spécifique du gène indicateur CAT

L'activation du gène indicateur CAT par les récepteurs de l'acide rétinoïque endogènes est négligeable par rapport à celle des récepteurs recombinants (moins de 1%).

3.1.3 Calcul de la concentration efficace à 50%

La valeur de l'EC 50 est définie comme la concentration en ligand capable d'induire 50% de l'activité transactivatrice induite par l'acide rétinoïque à 10^{-6} M.

3.2 Résultats et interprétation

Les valeurs de concentrations effectives à 50% sont mentionnées dans le tableau 14.

Composé	EC 50 (10 ⁻⁹ M)		
	RAR α	RAR β	RAR γ
CD 367	0,22	0,41	0,31
Ch55	2,	2,1	2,5
AR	2,51	4,12	2,41
1	2,5	2,52	2,7
4	320	400	I*
5	I	I	I
6	I	I	I
7	0,1	0,15	325
8	320	400	I

Ce tableau présente les valeurs d'EC 50 mesurées par dosage de la CAT. Il représente la moyenne de 2 à 5 déterminations, chacune d'entre elles est réalisée en triple.

*I= Inactif (EC 50 > 10⁻⁵M).

Tableau 14 : Mesure de l'effet transactivateur dans les cellules Cos 7 transfectées avec un gène indicateur CAT.

L'effet transactivateur des trois rétinoïdes de référence, l'acide rétinoïque, Ch55 et CD367 a été mesuré. Les valeurs sont tout à fait comparables à celle de la littérature.

Dans la série chalcone les dérivés 4, 5, 6 sont totalement inactifs dans ce modèle. Le composé 1 présente une activité intéressante, équivalente au Ch55 dont la structure est très proche.

Dans la série tryphényléthylénique le composé 7 est très actif, pour les récepteurs α et β (0,1 et 0,15 nM), valeurs équivalentes au CD367. Par contre le produit 8 présente une activité très faible 2600 à 3200 fois moins active que le produit 7 pour les récepteurs α et β . De plus, les produits 7 et 8 présentent une activité agoniste sélective des récepteurs α et β ce qui confirme les résultats obtenus par l'étude de l'activité de liaison. Le composé 7 présente, en effet une activité 2000 à 3000 fois supérieure pour RAR α et β à celle pour RAR γ .

Pour explorer l'éventualité d'une activité antagoniste des composés, nous avons réalisé des compétitions entre les composés 4, 5, 6, 7, 8 d'une part et un rétinoïde très actif le Ch55, d'autre part. (Figure 34). Nous avons choisi de nous restreindre aux récepteurs α et β qui lient préférentiellement la plupart de ces composés.

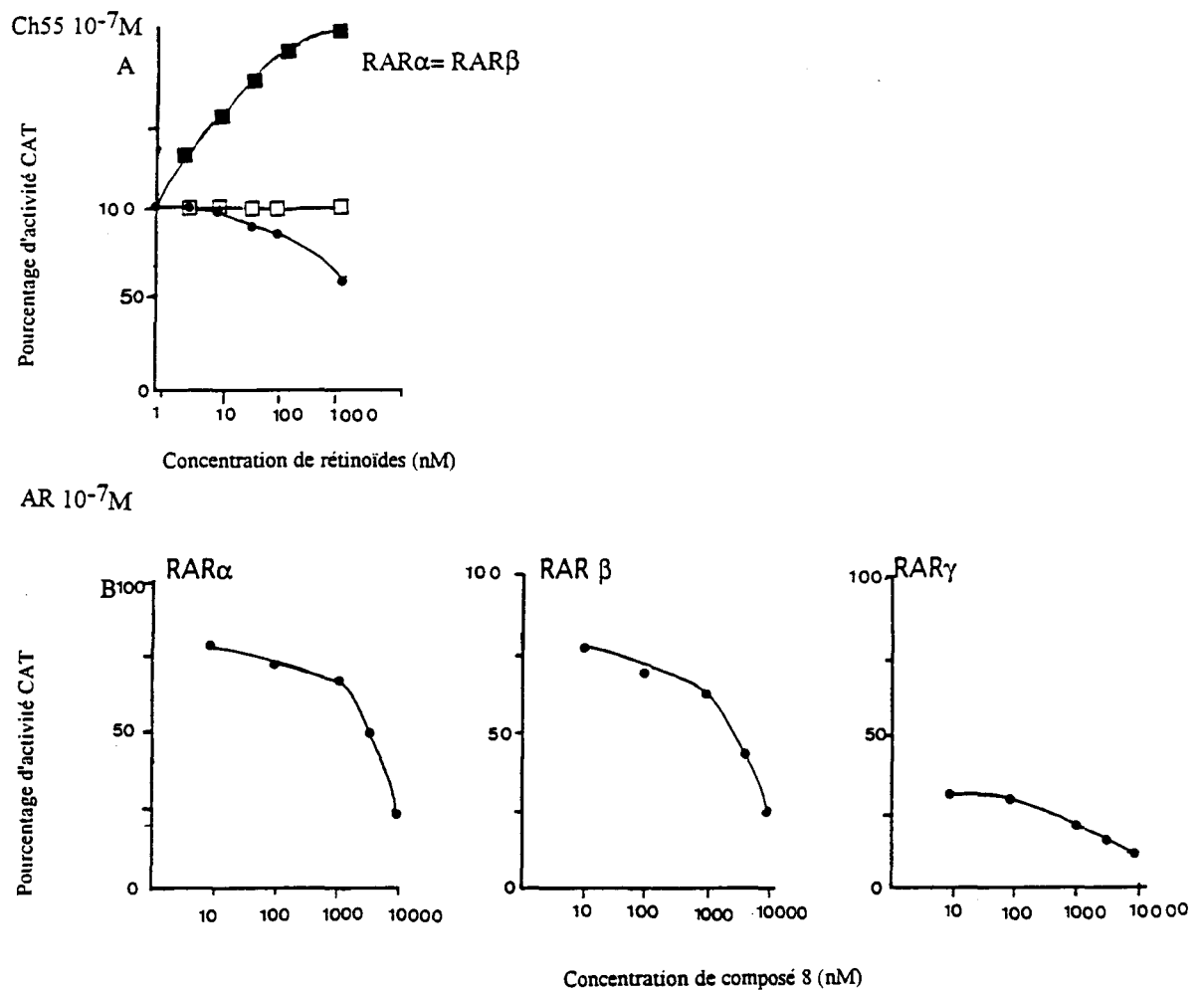
Les dérivés chalcones ne présentent aucune activité par contre, dans la série triphényléthylénique, le composé 7 confirme sa puissante activité agoniste. Le composé 8 présente une activité antagoniste modeste mais comparable à celle des produits synthétisés par l'équipe de Shudo, TD 550, 650, Biph et Bipb. Ces deux derniers dérivés présentent une activité antagoniste dans les cellules HL 60 (réduction au nitro bleu de tétrazolium) permettant une diminution de la réponse biologique de 30% pour des concentrations 50 fois supérieures à celles du rétinoïde de référence dans ce cas, l'Am80.

Il était important de vérifier que l'infléchissement de l'activité CAT n'était pas lié à la toxicité du produit. Des tests de viabilité au bleu trypan montrent qu'il n'y a pas de toxicité accrue par la présence du composé 8.

L'étude de l'influence du produit 8 sur l'activité CAT induite par l'acide rétinoïque, produit moins toxique, a ensuite été entreprise sur les trois récepteurs (Figure 34). Le composé 8 révèle une activité antagoniste plus affirmée pour RAR γ . L'activité CAT (acide rétinoïque 10^{-7} M) est diminuée de 90 % pour 10^{-6} M de compétiteur dans le cas du récepteur RAR γ alors qu'elle est respectivement à 78% pour RAR α et 63 % pour RAR β .

Un second point intéressant est la discordance entre l'activité de liaison et l'activité transactivatrice de Ch55 et de certains de nos dérivés (1, 7 et 8).

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette discordance. On sait que les rétinoïdes de synthèse subissent des modifications métaboliques (Sporn *et al.*, 1984). Ces remaniements pourraient aboutir à la formation de composés plus actifs. Il est vraisemblable



Les cellules Cos 7 sont transfectées par pSG5RAR α , β ou γ et le plasmide indicateur TRE₂-TK-CAT. 16h après la transfection, les concentrations de rétinoïdes compétiteurs, indiquées en abscisse, sont ajoutées en présence de Ch55 (A) ou d'acide rétinoïque (B). En ordonnée est précisé le pourcentage d'activité CAT (100% = Ch55 10⁻⁷M (A) ou acide rétinoïque 10⁻⁷M (B)).

- A Ch55 10⁻⁷M**
- Composé 4
 - Composé 7
 - Composé 8
- B AR 10⁻⁷M**
- Composé 8

Ces résultats sont une moyenne de quatre déterminations.

Figure 34 : Influence des composés 4, 7 et 8 sur l'activité transactivatrice induite par le Ch55 et l'acide rétinoïque

que l'activité métabolique mise en jeu dans les cellules SF 9 et Cos à 37°C ou à 4°C ne soit pas équivalente. Une hypothèse serait que certains des produits de synthèse, dont le Ch55, pourraient être transformés en composés plus actifs.

Une deuxième hypothèse s'appuie sur le mécanisme d'action des récepteurs de l'acide rétinoïque. Lors de la revue générale, nous avons vu que la formation d'hétérodimères avec les récepteurs RXRs était la voie préférentielle et que la nature et la concentration du ligand influence cette association. La transactivation est alors fortement stimulée. L'idée est que certains des rétinoïdes de synthèse favorisent *in vitro* cette association entre RARs transfectés et RXR endogènes. Or nous savons que cette association augmente l'affinité des récepteurs pour l'ADN et l'efficacité de la transcription.

Une expérience préliminaire a été tentée; les cellules Cos transfectées par TRE₂-TK-CAT ont été incubées en présence d'acide rétinoïque ou de Ch55(10⁻⁶M) afin de savoir si la quantité de RXRs endogène pourrait être suffisante pour stimuler la séquence TRE₂pal en présence de Ch55. L'activité CAT est la même dans les deux cas (Figure 35).

L'activité endogène du RXR n'expliquerait donc pas cette discordance. Néanmoins ces résultats doivent être confirmés notamment par la transfection de séquences plus sensibles aux RARs et aux RXRs ainsi que par celles de récepteurs RXRs recombinants.

Un "cross talk" avec d'autres facteurs de transcription endogènes, comme cJun et cFos pourrait également intervenir. Cependant, il ne faut pas oublier que le taux de récepteur transfecté est en moyenne 100 fois supérieur au taux endogène. Dans ces conditions, une hétérodimérisation ne s'effectue au maximum pour une molécule sur 100. La fréquence relativement faible de cette association ne suffit pas à elle seule à expliquer nos observations.

Il est à noter que la spécificité observée lors de la mesure de l'activité de liaison est conservée.

3.3 Conclusion

L'utilisation des récepteurs recombinants permet d'étudier l'interaction ligand-récepteur: l'affinité et la sélectivité de la liaison peut être quantifiée. En outre, l'effet de cette liaison peut être mesuré par l'effet transactivateur. Cette approche est indispensable pour détecter l'éventuelle activité antagoniste et/ou sélective d'un ligand. Cependant le mécanisme d'action du récepteur est modifié dans de tels systèmes. En effet, les cellules transfectées sont en quelque sorte des "usines" à transcription et à traduction protéique. Le taux de récepteurs produit est 30 à 100 fois supérieur aux taux endogène obtenu dans des lignées cellulaires. Le "cross talk" des récepteurs de l'acide rétinoïque avec les autres récepteurs nucléaires (RXRs, récepteurs stéroïdiens) et les messagers des diverses voies de transduction en est modifié. Aussi

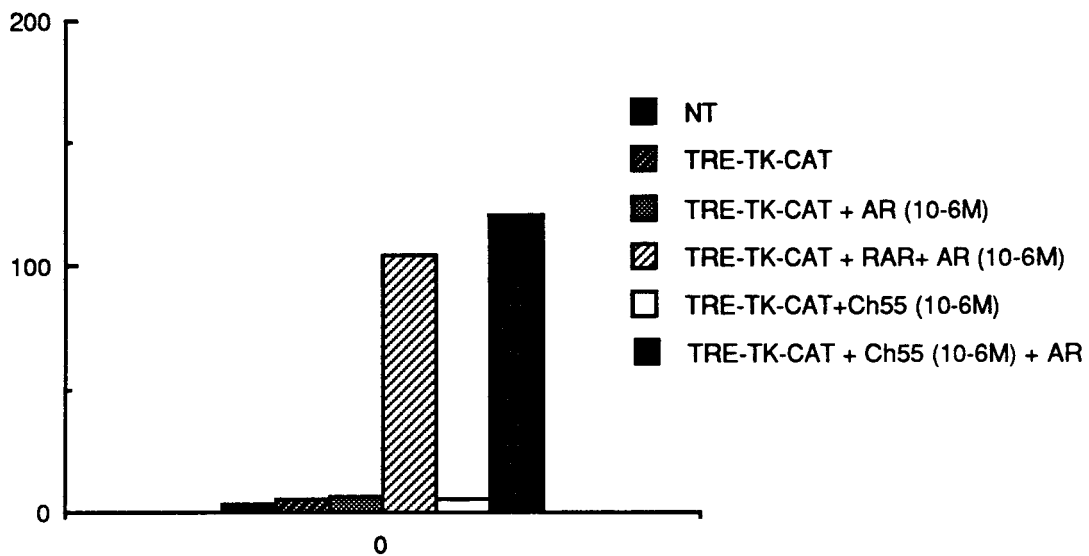


Figure 35 : Activité de Ch 55 sur les récepteurs endogènes

la fixation du ligand au récepteur provoque une réponse qui ne reflète pas toujours l'activité biologique de ces molécules.

4 - AUTRES TESTS BIOLOGIQUES

Nous avons complété l'étude conduite au laboratoire par le Docteur Dominique Manechez sur l'activité de certains rétinoïdes de synthèse au niveau de cellules leucémiques humaines HL 60 (Manechez, 1992). Ces cellules se différencient sous l'effet des rétinoïdes (Breitman *et al.*, 1980) puis évoluent vers l'apoptose (Martin *et al.*, 1990). Cette étude sera corrélée à l'induction d'une réponse primaire, l'induction de la transglutaminase de tissu.

4.1 Rétinoïdes de synthèse et différenciation cellulaire

Les composés Ch55 et 1, 2, 3, 4 ont été testés *in vitro* sur la différenciation des cellules leucémiques à promyélocyte humaines (HL 60) par D. Manechez. Ce modèle a déjà permis de caractériser l'activité biologique de nombreux dérivés chalcones (Kagechika *et al.*, 1989, 1990 et 1991).

4.1.1 Présentation du modèle

La lignée cellulaire HL 60 est constituée de cellules présentant des stades de différenciation variés. Les myéloblastes et les promyélocytes constituent 85% de la population cellulaire. Les autres cellules se situent à des niveaux de différenciation intermédiaires. La différenciation peut-être observée au niveau morphologique et quantifiée par un test fonctionnel ; le test de réduction du Nitro bleu de tétrazolium (NBT).

Son principe est simple:

Au cours de la différenciation, les cellules acquièrent les propriétés de phagocytose. Il en découle une augmentation des processus d'oxydo-réduction avec induction de la NADPH oxydase et production d'anions superoxydes, ce qui conduit à la réduction du bleu de tétrazolium qui devient alors insoluble en milieu aqueux. Il précipite alors sous forme de dépôts ou de granulations noires dans le cytoplasme. En comptant le nombre de granulations on peut alors établir une courbe dose-réponse.

Composés	Test de réduction du NBT réalisé dans les cellules HL 60 (EC50, nM)	Exclusion au bleu trypan HL 60 (CL 50, μ M)
AR	49,00	> 10
Ch55	1,2	0,54
1	1,6	0,81
2	> 100	> 10
3	I	> 10
4	I	> 10
7	I	1
8	I	> 10

CE 50 : Concentration efficace à 50%

CL 50 : Dose létale à 50%

I : Inactif ($EC_{50} > 10^{-5}M$)

Tableau 15 : Mesure de l'activité des rétinoïdes sur la différenciation et la toxicité aiguës dans la lignée cellulaire HL 60.

4.1.2 Résultats et interprétation

Les résultats quantitatifs mentionnés dans le tableau 15 confirment la forte activité différenciatrice du produit Ch55 par rapport à l'acide rétinoïque. De plus, le composé hydroxylé 1 possède une activité comparable à Ch55 (1,2nM) sur la différenciation cellulaire. Ce résultat confirme nos observations précédentes. La présence d'un groupement hydroxyle à proximité de la fonction carboxyle ne fait pas décroître l'activité biologique de manière

significative. Ces résultats sont bien corrélés avec une toxicité des deux chalcones bien supérieure à celle de l'acide rétinoïque. Par contre, la faible activité du composé 2 semble être le reflet de l'encombrement stérique apporté par le bras espaceur. Ce dernier est en effet pourvu d'un groupement tertio-butyle volumineux qui pourrait entraîner un encombrement stérique au niveau du groupement carboxyle impliqué dans la liaison récepteur-ligand. Le ligand 3, quant à lui est totalement inactif. Il en est de même pour le ligand 4, l'encombrement stérique de cette molécule à proximité du groupement carboxyle empêche toute activité de différenciation, ce qui confirme les résultats obtenus lors de la mesure de l'effet transactivateur. L'activité antagoniste de cette molécule a également été testée contre l'acide rétinoïque et le Ch55, la molécule s'avère une nouvelle fois inactive.

