

gen 20107148

00376  
1996  
87

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE**

Année 1996

N° d'ordre :

**THESE**

présentée à l'Université de Lille I pour l'obtention du grade de

**Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé**

Option :

**Biochimie, Biologie cellulaire et moléculaire**

par

**Ali TAHAYATO**



**ROLES DES PROCESSUS DE PHOSPHORYLATION ET  
DEPHOSPHORYLATION DANS LE MECANISME  
D'ACTION DES RETINOIDES**

**Soutenu le 29 Février 1996 devant la Commission d'Examen :**

**Président** : Professeur A. VERBERT

**Rapporteurs** : Docteur A. MANTEL  
Professeur J. CHAMBAZ

**Examineurs** : Professeur B. BOILLY  
Professeur P. FORMSTECHE

*A la mémoire de mon Père,  
A ma Mère,  
A mes Frères et Soeurs.*

*En témoignage de ma profonde reconnaissance et en remerciement de leurs soutien tout au long de  
mes études.*

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué au Laboratoire de Biochimie Structurale (CJF INSERM 92-03) de la Faculté de Médecine de Lille dirigé par Monsieur le Professeur P. Formstecher.

Ce travail a été financé par l'INSERM, l'Association de la Recherche sur le Cancer, la Fédération Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer, le C.H.R.U de Lille, le Conseil Régional du Nord-Pas de Calais et le Ministère de l'Education Nationale du MAROC.

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

Je remercie Madame le Docteur Anne MANTEL et Monsieur le Professeur Edmond CHAMBAZ d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Bénoni BOILLY d'avoir accepté spontanément d'examiner ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur Pierre FORMSTECHE qui m'a accueilli dans son laboratoire.

Je voudrais adresser un grand merci à mon tuteur et ami le Docteur Philippe LEFEBVRE à qui je dois tout ce que j'ai appris. J'ai énormément apprécié ta disponibilité, ta grande patience et ton inébranlable optimisme. Désolé pour la quantité de cheveux que je t'ai fait perdre. Saches que tu as ma gratitude éternelle "foi de Gurney"!

Je voudrais remercier mes compagnons thésards (Bruce, Chris et Nono) avec qui faire de la recherche est devenu une vraie partie de plaisir !

A Titine, j'exprime toute mon affection.

Enfin je remercie tous les autres membres du laboratoire, tout particulièrement Olga et Suzanna, pour leur sympathie et gentillesse.



# SOMMAIRE

<b>RESUME</b> .....	6
<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b> .....	7
<b>ABREVIATIONS</b> .....	8
<b>PRESENTATION DU MEMOIRE</b> .....	9
<b>REVUE GENERALE</b> .....	11
<b>Chapitre I : LES RETINOIDES</b> .....	11
<b>A/ DECOUVERTE ET STRUCTURE :</b> .....	12
<b>B/ METABOLISME DES RETINOIDES :</b> .....	12
<b>C/ LES EFFETS BIOLOGIQUES DES RETINOIDES :</b> .....	18
<b>I/ LES RETINOIDES ET LE DEVELOPPEMENT DES MEMBRES :</b> 18	
<b>1/ FORMATION DES MEMBRES CHEZ LES VERTÉBRÉS :</b> 18	
<b>2/ L'ACIDE RÉTINOÏQUE, UN MORPHOGENE DÉCHU !</b> . 18	
<b>II/ LES RETINOIDES ET L'AXE ANTEROPOSTERIEUR :</b> .....	20
<b>1/ LES GÈNES HOMÉOTIQUES :</b> .....	20
<b>2/ L'ACIDE RÉTINOÏQUE ET LA RÉGULATION DES GÈNES</b>	
<b>HOMÉOTIQUES :</b> .....	22
<b>III/ LES RETINOIDES ET LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE :</b> 24	
<b>IV// LES RETINOIDES ET L'APOPTOSE :</b> .....	25
<b>V/ LES RETINOIDES : UN ESPOIR DANS LA THERAPIE</b>	
<b>ANTI-CANCEREUSE :</b> .....	26
<b>D/ LE MECANISME D'ACTION DES RETINOIDES :</b> .....	26
<b>I/ LES PROTEINES LIANT LES RETINOIDES ET LEURS</b>	
<b>DISTRIBUTION TISSULAIRE :</b> .....	27
<b>1/ PROTEINE CYTOPLASMIQUE LIANT L'ATRA (CRABP) :</b> 27	
<b>2/ LES RÉCEPTEURS DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE TOUT</b>	
<b>TRANS (ATRA) :</b> .....	27
<b>3/ LES RÉCEPTEURS X DES RÉTINOÏDES :</b> .....	29
<b>4/ LA DISTRIBUTION TISSULAIRE DES RARS ET RXRS :</b> 29	

## **II/ STRUCTURE ET FONCTION DES RECEPTEURS DES**

<b>RETINOIDES:</b> .....	32
<b>1/ LE DBD, UN ENSEMBLE COMPLEXE DE "BOÎTES" :</b> ..	32
a/ LA BOÎTE P : .....	34
b/ LES BOÎTES D ET DR : .....	34
c/ LA BOÎTE T : .....	34
d/ LA BOÎTE A : .....	36
<b>2/ LES ELEMENTS DE REPONSES AUX RETINOÏDES</b>	
<b>(RARES ET RXRES) :</b> .....	37
<b>3/ L'ACTIVITE DE TRANSACTIVATION :</b> .....	41
a/ AF1 : .....	41
b/ AF2, UN DOMAINE ACIDE IMPLIQUÉ DANS LA	
TRANSACTIVATION ! .....	42
<b>4/ ACTIVITE DE DIMERISATION ET DE LIAISON AU</b>	
<b>LIGAND :</b> .....	44
a/ LE DOMAINE DE LIAISON AU LIGAND : .....	44
b/ L'INTERFACE DE DIMÉRISATION : .....	47
<b>5/ LE ROLE CENTRAL DU RXR :</b> .....	49

<b>Chapitre II : PHOSPHORYLATION ET DEPHOSPHORYLATION :</b> .....	53
<b>A/INTRODUCTION :</b> .....	54
<b>B/ LA FAMILLE DES PROTEINES KINASES C:</b> .....	54
<b>I/ STRUCTURE :</b> .....	56
<b>1/ LA REGION REGULATRICE :</b> .....	56
a/ DOMAINE C1 : .....	56
b/ PSEUDOSUBSTRAT : .....	58
c/ DOMAINE C2 : .....	58
<b>2/LA REGION CATALYTIQUE :</b> .....	60
<b>II/ REGULATION DE L'ACTIVITE DES PKCs :</b> .....	61
<b>1/ DIACYLGLYCEROL ET PHOSPHOLIPIDES :</b> .....	61
<b>2/ LE CALCIUM :</b> .....	61
<b>3/ PHOSPHORYLATION DES PKCs:</b> .....	63

4/ LES RECEPTEURS DE LA PKC ACTIVEE: .....	64
5/ PKCs ET PROTEASES : .....	66
6/ PKC ET RETINOIDES : .....	66
III/ EFFETS BIOLOGIQUES DES PKC : .....	67
1/ PKC ET DIFFERENCIATION EPITHELIALE : .....	67
2/ PKC ET DIFFERENCIATION DES CELLULES HL-60 : ..	67
C/ LES PHOSPHATASES : .....	68
I/ PROTEINE PHOSPHATASE 1 (PP1) : .....	68
II/ PROTEINE PHOSPHATASE 2A (PP2A) : .....	70
III/ PROTEINE PHOSPHATASE 2B (PP2B) : .....	70
IV/ PROTEINE PHOSPHATASE 2C (PP2C) : .....	71
V/ CONCLUSION : .....	71
Chapitre III : LA PHOSPHORYLATION ET LES RECEPTEURS NUCLEAIRES :	72
A/ DONNEES INDIRECTES : .....	73
B/ PHOSPHORYLATION DIRECTE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES : ..	74
A/ RECEPTEURS AUX GLUCOCORTICOIDES : .....	74
B/ RECEPTEURS A LA PROGESTERONE : .....	74
C/ LES RECEPTEURS AUX OESTROGENES : .....	75
D/ LES RECEPTEURS AUX ANDROGENES : .....	76
E/ LES RECEPTEURS A LA VITAMINE D : .....	76
F/ LES RECEPTEURS AUX HORMONES THYROIDIENNES : .....	76
G/ CONCLUSION : .....	77
RESULTATS : .....	79
1ère PARTIE : PROTEINES KINASES ET RETINOIDES : .....	80
A/ L'APPROCHE EXPERIMENTALE : .....	80
B/ LA VOIE DES PROTEINES KINASES AMPc DEPENDANTE (PKA) : ..	82
C/ LE CALCIUM : .....	85
D/ LA VOIE DES TYROSINE KINASES : .....	85
E/ LA VOIE DES PROTEINES KINASES C : .....	87
1- RESUME DE L'ARTICLE I : .....	87

2- ARTICLE I :	87
3- DISCUSSION :	100
<b>F/ LA VOIE DES PROTEINES KINASES C : Travaux non publiés</b>	101
1/ La phosphorylation de hRAR $\alpha$ par la PKC réduit sa capacité de dimérisation avec RXR:	101
2/ RAR $\alpha$ est phosphorylé <i>in vitro</i> par la PKC sur des résidus sérine:	101
3/ La PKC phosphoryle hRAR $\alpha$ <i>in vitro</i> sur la sérine 157et/ou 154 :	104
4/ Conclusion:	107
<b>2ème PARTIE : LES PHOSPHATASES ET LES RETINOIDES :</b>	109
1- RESUME DE L'ARTICLE II :	109
2- ARTICLE II :	109
3- DISCUSSION :	111
<b>DISCUSSION GENERALE:</b>	123
<b>MATERIELS &amp; METHODES :</b>	127
<b>PARTIE I: BACTERIES ET PREPARATION DE PLASMIDES :</b>	128
A/ PREPARATION DE BOITES DE PETRI A AGAROSE :	128
B/ PREPARATION DES BACTERIES COMPETENTES :	128
C/ TRANSFORMATION DES BACTERIES COMPETENTES :	129
D/ TRANSFORMATION DES BACTERIES PAR ELECTROPORATION :	130
E/ PREPARATION DE PLASMIDE :	130
I/ PREPARATION DE PLASMIDE SELON QUIAGEN :	131
II/ MINIPREPARATION DE PLASMIDE PAR CHLORURE DE LITHIUM:	132
III/ MINIPREPARATION DE PLASMIDE PAR PEG :	133
IV/ PURIFICATION DE FRAGMENTS D'ADN PAR MEMBRANE DEAE :	134
<b>PARTIE II : CULTURE CELLULAIRE ET TRANSFECTION TRANSITOIRE. . .</b>	134
A/ LIGNÉE CELLULAIRE :	134
B/ TRANSFECTION TRANSITOIRE :	135

<b>C/ DOSAGE DE L'ACTIVITÉ CAT :</b> .....	136
<b>PARTIE III : PURIFICATION ET ANALYSE DE PROTEINES :</b> .....	137
<b>A/ SUREXPRESSON ET PURIFICATION DE PROTEINES</b>	
<b>RECOMBINANTES :</b> .....	137
<b>B/ HETERODIMERISATION DE RAR/RXR DANS UN MILIEU</b>	
<b>HETEROGENE :</b> .....	139
<b>C/ PHOSPHORYLATION IN VITRO DE hRAR<math>\alpha</math> PAR LA PKC :</b> .....	140
<b>D/ HYDROLYSE ACIDE DES PROTEINES MARQUEES AU [<sup>32</sup>P] :</b> ....	140
<b>E/ DETERMINATION DES SITES PHOSPHORYLES :</b> .....	143
<b>BIBLIOGRAPHIE :</b> .....	145

## RESUME

La vitamine A et ses dérivés naturels ou synthétiques (les rétinoïdes) sont impliqués dans plusieurs processus biologiques fondamentaux, comme la reproduction, la vision, la différenciation cellulaire, l'hématopoïèse, et le développement embryonnaire. De plus, certains rétinoïdes ont des puissants effets anti-prolifératifs et sont utilisés dans le traitement de plusieurs maladies, comme le psoriasis et les leucémies myéloblastiques et promyélocytaires. Les effets biologiques des rétinoïdes passent par leur interaction avec des récepteurs nucléaires (RARs et RXRs). Par ailleurs, de plus en plus de résultats illustrent l'ampleur de l'importance des voies de phosphorylation dans les fonctions cellulaires.

Dans ce travail, nous avons montré que la voie des protéines kinases C est nécessaire pour la transactivation induite par les rétinoïdes. Les PKCs sont requises pour stabiliser l'interaction du complexe RARs/ligand avec l'ADN; elles sont aussi impliquées dans le transport des RARS vers le noyau. Les PKCs phosphorylent directement l'isoforme RAR $\alpha$  humaine sur des résidus sérines (Ser157 et/ou 154). Cette phosphorylation affecte la capacité des RARs à former des hétérodimères RAR/RXR.

Nous nous sommes également intéressés au rôle joué par les phosphatases (PP1 et PP2A) dans le mécanisme d'action des rétinoïdes. L'inhibition de PP1 et PP2A par l'acide okadaïque (AO) stimule la transactivation induite par les rétinoïdes. Cette stimulation dépend du type de l'élément de réponse et ne nécessite pas la présence du ligand. La surexpression de ces phosphatases induit une inhibition de la transactivation de gènes reporter par les RARS. L'AO augmente l'affinité de l'hétérodimère RAR/RXR pour ses éléments de réponse.

Tous ces résultats montrent que l'action des rétinoïdes est modulée par un mécanisme mettant en jeu la phosphorylation de leurs récepteurs.

# PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

## PUBLICATIONS :

A protein kinase C-dependent activity modulates retinoic acid-induced transcription  
**Ali Tahayato**, Philippe Lefebvre, Pierre Formstecher, and Michel Dautrevaux.  
Molecular Endocrinology 7: 1642-1653, 1993.

Protein phosphatases 1 and 2A regulates the transcriptional and DNA-binding activities of retinoic acid receptors.  
Philippe Lefebvre, Marie-Pierre Gaub, **Ali Tahayato**, Cécile Rochette-Egly and Pierre Formstecher.  
Journal of Biological Chemistry 270: 10806-10816, 1995.

## COMMUNICATIONS.:

La voie de la protéine kinase C est impliquée dans le mécanisme d'action de l'acide rétinoïque.  
**Ali Tahayato**, Philippe Lefebvre, William Bourget, Pierre Formstecher and Michel Dautrevaux.  
JOURNEES FRANCO-BELGES DE PHARMACOCHEMIE, 1993 Lille.

Modulators of phosphorylation pathways alter retinoic acid receptor alpha-induced transcription.  
Philippe Lefebvre, **Ali Tahayato**, William Bourget, Pierre Formstecher and Michel Dautrevaux.  
The Annual Meeting of the American Association for the Advancement of Science.  
February, 10-12, 1993 - Boston.

Protein-kinase C activity is required for retinoic acid-induced transcription  
Philippe Lefebvre, **Ali Tahayato** and Pierre Formstecher.  
1994 Keystone symposia on the steroid/Thyroid/Retinoic acid super gene family.

La depletion des cellules Cos-7 en protéines kinases C entraîne une diminution de la transactivation induite par l'acide rétinoïque.  
**Ali Tahayato**, Philippe Lefebvre and Pierre Formstecher.  
XXI<sup>e</sup> Forum Des Jeunes Chercheurs  
Université de Reims Champagne-Ardennes, 5-8 Juillet 1994.

Regulation of the function of nuclear receptors  
Philippe Lefebvre, Pascal Dao Phan, Bruno Lefebvre, Christophe Rachez, **Ali Tahayato** and Pierre Formstecher.  
EMBO Workshop, Ponto Conte, Italy, April 27-30, 1995.

## ABREVIATIONS

<b>AA</b>	: acide aminé	<b>LBD</b>	: ligand binding domain
<b>ADN</b>	: acide désoxyribonucléique	<b>LDL</b>	: lipoprotéines de faible densité
<b>ADNc</b>	: ADN complémentaire	<b>MMTV</b>	: mouse mammary tumor virus
<b>AER</b>	: Apical ectodermic ridge	<b>PAGE</b>	: électrophorèse sur gel de polyacrylamide.
<b>AF</b>	: activation function	<b>PC</b>	: phosphatidylcholine
<b>AGI</b>	: acide gras insaturé	<b>PIP2</b>	: phosphatidylinositol biphosphate
<b>AMPc</b>	: adénosine monophosphate cyclique	<b>PIP3</b>	: phosphoinositol trisphosphate
<b>AO</b>	: acide okadaïque.	<b>PKA</b>	: protéine kinase AMPc dépendante.
<b>AR</b>	: récepteur aux androgènes.	<b>PKC</b>	: protéine kinase calcium dépendante.
<b>ATRA</b>	: acide rétinoïque tout-trans.	<b>PLA2</b>	: phospholipase A2
<b>CAT</b>	: chloramphénicol acétyl transférase.	<b>PLC</b>	: phospholipase C
<b>CMs</b>	: chylomicrons modifiés	<b>PP1</b>	: protéine-phosphatase 1.
<b>CM-EsR</b>	: CMs complexés aux esters de rétinol	<b>PP2A</b>	: protéine-phosphatase 2A.
<b>C-EsR</b>	: chylomicron complexé aux esters de rétinol	<b>PR</b>	: récepteur à la progestérone.
<b>CRABP</b>	: cellular retinoic acid binding protein	<b>PS</b>	: phosphatidylsérine
<b>CRBP</b>	: cellular retinol binding protein	<b>RACK</b>	: receptors for activated C-kinases
<b>DAG</b>	: diacylglycérol	<b>RAREs</b>	: éléments de réponse à l'acide rétinoïque.
<b>dbAMPc</b>	: dibutyryl adénosine monophosphate cyclique.	<b>RARs</b>	: récepteurs à l'acide rétinoïque.
<b>DBD</b>	: DNA binding domain	<b>RBP</b>	: retinol binding protein
<b>DR</b>	: direct repeat	<b>ROH</b>	: rétinol
<b>DTT</b>	: dithiothreitol	<b>RXRs</b>	: récepteurs à l'acide 9cis rétinoïque.
<b>ER</b>	: récepteur aux oestrogènes.	<b>SDS</b>	: sodium dodecyl sulfate.
<b>ERE</b>	: éléments de réponse aux oestrogènes	<b>T<sub>3</sub>R</b>	: récepteur aux hormones thyroïdiennes.
<b>EsR</b>	: esters de rétinol	<b>TRE</b>	: éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes
<b>GNS</b>	: génistéine.	<b>TPA</b>	: 12-O-TétradecanoylPhorbol 13-Acétate.
<b>GR</b>	: récepteur aux glucocorticoïdes.	<b>TTR</b>	: transthyréine
<b>GRE</b>	: éléments de réponse aux glucocorticoïdes	<b>VDR</b>	: récepteur de la vitamine D.
<b>Hox</b>	: gènes homéotiques de vertébrés	<b>VDRE</b>	: éléments de réponse de la vitamine D
<b>hRAR<math>\alpha</math></b>	: récepteur humain de l'acide rétinoïque de type alpha.	<b>ZPA</b>	: zone à activité polarisante
<b>HR</b>	: heptad repeat		
<b>HRE</b>	: hormone responsive element		
<b>IP3</b>	: inositol trisphosphate		
<b>kDa</b>	: kilodalton.		



# PRESENTATION DU MEMOIRE

Au sein d'un organisme, une cellule est perpétuellement soumise à un flux de signaux extracellulaires qui agissent au niveau de récepteurs membranaires ou au niveau de récepteurs nucléaires. Ces signaux *via* l'activation de ces récepteurs vont moduler des processus biologiques aussi importants que la différenciation et la prolifération cellulaire. Parmi ces signaux extracellulaires, nous distinguons les hormones, les facteurs de croissance, les cytokines, et les neuropeptides. Notre travail apporte une modeste contribution à la compréhension des interactions impliquant les voies de phosphorylation et déphosphorylation, et le mécanisme d'action des rétinoïdes.

Dans la première partie des généralités, nous avons essayé de faire sentir au lecteur l'importance des rétinoïdes dans les processus du développement et de morphogénèse, ainsi que dans la différenciation cellulaire et le potentiel que représentent ces molécules dans le traitement de certains cancers. Ensuite, j'ai voulu familiariser le lecteur avec la structure et le mécanisme d'action des récepteurs aux rétinoïdes. J'avoue que certains paragraphes comme celui traitant de la dimérisation ou celui abordant le rôle du RXR sont difficiles à assimiler, mais c'est essentiellement parce que nous n'avons pas le recul nécessaire dans le temps pour pouvoir intégrer les récentes données dans un modèle cohérent.

La deuxième partie des généralités a été consacrée essentiellement à la voie des protéines kinase C, où j'ai essayé de mettre l'accent sur la diversité structurale et fonctionnelle des différents isoformes constituant la famille des PKCs. Pour faire apprécier le caractère unique des PKC, j'ai également décrit les mécanismes de régulation par le pseudosubstrat, les protéases et leurs interactions avec des récepteurs intracellulaires. A la fin de cette partie, j'ai décrit brièvement la famille des sérine/thréonine phosphatases. A l'inverse des PKCs, les phosphatases sont encore mal connues et les données sur les mécanismes régissant leurs spécificités de reconnaissance du substrat restent fragmentaires.

La troisième partie des généralités est un résumé de nos connaissances actuelles sur l'importance de la phosphorylation dans le mécanisme d'action des récepteurs nucléaires. Dans cet objectif et vu l'ampleur des données dans ce domaine, nous avons choisi de ne présenter que les travaux permettant l'identification des sites de phosphorylation sur les récepteurs nucléaires, ainsi que les effets de la mutation de ces sites sur leurs activités. Le lecteur remarquera que dans cette partie nous n'avons pas abordé la phosphorylation des récepteurs aux rétinoïdes car nous avons préféré la traiter en détail dans la partie résultat.

La partie résultat comporte deux volets majeurs ; l'un consacré à l'étude des interactions des kinases avec le mécanisme des rétinoïdes et l'autre traitant du rôle des phosphatases dans ce mécanisme. Dans le premier volet, nous avons présenté les résultats concernant la voie de la protéine kinase A, des tyrosine kinases

et du calcium. Les résultats traitant de la protéine kinase C sont divisés en deux parties; une première partie sous forme d'un article inséré dans le mémoire et la deuxième partie traitant des résultats que ne sont pas encore publiés. Dans le deuxième volet, sous forme d'un article inséré, nous présentons les résultats sur l'implication des phosphatases dans le mécanisme des rétinoïdes. Ce travail, qui vient d'être publié, a été fait en collaboration avec le groupe de Pierre Chambon.

Dans la partie matériels et méthodes nous décrivons les protocoles qui ne sont pas déjà abordés dans les articles insérés. Enfin, ce mémoire se termine par une discussion où nous reprenons les principaux résultats que nous avons obtenus, en essayant de mettre l'accent sur l'aspect perspective de ces résultats

**REVUE GENERALE**  
**Chapitre I : LES RETINOIDES**

## **A/ DECOUVERTE ET STRUCTURE :**

La vitamine A, source principale des rétinoïdes, est impliquée dans de nombreux processus biologiques. Elle intervient notamment dans la reproduction, la croissance et les mécanismes de la vision. La structure de la vitamine A a été caractérisée par Karrer et coll. en 1931 (Karrer et al., 1931). Quelques années plus tard, Arens et Van Dorp ont synthétisé l'acide rétinoïque tout trans (ATRA) (Arens et al., 1946) et ils ont montré que celui-ci est capable de rétablir la croissance de rats déficients en vitamine A. Malgré cette découverte, le rôle de l'acide rétinoïque n'a pas été pleinement apprécié, probablement à cause de l'intérêt suscité à l'époque par le rétinol dans le processus de la vision. Il a fallu attendre les années 70, pour qu'une équipe d'Hoffmann-La Roche, redécouvre le rôle important de l'ATRA, en travaillant sur l'élaboration de nouveaux agents anti-cancéreux. Le fait que l'acide rétinoïque puisse induire la différenciation de cellules en culture a suscité beaucoup d'enthousiasme quant à l'application des rétinoïdes dans le traitement des cancers et a stimulé la recherche sur leurs effets biologiques. Plus surprenant encore est l'effet de l'ATRA dans la morphogénèse chez les vertébrés. Toutes ces découvertes semblaient indiquer qu'on était face à l'une des molécules les plus importantes dans le contrôle de la croissance cellulaire et le développement embryonnaire.