Cependant le composé 7 se révèle totalement inactif sur la différenciation des cellules HL 60. Le composé 8 lui non plus ne présente aucune activité ni agoniste ni antagoniste.

4.1.3 Conclusion

Les tests de différenciation nous ont permis de compléter nos résultats précédents. Ils confirment l'activité du dérivé 1 et 4. Par contre les dérivés 7 et 8 ne présentent aucun effet sur la différenciation des cellules HL 60. Cependant, nous avons vu lors de la revue générale qu'il existait des variations dans l'activité biologique d'un modèle cellulaire à l'autre (Strickland *et al.*, 1983). De plus, l'effet antagoniste du composé 8 sur l'activité transactivatrice est plus marquée vis-à-vis du récepteur γ , ce qui peut expliquer son absence d'effet sur ce modèle.

D'un point de vue intéressant, cette étude met également en évidence, une nouvelle fois, la faible corrélation entre affinité et activité biologique du Ch55. Il est donc important de comparer l'activité de ces molécules dans un modèle plus direct, en abordant l'étude d'une réponse primaire induite par l'acide rétinoïque.

4.2 Induction de la transglutaminase de tissu

Peu d'exemples d'effets directs des rétinoïdes sur l'expression des gènes ont été décrits. L'induction de la transglutaminase de tissu, est un exemple de réponse primaire (Chica *et al.*, 1988 ; 1989) et a été choisie à ce titre comme second modèle pour l'étude de l'activité cellulaire des rétinoïdes par D. Manechez. Nous avons complété cette étude par l'évaluation des composés 7 et 8 qui étaient apparus tout à fait intéressants dans les tests utilisant les récepteurs recombinants.

4.2.1 Présentation du modèle

L'acide rétinoïque et les rétinoïdes actifs en général, induisent une différenciation cellulaire souvent accompagnée de l'induction de la transglutaminase de tissu, enzyme calcium-dépendante (Lorand et Conrad, 1984) (Figure 36). Ce phénomène a été observé dans de nombreuses lignées cellulaires et en particulier dans les lignées leucémiques HL 60 et HEL. Cette enzyme est fréquemment induite dans les cellules en différenciation terminale évoluant vers l'apoptose. La transglutaminase de tissu est impliquée dans le mécanisme d'altération de protéines catalysant la formation d'une liaison covalente ϵ (γ -glutamyl)-lysine entre deux protéines ou bien en incorporant certaines amines de faible poids moléculaire comme la putrescine ou la cadavérine, au niveau des sites γ glutamyle de ces mêmes protéines (Lorand et Conrad, 1984) (Figure 36).

La transglutaminase de tissu serait impliquée dans des phénomènes biologiques comme l'activation des macrophages (Schroff *et al.*, 1981), les modifications post-traductionnelles de protéines durant le développement (Carriello *et al.*, 1990), le maintien de l'état non prolifératif des cellules (Birdbichler *et al.*, 1977) et la différenciation cellulaire spontanée ou induite (Moore *et al.*, 1984). Des études visant à mesurer la cinétique de l'induction de l'ARNm de la transglutaminase de tissu après exposition de macrophages à l'acide rétinoïque ont montré une augmentation des taux d'ARNm de la transglutaminase de type II, 15 minutes seulement après le début du traitement. En outre, cet effet ne semble pas impliquer la synthèse de protéine intermédiaire, puisqu'il persiste en présence de cyclohexidine, un inhibiteur de la synthèse protéique.

L'induction de cette enzyme par l'acide rétinoïque semble être une réponse primaire qui s'effectue au niveau transcriptionnel (Chiocca *et al.*, 1988 ; Chiocca *et al.*, 1989). Il existerait des motifs types RARE dans le promoteur (séquence non publiée). Une forte corrélation a néanmoins été établie entre le niveau d'induction de cette protéine et le taux de récepteur présent dans le noyau (Denning et Yerma, 1991). Ainsi il apparaît que les récepteurs de l'acide rétinoïque pourraient être les facteurs de transcription régulant l'expression du gène de la transglutaminase de tissu.

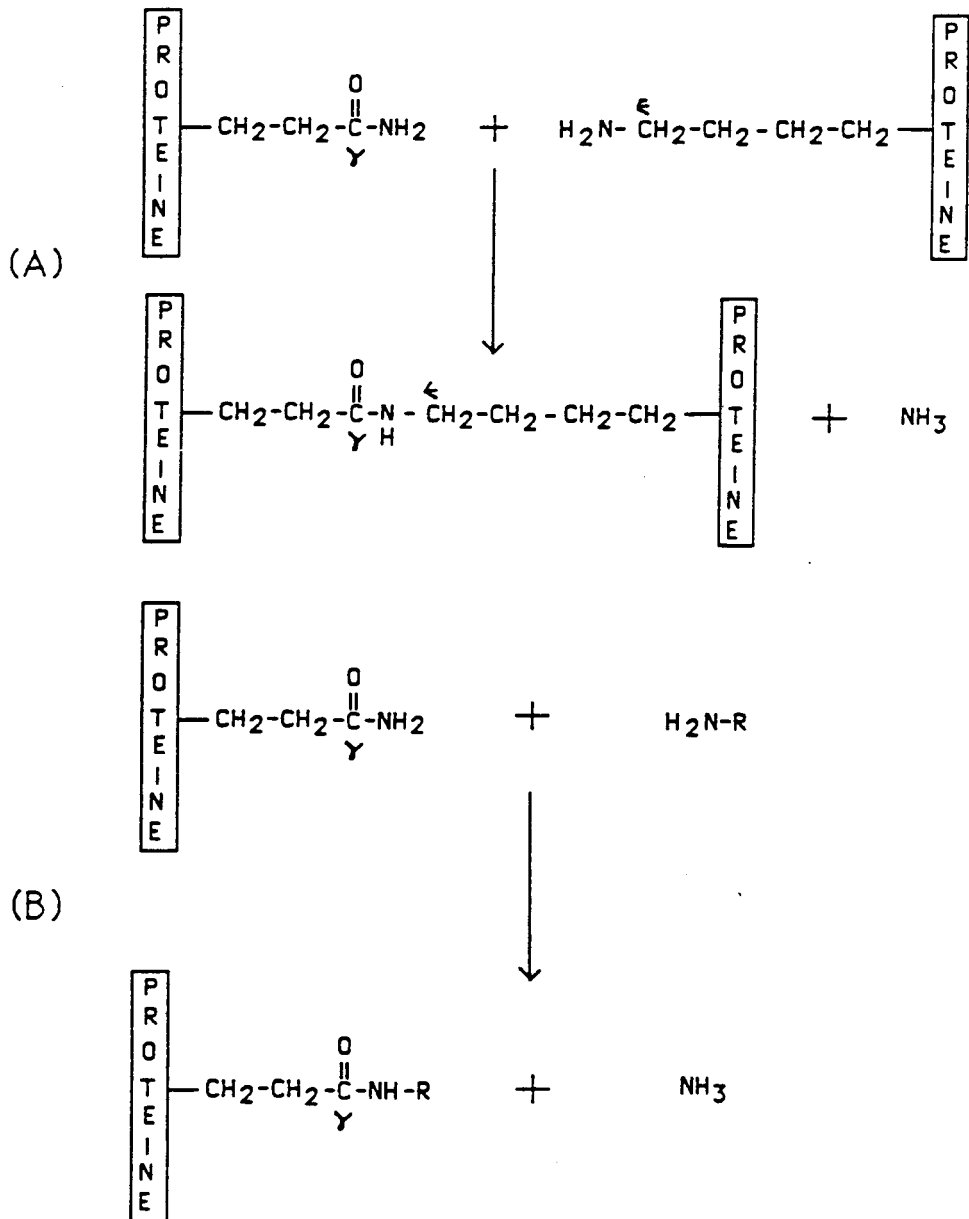


Figure 36 Deux réactions biologiques connues pour être catalysées par les TG :

(A) Croisement entre protéines, créant des peptides à chaîne latérale.

(B) Incorporation d'amines de petit poids moléculaire dans des protéines.

4.2.2 Principe du dosage

En pratique, on incube les cellules pendant 48 heures avec différentes concentrations en rétinoïdes. Après lyse cellulaire et sédimentation, le cytosol contenant l'enzyme est récupéré et incubé en présence de N-N'-diméthylcaséine et de putrescine tritiée. L'activité de la transglutaminase est évaluée en dosant la proportion de [3H]putrescine liée à la N-N'-diméthylcaséine. L'activité de la transglutaminase, est dépendante de son taux, reflétant ainsi la capacité des rétinoïdes à induire la synthèse de cette enzyme.

4.2.3 Résultats et interprétation

Comme le montrent les résultats du tableau 16, les composés Ch55 et 1 présentent une activité bien supérieure à l'acide rétinoïque. En outre des études de compétition contre l'acide rétinoïque révèlent que les composés 7 et 8 ne révèlent aucune activité, ni agoniste (Tableau 16) ni antagoniste. Cela peut paraître paradoxal compte tenu de l'activité de ces produits face aux récepteurs recombinants. Afin d'apporter une explication à ces observations contradictoires nous pouvons formuler plusieurs hypothèses :

-Premièrement, les composés 7 et 8 pourraient être soumis à un métabolisme différent dans les cellules Cos et HL 60, qui aboutirait à des produits plus ou moins actifs. Les métabolites des composés 7 et 8 seraient inactifs dans cette réponse biologique.

-La seconde hypothèse, est étayée par le fait que le mécanisme d'activation de l'expression de la transglutaminase implique l'intervention d'autres protéines.

En effet, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la pKC, Manechez *et al.*, ont montré qu'une part importante du mécanisme conduisant à l'induction de l'enzyme par l'acide rétinoïque peut résulter d'une action directe (par une réaction de rétinoylation par exemple) ou indirecte de ce dernier sur la pKC (Manechez., 1992). En outre, l'équipe de Davies a montré l'implication des récepteurs RXRs dans l'induction de la transcription de la transglutaminase par les rétinoïdes (Davies *et al.*, 1992). L'idée est donc que les composés 7 et 8 ne pourraient ni se lier aux RXRs contrairement à l'acide rétinoïque qui est isomérisé en 9 cis dans les cellules, ni interagir avec la pKC. L'intervention des deux hypothèses à la fois, est également possible. Cet exemple montre bien la difficulté d'établir une corrélation entre les différents modèles d'étude.

Composés	Activité de la transglutaminase HL 60 (EC50, nM)
AR	95,6
Ch55	2,4
1	3,2
7	I
8	I

EC 50 : Concentration efficace 50%

I : Inactif (EC 50 > 10⁻⁵M)

Tableau 16 : Effets de l'acide rétinoïque tout trans ,de Ch55 et des composés triphényléthyléniques sur l'activité de la transglutaminase de tissu dans les cellules HL 60

4.2.4 Conclusion

Cette étude sur des réponses biologiques nous aura permis de mettre en avant plusieurs points. D'une part nous avons pu confirmer certains résultats obtenus sur les récepteurs recombinants à savoir que l'introduction d'un groupement hydroxyle proche du carboxyle terminal (composé 1), n'interfère pas sur l'activité des rétinoïdes. D'autre part l'introduction d'un groupement phenylalkyloxy, d'encombrement stérique important (composés 4, 5, 6) inhibe toute activité de ces molécules.

Enfin, elles introduisent un doute quant à l'activité biologique des composés triphényléthyléniques.

Partie II

Etude du contrôle de l'expression de la transglutaminase de tissu par les rétinoïdes et les glucocorticoïdes

Au cours de notre étude sur l'activité biologique des rétinoïdes originaux, nous avons été amenée à collaborer avec le D. Manechez qui travaillait alors à l'étude du contrôle de la transglutaminase de tissu dans les cellules HL 60 et HEL.

1 - RESULTATS ACQUIS PRECEDEMMENT

La dexaméthasone, puissant agoniste de la famille des glucocorticoïdes, inhibe l'activité de la transglutaminase de tissu induite par l'acide rétinoïque dans les cellules HL 60. Le taux d'inhibition varie de 50 à 70%. Cependant, administrée seule, elle n'a aucun effet ni sur la différenciation ni sur l'expression de l'enzyme dans les cellules. Le taux d'inhibition varie de 50 à 70%.

Par ailleurs, un antagoniste des glucocorticoïdes, le RU486, inverse les effets inhibiteurs de la dexaméthasone pour des concentrations équivalentes. Ces résultats ont été montrés au niveau de l'activité de l'enzyme et au niveau de son expression par la technique de Western blot. Paradoxalement aucun effet inhibiteur n'a cependant été observé dans une lignée leucémique, la lignée HEL dans laquelle l'acide rétinoïque induit aussi la transglutaminase.

Le récepteur des glucocorticoïdes a alors été caractérisé dans ces deux lignées cellulaires. Dans les cellules HL 60, un transcrite de 5,4 Kb a été détecté alors que dans les cellules HEL deux transcrits respectivement de 5,0 Kb et 2,1 Kb ont été mis en évidence. Au niveau protéique, la protéine de 94 KDa a été détectée à la fois dans les cellules HL 60, HEL, et dans les extraits de cytosol de foie de rat, un tissu de référence connu pour être riche en récepteur. Nous avons alors essayé de disséquer les mécanismes qui sous-tendent la régulation différente de la transglutaminase.

Il était logique que nous nous intéressions en premier au récepteur des glucocorticoïdes dans la lignée HEL cellulaire, afin d'examiner l'hypothèse d'une mutation ponctuelle qui entraverait l'activité biologique du récepteur. Or, P.M. Danzé au laboratoire, a montré que le récepteur des glucocorticoïdes dans ses cellules ne liait pas la dexaméthasone, par la technique de Scatchard *in vivo*. Nous sommes alors intervenu, afin de montrer si le récepteur était fonctionnel au niveau de son activité transactivatrice.

2 - RESULTATS PERSONNELS ET INTERPRETATION

Pour vérifier le caractère fonctionnel du récepteur, nous avons mesuré sa capacité à transactiver un gène sous l'effet d'un agoniste puissant des glucocorticoïdes : la dexaméthasone.

Pour cela, nous avons utilisé la technique de transfection transitoire. Les cellules HEL et HL 60 sont des cellules cultivées en suspension, nous avons donc utilisé la méthode d'électroporation. La première étape a consisté à mettre au point les conditions expérimentales de l'électroporation dans les cellules HL 60 et HEL en suspension. Cette technique consiste à placer les cellules en suspension sous l'effet d'un choc électrique, ce qui déstabilise la membrane plasmique et permet aux plasmides de pénétrer dans les cellules. La mise au point des conditions expérimentales a été réalisée à l'aide d'un gène indicateur exprimant la β -galactosidase. Cette étape est particulièrement délicate, en effet elle dépend de plusieurs paramètres intrinsèques à la technique (durée et nombre des chocs électriques, intensité ...) mais surtout les conditions expérimentales varient en fonction de la nature des cellules et du nombre de passage de ces cellules.

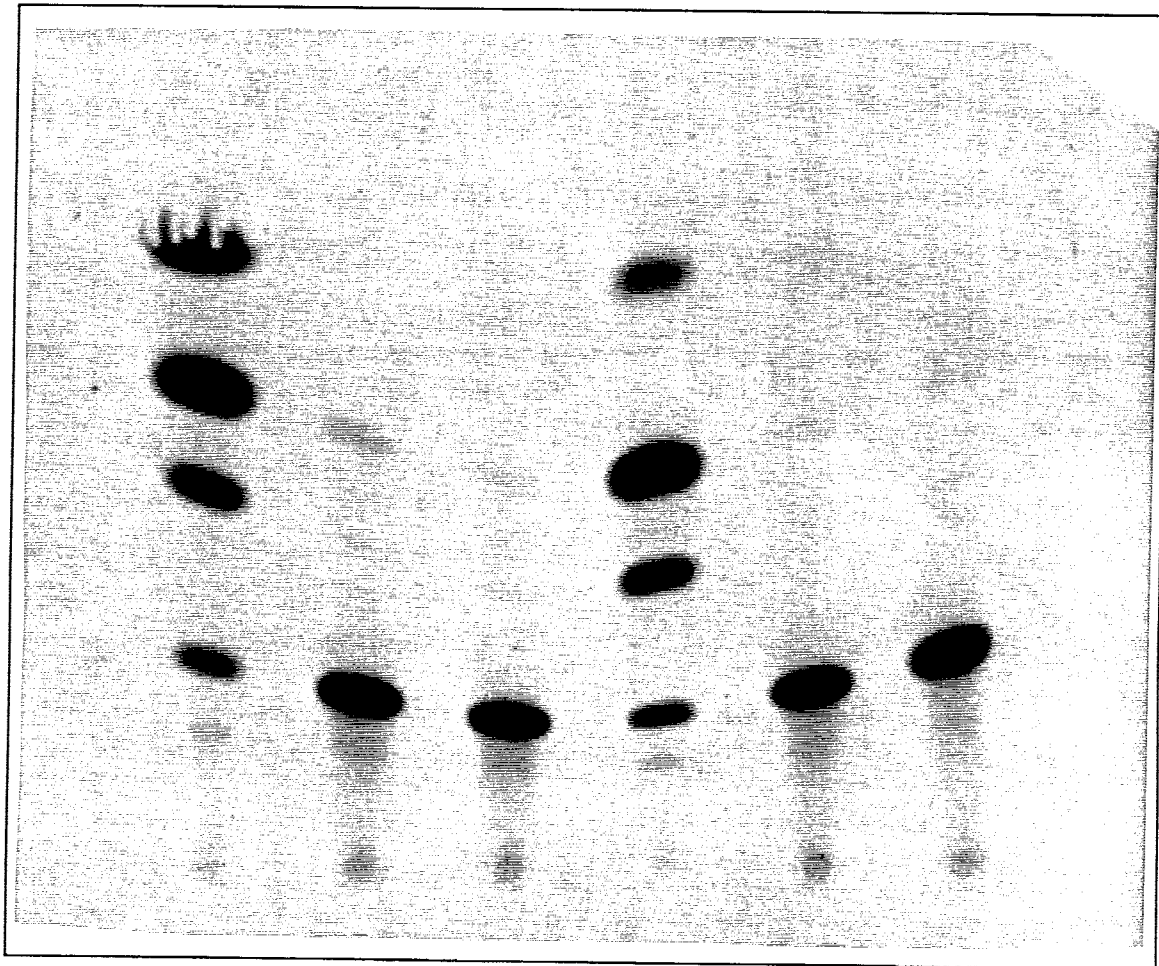
Nous avons pu alors étudier l'activité transactivatrice du récepteur des glucocorticoïdes dans les cellules HL 60 et HEL. Pour cela nous avons utilisé un vecteur d'expression du gène de la Chloramphenicol Acyl Transférase. Suivant le même principe que celui décrit précédemment, le niveau d'induction de la CAT va refléter l'activité intrinsèque du récepteur.

En pratique, le dosage de la CAT est légèrement différent de celui décrit précédemment, nous avons utilisé la méthode de base qui permet de visualiser l'activité CAT par autoradiographie. Le principe est le suivant:

L'acylation du chloramphénicol est effectuée par l'acétylcoenzyme A. Les formes acétylées du chloramphénicol sont séparées par chromatographie sur couche mince.

Nous avons cotransfecté un vecteur d'expression de la CAT, dans lequel l'enzyme est placée sous le contrôle d'un élément de réponse du récepteur des glucocorticoïdes : MMTV (MMTV-Cat). Après incubation des cellules transfectées avec de la dexaméthasone, le récepteur endogène des cellules HEL n'induit pas l'expression du gène CAT (Figure 37), contrairement à celui des cellules HL 60 (Figure 38). Ceci confirme bien que le récepteur présente des anomalies dans les cellules HEL; la réponse CAT est par ailleurs restaurée, après introduction d'un vecteur d'expression du récepteur des glucocorticoïdes (pSRV CAT) dans les cellules HEL.

Il est à noter alors que cette réponse est nettement supérieure à celle du récepteur endogène des cellules HL 60. Cela semble a priori logique, si on tient compte du fait que le récepteur transfecté est présent à des taux 30 à 100 fois supérieurs au récepteur endogène.



T
pSV₂ CAT
1
MMTV CAT
+DEX
2
-DEX
3
PRSVGR
MMTV CAT
+DEX
4
-DEX
5
NT

Les cellules HEL sont transfectées transitoirement par 50µg d'ADN plasmidique. Après 48h, l'expression du gène CAT est dosée.

T : Témoin positif de la transfection

1 : Cellules transfectées par le plasmide indicateur MMTV-CAT en présence de dexaméthasone

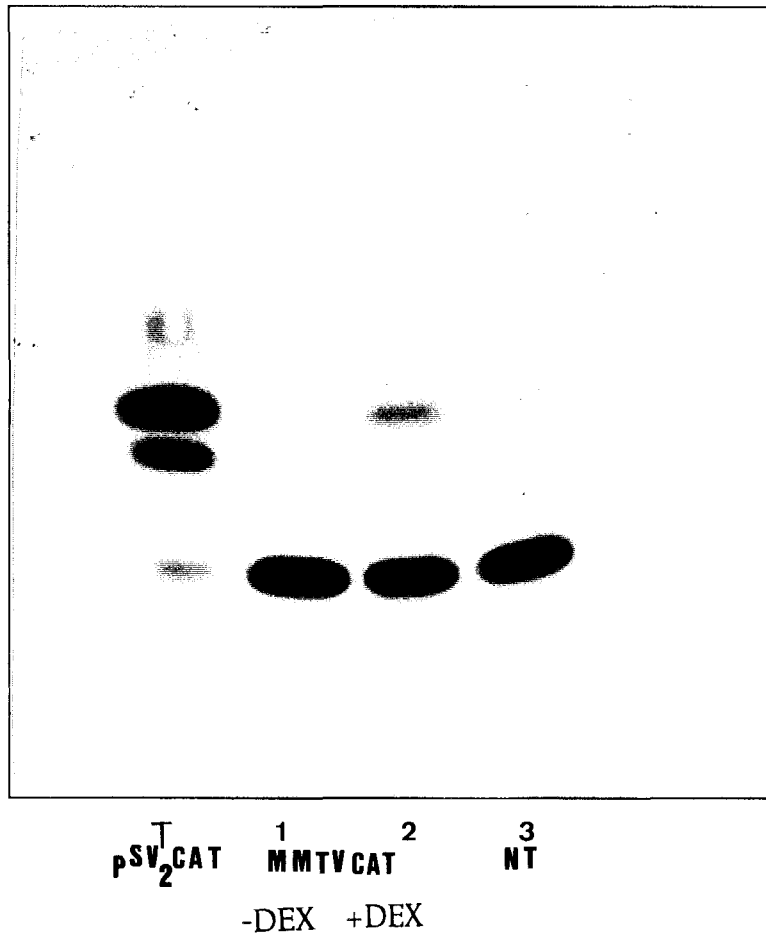
2 : Cellules transfectées par le plasmide indicateur MMTV-CAT en absence de dexaméthasone.

3 : Cellules transfectées par le plasmide d'expression du récepteur aux glucocorticoïdes et par le plasmide indicateur MMTV-CAT en présence de dexaméthasone.

4 : Cellules transfectées par le plasmide d'expression du récepteur aux glucocorticoïdes et par le plasmide indicateur MMTV-CAT en absence de dexaméthasone.

5 : Témoin négatif, cellules non transfectées.

Figure 37 : Activité transactivatrice du récepteur des glucocorticoïdes dans les cellules HEL.



Les cellules HL 60 sont transfectées transitoirement par 50µg d'ADN plasmidique. Après 48h, l'expression du gène CAT est dosée.

T : Témoin positif de la transfection

1 : Cellules transfectées par le plasmide indicateur MMTV-CAT en absence de dexaméthasone

2 : Cellules transfectées par le plasmide indicateur MMTV-CAT en présence de dexaméthasone.

3 : Témoin négatif, cellules non transfectées.

Figure 38 : Activité transactivatrice du récepteur des glucocorticoïdes dans les cellules HL.60

3) CONCLUSION

Les effets antagonistes des rétinoïdes et des glucocorticoïdes ont déjà été décrits pour de nombreux effets biologiques, comme lors de la différenciation des cellules de macrophages néoplasiques (Goldman *et al.*, 1985) ou de carcinomes humains (Violette *et al.*, 1989). Cet effet a également été mis en évidence sur l'expression de nombreux gènes, notamment pour les gènes de la phosphatase alcaline, de l'interleukine I de l'ostéocalcine, et de la CRBP (Rush, 1991.).

Les mécanismes transcriptionnels qui sous-tendent cet antagonisme, commencent seulement à être élucidés, trois mécanismes sont actuellement proposés. Le premier est basé sur une interaction protéine-protéine avec le facteur jun/fos (Habener, 1990). Le deuxième utilise un élément de réponse aux glucocorticoïdes négatif (Diamond, 1990 et Sakai, 1988). Le troisième met en jeu un élément de réponse composite du récepteur des glucocorticoïdes et d'autres facteurs de transcription comme dans le cas du gène de l'ostéocalcine que nous avons décrit lors de la revue générale (Akerblom *et al.*, 1988).

Ce travail apporte un nouvel exemple des effets antagonistes entre les récepteurs des glucocorticoïdes et des rétinoïdes. L'étude du mécanisme de cette inhibition peut être étudiée au laboratoire. Des expériences visant à apporter la preuve directe du mécanisme transcriptionnel de cette régulation sont en cours au laboratoire. Ainsi, l'étude de la transcription du gène de la transglutaminase dans des noyaux isolés de cellules traitées ou non traitées sont actuellement en cours. Par la suite le séquençage des séquences en amont, comprenant le promoteur de ce gène, permettrait d'étayer un mécanisme d'action transcriptionnel.

La réponse différentielle aux glucocorticoïdes mérite d'être approfondie. Nous devons vérifier que l'inhibition par la dexaméthasone dans les cellules HEL, est restaurée après l'introduction du récepteur des glucocorticoïdes recombinant. Nous avons montré qu'elle mettait en jeu une anomalie du récepteur des cellules HEL, vraisemblablement une mutation ponctuelle où une délétion au niveau du domaine de liaison au ligand. L'exploration d'une éventuelle mutation est actuellement en cours, par des expériences de RT-PCR sur le domaine E du récepteur des glucocorticoïdes des cellules HEL. Les ARNm des cellules HEL sont donc rétro-transcrits et analysés par PCR.

CONCLUSION

Les rétinoïdes sont des molécules très prometteuses dans le domaine thérapeutique, en particulier en cancérologie. Ils sont à la base du premier traitement différenciateur ayant été avec succès dans cette pathologie. La conception rationnelle de nouveaux rétinoïdes moins toxiques nécessite d'étudier les relations structure-activité de ces molécules. Pour cela, il est nécessaire de disposer de molécules permettant d'explorer leur activité à plusieurs niveaux, moléculaires et cellulaires.

L'étude de l'activité de liaison au récepteur et d'activités biologiques la capacité transactivatrice, la différenciation des cellules HL 60 et l'induction de la transglutaminase de tissu ont permis d'atteindre certains de ces objectifs.

L'étude des relations structure-activité sur une dizaine de composés originaux a été explorée. Parmi ces molécules, dans la série chalcone, le composé 1 présente une bonne activité dans les réponses biologiques des cellules transfectées et des modèles de différenciation cellulaire HL 60, malgré une affinité relativement modeste (K_D variant de 0,25 à $0,7 \times 10^{-6} M$).

Dans la série triphényléthylénique, nous avons obtenu des composés à activité agoniste sélective des récepteurs α et β à la fois au niveau de l'activité de liaison et de l'activité transactivatrice. Nous avons obtenu un composé à activité antagoniste apparemment spécifique des récepteurs γ . Cette activité antagoniste est très modeste, mais néanmoins significative. Malheureusement, dans les modèles HL 60, les composés triphényléthyléniques (7 et 8) se révèlent totalement inactifs aussi bien dans l'induction de la transglutaminase, que dans celle de la différenciation. Cette étude doit donc être complétée par l'exploration de ces composés dans d'autres modèles cellulaires, par exemple l'induction de l'activateur du plasminogène dans les cellules F9 de tératocarcinome. L'activité antagoniste plus spécifique de RAR γ doit être étudiée dans des modèles mieux adaptés ; la différenciation des kératinocytes de souris où l'inhibition de la transglutaminase épidermique pourra être étudiée.

Un point est particulièrement intéressant, c'est la discordance pour Ch55 et certains de nos dérivés 1, 7, 8, entre l'activité de liaison aux récepteurs et la capacité de transactiver les gènes indicateurs. Cette discordance peut être étudiée à différents niveaux.

D'une part, la piste de la formation d'un hétérodimère doit être poursuivie par des expériences de transfection.

D'autre part, la formation d'éventuels métabolites plus actifs pourrait être mise en évidence par fractionnement chromatographique et un isolement de métabolites. L'étude par HPLC de différents extraits après incubation avec le composé Ch55 peut être entreprise. Les différents profils d'élution seront comparés à celui de Ch55 seul. Ceci nécessite de disposer de Ch55 radiomarqué.

La conception de nouveaux dérivés dans la série prometteuse des dérivés triphényléthylènes sera entreprise.

A coté, nous avons participé à l'étude du contrôle de la transglutaminase de tissu par les rétinoïdes et les glucocorticoïdes dans deux lignées leucémiques HL 60 et HEL. Nous avons montré que la répression par les glucocorticoïdes nécessite un récepteur fonctionnel. De telles interactions, entre le glucocorticoïdes sont par ailleurs connues sur d'autres réponses biologiques et pourraient donc être prises en considération lors de l'élaboration de protocoles thérapeutiques anti-cancéreux.

Un certain nombre de résultats ont été présentés et les perspectives énoncées constituent une base pour la conception de nouvelles molécules.

Appendice technique

I CONSTRUCTION DES VECTEURS D'EXPRESSION

Matériel

- Plasmide pHK1 : il nous a été fourni par le groupe de R. Evans.

La séquence codante de l'ADNc de hRAR α est insérée dans un plasmide de type pHC624.

L'origine de réplication pBR322 permet l'amplification plasmidique dans les bactéries. Le gène de résistance à l'ampicilline permet de sélectionner les bactéries transformées par le plasmide.

- Plasmide pCod 20 : il nous a été fourni par le groupe de P. Tiollais. Il est issu du plasmide pTZ18. Son site de clonage, inclus dans le gène "lac Z" est le polylinker du plasmide pUC18. C'est dans ce site qu'est inséré l'ADNc de RAR β (hap) de 1,4 kb (Brand *et al.*, 1988).

- Oligonucléotide de synthèse de 10 mers dont la séquence palindromique 5'pAAGCTTAGCT3'OH permet la transformation du site de restriction Sac I en Hind III et sa propre dimérisation (Eurogentec, Liège).

- Oligonucléotide de synthèse de 10 mers 5'pGATCGAATTC3'OH permettant la transformation du site de restriction BglII en Eco RI.

- Plasmide pSVM dhfr (Lee *et al.*, 1981)

Il nous a été fourni par le laboratoire de J.C D'Halluin (INSERM U 233). C'est un vecteur d'expression eucaryote.

Il contient, outre l'origine de réplication de pBR322 et le gène de résistance à l'ampicilline, l'origine de réplication du virus simien SV40 qui permet aux séquences virales ou eucaryotes de se répliquer dans une cellule hôte eucaryote. Il exprime également le gène de résistance à la dihydrofolate réductase (dhfr) sous le contrôle du promoteur précoce du virus SV40 et du LTR du Virus Mammotrope de souris (MMTV) qui confère l'inductibilité de la transcription par les glucocorticoïdes.

Bactéries : *E. coli* type HB101, de phénotype sensible à l'ampicilline.

Réactifs et milieux de culture

Milieu de culture bactérien LB ampicilline :

Tryptone: 15,00g pH7,4
NaCl : 7,50g
NaOH 10 N : 0,3ml
H₂O qsp : 1l
50µg/ml d'ampicilline

Milieu LB gélosé :

LB 500ml
Bacto-agar 7,5g

Milieu 2XTY :

Tryptone : 10,00g pH7,4
Extrait de levure 5,00g
NaCl 5,00g
H₂O qsp 1l

Enzymes de restriction : Hind III, Bam H I, Sac I, Bgl II et leur tampons respectifs (Boehringer Mannheim).

T4 DNA ligase (Biolabs).

Matériel

Concentrateur RC 10.22 Jouan

Spectrophotomètre Perkin-Elmer 5515 (UV-Visible)

Mode opératoire

1) Amplification plasmidique

a) Transformation des bactéries (Sambrook *et al.*, 1990)

La croissance des bactéries HB 101, 1ml dans 30ml de milieu LB ampicilline se poursuit jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,5 à 0,7 à DO 580 nm. Cette dernière correspond à la phase exponentielle de croissance des bactéries soit environ $2,5 \cdot 10^8$ bactéries par ml.

Préparation des bactéries compétentes

Les bactéries sont sédimentées à 3000 tour/min pendant 15 min à 4°C. Les étapes suivantes s'effectuent dans la glace. Le culot bactérien est remis en suspension par 20ml de CaCl_2 0,1M. Après 10 min, le mélange est de nouveau sédimenté à 3000 tours/min pendant 10 min à 4°C. L'opération est renouvelée encore une fois, ensuite le culot bactérien est repris par 0,75 ml de CaCl_2 0,1 M.

Transformation des bactéries compétentes

20ng de plasmide sont mis en contact avec 200 μ l de bactéries compétentes. Après incubation pendant 20 min à 0°C, on effectue 5 chocs thermiques pendant 30 secondes à 0°C et à 37°C. Les bactéries sont incubées de nouveau pendant 30 secondes à 0°C pendant 20 min puis ajoutées à 1,4 ml de milieu 2 XTY.

La croissance des bactéries se poursuit à 37°C pendant 45 min puis elles sont étalées sur boîte de pétri LB Bacto Agar ampicilline. La sélection des bactéries se fait après une nuit d'incubation à 37°C. Les bactéries ayant acquis une résistance à l'ampicilline sont isolées et repiquées.

b) Préculture et culture des bactéries

La préculture s'effectue à partir de 1ml de bactéries transformées et décongelées ou un isolat de clones bactériens dans 100 ml de milieu LB ampicilline. Après 3 ou 4 heures lorsque la densité optique du milieu atteint 0,5 à 0,7 à DO 580nm, 170 μ l de chloramphénicol (34 μ l/ml dans de l'éthanol) sont ajoutés. Il inhibe la prolifération bactérienne et augmente ainsi la réplication plasmidique. Après une nuit sous forte agitation à 37°C, la culture est centrifugée à 3000 tours/min pendant 20 min à 4°C, le culot bactérien est alors récupéré.