En plus de l'ATRA, plusieurs métabolites dérivant de la vitamine A ont été identifiés (Figure 1). Notamment, le rétinaldéhyde impliqué dans le processus de la vision nocturne, l'acide 3, 4-didéhydrorétinoïque impliqué dans le contrôle du développement (Thaller et al., 1990) et l'acide 9cis rétinoïque qui pourrait jouer un rôle dans le contrôle de nombreuses voies métaboliques et également dans la morphogénèse (Zhang et al., 1990; Mangelsdorf et al., 1994)

Les rétinoïdes sont des molécules globalement hydrophobes dont la structure peut être subdivisée en trois parties : une extrémité cyclique terminale hydrophobe, une chaîne polyénique, et une extrémité polaire porteuse du groupement fonctionnel ( Figure 1).

## **B/ METABOLISME DES RETINOIDES :**

Le rétinol est considéré comme la source principale des rétinoïdes naturels. Il provient essentiellement de l'absorption des caroténoïdes et des esters du rétinol (EsR). La majorité des EsRs sont convertis en rétinol dans la lumière intestinale avant l'absorption par les cellules intestinales (entérocytes) (Figure 2). Dans ces dernières, le rétinol est estérifié puis incorporé les chylomicrons (principales lipoprotéines intestinales). Deux enzymes semblent intervenir dans ce processus : l'acylCoA rétinolacyltransférase (ARAT) et la lécithine rétinol acyltransférase (LRAT) (Pour revue voir Blomhoff et al., 1990; Figure3). Par exocytose, les chylomicrons passent dans la lymphe intestinale et ensuite dans la circulation générale, où ils seront modifiés (CMs).

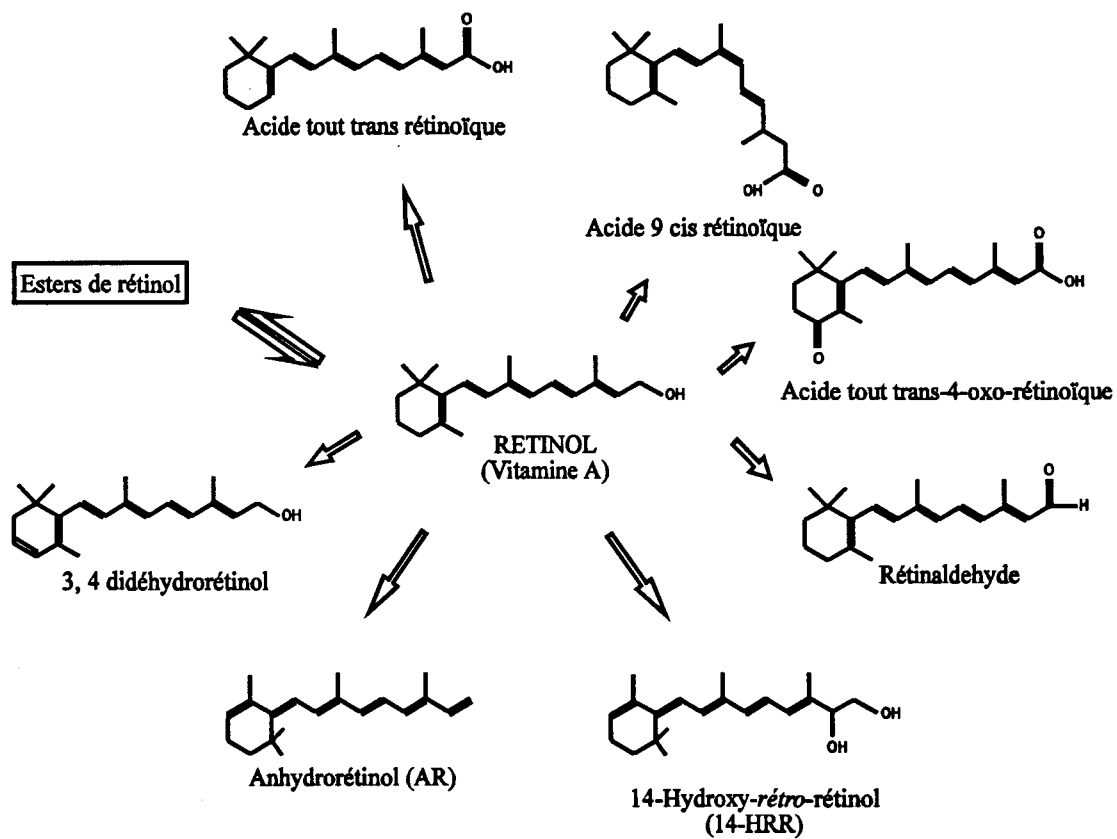


Figure 1 : Structure des principaux rétinolides naturels  
(Gudas , 1994)

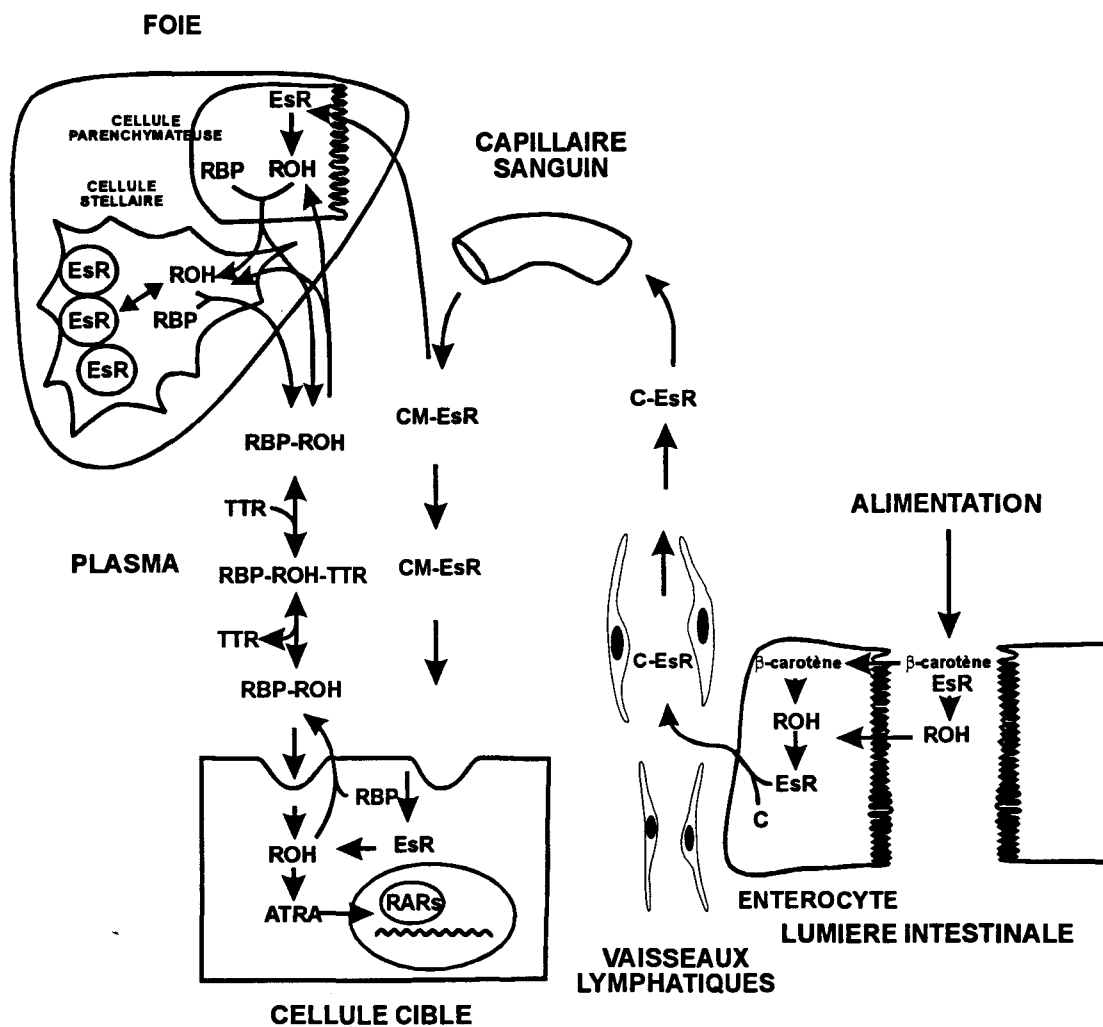
Dans le foie, les cellules parenchymateuses (hépatocytes) sont responsables de l'absorption des CMs complexés aux EsRs (CM-EsRs). Les EsRs sont probablement hydrolysés dans la membrane plasmique ou dans les endosomes proches par une EsR hydrolase. A l'inverse des autres ligands qui sont transférés dans le lysosome après passage dans les endosomes, le rétinol est transféré dans le réticulum endoplasmique, où la RBP (Retinol Binding Protein) est présente à des fortes concentrations. La fixation du rétinol par le RBP semble initier la translocation du complexe rétinol-RBP vers les cellules stellaires du foie. Dans les hépatocytes, la majorité du rétinol qui dérive du CM-EsR, est transféré très rapidement (2 à 4 heures) aux cellules stellaires du foie (Figure 3). Ce transfert est spécifique, car les autres composants des CMs, comme le cholestérol, et la vitamine D, ne sont pas transférés. Les EsRs dérivés des CMs doivent être hydrolysés avant leurs transferts vers les cellules stellaires. Le transfert du rétinol des cellules parenchymateuses vers les cellules stellaires fait intervenir la RBP.

Une absorption extrahépatique a été observée essentiellement dans la moelle épinière, la rate et dans une moindre mesure dans le tissu adipeux, le muscle squelettique, testicules, poumons et les reins. Ainsi les CMs peuvent jouer un rôle important dans l'apport des EsRs aux tissus comme la moelle épinière et la rate. Le mécanisme d'absorption des CMs est mal connu. Néanmoins, deux récepteurs sont soupçonnés pour être impliqués dans ce mécanisme : le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL) et un récepteur très proche des LDL, nommé LRP, pouvant fixer les apolipoprotéines E .

Chez les mammifères, environ 50 à 80% de la vitamine A présente dans le corps est stockée dans les cellules stellaires du foie sous formes de EsRs. Des cellules stellaires ont aussi été identifiées dans l'intestin, les reins, le coeur, les grands vaisseaux, les ovaires et les testicules. Ces cellules semblent être impliquées dans le stockage des EsRs, lorsqu'une grande quantité de la vitamine A a été consommée.

En général, la majorité du rétinol du plasma, non associée aux CMs est fixé par les RBPs et est transféré vers les cellules stellaires. Ces cellules ont la capacité de contrôler le stockage et la mobilisation du rétinol assure une concentration constante en rétinol dans le plasma, voisine de 2  $\mu\text{M}$ , indépendamment des fluctuations de la consommation quotidienne de la vitamine A (Pour revue voir Blomhoff et al., 1990). Dans le plasma le rétinol-RBP est associé de façon réversible à une autre protéine, la transthyréline (TTR), dont la fonction principale est d'empêcher la filtration glomérulaire du complexe RBP-rétinol (Figure 2).