2) Extraction-purification de l'ADN plasmidique

Mini préparation d'ADN : méthode de lyse alcaline

10ml du milieu de culture sont sédimentés à 8000 tours/min pendant 10 min à 4°C. Le culot est alors resuspendu dans 100µl de tampon de lyse froid (25mM Tris-HCl ; 10 mM EDTA ; 50 mM glucose). Après 5min à température ambiante, 200 µl d'une solution NaOH 2 N , SDS 1% sont ajoutés. Les bactéries sont alors mélangées vigoureusement par inversion du tube (et non par agitation mécanique). Après avoir laissé les bactéries 5 min dans de la glace, on ajoute 150 µl d'une solution d'acétate de potassium froid pH 4,8 (60ml d'acétate de potassium 5 M, 11,5 ml d'acide acétique, 28,5ml d'eau). Les bactéries sont de nouveau mélangées par inversion puis laissées au repos pendant 5min dans de la glace. Les bactéries sont ensuite sédimentées à 12 000 tour/min pendant 10 min puis transférées dans un tube propre. On procède alors à une extraction par 200 µl de phénol saturé et 200µl de chloroforme : alcool isoamylique (24/1). Après agitation et centrifugation, la phase supérieure est récupérée puis réextraite par 400µl de chloroforme : alcool isoamylique (24/1). L'ADN est ensuite obtenu après précipitation par 1 ml d'éthanol froid pendant 30 min à -20°C. Le précipité est sédimenté à 12 000 tours/min pendant 15 min. Le culot est ensuite rincé par de l'éthanol froid à 70%, de nouveau sédimenté à 12 000 tour/min 5 min, puis séché sous vide. Le culot est repris par 50 µl d'eau auquel on ajoute 1 µl de RNase (10mg dans de l'eau). La réaction enzymatique est poursuivie 10 min à 37°C. Les clones sont ensuite analysés par l'établissement d'une carte de restriction.

Maxi préparation

Après culture et amplification des bactéries contenant le plasmide à sélectionner, nous avons utilisé une technique de purification d'ADN qui utilise la lyse alcaline. Cette technique dérivée de celle de Birboin et Doly est utilisée à l'aide du kit "Maxi-Quiagen" (Diagen). Ce kit permet de préparer de 300 à 500µg de plasmide à partir de 400 ml de culture.

3) Digestions enzymatiques et ligations

a) Digestions enzymatiques

Une aliquote d'ADN plasmidique est dissoute dans un tampon de digestion 10X. La réaction s'effectue en présence d'une unité d'enzyme par microgramme de plasmide. On

complète avec de l'eau stérile pour obtenir un tampon 1X. La digestion se déroule à 37°C pendant 1h.

SacI : 3µg de plasmide sont digérés dans un tampon A 10X (Tris-acétate 33mM, acétate de magnésium 10mM, acétate de potassium 60 mM, dithiothréitol 0,5 mM).

Bam HI-Hind III : 30µg de plasmide sont digérés dans un tampon B 10 X (Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 5mM, NaCl 100 mM, 2-mercaptoéthanol 1mM).

Bgl II-Hind III : 3µg de plasmide sont dissous dans un tampon M 10 X (Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM). La digestion est effectuée par 3U de BglII pendant 1h30. Les sels sont ensuite éliminés par dialyse sur membrane millipore, type VS 0,025 µM. La digestion par Hind III peut être alors effectuée.

Eco RI : 30 µg de plasmide sont digérés dans un tampon M 10 X (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10mM, DTE 100mM, DTT 1mM).

b) Ligation

Principe : La T4 DNA ligase catalyse la formation de ponts phosphodiester entre des extrémités d'ADN 3' et 5'P adjacentes.

On incube le plasmide en présence d'un taux molaire d'insert 20 fois supérieur (oligonucléotide de synthèse phosphorylé et dimérisé par chauffage 30 min à 60°C ou la séquence d'ADNc). Le tampon de ligation 10 X (Tris-Hcl 500 mM, MgCl₂ 10 mM, 500µg/ml de sérum albumine bovine) est complété par 2 U de ligase par µg de plasmide et ajusté à 1 X par de l'eau stérile. La réaction enzymatique se déroule à 10°C pendant 16 h. La ligase est inhibée par chauffage à 65°C pendant 30 min. La solution est ensuite dialysée sur membrane millipore type VS 0,025µm.

Un contrôle est réalisé par digestion enzymatique et électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%.

II PRODUCTION DES PROTEINES RECOMBINANTES

1) Les récepteurs recombinants procaryotes

Réactifs

IPTG (Sigma)

Matériels

Sonicateur : Vibra cells (sonics et materials).

Mode opératoire

Culture bactérienne et expression de la protéine dans le système d'expression PET3

Une préculture d'une nuit (100 ml) est diluée dans 400ml de milieu LB ampicilline de façon à obtenir une DO_{580nm} de 0,2. Lorsque la culture atteint une DO comprise entre 0,8 et 1, l'induction par l'IPTG (0,2mM) est réalisée. La culture se poursuit 3h, le milieu de culture est éliminé par sédimentation 4000 tours/min à 4°C, pendant 45min. Le culot, placé dans la glace, est repris par 2 volumes de tampon Tris-HCl 50mM pH 8,00, EDTA 10mM, saccharose 10%, contenant un cocktail d'anti-protéases PMSF 10mM, leupeptine 20mM et aprotinine 20µg/ml. Après 20 min de contact, les bactéries sont lysées par addition de 10 mg de lysosyme et 45min plus tard de Triton-X 100 à la concentration finale de 1%. La réaction se poursuit 15min, la lyse est alors complétée par 3 chocs ultrasoniques de 15 secondes chacun. Les protéines solubles sont séparées des débris bactériens par sédimentation à 19 000 tours/min pendant 2h.

2) Les récepteurs recombinants eucaryotes

a) Le système d'expression Baculovirus

Culture cellulaire et infection virale

Les cellules SF9 cultivées en monocouche dans un milieu SF900 additionné extemporanément de 5% de sérum de veau, de 50µg/ml de gentamicine et de 2,5µg/ml

d'amphotéricine B. Elles sont incubées à 27°C dans une atmosphère sèche et sans apport de CO₂. Pour l'infection, les cellules sont placées dans un flacon en verre de 10 litres, contenant 1 litre de milieu additionné de 0,1% de pluronic 68 et agitées par un barreau magnétique à 150 tour/min. Elles sont alors cultivées en suspension. Lorsque la concentration atteint 2.10⁶ cellules/ml, les cellules sont centrifugées 900 tours/min et concentrées à 10⁷ cellules par ml. Elles sont alors incubées pendant une heure avec une aliquote de suspension du virus recombinant à une concentration de 10⁶-10⁷ virus/ml. La concentration cellulaire est ensuite ajustée à 2.10⁶ cellules par ml et l'infection est maintenue pendant 48 à 68 heures.

Préparation des extraits nucléaires contenant le récepteur recombinant

Les cellules sont récupérées par centrifugation à 1500 tours/min et lavées 3 fois par du PBS. Elles sont ensuite incubées 30 mn à 0°C avec du tampon Tris 10mM pH 8, KCl 10mM, DTT 1mM, glycérol 10% en présence d'un cocktail d'antiprotéases. Les cellules subissent alors une homogénéisation douce au Potter, puis elles sont centrifugées à 3500 tours/min pendant 20mn. Le culot contenant les noyaux est repris par 20ml de tampon Tris 10mM pH 8, KCl 0,6M, DTT 1mM, glycérol 10% et incubé 30 min à 0°C. Il est ensuite homogénéisé au Dounce par 20 aller-retours. L'homogénat est ultracentrifugé 30 min à 45000 tours/min, le surnageant est alors récupéré.

b) Les cellules Cos transfectées

Matériel

Plasmides d'expression : pRSV GR (expression du récepteur des glucocorticoïdes). Il nous a été fourni par le groupe de R. Evans

pSVm RAR (expression des récepteurs de l'acide rétinoïque)

Réactifs

Tampon HEPES 2,5X pH 7,05 : NaCl 8,2g, acide HEPES 5,9g, Na₂ HPO₄ 0,1g, H₂O qsp 50ml.

Culture cellulaire et transfection transitoire

a) préparation des cellules

Les cellules Cos sont cultivées en monocouches dans le milieu minimum essentiel d'eagle modifié par Dulbecco (DMEM), supplémenté par 10% de sérum de veau foétal (décomplémenté par chauffage 30 min à 56°C), de la pénicilline 100UI/ml et de la streptomycine 50UI/ml, des acides aminés non essentiels à 1% (v/v) de la L-glutamine (2mM final). Elles sont incubées dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

La veille de la transfection les cellules sontensemencées à 50% de confluence dans des boîtes de pétri (diamètre 10cm).

b) Conditions de la transfection

Après 24h les cellules sont transfectées par la technique au chlorure de calcium. Dans un premier temps le milieu des cellules est changé 4h avant la transfection, puis, on ajoute 500 µl d'une solution contenant l'ADN à transfecter. Cette solution comprend 10µg de vecteur d'expression pSVm RAR, 10µg de vecteur d'expression pRSV GR 500µl de tampon HEPES 2X, 50µl de CaCl₂ 2,5X. Les cellules sont incubées 16h puis lavées trois fois par une solution de DMEM (sans supplémentation). Les cellules sont alors incubées avec de la dexaméthasone à la concentration finale de 10⁻⁶ M.

Il est à noter que l'ADN plasmidique préparé à l'aide du kit Quiagen est réextrait par du phénol/chloroforme (paragraphe 1).

Préparation des extraits nucléaires contenant le récepteur recombinant

Les cellules sont lavées par du PBS 1X et récupérées par grattage. Après sédimentation 4 mn à 1500 tours/min. Le récepteur recombinant est récupéré suivant le protocole décrit précédemment pour le système d'expression Baculovirus.

III MESURE DE L'ACTIVITE DE LIAISON

Réactifs

DCC : 1,5g de charbon activé norit dans le tampon ; Tris 10mM, KCl 10mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, pH 8, 150mg de dextran ; (³H) AR.

Mode opératoire

1) Scatchards

Les extraits cellulaires (nucléaires) SF 9, Cos, ou bactériens (totaux) sont dilués respectivement au 1/20 ième, 1/2 ou au 1/30 ième dans du tampon B. Dans un tube à hémolyse, on évapore, sous azote, la solution d'acide rétinoïque tritié de concentration croissante de 1nM à 40nM (Amersham 40Ci/mmol) dissoute dans de l'éthanol, de manière à ne pas diluer les extraits dosés. Une incubation analogue est réalisée en présence d'un excès 100 d'acide rétinoïque froid. 500µl d'extrait sont alors introduits. Les incubations sont réalisées en double pendant 2 h à 0°C. La radioactivité liée est mesurée par la technique de charbon dextran (DDC). A la fin de l'incubation, 100µl de suspension de charbon sont ajoutés à 200µl de chaque extrait. Chaque incubat est traité en double. Après 10 seconde au vortex et 15 min de contact, les tubes sont centrifugés 3 min à 3000 tours/min. Des aliquotes de 150µl sont alors prélevées et placées dans des tubes de comptage. On ajoute alors 5ml de liquide scintillant, le comptage est effectué dans un compteur β.

$\text{Concentration (pmol : ml)} = \frac{\text{cpm (T)} - \text{cpm (B)} \times \text{dilution de départ} \times \text{dilution DCC} \times 1000}{\text{Act. Spé} \times \text{volume compté}}$
--

2) Compétitions

Le principe est le suivant : les extraits nucléaires sont incubées en présence d'une quantité fixe d'acide rétinoïque tritié en (20nM) et croissantes de ligand compétiteur froid de 2,5 à 10 000 fois en excès. Toutes ces expériences sont réalisées en double dans au moins 4 expériences indépendantes.

Les incubations et l'élimination de l'excès de ligand sont réalisées dans les mêmes conditions que précédemment. La compétition est mesurée par rapport à un témoin incubé en absence de compétiteur. Elle est exprimée en pourcentage de liaison et IC 50% est déterminée graphiquement.

3) Dosage des protéines

Réactifs

Réactif de coomassie : Bleu de Coomassie G 250 15 mg, Alcool absolu 4,7ml, H₃PO₄ 85% 10ml, H₂O : qsp 100ml, filtrer sur papier whatman 3 MM ; prise de l'échantillon dilué au 1/20ème : 135µl ; volume de réactif colorant : 2565µl.

Mode opératoire

Après avoir mélangé les deux réactifs, on laisse 5 mn à température ambiante puis on lit la densité optique contre un blanc à 595 nm (Gamme serumalbumine bovine de 5 à 200 µg/ml).

IV MESURE DE L'ACTIVITE TRANSACTIVATRICE

1) Cotransfection

Matériel

Plasmides d'expression : pSG5 RARs (expression des récepteurs de l'acide rétinoïque)

Plasmide indicateur : TRE_{2pal}-TK-CAT (P. Lefebvre)

Réactifs

Tampon HEPES 2,5X pH 7,05 : NaCl 8,2g, Acide HEPES Na₂ HPO₄ 0,1g, H₂O qsp 50 ml.

Mode opératoire

a) Préparation des cellules

La veille de la transfection les cellules sontensemencées à 20 000 cellules par puits dans des plaques à 6 puits. Après 24h les cellules sont transfectées par la technique au chlorure de calcium.

b) Condition de la transfection

Dans un premier temps le milieu des cellules est changé 4h avant la transfection, puis 200 µl d'une solution contenant l'ADN à transfecter sont ajoutés. Cette solution comprend 2µg de pCH110, pharmacia (contrôle β-galactosidase), 2µg du plasmide indicateur TRE_{2pal}-TK-CAT 2 µg des vecteur d'expression pSG5 RAR, 100µl de tampon hepes 2 X, 100mM de CaCl₂. La quantité d'ADN est portée à 20µg par de l'ADN "carrier" de sperme de saumon, H₂O qsp 200 µl. Les cellules sont incubées 16h et traitées par les différents rétinoïdes. Des quantités croissantes de rétinoïdes testés sont utilisées pour mesurer l'activité agoniste, les mêmes quantités sont mises en compétition contre des agonistes puissants, pour mesurer l'activité antagoniste.

2) Dosage de l'activité CAT (Seed *et al.*, 1988)

Réactifs

Chloramphénicol (^{14}C) 55 à 60 μCi (Amersham)

Butyryl Coenzyme A 25mg (Sigma)

Xylène (O+P+M, Merck)

Mode opératoire

Le principe du dosage est le suivant : L'enzyme bactérienne catalyse le transfert d'un groupement acyle sur les groupements OH du chloramphénicol marqué au carbone 14.

48 h après la transfection les cellules sont lavées avec du PBS 1X trois fois ,puis sédimentées pendant 5 min à 4°C. Chaque culot est alors repris dans 100 μl de Tris-HCl 0,25M pH 7,6. On réalise alors trois chocs thermique de 10 min de -70°C à +37°C pour lyser les membranes cellulaires, puis 50 μl d'extraits sont ajoutés à une solution comprenant:

10 μl de chloramphénicol (C^{14})(0,01 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)

5 μl de butyrylCoA (5 $\mu\text{l}/\text{ml}$)

5 μl de Tris-HCl 2M pH 8

20 μl d' H_2O

La réaction d'acylation s'effectue pendant 1h30 à 37°C. Le chloramphénicol acylé est ensuite extrait par 200 μl de xylène une première fois. La forme acylée plus hydrophobe est récupérée dans la phase organique puis réextraite par de l'eau de manière à éliminer la majeure partie du chloramphénicol non acylé. La phase organique est transférée dans des tubes de comptage et la radioactivité est alors dosée. Les dosages sont réalisés en triple dans au moins trois expériences indépendantes.

Les EC50 sont calculées par rapport à l'induction par l'acide rétinoïque 10^{-7}M .

3) dosage de l'activité β -galactosidase

Réactifs

ONPG : 3mg (Sigma)

Mode opératoire

20 μ l d'extraits préparés suivant le protocole précédent sont incubés en présence de 58 μ l d'une solution ONPG (4 mg ONPG, 6mM de Na_2HPO_4 , 60mM de NaH_2PO_4) pendant 30min. La réaction est arrêtée à l'aide de 58 μ l de Na_2CO_3 (1 M).

Calcul

L'efficacité de la transfection est mesurée par la différence des densités optiques obtenues à 420 et 600 nm ;

$$1 \text{ unité} = \frac{\text{DO } 420 - \text{DO } 600}{\text{Temps de réaction (min)} \times 3,5}$$

V/ ETUDES BIOLOGIQUES

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 un milieu RPMI 1640 additionné de 15% de sérum de veau foetal décomplémenté, de 4nM de L-glutamine, de 100 UI/ml de péniciline et de 100µg/ml de streptomycine. Le milieu doit être renouvelé tous les 2 jours dès que les cellules atteignent la confluence maximale 10^6 cellules par ml. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂ (10 cellules/ml).

2) Dosage de la transglutaminase

Réactifs :

Putrescine tritiée (25-35 mCi/ml) : Amersham

Caséine : Sigma

Papier Wathman 3MM

Mode opératoire

a) Incubation

Les cellules HL 60 ($5 \cdot 10^5$ cellules par ml) sont traitées pendant 48 heures avec des concentrations variables de rétinoïdes dans 10 ml de milieu défini constitué de RPMI 1640 auquel on ajoute 5 µg/ml d'insuline et 5ng/ml de Sélénium.

Puis les cellules sont lavées dans du tampon TBS (20mM Tris-HCl, pH 7,5, 150mM NaCl) par centrifugation à 1 200 tours/min pendant 10 min.

b) Dosage

Les cellules sont alors lysées par 150µl d'une solution TET (20mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100). Après sédimentation, 10 mn à 16 000 tours/min, le surnageant est récupéré et 50µl de lysat sont incubés à 30°C pendant 20mn avec 50µl d'une solution contenant : 20nM Tris-HCl, pH 7,5, 5nM CaCl₂, 15nM β-mercaptoéthanol, 2mg N,N'- diméthylcaséine/ml, 2µCi [³H] putrescine et 0,1mM putrescine. Le reste du lysat est utilisé pour le dosage des protéines. Chaque dosage enzymatique est réalisé en double. Deux

témoins blancs sont préparés au début et à la fin de chaque série en ajoutant 50µl de solution de lyse à 100mM d'EDTA .

La réaction enzymatique est stoppée dans la glace et 80 µl de solution sont déposés sur un papier filtre Whatmann 3M M. Le papier filtre est alors placé dans une solution à 10% d'acide trichloroacétique froid pendant 20mn et le complexe [³H]putrescine-N-N'-diméthylcaséine précipite. La putrescine tritiée libre est éliminée par des lavages successifs de 5 mn du filtre avec une solution à 10% d'acide trichloroacétique froid, un mélange 1/1 éthanol/acétone froid et de l'acétone pure. Le papier filtre est séché à température ambiante et placé avec 5ml de liquide à scintillation (AQUALYTE TM). La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation.

c) Calcul

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.

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

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 = 1nCi

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

T= temps réactionnel en minutes

Q= quantité de protéine déposée sur le filtre en mg

3) Test de différenciation cellulaire

Matériel

Cytospin : Shandon

Réactif :

Ester de phorbol (TPA) : Sigma

Mode opératoire

Les cellules ($2 \cdot 10^5$ /ml) sont traitées par des concentrations variables de rétinoïdes pendant cinq jours dans du milieu défini sans sérum de veau foetal (insuline $5 \mu\text{l/ml}$, de la transferrine 5ng/ml). Si le rétinoïde est utilisé à une concentration supérieure à $1 \mu\text{M}$, le sérum de veau peut être utilisé sans qu'il y ait d'interférence avec les protéines contenues dans le sérum (sérumalbumine, SRBP "serum retinol binding protein")

a) La différenciation cellulaire morphologique

Elle est observée à partir d'une préparation cytocentrifugée à 600 tour/min pendant 10 min puis colorée :

- May Grünwald pur : 2min
- May Grünwald dilué au 1/2 : 3min
- May Grünwald dilué au 1/10 : 10 mn
- H_2O : 1min.

b) La différenciation fonctionnelle

La différenciation cellulaire est évaluée selon le test de réduction du NBT (Bleu de tétrazolium). Les cellules (10^6) sont incubées pendant 20 min à 37°C avec un volume égal d'une concentration saline contenant 400ng d'ester de phorbol (TPA) fraîchement dilué et $0,5\%$ de NBT. Après dépôt sur les lames par cytocentrifugation, séchage à l'air sec, les cellules sont colorées au May Grünwald-Giemsa. Le pourcentage de cellules contenant les dépôts de formazan (NBT réduit) est déterminé par comptage direct au microscope de 200 cellules minimum.

4) Toxicité

Elle est appréciée par le test d'exclusion du Bleu trypan, cinq jours après le début de l'incubation.

VI) ELECTROPORATION

Matériel

Electroporateur : "gene pulser" Biorad

Plasmides : pSV2 CAT

pCH110

MMTV CAT (fourni par le groupe de Gruss)

pRSV GR

a) Préparation des cellules

Les cellules HEL et HL 60 en phase exponentielle de croissance sont sédimentées à 900 tours/min et concentrées dans des tubes stériles en présence de milieu de culture complet mais sans sérum de veau.

20.10⁶ cellules sont concentrées dans 800µl de milieu de culture sans sérum de veau et placées dans des cuvettes d'électroporation, puis mises en contact avec 50 µg d'ADN plasmidique (pSV2 CAT ou pCH110 ou MMTV CAT et pRSV GR). Un choc électrique (single pulse, 210 V et 1500µF, résistance infinie) est réalisé et les cellules sont très rapidement placées dans 15ml de milieu de culture contenant du sérum de veau. Les conditions expérimentales de l'électroporation ont été mises au point à l'aide du plasmide exprimant la β-galactosidase, le dosage est réalisé suivant la méthodologie décrite dans le chapitre IV.

24h après les cellules sont incubées en présence de différents traitements.

2) Dosage de l'activité CAT (Gorman *et al.*, 1982)

Réactifs :

Chloramphénicol (14C) 55à 60 µci (Amersham)

Acétyl Coenzyme A 25mg (Sigma)

Plaque de couche mince de silice (Merck, Darmstadt)

Film β max (Amersham)

72h après l'électroporation des cellules, l'activité du récepteur des glucocorticoïdes est appréciée par mise en évidence de l'activité CAT, selon la technique de Gorman *et al.*, (1982). Cette technique permet de visualiser par autoradiographie l'activité du récepteur.

Les extraits cellulaires sont préparés suivant le protocole décrit précédemment pour les dosages CAT suivant la technique de Seed. 50µl d'extraits sont alors, ajoutés à une solution comprenant:

20µl de chloramphénicol (C¹⁴)(0,01µCi/µl)

20µl d'acétylCoA(5µl/ml)

32,5µl deTris-HCl 1M pH 7,5

29,5µl d'H₂O

La réaction d'acétylation s'effectue pendant 1h à 37°C. Le chloramphénicol est extrait par de l'acétate d'éthyle froid et la phase supérieure obtenue par une centrifugation de 12000 tours/min pendant 5min est concentrée sous vide pendant 45 min.

Chaque échantillon est alors déposé sur couche mince de silice (15cm/10cm) à 2cm du bord inférieur de la plaque. La chromatographie ascendante est réalisée dans une atmosphère saturée en chloroforme/méthanol (9V/1V) pendant 45 min. Les formes mono et diacétylées sont séparées et visualisées par autoradiographie.

BIBLIOGRAPHIE

ADAMSON P.C., BOYLAN J.F., BALIS F.M., MURPHY R.F., GODWIN K.A., GUDAS L.J. and POPLACK. D.G.

Time course regulation of metabolism of all trans retinoic acid and the up regulation of cellular retinoic acid binding protein.

Cancer Res., 1993, **53**, 472-476.

AKERBLOM I. E., SLATER E.P., BEATO M., BAXTER J.D. and MELLON P.L.
Negative regulation by glucocorticoids through interference with a cAMP responsive enhancer.

Science, 1988, **241**., 350-353.

ALI M., TORIANE B. and VEDECKI S.

Identification of human, mouse and rat acid retinoic receptor α using monoclonal antibodies.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, **182**, 1032-1039.

ALLENBY G., BOCQUEL M.T., SAUNDERS M., KAZMER S., SPECK J., ROSENBERGER M., LOVEY A., KASTNER P., GRIPPO J.F., CHAMBON P. and LEVIN A.

Retinoic acid receptors and retinoic X receptors : interactions with endogenous retinoic acids.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, **90**, 30-34.

APFEL C., BAUER F., CRETTEZ M., FORNI L., KAMBER M., KAUFMANN F., LEMOTTE P., PIRSON W. and KLAUS M.

A retinoic acid receptor α antagonist selectively counteracts retinoic acid effects.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, **89**, 7129-7133.

ASSELINEAU D., BERNARD B.A., BAILLY C. and DARMON M.

Retinoic acid improves epidermal morphogenesis.

Developmental Biology, 1989, **133**, 322-335.

ASSELINEAU D., CAVEY M., SHROOT B. and DARMON M.

Control of epidermal differentiation by retinoid analogues unable to bind cytosolic retinoic acid binding proteins (CRABP).

The J. Invest. Dermatol., 1992, **55**, 128-134.

ASTROM A., TAVAKKOL A., PETTERSSON U., CROMIE M., ELDER J.T. and VOORHEES J.J.

Molecular cloning of two man cellular binding retinoic acid binding proteins (CRABP).

J. Biol. Chem., 1991, **266**, 17 662-17 666.

AU-FLIEGNER M., HELMER E., CASANOVA J., RAAKA B. and SAMUELS H.

The conserved ninth C-terminal heptad in thyroid hormone and retinoic acid receptors mediates diverse responses by affecting heterodimer but not homodimer formation

Mol. Cell. Biol, 1993, **13**, 5725-5737.

BAVIK C.O., ERIKSON V., ALLEN R.A., and PETERSON P.A.

Identification and spatial characterization of a retinal pigment epithelial membrane receptor for a plasma retinol-binding protein.

J. Biol. Chem., 1991, **226**, 14978-14985.

BEARDSLEY T.

Le futur de l'embryologie : la régulation des gènes.

Pour la Science, 1991, **168**, 55-63.

BEEBE J.S., DARLING D.S. and CHIN W.W.

3, 5, 3'-triiodothyrosine receptor auxiliary protein (TRAP) enhances receptor binding by interactions within the thyroid hormone response element.

Mol. Endocrinol., 1991, **5**, 85-93.

BENBROOK D., LERNHARDT E. and PFAHL M.

A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma.

Nature, 1988, **333**, 669-672.

BERNARD B.A., BERNARDON J-M., DELESCLUSE C., MARTIN B., LENOIR M-C., MAIGNANT J., CHARPENTIER B., PILGRIM W.R., REICHER U. and SHROOT B.

Identification of synthetic retinoids with selectivity for human nuclear retinoic acid receptor.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, **186**, 977-983.

BIRCKBICHLER P.J, ORR G.R. CONWAY E and PATTERSON M.K

Transglutaminase activity in normal and transformed cells.

Cancer Research ,1977, **37**, 1340-1344.

BLANCHARD J.M.

Le proto-oncogène c-fos : un entremetteur moléculaire.

Médecine/Sciences, 1990, **2**, 54-65.

BLOMHOFF R., GREEN M.H., BERG T. and NORUM K.R.

Transport and storage of vitamin A.

Science, 1990, **250**, 399-404.

BLOMHOFF R., GREEN M.H. and NORUM K.R.

Vitamin A : Physiological and biochemical processing.

Ann. Rev. Nutr., 1992, **12**, 37-57.

BLUMBERG B., MANGELSDORF J.A., DYCK J.A., BITTNER D.A., EVANS R.M. and H. F De ROBERTIS.

Multiple retinoid-responsive receptors in a single cell : Family of RXRs and RARs in the *Xenopus* eggs.

Proc. Natl. Acad. Sci., 1992, **32**, 1234-1254.

BOLLA M., LAPLANCHE A., Le FUR R., DOMANGE C., LEFEBVRE J.L., BADET J.M., MAURY J.M. and ROGNIN C.

Prevention of second primary tumor with etretinate in squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx.

Eur. J. Cancer Suppl., 1990, **2**, 1907, S 310.

BOLLAG W. and HARTMAN H.R.

Prevention and therapy of cancer with retinoids in animals and man.

Cancer Surveys, 1983, **2**, 293-314

BONCINELLI E., SIMEONE A., ACAMPORA D. and MAVILIO F.

Hox gene activation by retinoic acid.

TIG, 1991, **7**, 329-334.

BOUCLIER M., DANGE M., BURGE G., DELAMADELEINE F., ROSSIO R., FOUQUE M.C. and HENSBY C.N.

Retinoid-induced dose related hypervitaminosis A, epidermal hyperplasia and tail morphological changes in the mouse : an assay to evaluate biological indexes of activity.

Pharmacology of retinoids in the skin.

Pharmacol. Skin basel, Karger, 1989, 136-138.

BOURGUET W., SABLONNIERE B., FORMSTECHEP P., CHEN J.Y., BERNIER J.L. and HENICHART J.P.

Synthesis of a biospecific adsorbent for the purification of the three human retinoic acid receptors (h RARs) by affinity chromatography.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, **187**, 711-716.

BOURGUET W.

Synthèse de nouveaux ligands utilisables pour la purification des récepteurs de l'acide rétinoïque et l'étude du mode d'action des rétinoïdes.

Thèse, Chimie, Lille, 1992.

BOYLAND J.F. and GUDAS L.J.

Over expression of the cellular retinoic acid -binding protein I (CRABP) result of a reduction in differentiation specific gene expression in teratocarcinoma cells.

J. Cell. Biol., 1991, **112**, 965-979.

BOYLAND J.F. and GUDAS L.J.

The level of CRABP-A expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F-9 teratocarcinoma stem cells.

J. Biol. Chem., 1992, **267**, 21 436-21 491.

BRAND N.J., PETKOVICH M., KRUST A., CHAMBON P., de THE H., MARCHIO A., TIOLLAIS P. and DEJEAN A.

Identification of a second human retinoic acid receptor.

Nature, 1988, **332**, 850-853.

BRAND N.J., PETKOVICH M. and CHAMBON P.

Characterization of a functional promoter for the human retinoic acid receptor α (hRAR α).
Nucl. Acids Res., 1990, **18**, 6799-6806.

BREITMAN T.R., SELONICK S E. and COLLINS S.J.

Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL 60) by retinoic acid.

Proc. Natl. Acad.Sci..USA, 1980, **77**, 2936-2940.

BROCKES J.P.

We may not have a morphogen.

Nature, 1991, **350**, 15.

BUETTNER R., YIM O.S., HONGX Y.S., BONCINELLI E. and TAINSKY M.

Alteration of homeobox gene expression by N-RAS transformation of PA-1 human teratocarcinoma cells.

Mol. Cell. Biol., 1991, **11**, 3573- 3583.

BUGGE T., POHL J., LONNOY O. and STUNNENBERG H.

RXR α , a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors.

The EMBO. J., 1992, **11**, 1409-1418.

BURNSIDE J., DARLING D.S. and CHIN W.W.

A nuclear factor that enhances binding of thyroid hormone receptors to thyroid response elements.

J. Biol. Chem, 1990, **265** , 2500-2504.

BUSCH S.J. and SASSONE-CORSI P.

Dimer, leucine zippers and DNA-binding domains.

TIG. 1990, **6**, 36-40.

CARIELLO L., VELASCO P.T., WILSON J., PARAMESWARAN K.N., KARUSCH F. and LORAND L.

Probing the transglutaminase-mediated, posttranslational modifications of proteins during development.

Biochem., 1990, **29**, 5103-5108.

CARLBERG C., BENDIK I., WYSS A., MEIER E., STUZENBECKER J ., GRIPPO J.F. and HUNZIKER W.

Two nuclear signalling pathway for vitamin D.

Nature, 1993, **361**, 657-660.

CAVEY M T., MARTIN B., CARLAVAN I. and SHROOT B.

In vitro binding of retinoids to the nuclear retinoic acid receptor RAR α .

Anal. Biochem. 1990, **186**, 19-23.

CHAMBON P., ZELENT A., PETKOVICH M., MENDELSON P., LEROY P., KRUST A., KASTNER P and BRAND N.

Retinoids : "10 years On", Basel, Karger, 1991, 10-27.

CHATTERJEE V.K., MADISON L.D., MAYO S. and JAMESON J.L.

Repression of the human glycoprotein hormone α -subunit gene by glucocorticoids: evidence for receptor interactions with limiting transcriptional activators.

Mol. Endocrino., 1991, **5**, 100-110.

CHIOCCA E A., DAVIES P.J and STEIN J.P.

The molecular basis of retinoic acid action. Transcriptional regulation of tissue transglutaminase gene expression in macrophages.

J.Biol.Chem, 1988, **263**, 11584-11589.

CHIOCCA E A., DAVIES P.J and STEIN J.P.

Regulation of tissue transglutaminase gene expression as a molecular model for retinoid effects on proliferation and differentiation.

J.Cell.Biochem, 1989, **39**, 293, 304.

CHOMIENNE C., BALLERINI P., BALITRAND P., AMAR M., BERNARD J.F., BOIVIN D., DANIEL M.T., BERGE R., CASTAIGNE S. and DEGOS L.

Retinoic acid therapy for promyelocytic leukemia.

Lancet, 1989, **5**, 746-747.

CHRISTOPHERS E.

Growth stimulation of cultured postembryonic epidermal cells by vitamin A acid.

J. Invest. Dermatol., 1974, **63**, 450-455.

CHYTIL F.

Retinoic - acid : biochemistry, pharmacology, toxicology, and therapeutic use.

Pharmacological Reviews, 1984, **36**, 93S-100S.

CHYTIL F. and ONG D.E.

In "The retinoids" eds SPORN M.B., ROBERTS A.B., GOODMAN D.S.

1984, Vol 2, 89-123, Orlando.

COLLINS J.

The HL 60 promyelocytic leukemia cell line : proliferation, differentiation and oncogene expression.

Blood, 1987, **12**, 1 233-1236.

CRETTAZ M., BARON A., SIEGENTHALER. G and HUNZIKER W.

Ligand specificities of recombinant retinoic acid receptors RAR α and RAR β .

Biochem. J., 1990, **272**, 391-397.

DANIELSEN M., HINCK L and RINGOLD G.M.

Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor.

Cell, 1989, **57**, 1131-1138.

DANIELSEN M.

Structure and function of the glucocorticoid receptor.

In Nuclear Hormone Receptors.

Eds, Parker, M.G. Academic Press, 1991, 39-68.

DARLING. D.S., BEEBE J.S., BURNSIDE J., WINSLOW E.R. and CHIN W.W.

3, 5 ,3'- triiodothyronine (T3) receptor-auxiliary protein (TRAP) binds DNA and forms heterodimers with the T3 receptor.

Mol. Endocrino., 1991, **5**, 73-84.

DARMON M., ROCHER M., CAVEY M.T., MARTIN B., RABILLOU T.,

DELESCLUSE C. and SCHROOT B.