Des études cinétiques suggèrent l'existence d'un récepteur membranaire de la RBP qui permettrait une pénétration active du rétinol (Eriksson et al., 1986). Un tel récepteur a été mis en évidence dans les cellules du pigment rétinien bovin (Bavik et al., 1991). Le mécanisme exact d'absorption est encore mal connu, mais on pense qu'un récepteur membranaire pourrait lier la holo-RBP. Le rétinol serait alors libéré et internalisé, alors que l'apo-RBP serait métabolisé dans les reins (Goodman, 1984). Mais des travaux



- CM-EsR** : Chylomicrons modifiés associés aux esters du rétinol
- C-EsR** : Chylomicrons associés aux esters du rétinol
- EsR** : Esters du rétinol
- ATRA** : Acide rétinoïque tout trans
- RARs** : Récepteurs de l'acide rétinoïque
- RBP** : Protéine fixant le rétinol (Retinol binding protein)
- ROH** : Rétinol
- TTR** : Transthyréline

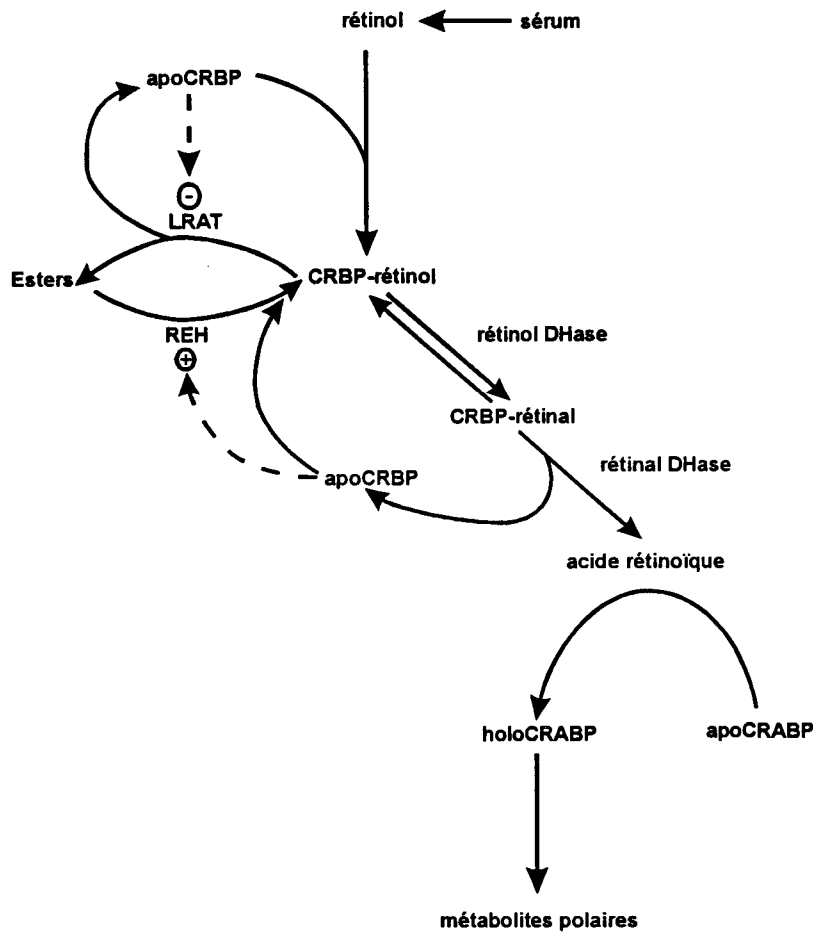
**Figure 2 : Absorption, stockage et métabolisme de la vitamine A**  
(D'après Blomhoff et al., 1990)

de Noy et Xu (Noy et al., 1990a; Noy et al., 1990b) ont montré que la holo-RBP du plasma se dissocie spontanément et rapidement en apo-RBP et rétinol, qui à son tour traverse la membrane. La cinétique d'absorption calculée pour ce mécanisme est en accord avec la cinétique observée *in vivo* (Noy et al., 1991; van Bennekum et al., 1993). En se basant sur la cinétique de formation et dissociation de la holo-RBP, Noy et Blaner suggèrent que le contenu cellulaire en apo-CRBP régule la cinétique d'absorption du rétinol dans les cellules (Noy et al., 1991).

Bien qu'une faible quantité soit apportée par l'alimentation, la majorité de l'ATRA provient essentiellement de l'oxydation du rétinol dans les tissus. Les enzymes intervenant dans ces réactions ne sont pas encore bien définis. L'oxydation du rétinol en rétinaldéhyde est probablement catalysée par une ou des enzymes microsomiales qui utiliseraient le rétinol lié à la CRBP comme substrat (Posch et al., 1991). La transformation du rétinaldéhyde en ATRA par une aldéhyde déhydrogénase ou une aldéhyde oxydase n'a pas été démontré de façon formelle. Enfin, d'autres métabolites dérivant soit du rétinol ou de l'ATRA sont présents dans le plasma humain, comme le 13-cis-RA, l'acide 13-cis-4-oxo-rétinoïque (Eckhoff et al., 1990), l'acide 9-cis-rétinoïque (Levin et al., 1992; Heyman et al., 1992) et l'acide 3,4-didéhydrorétinoïque (Wagner et al., 1990).

En conclusion, bien que notre connaissance du métabolisme des rétinoïdes se soit considérablement accrue, plusieurs points restent encore à éclaircir. Ainsi, les mécanismes biochimiques régissant le transfert du rétinol entre cellules et entre les cellules et le plasma ne sont pas encore complètement élucidés. En outre, l'identification d'enzymes spécifiques au métabolisme des rétinoïdes, constituerait une étape importante dans la compréhension des mécanismes régulant ce métabolisme.





**Figure 3 : Modèle de la synthèse et du catabolisme de l'acide rétinoïque.**

Le rapport holoCRBP/apoCRBP pourrait contrôler directement le flux du rétinol de ou vers les esters de rétinol. La lécithine-rétinol acyl transférase (LRAT) intervient dans le stockage du rétinol en utilisant la holoCRBP comme substrat. L'apoCRBP, provenant du recyclage de la holoCRBP, inhibe l'estérfication du rétinol en stimulant la rétinol ester hydrolase (REH). La holoCRBP est également le substrat de la rétinol déhydrogénase (ROH-DHase), qui transforme le rétinol en rétinol. La CRBP intervient dans le transport du rétinol à partir des microsomes vers le cytoplasme. Le rétinol sera utilisé comme substrat par la rétinol déhydrogénase (rétinal DHase) pour produire l'acide rétinoïque (ATRA). L'excès d'ATRA serait séquestré par la CRABP, et dirigé vers des voies de métabolisme qui vont le convertir en plusieurs métabolites polaires (adapté à partir de Napoli, 1993).

## **C/ LES EFFETS BIOLOGIQUES DES RETINOÏDES :**

L'acide rétinoïque a de nombreux effets biologiques et ceci ne facilite pas la compréhension de son mécanisme d'action. Ses effets principaux sont représentés par son implication dans les processus de développement, l'inhibition de la prolifération cellulaire et la stimulation de la différenciation cellulaire.

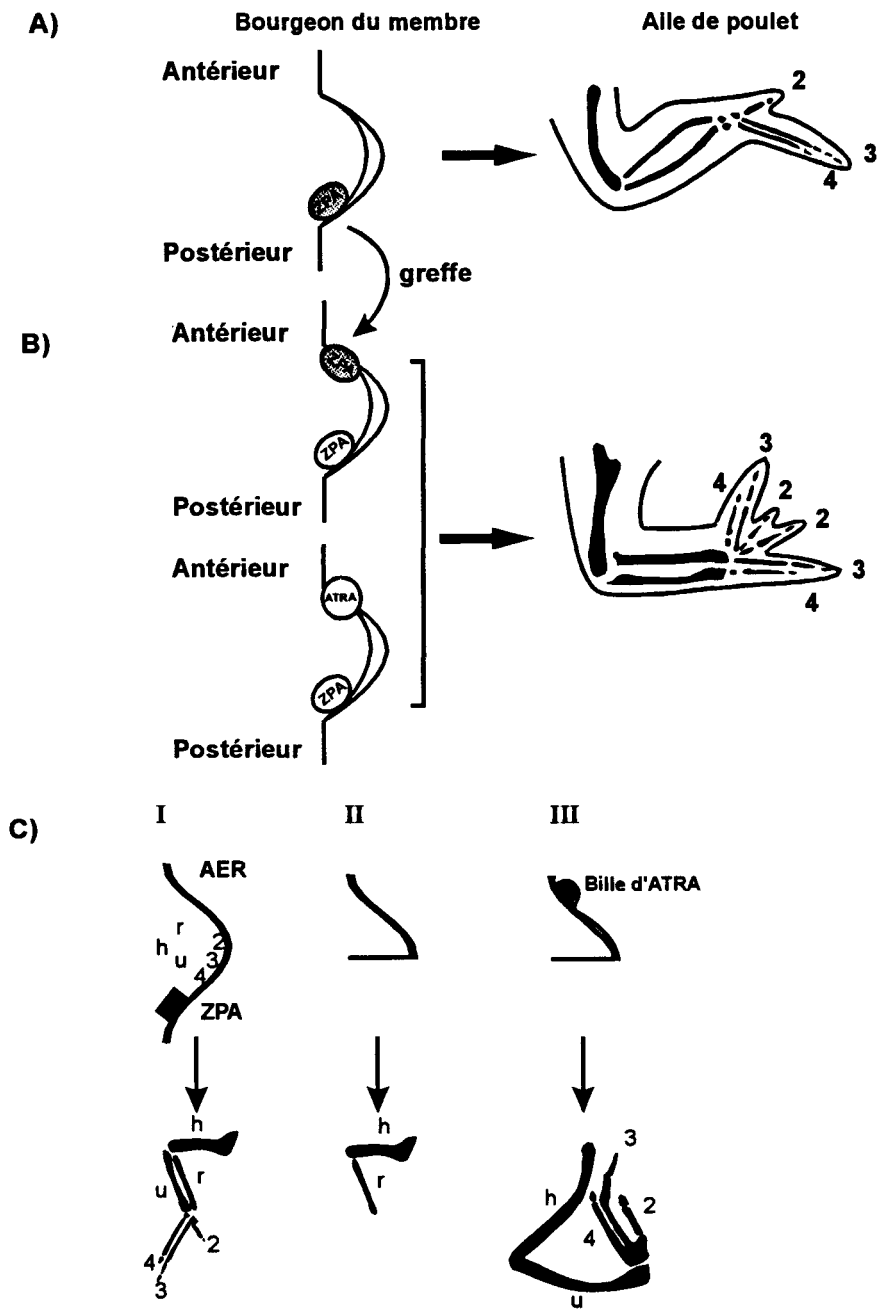
## **I/ LES RETINOÏDES ET LE DEVELOPPEMENT DES MEMBRES :**

### **1/ FORMATION DES MEMBRES CHEZ LES VERTÉBRÉS :**

Chez les vertébrés, les membres se développent à partir d'un bourgeon qui se forme sur le flanc de l'embryon. Ce bourgeon est délimité par une coque ectodermique très fine, appelée la ligne ectodermique apicale (AER). L'élimination de l'AER empêche le développement des membres (Saunders, Jr. 1948; Summerbell. 1974). Le développement des membres se fait selon trois axes, l'axe proximodistal allant de l'épaule au doigt, l'axe antéropostérieur, passant entre le pouce et le petit doigt et l'axe dorsoventral qui est perpendiculaire aux deux autres axes. Par des expériences de greffe, Saunder et Gasseling ont montré que les trois axes sont spécifiés indépendamment les uns des autres (Saunders et al., 1968). Ainsi, la greffe d'un tissu provenant de la région postérieure du bourgeon de l'aile de poulet dans la partie antérieure du bourgeon entraîne une duplication en miroir des doigts (Figure 4). La région capable d'induire cette duplication est appelée la zone à activité polarisante (ZPA). Tickle a montré que ce processus est commun à tous les vertébrés. En effet, des ZPA provenant de plusieurs espèces (souris, homme, hamster et tortue) peuvent aussi induire la duplication des doigts dans le bourgeon de poulet (Tickle et al., 1982).