Biological activity of retinoids correlates with affinity for nuclear receptors but not for cytosolic binding protein.

Skin Pharmacology, 1988, **1**, 161-175.

DAVIES P.J., MURTAUGH M.P., MOORE W.T., JOHNSON G.S and LUCAS D.

Retinoic acid induced expression of the tissue transglutaminase in human promyelocytic leukemia HL 60.

J. Biol. Chem., 1985, **260**, 5166-5174.

DAVIES P.J STEIN J.P., CHIOCCIA E.A., BASILON J.P., GENTILE V. THOMASY V and FESUS L.

Retinoid regulated expression of transglutaminase in human promyelocytic leukemia (HL60) cells.

In Retinoids in normal development and teratogenesis, 1992, 249-263.

Oxford University press, oxford.

DAWSON M., HOOPS P.D., CHAN R., DERDINSKI K., and CHAO W.

J. Med. Chem., 1981, **24**, 1214-1223.

DAWSON M., CHAN R.L., DERDINSKI K., HOOPS P.D., CHAO W. and SCHIFF L.J.

Synthesis and pharmacological activity of 6(E)-2-(2-6-,6, trimetyl-1 yl)-1cyclohexen-1-yl) ethen -1yl)-and 6(1,2,3,4-tetrahydro 1,1,4,4 tetramethyl-6-naphthyl)-2-naphtalenyl)2-naphtalenecarboxylic acids.

J. Med. Chem., 1983, **26**, 1653-1656.

DAWSON M., HOOPS P.D., DERDINSKI K., HELMES C.T., CHO W.,

HEIERHENRY., E. and SCHIFF L.J.

Conformational restriction of the retinoic skeleton.

In "retinoids, differentiation and disease" Ciba foundation.

Symposium, 113, Pittman Eds, London, 1985, 6-28.

DAWSON M., HOOBS P.D., DERDINSKI K., CHO W., FRENKLING G., LOEW G.H., JETTEN A.M., NAPOLI J.L., WILLIAM J.P., SANI B.P., WILLE J. and SCHIFF L.J.

Effects of structural modifications in the C7-C17 region of the retinoid skeleton on biological activity in a serie of aromatic retinoids.

J. Med. Chem, 1989, **32**, 1504-1517.

DEGOS L., CHOMIENNE C., DANIEL M.T., BERGER M.T DOMBRET H ., FENAUX P. and CASTAIGNE S.

Treatment of the first relapse of acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid. Lancet, 1990, ii, 1440-1441.

DEGOS L., CASTAIGNE S., FENAUX P., DANIEL M.T. and CHOMIENNE C.

Le traitement des leucémies aigües à promyélocytes par l'acide tout trans rétinóique. Médecine/Science, 1991, **7**, 460-464.

DEJEAN A., BOUGUELERET L., GRZESCHIK K.H. and TIOLLAIS P.

Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to v-erb-A and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma.

Nature, 1986, **322**, 70-72.

DELESCLUSE C., CAVEY M.T. , MARTIN B., BERNARD B.A., REICHERT U., MAIGANT J., DARMON M. and SHROOT B.

Selective high affinity retinoic acid receptor α or β - γ ligands.

Mol. Pharmacol., 1991, **40**, 556-562.

De LUCAS H.F.

The vitamin D story : a collaborative effort of basic science and clinical medicine.

FASEB J., 1988, **2**, 224-236.

De LUCA L.M.

Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia.

FASEB J, 1991, **5**, 2924-2933.

DENNING M. and VERMA A.K.

Involvement of retinoic acid nuclear receptors in retinoic acid induced tissue transglutaminase gene expression in rat tracheal 2C5 cells.

Bioch. Biophys. Res. Comm., **175**, 344-350.

De ROBERTIS E.M., MORITA E.A. and CHO K.W.Y.

Gradient fields and homeobox genes.

Development, 1991, **112**, 669-678.

de THE H., MARCHIO A., TIOLLAIS P. and DEJEAN A.

A novel steroid thyroid hormone receptor-related gene inappropriately expressed in human hepatocellular carcinoma.

Nature, 1987, **330**, 667-670.

- de THE H., MARCHIO A., TIOLLAIS P. and DEJEAN A.
Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor α and β genes.
The EMBO J., 1989, **8**, 429-433.
- de THE H., VIVANCO-RUIZ M.M., TIOLLAIS P., STUNNENBERG H. and DEJEAN A.
Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid β receptor gene.
Nature, 1990, **343**, 177-180.
- de THE H., CHOMIENNE C., LANOTE M., DEGOS L. and DEJEAN A.
The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor α gene to a novel transcribed locus.
Nature, 1990, **347**, 558- 561.
- de THE H., VIVANCO-RUIZ M.M., TIOLLAIS P., STUNNENBERG H. and DEJEAN A.
The PML-RAR α fusion mRNA generated by the t(15-17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR.
Cell, 1991, **66**, 675-684.
- DIAMOND M.I., MINER J.N YOSHINA S.K. and YAMAMOTO F.R.
Transcription factor interactions : selectors of positive or negative regulation from a single DNA element.
Science, 1990, **249**, 1266-1272.
- Di GIOVANNA J.J.
Retinoids for the future : oncology.
J.Am. Acad. Dermatol., 1992, **27**, 534-537.
- DOLLE P., RUBERTE E., KASTNER P., PETKOVITH M., STONER C.M., GUDAS L. and CHAMBON P.
Differential expression of genes encoding α , β and γ retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse.
Nature, 1989, **342**, 702-705.
- DOLLE P., RUBERTE E., LEROY P., MORRIS-KAY G. and P. CHAMBON.
Retinoic acid receptors and cellular binding proteins .
Development, 1990, **110**, 1133-1151.
- DONOVAN M., BAVIK C., SIMON A. and ERIKSSON U.
Identification of a cell surface receptor for retinol-binding protein.
Mecanism of action of retinoids, Vitamin D, and steroid hormones.
The banff centre, Banff, Alberta, Canada, March 15-20, 1993.

DOUCAS V., BROCKES J., YANIV M., de THE H. and DEJEAN A.

The PML-retinoic acid receptor α translocation converts the receptor from an inhibitor to a retinoic acid dependant activator of transcription factor AP1.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, **90**, 9345-9349.

DUBOULE D.

The vertebrate limb : a model system to study the Hox/Hom gene network during developement and evolution.

Bioassay, 1992, **14**, 375-383.

DURAND B., SAUNDERS M., LEROY P., LEID M. and CHAMBON P.

All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABPII transcription is mediated by RAR-RXR.

Cell, 1992, **71**, 73-85.

EICHELE G.

Retinoids and vertebrate limb pattern formation.

TIG, 1989, **5**, 246-251.

ELLERS M S., OLEKSIK M.F, Mc QU Aid T.J., Mc AFEE S.G. and GILCHREST B. A.

The molecular cloning and expression of two CRABP cDNA from human skin.

Exp. Cell Res., 1992, **199**, 328-336.

ERIKSSON U., HANSSON E., NILSSON M., JÖNSSON K.H., SUNDELIN J. and PETERSON P.A.

Increased levels of several retinoid binding proteins resulting from retinoic acid differentiation of F9 cells.

Cancer Res., 1986, **46**, 717-721.

EVAIN-BRION D., RAYNAUD F., TOURNIER S., PLET A. and ANDERSOW W.B.

In "Retinoids : 10 years on" Basel Karger.

SAURAT J.H. (Ed), Geneva, 1991, 46-55.

EVANS R.M.

The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.

Science, 1988, **240**, 889-895.

EYROLLES L., KAWACHI E., MATSUSHIMA Y., NAKAJIMA O., KAGECHIKA H., HASHIMOTO Y. and SHUDO K.

Retinoid antagonists : molecular design based on the ligand superfamily concept.

Med. Chem. Res., 1992, **2**, 361-367.

FELL H.B. and MELLAMBY E.

Metaplasia produces in cultures of chick ectoderm by high vitamin A.

J. Physiol. (London), 1953, **116**, 320-349.

FENAUX P.

The role of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia.
Acta Haematol., 1993, 374.

FESUS L., SANDOR M., HORVATH L.I., BAGYINGA., ERDEI A. and GERGELY J.
Immune-complexe-induced transglutaminase activation : its role in the Fc-receptor-mediated transmembrane effect on peritoneal macrophages.
Mol. Immunol., 18, 1981, 633-638.

FILHOLE O., COCHET C. et CHAMBAZ M.

Un système d'expression fidèle de protéines recombinantes : les cellules d'insectes infectées par baculovirus.

Regard sur la Biochimie, 1990, 5, 36-39

FORMAN B.M. and SAMUELS H.H.

Dimerization among nuclear hormone receptors

The New Biol., 1990a, 2, 587-594.

FORMAN B.M. and SAMUELS H.H.

Interactions among a superfamily of nuclear hormone receptors : the regulatory zipper model.

Mol. Endocrinol., 1990b, 4, 1293-1301.

FREEDMAN L.P., LUISI B.F., KORSZUN Z.R., BASAVAPPA R., SIGLER P.B. and YAMAMOTO K.R.

The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain.

Nature, 1988, 334, 543-546.

FREEMONT P.S., HANSON I.M and TROWSDALE J.

A novel cysteine-rich sequence motif.

Cell, 1991, 64, 483-484.

FRITSCH P.

Oral retinoids in dermatology.

Int. J. Dermatology, 1981, 20, 314-329.

FRITSCH P.

Retinoids in psoriasis and disorders of keratinization.

J. Am. Acad. Dermatol. Supl., 1992, S8-S14.

FROLICK C.A., SWANSON B.N., DART L.L. and SPORN M.B.

Metabolism of 13 cis retinoic acid : identification of 13 cis 4 oxo retinoyl β glucuronides in the bile of vitamin A normal rats.

Arch. Biochem. Biophys., 1981, 208, 344-452.

FUCHS E. and GREEN H.

Change in keratine gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte.
Cell, 1980, **19**, 1033-1042.

FUCHS E. and GREEN H.

Regulation of the terminal differentiation of the cultured human keratinocytes by vitamin A.
Cell, 1981, **25**, 617-625.

FUKASAWA H., IJIMA T., KAGECHIKA H., HASHIMOTO Y. and SHUDO K.

Expression of the α , β and γ in *E. coli* and evaluation of ligand-binding selectivity.
Biol. Pharm. Bull, 1993, **4**, 343-348.

GAUB M.P., LUTZ Y., RUBERT G. E., PETKOVICH M., BRAND N and CHAMBON P.

Antibodies specific to the retinoic acid receptor human nuclear receptor α and β .
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1989, **86**, 3089-3093.

GEHRING W.J., MÜLLER M., AFFOLTER M., PERICIVAL-SMITH A., BILLETER M., QIAN Y.Q., OLTING G. and WÜTBRICH K.

The structure of the homeodomain and its functional applications.
TIG, 1990, **6**, 309-341.

GEIGER J.M.

Aspects pharmacologiques des rétinoïdes
Revue thérapeutique, 1986, **49**, 678-683.

GIGUERE V., HOLLENBERG S.M., ROSENFELD G.M. and EVANS R.M.

Functional domains of the human glucocorticoid receptor.
Cell, 1986, **46**, 645-652.

GIGUERE V., ONG E.S., SEGUI P. and EVANS R.M.

Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid.
Nature, 1987, **330**, 624-629.

GIGUERE V., SHAGO M., ZIRNGIGL R., TATE P., ROSSAN J. and VARMUZA S.

Identification of a novel isoform of the retinoic acid receptor γ expressed in the mouse embryo.

Mol. Cell. Biol., 1990, **10**, 335-340.

GIGUERE V., LYN S., YIP P., SIU C-H. and AMIN S.

Molecular cloning of cDNA encoding a second cellular retinoic acid-binding protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, **87**, 6233-6237.

GINSBERG A.M., KING B.O. and ROEDER R. D.

Xenopus 5S gene transcription factor, TFIII A : characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development.

Cell, 1984, **39**, 479-489.

GIUDICE G.J. and FUCHS E.

Vitamin A mediated regulation of keratinocyte differentiation.
Methods in enzymology, 1991, **190**, 18-30.

GODOWSKI P.J., RUSCONI S., MIESFELD R. and YAMAMOTO K.R.

Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement.
Nature, 1987, **327**, 365-369.

GOLDMAN R.

Synergism and antagonism in the effects of $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃, retinoic acid, dexamethasone, and a tumor-promoting phorbol ester on the functional capability of P388D1 cells : phagocytosis and transglutaminase activity.
Cancer Res., 1985, **45**, 3118-3124.

GOLSTEIN J.L.

Annu. Rev. Cell.Biol, 1985, **1** ,1-5.

GOODMAN D. and BLANER W.

Biosynthesis, absorption, and metabolism of retinol
In "The retinoid", 1984, **2**, 1-39

GORMAN C.M MOFFAT L.F. and HOWARD B.H.

Recombinant genes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells.
Mol. Cell. Biol, **2**, 1044-1051.

GOUVEIA J., HERCEN T., LEMAIGRE G., MATHE G. and GROS F.

Degree of bronchial metaplasia in heavy smokers and its regression after treatment with a retinoid.
Lancet, 1982, **1**, 710-712.

GRAUPNER G., MALLE G., MAIGNAN J., LANG G., PRUNIERAS M. and PFAHL M.

6'-substituted naphthalene-2-carboxylic acid analogs, a new class of retinoic acid receptor subtype-specific ligands.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1991, **182**, 1032-1039.

GREEN S and CHAMBON P.

Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation.
TIG, 1988, **4**, 309-314.

GREEN S., KUMAR V., THEULAZ I., WAHLI W. and CHAMBON P.

The N-terminal DNA-binding "Zinc finger" of the estrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity.
The EMBO J., 1988, **7**, 3037-3044.

GREEN S. and CHAMBON P.

The estrogen receptor : from perception to mechanism.

In Nuclear Hormone Receptors. Ed. Parker, M.G. Academic Press, 1991, 15-33.

GREEN S.

Nuclear hormon receptors : promiscuous liaisons.

Nature, 1993, **361**, 590-591.

GUDAS L.M.

Assay for expression of gene regulated by retinoic acid in murine teratocarcinoma cell lines.

Methods in enzymology, 1991, **190**, 131-140.

HAAKE A.R. and POLAKOWSKA R.R.

Cell death by apoptosis in epidermal biology.

J. Invest. Dermatol. ,1993, **11**, 107-112.

HARPER M.J.K. and WALPOLE A.L.

Contrasting endocrine activities of cis and trans isomers in a series of substituted tryphenylethylenes.

Nature, 1966, **212**, 87.

HÂRD T., KELLENBACH E., BOELENS R., MALER B.A., DAHLMAN K,
FREEDMAN L.P., CARLSTEDT-DUKE J., YAMAMOTO K.R., GUSTAFSSON J.A.
and KAPTEIN R.

Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain.

Science, 1990, **249**, 157-160.

HARRISON E.H., BLANER W.S., GOODMAN D.S. and ROOS C.A.

Subcellular localisation of retinoids, retinoid binding proteins and acyl CoA : retinol acyltransferase in rat liver.

J. Lipid. Res., 1987, **28**, 973-981.

HASHIMOTO Y., KAGECHIKA H., KAWACHI E. and SHUDO H

Specific uptake of retinoids into human promyelocytic leukemia cells HL 60 by retinoid-specific binding protein : possibly the true receptor.

Jpn. J. Cancer. Res.,1988, **79**, 473-483.

HASHIMOTO Y., PETKOVITH M., GAUB M.P., KAGECHIKA H., SHUDO H. and
CHAMBON.P

The retinoic acid receptor α and β are expressed in the human promyelocytic leukemia cell line HL60.

Mol. Endocrinol., 1989, **89**, 1046-1052.

HASHIMOTO Y., KAGECHIKA H. and SHUDO H.

Expression of retinoic acid receptor genes and the ligand-binding selectivity of retinoic acid receptor (RARS).

Bioch. Biophys. Res. Comm., 1990, **160**, 1300-1307.

HILL D.L. and GRUBBS C.J.

Retinoids and cancer prevention

Ann. Rev. Nutr., 1992, **12**, 161-181.

HONG W.K., SCOTT M.D. and LIPPMAN M.N.

Prevention of second primary tumor with isotretinoin in squamous cell carcinoma of the head and neck.

N. Engl. J. Med., 1990, **323**, 795-801.

JANNE O.A., PALVIMO J.J., KALLIO P., METHO M., XU Y-B. and SUI Y.P.

Production of recombinant androgen receptor in a heterologous expression system.

Clin. Chem., 1993, **2**, 346-352.

JETTEN A.M., ANDERSON K., DEAS M.A., KAGECHIKA H., LOTAN R.,

REARICK J.I. and SHUDO K.

New benzoic acid derivatives with retinoic activity : lack of direct correlation between biological activity and binding to cellular retinoic acid binding protein.

Cancer Res., 1987, **47**, 3523-3527.

JONG L., LEHMANN J.M., HOBBS P.D., HARLEY E., HUFFMAN J.C., PFAHL M. and DAWSON M.I.

Conformal effects on retinoid receptor selectivity.1. Effect of double bond geometry on retinoid X receptor activity.

J. Med. Chem., 1993, **36**, 2605-2613.

KAGECHIKA H., KAWACHI E., HASHIMOTO Y., HIMI T. and SHUDO K.

Retinobenzoic acids 1 : Structure-activity relationships of aromatic amides with retinoidal activity.

J. Med. Chem., 1988, **31**, 2182-2192

KAGECHIKA H., KAWACHI E., HASHIMOTO Y. and SHUDO K.

Retinobenzoic acids 2 : structure-activity relationships of chalcone. 4 - carboxylic acids and flavone - 4' - carboxylic acids.

J. Med. Chem., 1989, **32**, 834-840.

KAGECHIKA H., HIMI T., NAMIKAWA K., KAWACHI E., HASHIMOTO Y. and SHUDO K.

Retinobenzoic Acids 3 : structure-activity relationships of retinoidal azobenzene - 4 carboxylic acids and stilbene -4 - carboxylic acids.

J. Med. Chem., 1989, **32**, 1098 - 1108.

KAGECHIKA H., HIMI T., KAWACHI E. and SHUDO K.

Retinobenzoic acids 4 : conformation of aromatic amides with retinoidal activity.

Importance of trans-amide. structure for the activity .

J. Med. Chem., 1989, **32**, 2292 - 2296.

KAKIZUKA A., MILLER W.H.Jr., UMESONO K., WARRELL R.P.Jr., FRANKEL S.R., MURTY V.V.V.S., DMITROVSKY E.D. and EVANS R.M.
Chromosomal translocation t(15-17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR α with a novel putative transcription factor, PML.
Cell, 1991, **66**, 663-674.

KALDERON D., ROBERTS B.L., RICHARDSON W.D. and SMITH A.E.
A short amino acid sequence able to specify nuclear localization.
Cell, 1984, **66**, 499-509.

KASTNER P., KRUST A., MENDELSON C., GARNIER J.M., ZELENT A., LEROY P., STAUB A. and CHAMBON P.
Murine isoforms of retinoic acid receptor γ with specific patterns of expression
Proc. Acad. Sci. USA, 1990, **87**, 2700-2704.

KASTNER P., PEREZ A., LUTZ Y., ROCHETTE -EGLY C., GAUB M.P., DURAND M., LAMOTE R., BERGER R. and CHAMBON P.
Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid α fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL) : structural similarities with a new family of oncogenes.
EMBO J., 1992, **15**, 629-642.

KEIDEL S., RUPP E. and SZARDENINGS M.
Recombinant human retinoic acid receptor α .
Binding of DNA and synthetic retinoids to the protein expressed in *Escherichia. Coli*.
Eur. J. Biochem., 1992, **204**, 1141-1148.

KEIDEL S., SZARDENINGS M. and MUELLER W.
In vivo biological activity of retinoids partially correlates to their affinity to recombinant retinoic acid receptor α and recombinant-cellular retinoic-acid-binding-protein I.
Eur. J. Biochem., 1993, **212**, 13-26.

KESSEL M. and GRUSS P.
Murine developmental control genes.
Science, 1990, **249**, 374-379.

KESSEL M. and GRUSS P.
Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid
Cell, 1991, **67**, 89-104.

KINDMARK A., TORMA H., JOHANSSON J., LJUNGHALL S. and MELHUS H.
Cellular retinoic acid binding protein type II is expressed in adult osteoblast and in adult liver.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, **189**, 3, 1397-1403.

- KLIEWER S.A., UMESONO K., MANGELSDORF D.J. and EVANS R.M.
Retinoic X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D₃ signalling.
Nature, 1992, **355**, 446-449.
- KLUG A. and RHODES D.
"Zinc finger" : a novel protein motif for nucleic acid recognition.
TIBS, 1987, **12**, 464-469.
- KNEGTEL R.M..A., KATAHIRA M., SCHILTHUIS J.G., BONVIN A.M.J.J.,
BOELENS R., EIB D., VANDERSAAG P.T. and KAPTEIN R.
The solution structure of the human retinoic acid receptor- β DNA-binding domain.
J. Bio.Mol. NMR, 1993, **3**, 1-17.
- KRUST A., GREEN S., ARGOS P., KUMAR V., WALTER P., BORNERS T J.M. and
CHAMBON P.
The chicken estrogen receptor sequence : homology with *v-erb* and the human estrogen and
glucocorticoid receptors.
Embo. J., 1986, **5**, 891-897.
- KRUST A., KASTNER P., PETKOVICH M., ZELENT A. and CHAMBON P.
A third human retinoic acid receptor, h RAR γ .
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, **86**, 5310-5314.
- KUMAR V. and CHAMBON P.
The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced
homodimer.
Cell, 1988, **55**, 145-156.
- KUROKAWA R., YU V.R., NAAR A., KYATUMOTO S., HAN Z., SILVERMAN S.,
ROSENFELD M.G. and GLASS C.
Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerisation
interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers.
Genes & Dev., 1993, **7**, 1423-1435.
- LARGMAN C., DETMER K., CORRAL J.C., HACK F. M. and LAWRENCE H.J.
Expression of retinoic acid receptor α mRNA in leukemia cells.
Blood, 1989, **74**, 99-102.
- LA ROSA G.J. and GUDAS L.J.
An early effect of retinoic acid : cloning of an mRNA (Era-1) exhibiting rapid and protein
synthesis-independent induction during teratocarcinoma stem cell differentiation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988a, **85**, 329-333.

LA ROSA G.J. and GUDAS L.J.

Early retinoic acid-induced F9 teratocarcinoma stem cell gene Era-1 : alternative splicing creates transcripts for a homeobox-containing protein and one lacking the homeobox.

Mol. Cell. Biol., 1988b, **8**, 3906-3917.

LASNITZKI I.

The effect of excess of vitamin A on the embryonic rat oesophagus in culture.

Br. J. Cancer, 1955, **9**, 434-441.

LAUDET V., HANNI C., COLL J., CATZEFLIS F. and STEHELIN D.

Evolution of the nuclear receptor gene superfamily

The EMBO J., 1992, **11**, 1003-1013.

LAYTON A. and CUNLIFF W. J.

Guidelines for optimal use of isotretinoin in acne.

J. Am. Acad. Dermatol. Supl., 1992, S1-S7.

LAZARD M.A. and BERRODIN T.J.

Thyroid hormone receptors form distinct nuclear protein-dependent and independent complexes with a thyroid hormone response element.

Mol.Endocrinol., 1990, **4**, 1627-1634.

LEE F., MILLIGAN R., BERG P. and RINGOLD G.

Glucocorticoids regulate expression of dihydrofolate reductase cDNA in mouse mammary tumour virus chimeric plasmids

Nature, 1981, **294**, 228-254.

LEE M.S., KLIEWER S. A., PROVENCAL J., WRIGHT P.E. and EVANS R.M.

Structure of the retinoic X receptor α DNA binding domain : a helix required for a homodimeric DNA binding.

Science, 1993, **260**, 1117-1121.

LEES J.A., FAWELL S.E. and PARKER M.G.

Identification of two transactivation domains in the mouse estrogen receptor.

Nucl.Acids.Res., 1989, **17**, 5477-5488.

LEHMAN J.M., DAWSON M.I., HOBBS P., HUSMANN M. and PFAHL M.

Identification of retinoids with nuclear receptor subtype-selective activities.

Cancer research, 1991, **51**, 4804-4809.

LEHMAN J.M., JONG L., FANJUL A., CAMERON J.F., LU X.P., HAEFNER P., DAWSON M.I. and PFAHL M.

Retinoids selective for retinoid X receptor response pathways.

Science, 1992, **258**, 1944-1946.

LEID M., KASTNER P., LYONS R., NAKSHATRI H., SAUNDER M., ZACHAREWSKI T., CHAN J.Y., STAUB A., GARNIER J.M., MADER S. and CHAMBON P.

Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently.
Cell. 1992, **68**, 377-395.

LEID M., KASTNER P. and CHAMBON P.

Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways
Trends Biochem. Sci., 1992, **17**, 427-433.

LEID M., KASTNER P., DURAND B., KRUST A., LEROY P., LYONS R., MENDELSON C., NAGPAL S., NAKSHATRI H., REIBEL C., SAUNDER M. and CHAMBON P.

Retinoic acid signal transduction pathway
Ann. N.Y.Acad. Sci., 1993, **684**, 19-34.

LEO M.A., KIM.C. and LIEBECS M

NAD⁺ dependant retinol dehydrogenase in liver microsome
Arch. Biochem. Biophys., 1987, **259**, 241-249.

LEROY P., KRUST A., ZELENT A., MENDELSON C., GARNIER J.M., KASTNER P., DIERICH A. and CHAMBON P.

Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor α are generated by a alternative splicing and differential induction by retinoic acid.
EMBO J., 1991, **10**, 59-69.

LEVIN M.S., LOCKE B., YANG N.C., LI E. and GORDON J.L.

Comparaison of the ligand binding proprieties of two homologous rat apocellular retinol-binding proteins expressed in *Escherichia-coli*.
J. Biol. Chem., 1988, **263**, 17715-17723.

LEVIN A.A., STURZENBECKER J., KAZMER S., BOSAKOWSKI T., HUSELTON C., ALLENBY G., SPECK J., KRATZEISEN C., ROSENBERG M., LOVEY A. and GRIPPO J.F.

9 - Cis Retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR .
Nature, 1992, **355**, 359-361.

LI E., DEMMER L.A., SWEETER D.A., ONG D.E. and GORDON J.I.

Rat cellular retinol- binding protein II : use of a cloned cDNA to defined its primary structure, tissue -specific expression and regulation.
Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 1986, **83**, 5779-5783.

LI E., SUCOV H.M., LEE K-F., EVANS R.M. and JANISCH R.

Normal development and growth of mice carrying a targeted disruption of the α 1 retinoic acid receptor gene.
Proc. Natl., Acad. Sci. USA., 1993, **90**, 1590-1594.

- LIA O., OZONO K., SOME. P., Mc DONNEL D.P. and PIKE J.W.
Vitamin D receptor interaction with specific DNA requires nuclear protein and 1,25-dihydroxy vitamin D3.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1990, **80**, 9781-9788.
- LOELIGER P., BOLLAG.W. and MAYER H.
Aroretinoids a new class of highly active retinoids.
Eur. J. Med. Chem., 1980, **15**, 9-15.
- LOHNES D., DIERICH A., GHYSELINCK N., KASTNER P., LAMPRON C.,
LEMEUR M., LUFKIN T., MENDELSON C., NAKSHATRI H. and CHAMBON P.
Retinoic receptors and binding proteins.
J. Cell. Sci, 1992, **16**, 69-76.
- LOHNES D., KASTNER P., DIERICH A., MARK M., LEMEUR M. and CHAMBON P.
Function of retinoic acid receptor γ in the mouse.
Cell, 1993, **73**, 643-658
- LOTAN R.
Effect of vitamin A and its analogs on normal and neoplastic cells.
Biochim. Biophys. Acta, 1980, **605**, 33-91.
- LOTAN L and CONRAD S.M.
Transglutaminases.
Mol. Cell. Biochem., 1984, **58**, 9-35.
- LOTAN R., LOTAN D. and DEUTSCH V.
Growth inhibition of murine melanoma cells by antibodies to a cell surface glycoprotein implicated in retinoic action.
Cancer Res., 1987, **47**, 3152-3158.
- LOTAN R.and CLIFFORD J.L.
Nuclear receptors for retinoids : mediators of retinoid effects on normal and malignant cells.
Biomed. & Pharmacother, 1991, **45**, 145-156.
- LUCIBELLO F.C., SLATER E.P., JOSS K.U., BEATO M. and MULLER R.
Mutual transrepression of fos and the glucocorticoid receptor : involvement of a functional domain in fos wich is absent in fos B.
EMBO. J., 1990, **9**, 2827- 2834.
- LUPULESCU A.
in "Hormone and vitamin in cancer treatment".
CRC Press., 1990, 149-171 et 239-249.

Mac DONALD P.N. and ONG D.E.

Binding specificities of cellular binding-retinol protein TYPE I and cellular binding-retinol protein type II.

J. Biol. Chem. 1987, **262**, 1055- 10556.

MADEN. M.

Vitamin A and pattern formation in the generating limb.

Nature, 1982, **295**, 672-675.

MADER S, KUMAR V., De VERNEUIL H. and CHAMBON P.

Three amino acids of estrogen receptor are essential to its ability to distinguish an estrogen from a glucocorticoid-responsive element.

Nature, 1989, **338**, 271-274.

MANECHEZ D.

Mécanisme d'action des rétinoïdes

Thèse, 1992, Science de la vie et de la santé

Lille.

MANGELSDORF D J., ONG E.S., DYCK J.A and EVANS R.M.

Nuclear receptor that indentifies a novel retinoic acid response pathway.

Nature, 1990, **345**, 224-229.

MANGELSDORF D.J., UMESONO K., KLIEWER S.A., BORGMEYER U., ONG E.S. and EVANS R.M.

A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation of RXR and RAR.

Cell. 1991, **66**, 3, 555-561.

MANGELSDORF D.J., BORGMEYER U., HEYMAN R.A., ZHOU J.Y., ONG E.S., ORO A.E., KAKIZUKA. A and EVANS R.M.

Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9 cis retinoic acid.

Genes & Dev., 1992, **6**, 329-344.

MARTIN B., BERNARDON J.M., CAVEY M.T., BERNARD B., CARLAVAN I., CHARPENTIER B., PILGRIM W., SHROOT B. and REICHERT U.

Selective synthetic ligands for human nuclear retinoic acid receptors.

Skin Pharmacol., 1992, **5**, 57-65.

MARTINEZ E., DUSSERE Y., WAHLI W. and MERMOD N.

Synergistic transcriptional activation by CTF/NF-1 and the estrogen receptor involves stabilized interactions with a limiting target factor.

Mol. Cell. Biol., 1991, **11**, 2 937-2 945.

- MILLER J., Mc LACHLAN A.D. and KLUG A.
Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor III A from *Xenopus* ovocyte.
EMBO J., 1985, **4**, 1609-1614.
- MOORE W.T., MURTAUGH M.P and DAVIES J.P.
Retinoic acid induced expression of tissue transglutaminase in mouse peritoneal macrophages.
J. Biol.Chem, 1984, **259**, 12794-127802.
- NAAR A.M., BOUTIN J.M., LIPKIN S.M., YU V.C., HOLLOWAY J.M., GLASS C.K. and ROSENFELD. M.G.
The orientation and spacing of core DNA- binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors.
Cell, 1991, **65**, 1267-1279.
- NAGPAL S., SAUNDERS M., KASTNER P., DURAND B., NAKSHATRI H. and CHAMBON P.
Promoter context-and response element dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors
Cell., 1992, **70**, 1007-1919.
- NAGPAL S., FRIANT S., NAKSHATRI H. and CHAMBON P.
RARs and RXRs : evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization *in vivo*.
EMBO J., 1993, **12**, 6, 2349-2360.
- NAPOLI J.L.and RACE K.R.
Biogenesis of retinoic acid from β - carotene. Differences between the metabolism of β -carotene and retinal.
J. Biol. Chem., 1988, **263**, 17372-17377.
- NAPOLI J.L., POSCH K.P., FIORELLA P.D. and BOERMAN M.H.
Physiological occurrence, biosynthesis and metabolism of retinoic acid : evidence for roles of cellular retinol binding proteine (CRBP) and cellular retinoic binding protein (CRABP) in the pathway of retinoic acid homeostasis.
Biomed and Pharmacother., 1991, **45**, 131-143.
- NERVI C., GRIPPO J.F., SHERMAN M.I., GEORGE M.D. and JETTEN A.M.
Identification and characterization of nuclear retinoic acid-binding activity in human myeloblastic leukemia HL 60 cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, **86**, 5854-5858.

NICHOLSON R.C., MADER S., NAGPAL S., LEID M., ROCHETTE-EGLY C. and CHAMBON P.

Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoic acid is mediated by an AP 1 binding site.

EMBO J., 1990, **9**, 223-227.

NOJI S., NOHNO T., KOYAMA E., MUTO K., OHYAMA K., AOKI Y., TAMURA K., OHSUGI K., IDE H., TANIGUCHI S. and SAITO T.

Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud.

Nature, 1991, **350**, 83-86.

O'DONNELL A.L., ROSEN E.D., DARLING D.S. and KOENIG R.J.

Thyroid hormone receptor mutations that interfere with a transcriptional activation also interfere with receptor interaction with a nuclear protein.

Mol.Endocrinol., 1991, **5**, 94-99.

OLSSON I.L., BREITNANT R. and GALLO R.C.

Priming of human myeloid leukemia cell line HL60 and U937 with retinoic acid for differentiation effects of cyclic adenosine 3' : 5' -monophosphate-inducing agents and a T-lymphocyte-differentiation factor.

Cancer Res., 1982, **42**, 3928-3933.

ONG D.E. and CHYTIL F.

Cellular retinoic acid binding protein binding from rat testis.

J. Biol. Chem., 1978, **253**, 4551-4554.

ONG D.E.

A novel retinol binding protein from rat.

J. Biol. Chem., 1984, **259**, 1476-1482.

ONG D.E.

Retinoid metabolism during intestinal absorption.

J. Nutr., 1993, **123**, 351-355.

O' MALLEY B and MEANS A.

Female steroid hormones and target cell nuclei are of major importance in the induction of new cell functions.

Science, 1974, **183**, 610-620.

ORO A.E., Mc KEOWN M. and EVANS R.M.

Relationship between the product of the *drosophila ultraspiracle* locus and the vertebrate retinoid X receptor.

Nature, 1992, **347**, 298-301.

PANDOLFLI P.P., GRIGNANI F., ALCALAY M., MENCARELLI A., BIONDI.,
LOCOCO F., GRIGNANI F and PELICCI P.G.

Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR α cDNA and
characterisation of its retinoid-binding and transactivation properties.