### **2/ L'ACIDE RÉTINOÏQUE, UN MORPHOGÈNE DÉCHU !**

En 1982, le groupe de Tickle a pour la première fois montré qu'une molécule seule, en l'occurrence l'ATRA, peut induire une duplication des doigts de l'aile de poulet (Figure 4) (Tickle et al., 1982). Ainsi l'ATRA semble pouvoir mimer l'action de la zone d'activité polarisante (ZPA), région située dans la partie postérieure du bourgeon des membres et qui dirige la formation de l'axe antéropostérieur des membres (Eichele. 1989). L'ATRA est présent naturellement dans le bourgeon des membres sous forme d'un gradient, avec un maximum (~50nM) dans la région postérieure incluant la ZPA et un minimum (~20nM) dans la partie antérieure. D'autres structures sont connues pour avoir une activité ZPA-like, comme le noeud de Hensen et la plaque neurale (Hornbruch et al., 1986; Wagner et al., 1990). Ces structures sont aussi le siège de synthèse des rétinoïdes (Wagner et al., 1990; Hogan et al., 1992), comme l'ATRA mais aussi l'acide 3, 4-didéhydrorétinoïque, qui se trouve dans le bourgeon des membres à des concentrations plus élevées que l'ATRA (Thaller et al., 1990). Ces résultats suggèrent que les rétinoïdes sont des morphogènes, qui sont secrétés par des structures



**Figure 4 : L'ATRA est capable de mimer l'action de la ZPA dans le développement de l'aile de poulet (Tabin, 1991).**

- A) Bourgeon normal donnant naissance à une aile avec trois doigts 2, 3 et 4.
- B) La greffe d'une nouvelle ZPA ou l'implantation d'une bille d'ATRA dans la partie antérieure du bourgeon entraîne une duplication des doigts.
- C) L'ATRA est capable de spécifier la formation des doigts en absence de la partie postérieure du bourgeon (Hofmann et Eichele, 1994) h : humerus, r : radius, u : ulna

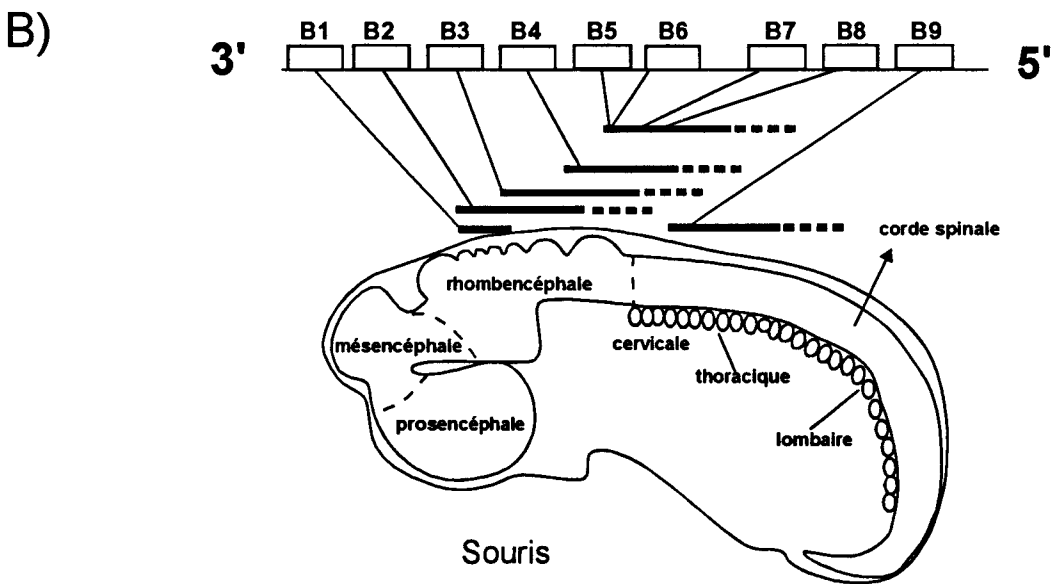
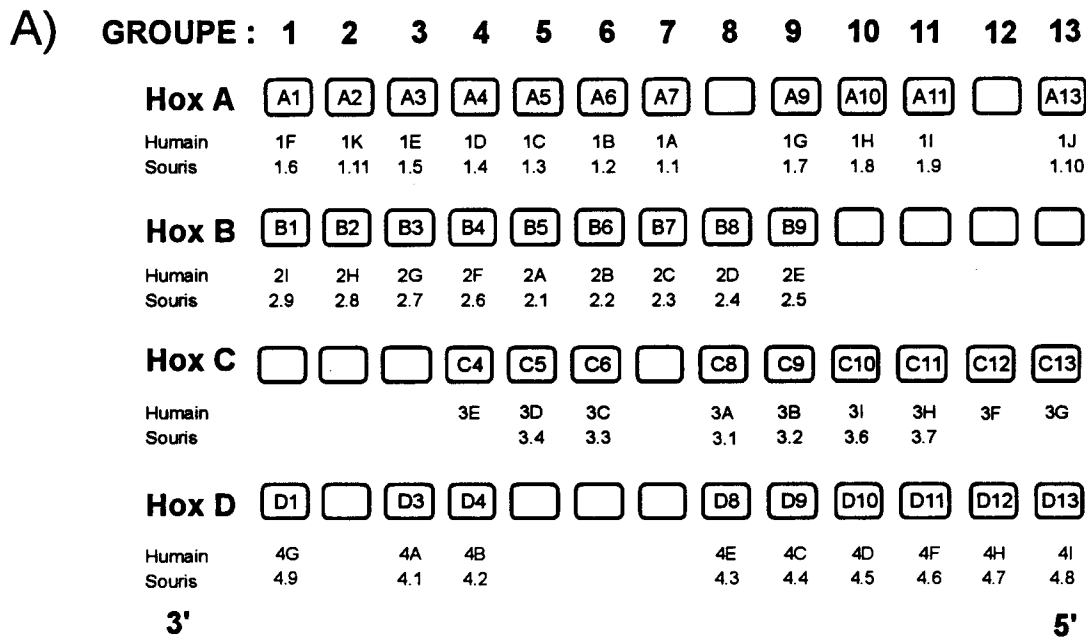
capables de diriger la formation des différents axes antéro-postérieurs. Malheureusement, l'enthousiasme initial a été refroidi par des résultats qui suggèrent que les rétinoïdes ne semblent pas être les vrais morphogènes, tout au moins dans les membres (Tabin, 1991). En effet, dans des expériences de transplantation, il a été observé que le mésenchyme antérieur du membre, exposé à de l'ATRA exogène, peut induire la duplication de l'axe quand il est greffé sur la partie antérieure du bourgeon, sans l'intervention de l'ATRA (Wanek et al., 1991; Noji et al., 1991). Le mécanisme moléculaire de cette duplication semble faire intervenir les gènes HOX-D (anciennement appelé Hox4). En effet, on sait que ces gènes sont impliqués dans la formation des membres et plusieurs de ces gènes (d9, d10, d11, d12 et d13) s'expriment normalement dans le côté postérieur du bourgeon des membres chez les vertébrés. Les gènes de la classe HOX-D sont impliqués directement dans la spécification des doigts; Ainsi la surexpression du gène Hoxd-11 (en absence de l'ATRA) transforme le doigt 1 en doigt 2 (Morgan et al., 1992). L'application de l'ATRA sur le bord antérieur du bourgeon entraîne l'expression des gènes HOX-D à la fois dans la moitié antérieure et postérieure (Figure 6). Ces expériences mettent en évidence le rôle de l'ATRA dans l'activation des gènes HOX-D. Cette activation est probablement l'un des processus par lequel l'ATRA induit la duplication de l'axe des membres. Récemment, plusieurs groupes ont montré que le gène sonic hedgehog est impliqué dans les processus de formation des membres. Chez les vertébrés, l'expression de hedgehog est limitée à certaines cellules du bord postérieur du bourgeon des membres. L'application de l'ATRA sur le bord antérieur induit une forte expression de hedgehog dans la partie antérieure du bourgeon (Riddle et al., 1993). Ainsi, l'expression de sonic hedgehog et de HOX-D semble être l'intermédiaire entre l'ATRA et la formation des membres. Un excès d'ATRA exogène peut également entraîner des malformations crânofaciale et rhombencéphalique (cerveau postérieur). La capacité de l'ATRA à altérer l'organisation des segments du rhombencéphale est due en partie à sa capacité à affecter l'expression des gènes HOX, en particulier le gène Hoxb-1 (Conlon et al., 1992).

Des souris au huitième jour de la gestation traitées par l'ATRA peuvent développer une "spina bifida" (le tube neural ne se ferme pas). Ce résultat semble être dû à un excès de mort cellulaire induite par l'ATRA dans les tissus sous-jacents de la partie postérieure de la plaque neurale, tels que les tissus mésenchymateux de la région de la ligne primitive (Alles et al., 1990).

## **II/ LES RETINOIDES ET L'AXE ANTEROPOSTERIEUR :**

### **1/ LES GÈNES HOMÉOTIQUES :**

L'une des avancées fondamentales en biologie du développement a été la découverte de gènes ayant une séquence conservée appelée "homéodomaine" (McGinnis et al., 1984a; McGinnis et al., 1984b). L'homéodomaine



**Figure 5 : Organisation et territoires d'expression des gènes Hox chez les mammifères (Souris).**

**A)** Organisation et nomenclature des gènes Hox. Les anciennes appellations sont citées sous les rectangles. Les rectangles vides signifient qu'aucun gène n'a été découvert chez les vertébrés. Les gènes situés à l'extrémité 3' s'expriment plus tôt dans le développement que ceux situés à l'extrémité 5'. Par ailleurs, les gènes de l'extrémité 3' sont plus sensibles à l'acide rétinoïque que ceux de l'extrémité 5'.

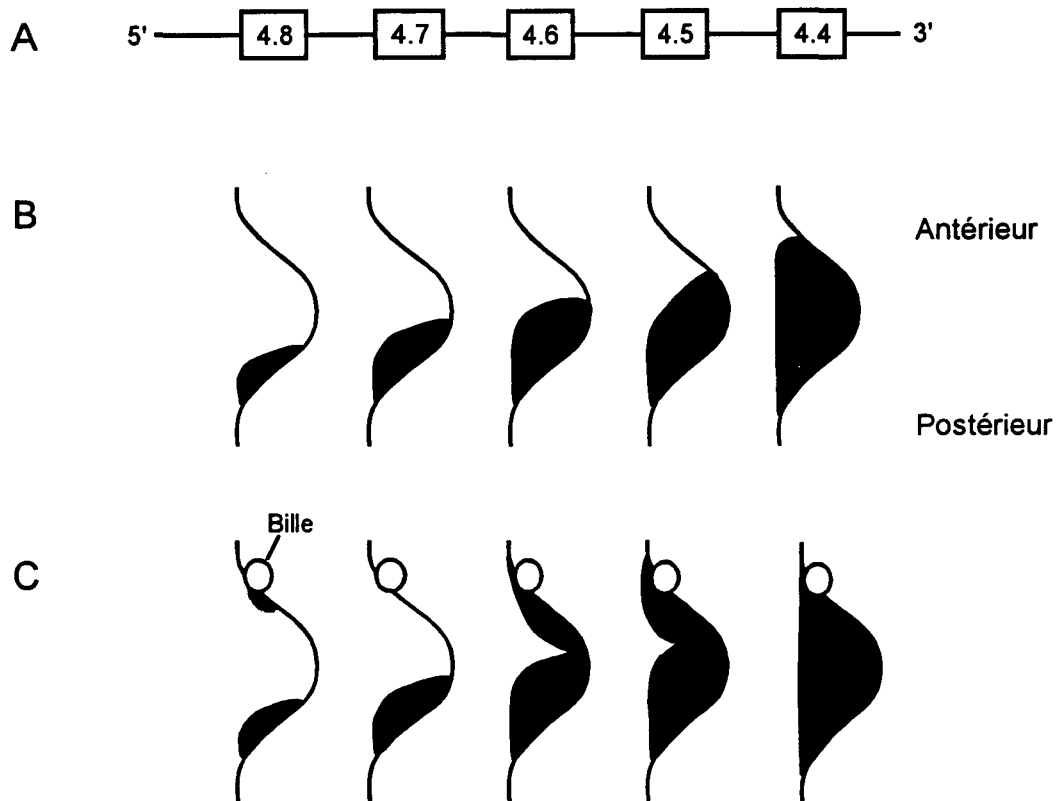
**B)** Territoire d'expression des gènes de la classe Hox B chez l'embryon de la souris. Les barres horizontales représentent les régions d'expression des gènes Hox B dans le système nerveux central de l'embryon de souris au jour 12. Les pointillés illustrent l'extension de l'expression de ces gènes vers la partie postérieure du tronc de l'embryon. Les ronds au-dessous de la corde spinale représentent les prévertèbres cervicales, thoraciques et lombaires (Adapté à partir de Mc Ginnis et Krumlauf, 1992 et Scott, 1992).

est un motif de 183 pb qui code pour un domaine de 61 AAs. Ce domaine possède une structure en "hélice-boucle-hélice" capable de se lier à des séquences spécifiques d'ADN (Gehring.1987; Gehring et al.,1990; McGinnis et al.,1992). Ces gènes ont été découverts pour la première fois chez la drosophile, mais actuellement plus d'une centaine ont été identifiés à la fois chez les invertébrés et les vertébrés. Les vertébrés supérieurs possèdent quatre classes de gènes homéotiques (Figure 5A), les membres de chaque classe sont groupés sur un locus chromosomique. L'une des caractéristiques surprenante de ces gènes est qu'ils semblent obéir à un ordre d'expression dans l'espace pendant le développement. Ainsi, pendant la formation de l'axe antéropostérieur, les gènes HOX des quatre classes qui sont situés à l'extrémité 3' s'expriment dans les régions antérieures de l'embryon, alors que ceux situés à l'extrémité 5' s'expriment dans les parties postérieures de l'embryon (Figure 5B). Une deuxième caractéristique de ces gènes est que leur expression semble également obéir à un ordre temporel. Ainsi les gènes situés près de l'extrémité 3' s'expriment plus rapidement que ceux situés à l'extrémité 5'.

## **2/ L'ACIDE RÉTINOÏQUE ET LA RÉGULATION DES GÈNES HOMÉOTIQUES :**

Le groupe de Gudas a montré que le gène HOX situé à l'extrémité 3' de la classe A situé sur le chromosome 6 (Hoxa-1) est activé rapidement par l'ATRA dans les cellules de tératocarcinome embryonnaire F9 (Larosa et al.,1988). Simeone et coll. (1990) ont également montré que des concentrations allant de  $10^{-8}$  à  $10^{-5}$  M d'ATRA activent différemment les gènes HOX de la classe B dans des cellules de tératocarcinome humain (NT2-D1). Ainsi, les gènes situés à l'extrémité 3' sont induits par une concentration de  $10^{-8}$  M d'ATRA, alors qu'il faut une concentration de  $10^{-5}$  M pour activer les gènes de l'extrémité 5'. Ces observations suggèrent que l'activation d'un gène HOX donné dépendrait de la concentration d'ATRA à laquelle les cellules seraient soumises. Plus surprenant encore est le fait que l'activation induite par l'ATRA des gènes HOX semble suivre un ordre séquentiel dans le temps. Les gènes de l'extrémité 3' sont activés plus rapidement par l'ATRA que ceux situés à l'extrémité 5' (Simeone et al.,1990; Boncinelli et al.,1991) (Figure 6B). En conclusion, le degré d'activation d'un gène HOX dépend de sa localisation sur le chromosome, de la concentration et du temps d'exposition à l'ATRA. Finalement, l'une des questions primordiales à laquelle il faudrait répondre est quelle est la nature des gènes cibles des protéines HOX ? (Gudas.1994)

(Pour plus de détails voir l'excellent livre : THE RETINOIDS : Biology, Chemistry and Medicine de M.B. Sporn, A.B. Roberts and D.S. Goodman)



**Figure 6 : L'ATRA affecte l'expression des gènes Hox4 durant le développement du bourgeon de l'aile du poulet**

- A) Organisation génomique des gènes situés à l'extrémité 5' de la classe Hox 4 (Hox D).
- B) Schéma des territoires d'expression des gènes Hox 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 et 4.8 au stade 21 du développement du bourgeon de l'aile.
- C) L'implantation au stade 18 d'une bille imprégnée d'ATRA entraîne l'expression des gènes Hox 4 dans la partie antérieure du bourgeon.  
Les gènes situés à l'extrémité 3' sont induits plus rapidement que ceux situés à l'extrémité 5'

(Modifié à partir de Izpisua-Belmonte et al., 1991, 1992a; Nohno et al., 1991; and Izpisua-Belmonte and Duboule, 1992)

### III/ LES RETINOIDES ET LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE :

L'un des effets les plus frappants des rétinoïdes est leur capacité à induire la différenciation de certaines lignées cellulaires. L'une des lignées la plus utilisée pour étudier le rôle des rétinoïdes dans la différenciation est probablement la lignée HL-60 (cellules de leucémie myéloblastique et promyélocytaire humaine). En effet, HL-60 se différencie en granulocytes sous l'effet du DMSO et de l'ATRA, alors que la vitamine D3 ou le TPA (12-O-Tétradécanoyl phorbol-13-acétate) induisent sa différenciation en monocytes et macrophages. Plusieurs de ces effets sont relayés et amplifiés par une modification d'expression de certains facteurs de transcription. Ainsi, l'expression de c-myc (Westin et al., 1982; Bentley et al., 1986) et c-myb (Boise et al., 1992) est inhibée par le traitement des HL-60 par l'ATRA. Une diminution précoce et progressive de la protéine Rb est aussi observée suite à un traitement par l'ATRA (Yen et al., 1992). Les récepteurs des rétinoïdes (RARs) semblent être intimement impliqués dans le processus de différenciation des HL-60. La résistance à l'ATRA manifestée par certaines lignées HL-60 peut être levée par une transfection de vecteurs codant des isoformes de RARs (Robertson et al., 1992). Dans la lignée HL-60, l'ATRA stimule également l'activité de certaines enzymes, comme la cyclo-oxygénase (Honda et al., 1990), la phosphatase alcaline (Wei et al., 1992), la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>)-glycohydrolase (Hemmi et al., 1982), le cytochrome b558 et le métabolisme oxydatif (Capeillere Blandin et al., 1990), certains isozymes de la protéine kinase C (Makowske et al., 1988; Hashimoto et al., 1990b; Tanaka et al., 1992; Devalia et al., 1992), et la transglutaminase II (Davies et al., 1985). D'autres lignées du système immunitaire comme la lignée monoblastique humaine U-937 se différencie sous l'action de l'ATRA, du TPA et de l'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique) (Olsson et al., 1982).

D'autrepart, l'ATRA inhibe la croissance de plusieurs lignées du mélanome et modifie leurs propriétés de différenciation. Dans certains cas l'ATRA joue même le rôle d'un agent suppresseur de la différenciation cellulaire. Ainsi, bien que l'ATRA inhibe la croissance des lignées du mélanome B16F1, B16F10 et B16BL6, la synthèse de la mélanine, un des marqueurs de différenciation dans ces cellules, n'est observé que dans la lignée B16F1 (Edward et al., 1988; Hosoi et al., 1985). Ces résultats montrent que la différenciation n'est pas toujours corrélée avec la suppression de la prolifération cellulaire.

L'effet de l'ATRA sur les kératinocytes est encore plus complexe. En effet, l'ATRA peut inhiber ou stimuler la prolifération de ces cellules en fonction des facteurs de croissance présent dans le milieu. En présence de l'EGF, l'ATRA stimule la synthèse de l'ADN (Tong et al., 1990; Zhang et al., 1992; Tong et al., 1988; Varani et al., 1989). Par contre, l'ATRA en présence uniquement du calcium inhibe la prolifération de ces cellules (Varani et al., 1989).



L'ATRA est également capable d'induire la différenciation de nombreuses lignées murines du tératocarcinome embryonnaire. En présence de l'ATRA les cellules P19 peuvent se différencier en neurones et fibroblastes (Janes-Villeneuve et al., 1982). Plus surprenant encore, ces cellules peuvent se différencier en fibre du muscle cardiaque en présence du DMSO (McBurney et al., 1982).

Chez les cellules F9, une autre lignée du tératocarcinome embryonnaire, l'ATRA et le 8-Br-AMPC(analogue de l'AMPC) induisent leurs différenciation en cellules ayant les caractéristiques morphologiques et biochimique des cellules de l'endoderme pariétal (Strickland et al., 1980). Par contre, si ces cellules sont cultivés en agrégat en présence de l'ATRA on observe l'apparition de cellules ayant des caractéristiques de celles de l'endoderme viscéral, qui sont sur le plan morphologique et biochimique très différentes des cellules de l'endoderme pariétal (Hogan et al., 1981)

En conclusion, les effets des rétinoïdes, et en particulier ceux de l'ATRA sont innombrables et variés en fonction des lignées cellulaires, mais d'une manière générale, ils induisent la différenciation et bloquent la prolifération cellulaire.

(Pour plus de détails, voir le livre "The Retinoids : Biology, Chemistry et Medecine" de M.B. Sporn, A.B. Roberts et D.S. Goodman (1994).

#### **IV/ LES RETINOIDES ET L'APOPTOSE :**

Décrite pour la première fois au début des années soixante-dix, l'apoptose, appelée aussi mort cellulaire programmée ou suicide cellulaire, est aujourd'hui considérée comme un mécanisme vital pour l'harmonie des organismes multicellulaires. L'apoptose est un processus physiologique permettant l'élimination discrète d'un nombre important de cellules. Ces rouages essentiels semblent avoir été largement préservés au cours de l'évolution. Elle joue un rôle central dans le développement embryonnaire et foetal lors de la morphogénèse des membres, dans l'organisation du système nerveux central, ainsi que dans l'élaboration du système immunitaire et dans l'élimination des cellules tumorales. La mort cellulaire programmée est régulée par de multiples signaux activateurs ou inhibiteurs provenant d'autres cellules. Ce programme de mort cellulaire est régulé par un nombre important de gènes hautement conservés du nématode à l'homme et dont la liste s'allonge chaque jour (pour revue voir Bousquet et Sarthou, 1995).

Le rôle des rétinoïdes dans les processus de l'apoptose est mal compris et dépend du type cellulaire. Ainsi, l'ATRA inhibe l'apoptose induite par le complexe TCR/CD3 dans les hybridomes des cellules T (Owensgrillo et al., 1995). Cette inhibition semble être due à la répression de l'expression du ligand de Fas (Fas est un récepteur membranaire, qui induit l'apoptose en liant son ligand) par les rétinoïdes (Yang et al., 1995). Alors que dans les cellules F9 de carcinome embryonnaire humain, les rétinoïdes induisent l'apoptose (Vanderburg

et al.,1995). Récemment, le groupe de Jetten a montré que l'apoptose des cellules murines SPOC-1 est contrôlée spécifiquement par l'isoforme RAR $\alpha$  (Zhang et al.,1995). Par contre, dans la lignée humaine HL-60, l'induction de l'apoptose nécessite l'activation des RXRs (Nagy et al.,1995).

Bien que des travaux de plus en plus nombreux montrent que les rétinoïdes sont impliqués dans le processus de l'apoptose, le mécanisme moléculaire est loin d'être élucidé, essentiellement parce que l'apoptose est un processus multifactoriel.

## **V/ LES RETINOIDES : UN ESPOIR DANS LA THERAPIE ANTICANCEREUSE**

Durant plusieurs décennies, les rétinoïdes ont été largement utilisés dans le traitement des maladies de la peau avec un succès considérable (Bollag et al.,1992; Smith et al.,1992). Depuis, le champ d'application des rétinoïdes s'est élargi au traitement de nombreux cancers. L'une des grande réussites de la thérapie par les rétinoïdes est le traitement des leucémies aiguës promyélocytaire (APL). En effet, on a constaté une augmentation du taux de rémission des patients à APL après traitement par les rétinoïdes (Chen et al.,1991; Warrell, Jr. et al.,1991). Cependant il faut relativiser ce succès car il se restreint uniquement à l'APL. Pour les autres hémopathies malignes, comme le syndrome myelodysplastique (Koeffler et al.,1988), leucémie chronique juvénile (Castleberry et al., 1991), ou le syndrome Sézary (Wieselthier et al.,1990), les rétinoïdes n'ont qu'un effet très modeste. Par contre, les rétinoïdes semblent donner de bons résultats dans le traitement des carcinomes des cellules squameuses de la tête et du cou (Jetten et al.,1990). Malheureusement, l'utilisation des rétinoïdes dans le traitement des tumeurs solides comme le cancer des poumons a été décevante (Grunberg et al.,1987). Les rétinoïdes induisent également l'inhibition de la prolifération des lignées cellulaires malignes du mélanome (Lotan et al., 1979) et inhibent les métastases de mélanome chez la souris athymique (LaCroix et al., 1980). Les rétinoïdes ont également donnés des résultats encourageant dans les traitements chimiopréventifs. En effet, les rétinoïdes augmentent sensiblement le taux de rémission ou l'arrêt de la progression des tumeurs pré malignes des voies orales.