Oncogene, 1991, **6**, 1285-1292.

PEREZ A., KASTNER P., SETHI S., LUTZ Y., REIBEL C. and CHAMBON P
PML-RAR homodimers : distinct DNA binding properties and heterodimeric interactions
with RXR.

Embo. J.,1993, **12**, 3171-3182.

PERLMANN T., RANGARAJAN P.N., UMESONO K. and EVANS R.M.

Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs.

Genes & Dev.,1993, **7**, 1411-1422.

PETKOVICH M., BRAND N.J., KRUST A. and CHAMBON P.

A human retinoic acid receptor which belongs to the family of the nuclear receptors.

Nature, 1987, **330**, 444-450.

PICARD D. and YAMAMOTO. K.

Two signals mediate hormone-dependant nuclear localization of the glucocorticoid receptor.

EMBO J. 1987, **6**, 3333-3340.

PINNOCK B. C. and ALDERMAN P.

The potential for teratogenicity of vitamin A and its congeners.

The Medical Journal of Australia, 1992, **157**, 804-809.

PLET A., RAYNAUD F. et EVAIN-BRION D.

Mécanisme d'action de l'acide rétinoïque.

Médecine\Sciences, 1988, **4**, 618-623.

POCHI P.E.

13 cis retinoic acid in severe acne.

N. Engl. Med., 1979, **300**, 369-380.

RAGSDALE C., PETKOVITCH M., GATES P., CHAMBON P. and BROCKES J.

Identification of a novel retinoic acid receptor in the generative tissues of the newt.

Nature, 1989, **341**, 654- 657.

RAGSDALE C., GATES P. and BROCKES J.

Identification and expression pattern of a second isoform of the newt α retinoic acid
receptor.

Nucl.Acids Res., 1992, **20**, 5851.

RANDO R.

Vitamin A isomerization mechanisms

Mechanism of action of retinoids, vitamin D and steroid hormones.

The Banff centre, Banff, Alberta, Canada, March 15-20, 1993.

REDDY A.P., CHEN J.Y., ZACHAREWSKI T., GRONEMEYER H., VOORDHEES J.J. and FISCHER G.J.

Characterization and purification of human retinoic acid receptor γ 1 overexpression in baculovirus-insect cell system.

Biochem J. 1992, **287**, 833-840.

REGNIER M. and DARMON M.

Human epidermis reconstructed *in vitro* : A model to study keratinocyte differentiation and its modulation by retinoic acid.

In vitro cellular & developmental Biology, 1989, **25**, 1000-1008.

RESS J.L., DALY A.K. and REDFERN C.P.F.

Differential expression of the α and β retinoic acid receptors in tissues of the rat.

Biochem J. 1989, **259**, 917-919.

ROBERTS A.B., FROLIK C.A., NICHOLS M.D. and SPORN M.B.

Retinoic dependent induction of the *in vivo* and *in vitro* metabolism of retinoic acid in tissue of the vitamin A deficient hamster.

J. Biol. Chem., 1979, **254**, 6303-6309.

ROBERTS A.B., LAMB L.C. and SPORN M.B.

Metabolism of all trans retinoic acid in hamster liver microsome : oxidation of 4-hydroxy to 4 keto-retinoic acid.

Arch. Biochem. Biophys., 1980, **159**, 374-383

ROBERTS A.B. and SPORN M.B.

Cellular biology and biochemistry of the retinoids.

The retinoids Vol 2., 1884.

ROCHETTE-EGLY C., LUTZ Y., SAUNDERS M., SCHEUER I., GAUB M.P. and CHAMBON P.

Retinoic acid receptor γ .

Specific immunodetection and phosphorylation.

J. Cell. Biol., 1991, **115**, 535-545.

aROSS C.A.

Cellular metabolism and activation of retinoids : roles of cellular retinoid binding proteins.

FASEB J., 1993, **7**, 317-327.

bROSS C.A.

Overview of retinoid metabolism.

J. Nutr., 1993, **123**, 346-350.

ROTTMAN N.J., WIDOM R.L., NADAR-GINARD B., MAHDAVI V. and KARATHANASIS SK.

A retinoic acid response element in the apolipoprotein A1 gene distinguishes between two different retinoic acid response partways.
Mol.Cell.Biol., 1991, **11**, 3814-3820.

ROWE A., EAGER N.S.C. and BRICKEL P.M.

A member of the RXR nuclear receptor family is expressed in neural-crest-derived cells of the developing chick peripheral nervous system.
Development, 1991, **111**, 213-222.

ROWLEY J, D., GOLOMB H.M. and DOUGHERTY C.

15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukemia.
Lancet, 1977, i : 549-450.

RUSH MG., HAQ R and Chytil F.

Opposing effects of retinoic acid and dexamethasone on cellular retinol binding protein ribonucleic acid levels in the rat.
Endocrinology, 1991, **129**, 705-709.

SABLONNIERE B., DALLERY.N., GRILLIER I., FORMSTECHEP P. and DAUTREVAUX.

Physicochemical parameters affecting the charcoal adsorption assay for quantitative retinoid-binding measurement.
Anal. Biochem., 1994, in press

SABLONNIERE B., DALLERY N., DANZE P.M., HUBLAU P., FORMSTECHEP P and DAUTREVAUX M.

Hydrodynamic characterization and DNA binding properties of the liganded forms and unliganded forms of the retinoic acid receptor α from human HL 60 cells.
Biochim. Biophys. Acta., 1993, **1220**, 85-93.

SACHS L.

Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukemia.
Nature, 1978, **274**, 535-539.

SAMBROOK J., FRISCH AND MANIATIS T

Molecular cloning
Cold Spring harbord laboratory press, 1989.

SANI B.P., SINGH R.K., LASHMI G.R. and GAUB M.P.

Isolation, partial purification and characterization of nuclear retinoic acid receptor from chick skin
Arch. Biochem. Biophys., 1990, **75**, 293-304.

- SCHENA M., FREEDMAN L.P. and YAMAMOTO K.R.
Mutations in the glucocorticoid receptor zinc finger region that distinguish interdigitated DNA binding and transcriptional enhancement activities.
Genes & Dev, 1989, **3**, 1590-1601.
- SCHREIBER V., de MURCIA. G et MENISSIER de MURCIA J.
Le transport des protéines dans le noyau : les protéines de localisation nucléaire et leurs récepteurs.
Medecine/Sciences 1992, **8**, 134-139.
- SCHROFF G., NEWMANN G and SORG C.
Transglutaminase as a marker for subsets of murine macrophages.
Eur. J. Immunol, 1981, **11**, 637-642.
- SCHULE R., UMESONO K., MANGELSDORF D.J., BOLADO J., PIKE J.W. and EVANS R.M.
Jun -Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene.
Cell, 1990, **61**, 497-504.
- SCHÜLE R., RANGARAJAN P., YAN N., KLIEWER S., RANSONE L., BOLADO J., VERMA I.M. and EVANS R.M.
Retinoic acid is a negative regulator of AP1 responsive genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, **88**, 6092-6096.
- SCHWABE J.W.R., NEUHAUS D. and RHODE S.
Solution structure of the DNA-binding domain of the estrogen receptor.
Nature, 1990, **348**, 458-461.
- SEED B., SHEN J-Y.
A simple phase extraction assay for chloramphenicol acetyl transferase activity.
Gene, 1988, **67**, 271-277.
- SENDOGORTA E., LESIEWICZ J. and ARMSTRONG R.B.
Topical isotretinoin for photodamaged skin.
J. Am. Acad. Dermatol. Supl., 1992, S15-S18.
- SEVERNE Y., WIELAND S., SCHAFFNER W. and RUSCONI S.
Metal binding "finger" structures in the glucocorticoid receptor defined by site - directed mutagenesis.
EMBO J., 1988, **7**, 2503-2508.
- SHUDO K., KAGECHIKA H., KAWACHI E. and HASHINOTO Y.
Y.Chalcone carboxylic acids. Potent differentiation inducers of human promyelocytic cells HL60.
Chem. Pharm. Bull, 1985, **33**, 404-407.

SLACK, J.M.W.

We have a morphogen!

Nature, 1987, **327**, 553-554.

SMITH M.A., PARKISON D.R. and LIPPMAN M.N.

Retinoid in cancer therapy.

J. Clin. Oncol., 1992, **10**, 839-864.

SMITH W. C., NAKSHATRI H., LEROY P., REES J. and CHAMBON P.

A retinoic acid response element is present in the mouse cellular retinol binding protein I (mCRBP) promoter.

EMBO J., 1991, **8**, 2223-2230.

SPORN M.P.

Retinyl acetate : effect of cellular contact on RNA in epidermis in cell culture in chemically defined medium.

Science, 1973, **182**, 722-723.

SPORN M.P., CLAMON G.H., DUNLOP N.M., NEWTON DL., SMITH JM. and SAFFLOTTI U.

Activity of vitamin A analogues in cell cultures of mouse epidermis and organ cultures of hamster trachea.

Nature, 1975, **253**, 47-50.

SPORN M.P.

Approaches to prevention of epithelial cancer during the Preneoplastic period.

Cancer Res., 1976, **36**, 2699-2707.

SPORN M.B. and ROBERTS A.B.

Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis.

Cancer Res., 1983, **43**, 3034-3040.

SPORN M.B. and ROBERTS A.B.

What is a retinoid?

in "retinoids, differentiation and disease". Ciba foundation Symposium, 113, Pitman Eds, London, 1985, 1-5.

SPRUCE L.W., RAJADHYAKSHA S.N., BERLIN K.P., GALE J.B., HOSSAIN M.B., VAN DER HELM D. and BREITMAN T.

Heteroaroretinoids. Synthesis, characterization and biological activity in terms of an assessment of these systems to inhibit the induction of ornithine decarboxylase activity and induce terminal differentiation of HL60 cells.

J. Med. Chem., 1987, **30**, 1474-1482.

STRICKLAND S. and MAHDAVI V.

The induction of the differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid

Cell, 1978, **15**, 393.

STRICKLAND S., BREITMAN T.R., FRICKEL F., NURRENBACH A., HADICKE E. and SPORN M.B.

Structure-activity relationships of a new series of retinoidal benzoic acid derivatives as measured by induction of differentiation of murine F9 teratocarcinoma cells and human HL 60 promyelocytic leukemia cells.
Cancer Res., 1983, **43**, 5268-5272.

STUDER U.E., BIEDERMAN C., CHOLLET D., KARRER D. and KRAKT M.
Prevention of recurrent superficial bladder tumor by oral etretinate ; preliminary results of a randomized, double blind multicenter trial in Switzerland.
Switzerland J. Urol., 1984, **131**, 47-49.

SUEDHOFF T., BIRCKBICHLER P.J., LEE K.N., CONWAY E and PATTERSON M.K.
Differential expression of transglutaminase in human erytroleukemia cells in response to retinoic acid.
Cancer Res., 1990, **50**, 7830-7 834.

SUMMERS M.D. and SMITH G.E.
A manual of methods for baculovirus vectors and insects cells cultures procedures.
Texas Agricultural Experiment Station, 1987, bulletin N° 1555.

TABIN C.J.
Retinoids, homeoboxes and growth factors : toward molecular models for limb development.
Cell, 1991, **66**, 199-217.

TAKAHASHI N. and BREITMAN T.R.
Covalent modification of proteins by ligands of steroid hormone receptors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, **89**, 10807-10811.

THALLER C. and EICHELE G.
Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud.
Nature, 1987, **327**, 625-627.

THALLER C. and EICHELE G.
Isolation of 3,4-didehydroretinoic acid, a novel morphogenic signal in the chick limb bud.
Nature, 1990, **345**, 815-819.

TINI M., OTULAKOWSKI G., BREITMAN M.L., TSUI L.C and GIGUERE V.
An everted repeat mediate retinoic acid induction of the γ F crystallin gene : evidence of a direct role for retinoids in lens development.
Genes & Dev., 1993, **336**, 295-307.

TIOLLAIS P., DEJEAN A. and BUENDIA M.A.
Virus de l'hépatite B et hépatocarcinome.
Pour la Science 1991, **6**, 96-97..

- TSAI S.Y., CARLSTEDT-DUKE J., WEIGEL N., DAHLMAN K., GUSTAFSSON J.,
TSAI M. and O'MALLEY W.
Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element : evidence for
receptor dimer formation.
Cell, 1988, **55**, 361-369.
- UMESONO K., GIGUERE V., GLASS C.K., ROSENFELD M.G. and EVANS R.M.
Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive
element.
Nature, 1988, **336**, 262-265.
- UMESONO K. and EVANS R.M.
Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors.
Cell, 1989, **57**, 1139-1146.
- UMESONO K., MURAKAMI K.K., THOMPSON C.C. and EVANS R. M.
Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and
vitamin D3 receptors.
Cell, 1991, **65**, 1255-1266.
- VAN DEN BOSSCHE H. and WILLEMSSENS G.
In " Retinoids : 10 years on " BASEL KARGER
SAURAT J.H..(Ed), Geneva, 1991, pp 79-88.
- VERMA A.K., SLAGA T.J., WERTZ P.W., MEULLER G.C. and BOUTWELL R.K.
Inhibition of skin tumor promotion by retinoic acid and its metabolic 5-6 epoxyretinoid
acid.
Cancer Res., 1980, **40**, 2367-2371.
- VIOLETTE SM., KING I and SARTORELLI A.C.
Antagonistic effects of retinoic acid and hydrocortisone on terminal differentiation of human
squamous carcinoma cells.
J-Invest. Dermatol., 1989, **1**, 165-168.
- WALD G.
Molecular basis of visual excitations.
Science, 1968, **162**, 24-60.
- WANEK N., GARDINER D.M., MUNEOKA K. and BRYANT S.V.
Conservation by retinoic acid of anterior cells into ZPA cells in the chicken wing bud.
Nature, 1991, **350**, 81-83.
- WAUGH K.M., BERLIN K.D., FORD W.T., HOLT E.M., CARROL J.P., SCHOMBER
P.M., THOMPSON M.D and SCHIFF L.J.
Synthesis and characterization of the selected heteroaroretinoids.
J. Med. Chem. 1985, **28**, 116-124.

WEBSTER N.J.G., GREEN S., TASSET D., PONGLIKITMONGKO L. and CHAMBON P.

The transcriptional activation function located in the hormone-binding domain of the human estrogen receptor is not encoded in a single exon.

EMBO J., 1989, **8**, 1441-1446.

WEINBERGER C., HOLLENBERGER S.M., ROSENFELD M.G. and EVANS R.M.

Domain structure of the human glucocorticoid receptor and its relationships to the V.erb A oncogene product.

Nature, 1985, **318**, 670-672.

WILSON T.E., PAULSEN R.E., PADGETT K.A. and MILBRAND J.

Participation of nonzinc finger residues in DNA-binding by two nuclear orphan receptors.

Science, 1992, **256**, 107-110.

WOLBACH S.B. and HOWE P.R.

Tissue change following deprivation of fat liposoluble A Vitamin.

J. Exp. Med., 1925, **42**, 768-777.

WOLF G.

The newly discovered retinoic acid X receptors (RXRs).

Nutri. Rev., 1993, **51**, 81-84.

WOODCOCK-MITCHELL J., EICHNER R., NELSON WG. and SUN T.T.

Immuno-localization of keratine polypeptides in human epidermis, using monoclonal antibodies.

J. Cell. Biol., 1982, **95**, 580-588.

YAMAKAWA T., KAGECHIKA H., KAWACHI H., HASHIMOTO Y. and SHUDO K.

Retinobenzoic acids.5. Retinoidale activity of compounds having a trimethylsilyl or a trimethygermyl groups in human promyelocytic leukemia cells HL60.

J. Med. Chem., 1990, **33**, 1430-1437.

YANG N.A., SCHÜLE R., MANGELSDORF D.J. and EVANS R.M.

Characterization of DNA binding and retinoic acid binding properties of retinoic acid receptor.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991, **88**, 3559-3563.

YU V.C., DELSERT C., ANDERSEN B., HOLLOWAY J.M., DEVARY O V., NAAR

A.M., YUN KIM S., BOUTIN J.M., GLASS C.K. and ROSENFELD M.G.

RXR β : a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements.

Cell, 1991, **67**, 1251-1266.

YUSPA S. H., BEN T. and STEINER P.

Retinoic acid induces transglutaminase activity but inhibits cornification of cultured epidermal cells.

J. Biol. Chem., 1982, **257**, 9906- 9908.

YUSPA S. H. and HARRIS C.C.

Altered differential of mouse epidermal cells treated with retinyl acetate *in vitro*.
Exp. Cell Res., 1974, **86**, 260-274.

ZELENT A., KRUST A., PETKOVICH M., KASTNER P. and CHAMBON P.

Cloning of a murine α and β retinoic acid receptors and a novel receptor γ predominantly expressed in the skin.
Nature, 1989, **339**, 714-717.

ZHANG X.K., WILLS K.N., GRAUPNER G., TZUKERMAN M., HERMANN T. and PFAHL M.

Ligand-binding domain of thyroid hormone receptors modulates DNA binding and determines their bifunctional roles.
The New Biol., 1991, **3**, 169-181.

ZHANG X.K., WILLS K.N., HUSMANN M., HERMANN T. and PFAHL M.

Novel pathway for thyroid hormone receptor action through interaction with jun and fos oncogene activities.
Mol. Cell. Biol., 1991, **11**, 6016-6025.

ZHANG X.K., HOFFMANN B., TRAN P.B.V., GRAUPNER G. and PFAHL M.

Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone receptors.
Nature, 1992, **355**, 441-446.