En résumé, bien que leur mécanisme d'action sur le cancer soit encore mal connu, les rétinoïdes représentent un espoir dans le traitement des cancers. Cet espoir est d'autant plus grand qu'une nouvelle génération de rétinoïdes moins toxiques et plus spécifiques commence à voir le jour.

## **D/ LE MECANISME D'ACTION DES RETINOIDES :**

Les rétinoïdes interagissent avec des protéines cytoplasmiques (CRABP et CRBP) et des récepteurs nucléaires (RARs et RXRs). Ces derniers reconnaissent spécifiquement des séquences d'ADN, appelées éléments de réponse des rétinoïdes (RAREs ou RXREs). Ces éléments de réponse sont localisés généralement dans

les régions promotrices des gènes régulés par les rétinoïdes. La spécificité de reconnaissance des éléments de réponse par les RARs dépend également de leur état de dimérisation. En effet, les RARs sont capables d'hétérodimériser avec d'autres récepteurs nucléaires (Figure 7).

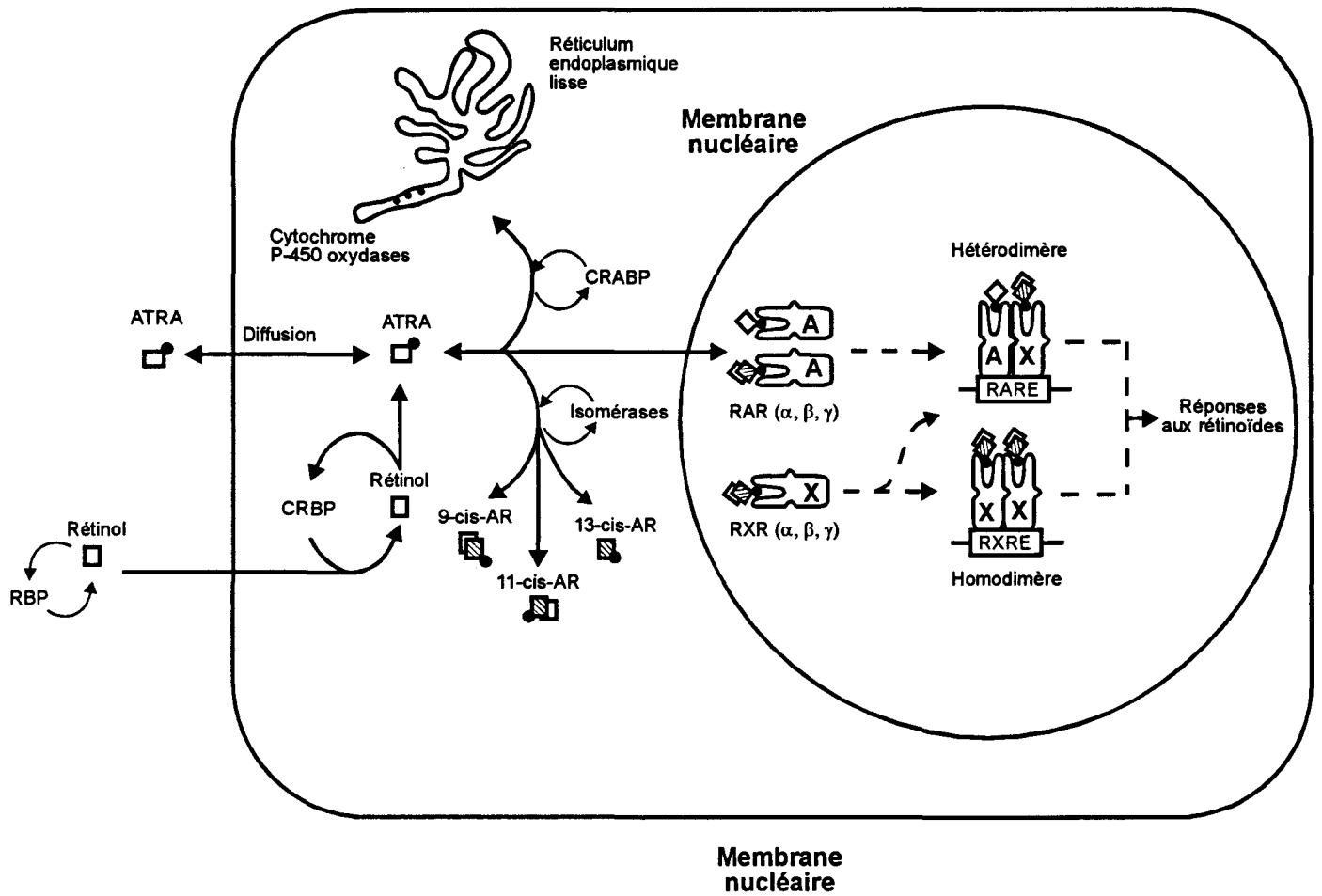
## **I/ LES PROTEINES LIANT LES RETINOIDES ET DISTRIBUTION TISSULAIRE :**

### **1/ PROTEINES CYTOPLASMIQUES LIANT L'ATRA (CRABP) :**

A la fin des années 70, Ong et Chytil ont identifié une protéine cellulaire liant l'ATRA (CRABP) (Ong et al., 1978). C'est une petite protéine cytoplasmique (Mr 15,5 kDa) qui lie sélectivement et avec une grande affinité l'ATRA ( $K_d = 4nM$ , Ong et al., 1978). Actuellement nous savons qu'il existe au moins deux isoformes de cette protéine (Wei et al., 1987; Shubeita et al., 1987; Stoner et al., 1989; Giguere et al., 1990a). Bien que la CRABP I et CRABP II soient très proches sur le plan structural, elles présentent une expression différente chez l'adulte et pendant le développement (Maden et al., 1988; Dolle et al., 1989; Perez-Castro et al., 1989; Dolle et al., 1990; Giguere et al., 1990a). Ainsi dans le développement embryonnaire, l'expression de CRABP I suggère qu'elle est importante dans la formation du gradient endogène de l'ATRA (Maden et al., 1988; Perez-Castro et al., 1989). Des études génétiques et biochimiques ont aussi montré que des cellules qui répondent normalement à l'ATRA deviennent moins sensibles à ce traitement après une surexpression de CRABP (Boylan et al., 1991). Mais on n'a jamais pu montrer si les CRABPs pouvaient réguler la transcription ou avoir un rôle clé dans le mécanisme d'action de l'ATRA. Certaines cellules dépourvues en CRABPs peuvent néanmoins répondre normalement à un traitement par l'ATRA, ce qui montre bien que les CRABPs ne sont pas nécessaire à son transport (Haussler et al., 1984; Jetten et al., 1987; Mangelsdorf et al., 1990). Bien que le rôle des CRABPs soit mal connu, on pense qu'elles peuvent agir comme un système tampon régulant la concentration intracellulaire de l'ATRA et peuvent ainsi déclencher ou inhiber une réponse particulière. Cette hypothèse a été confortée par les résultats de Maden et coll. obtenus avec les bourgeons des membres de poulet, dans lesquels la CRABP forme un gradient antéro-postérieur (Maden et al., 1988). Mais des rétinoïdes synthétiques qui ne se lient pas à la CRABP, sont capables de mimer l'action de l'ATRA dans la morphogénèse, suggérant que l'ATRA peut agir en l'absence de la CRABP (Tamura et al., 1990). La CRABP pourrait avoir également un rôle dans la conversion de l'ATRA en d'autres métabolites (Fiorella et al., 1991; Boylan et al., 1991). Dans ce cas, la CRABP jouerait le rôle d'un transporteur qui va amener l'ATRA vers les voies enzymatiques appropriées de façon similaire à l'action des protéines cellulaires liant le rétinol (CRBPs) (Ong, 1987; Blomhoff et al., 1990).

### **2/ LES RÉCEPTEURS DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE TOUT TRANS (ATRA) :**

En 1987, les groupes de Chambon et d'Evans ont isolé indépendamment le cDNA d'un récepteur humain



**Figure 7 : Mode d'action des rétinoïdes**  
(D'après Warrell et al., 1993)

de l'acide rétinoïque tout trans (hRAR $\alpha$ ) (Petkovitch et al., 1987; Giguere et al., 1987). Ce récepteur possède une organisation en domaines similaire à celle de la superfamille des récepteurs nucléaires, et peut activer la transcription des gènes cibles sous l'action de l'ATRA (Evans. 1988). La découverte de ce récepteur a été déterminante à la fois pour la compréhension du mécanisme d'action de l'ATRA, mais aussi pour identifier les gènes régulés par l'ATRA. Actuellement on connaît trois isoformes distinctes de RAR (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  et RAR $\gamma$ ) qui sont exprimées chez les mammifères, les oiseaux et les amphibiens. Ces isoformes présentent un degré d'homologie élevé au-niveau des domaines C et E/F (Figures 8 et 9). Cette diversité se trouve encore augmentée par l'existence de deux promoteurs pour chaque gène, donnant naissance à deux transcrits alternatifs. Ces transcrits génèrent des isoformes avec des extrémités N-terminales différentes (Kastner et al., 1990; Giguere et al., 1990b; Blumberg et al., 1992; Leroy et al., 1991; Zelent et al., 1991). En plus, plusieurs variants dû à des épissages alternatifs ont été caractérisés (Kastner et al., 1990; Leroy et al., 1991; Zelent et al., 1991; Nagpal et al., 1992b). Ainsi, il apparaît que la diversité des effets des rétinoïdes sur les cellules peut être expliquée en partie par la diversité des récepteurs de l'ATRA.

### **3/ LES RÉCEPTEURS X DES RÉTINOÏDES :**

Récemment, un nouveau récepteur des rétinoïdes représentant une seconde classe des récepteurs des rétinoïdes, a été identifié, le récepteur humain X des rétinoïdes (hRXR $\alpha$ , Mangelsdorf et al., 1990). L'analyse de la séquence de hRXR $\alpha$  a montré qu'il existe peu de similitudes entre le RXR et le RAR ce qui est d'autant plus surprenant que l'activité transcriptionnelle des deux récepteurs est stimulée par l'ATRA, bien que celle du RXR n'apparaît qu'à de fortes concentrations (10 $\mu$ M). Ce résultat illustre bien la complexité du mode d'action des rétinoïdes. Depuis, trois isoformes de RXR (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  et RXR $\gamma$ ) ont été identifiés chez les mammifères, oiseaux et amphibiens (Figure 8 et 9). Bien que ces isoformes présentent des similitudes structurales entre elles, leurs domaines N-terminaux montrent une grande variabilité, suggérant que chaque isoforme pourrait avoir une fonction de transactivation différente (Nagpal et al., 1992b). Plus surprenant encore, est la présence d'un homologue de RXRs chez la Drosophile (Usp=Ultraspiracle) alors qu'aucun homologue des RARs n'y a été identifié (Oro et al., 1990; Oro et al., 1992; Shea et al., 1990). Ces résultats semblent suggérer que les RXRs sont plus anciens phylogénétiquement que les RARs (Laudet et al., 1992).

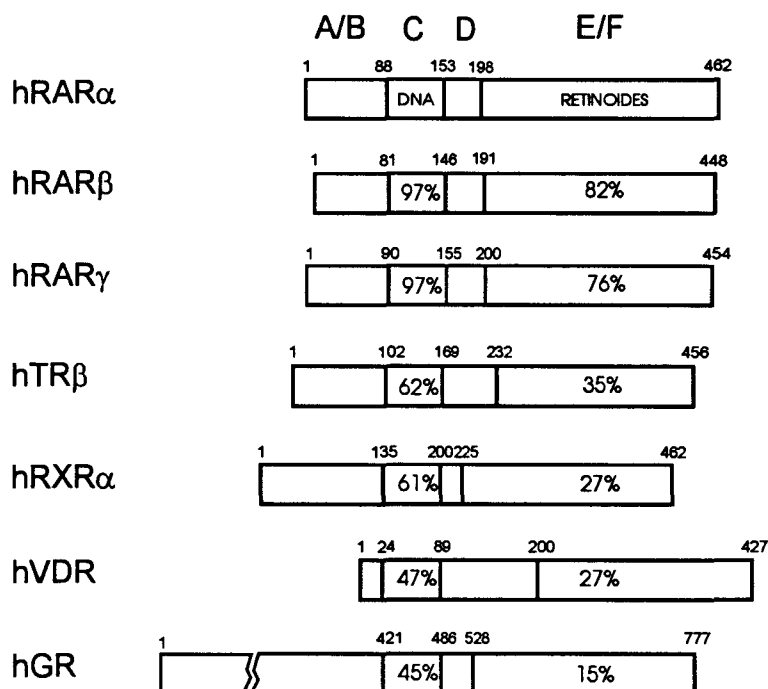
### **4/ LA DISTRIBUTION TISSULAIRE DES RARS ET RXRS :**

L'effet pléiotropique des rétinoïdes peut être expliqué en partie par le large éventail d'expression offert par les différents gènes de RAR et RXR. Les études de l'expression de RAR par les techniques d'hybridation

Récepteur	Espèce	Localisation chromosomique
RAR- $\alpha$	Homme	17q21.1
	souris	11
	Triton Grenouille	
RAR- $\beta$	Homme	
	Souris	3p24
	Triton Poulet	14
RAR- $\gamma$	Homme	
	Souris	12q13
	Triton Grenouille	15
RXR- $\alpha$	Homme	
	Souris	9q34.3
	Grenouille	2
RXR- $\beta$	Homme	
	Rat	6p21.3
	Souris	17
RXR- $\gamma$	Homme	
	Souris	1q22-23
	Grenouille	1
	Poulet	

**Figure 8 : Les gènes des récepteurs aux rétinoïdes : Clonage et localisation chromosomique**

(Adapté à partir de Mangelsdorf et al., 1994 in THE RETINOIDS: Biology, Chemistry, and Medecine)



**Figure 9 : Homologie de séquence des différents domaines de hRAR $\alpha$  et ceux des autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires**

(Adapté à partir de Mangelsdorf et al., 1994 in THE RETINOIDS: Biology, Chemistry, and Medecine)

*in-situ* sont maintenant bien avancées (Dollé et al., 1989; Noji et al., 1989; Ruberte et al., 1990; Osumi-Yamashita et al., 1990; Dollé et al., 1990; Smith et al., 1991) et permettent d'attribuer un rôle à chaque isoforme de RAR durant le développement embryonnaire et la formation des membres (Mendelsohn et al., 1992). Plusieurs isoformes de RAR présentent un profil d'expression propre, qui peut être exclusif ou chevauchant avec celui de RXR, CRABP et CRBP. Dans un embryon de souris, RAR $\alpha$  est exprimée de façon ubiquitaire, alors que les zones d'expression des transcrits de RAR $\beta$  et RAR $\gamma$  ne se chevauchent pas, ce qui suggère qu'ils doivent avoir un rôle différent dans le développement. Ainsi, au jour 8,5 de la gestation chez la souris, les transcrits RAR $\beta$  sont présents dans les portions proximales du tube neural alors que RAR $\gamma$  est localisé uniquement dans les plis ouverts du tube neural (Dollé et al., 1989). Au jour 13,5, RAR $\beta$  se trouve exclu des condensations précartilagineuses des membres, alors que le RAR $\gamma$  est y fortement exprimé (Dollé et al., 1990). RAR $\beta$  est spécifiquement exprimé dans le mésenchyme interdigital, le mésenchyme entourant l'épithélium de l'oreille interne (Dollé et al., 1989), les tissus dérivés de l'endoderme comme l'épithélium des poumons, des intestins et aussi dans le système nerveux (Smith et al., 1991). Le fait que RAR $\beta$  puisse jouer un rôle dans la neurogénèse (Simeone et al., 1990; Smith et al., 1991) a été corroboré par la découverte de Wagner et coll, qui ont montré que l'ATRA peut être synthétisé dans la plaque neurale durant le développement (Wagner et al., 1990). Parce que RAR $\beta$  est exprimé dans le mésenchyme interdigital pendant la développement des doigts, il est aussi soupçonné pour être impliqué dans la régulation de l'apoptose cellulaire (Dollé et al., 1989). Par contre, RAR $\gamma$  est présent dans tous les mésenchymes impliqués dans la formation des os et des cartilages faciaux, et aussi dans la différenciation de l'épithélium squameux kératinisé (Ruberte et al., 1990; Osumi-Yamashita et al., 1990). Chez l'embryon et l'adulte, RAR $\gamma$  est l'isoforme prédominante dans la peau (Kastner et al., 1990). Dans certains tissus, l'expression de RAR $\beta$  et RAR $\gamma$  chevauche celle de CRBP et CRABP. Ainsi, dans le mésenchyme du système olfactif et de l'oreille interne, les territoires d'expression des transcrits de RAR $\beta$  et CRBP se confondent alors que dans le poumon, RAR $\beta$  est localisé dans l'épithélium et CRBP dans le mésenchyme. Plus tard dans la gestation, les territoires d'expression de RAR $\beta$ /RAR $\gamma$  et CRABP sont mutuellement exclusifs, alors que ceux ci se confondent dans le mésenchyme des membres, les structures crânofaciales, et le tubercule génital (Dollé et al., 1990).

Récemment, le groupe de Chambon a réussi à créer plusieurs lignées de souris qui sont incapables d'exprimer une ou plusieurs isoformes des récepteurs des rétinoïdes. Des souris homozygotes "null" pour RAR $\alpha$  1 (Lufkin et al., 1993), RAR $\beta$ / $\beta$ 4, ou RAR $\gamma$ 2, présentent un phénotype normal, alors que des souris homozygotes "null" pour tous les isoformes de RAR $\alpha$  (Lufkin et al., 1993) ou de RAR $\gamma$  (Lohnes et al., 1993) présentent un phénotype très altéré. Généralement ces souris mutantes sont stériles, à cause d'une métaplasie squameuse des vésicules séminales et des glandes de la prostate. Elles présentent également une sévère dégénérescence

des vertèbres cervicales probablement à cause d'une perturbation de l'expression des gènes Hox. Le double mutant  $RAR\alpha^{(-)}/\beta2^{(-)}$  présente des malformations de poumon, de l'oesophage et de la trachée, alors que le double mutant  $RAR\alpha^{(-)}/\gamma^{(-)}$  présente un phénotype normal. Ces résultats suggèrent que  $RAR\beta$  joue un rôle important dans la morphogénèse de ces organes. Dernièrement, Kastner et coll. ont créé des souris dont le gène  $RXR\alpha$  a été inactivé. Ces souris présentent des malformations du coeur et des yeux qui deviennent plus grave chez les souris double mutantes  $RXR\alpha$  et  $RAR\gamma$ . Ce résultat suggère que  $RAR\gamma$  et  $RXR\alpha$  interviennent ensemble dans le développement du coeur et des yeux (Kastner et al., 1994).

En conclusion, ces expériences mettent évidence *in vivo* le rôle des RARs et RXRs dans le développement. Cependant, l'interprétation de ces résultats est rendue difficile par la redondance génétique des RARs et RXRs qui pourrait compenser sur le plan fonctionnel l'absence d'une isoforme (Pour revue voir Chambon, 1995).

## **II/ STRUCTURE ET FONCTION DES RECEPTEURS DES RETINOIDES :**

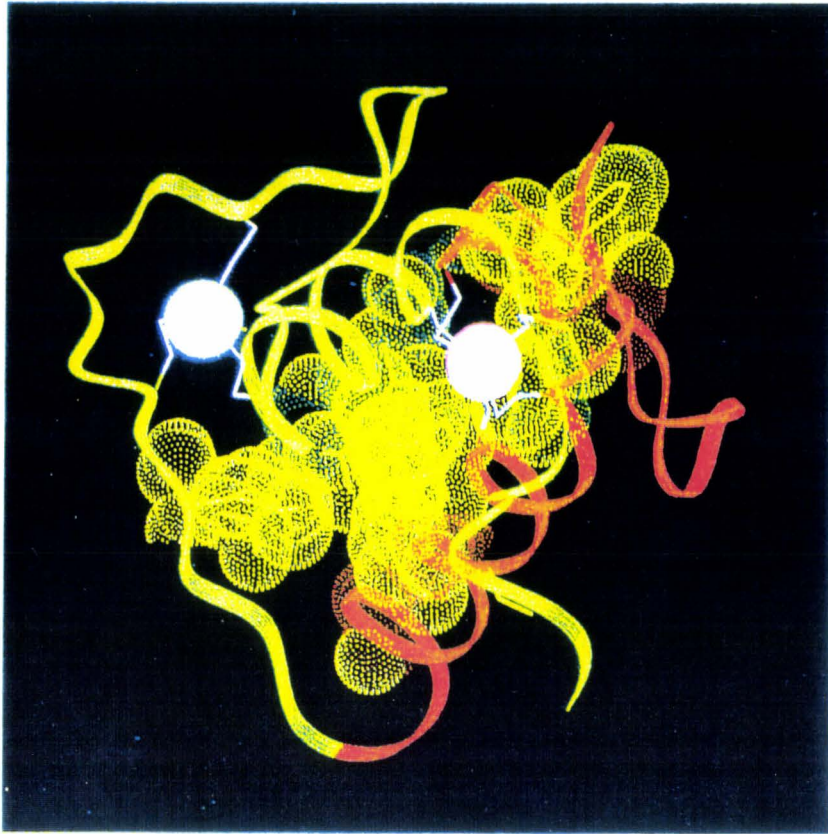
Le clonage des récepteurs des hormones stéroïdiennes a suscité un intérêt croissant dans l'étude du mécanisme moléculaire des hormones et des vitamines. Au cours de la dernière décennie, de nombreux récepteurs nucléaires ont été identifiés. Tous ces récepteurs présentent la même organisation structurale (Figure 9). Bien qu'au début on ait proposé six domaines (A-F), seuls quelques uns ont été identifiés chez tous les récepteurs. Parmi ces domaines, on distingue le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et celui de liaison à l'hormone (LBD), chacun étant composé de sous-domaines ou "boîtes".

### **1/ LE DBD, UN ENSEMBLE COMPLEXE DE "BOÎTES" :**

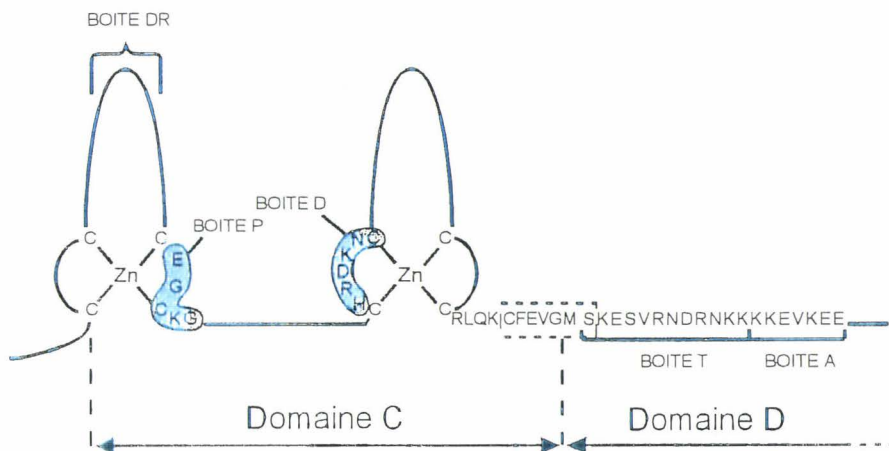
Le DBD est responsable de la reconnaissance et de la fixation à l'ADN. C'est le domaine le plus conservé parmi les récepteurs nucléaires (94% d'homologie entre les trois RARs et près de 50% d'homologie entre les différents membres de la famille des récepteurs stéroïdiens et thyroïdiens). Le DBD est constitué par des AAs hautement conservés chez les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires et dont la mutation entraîne une perte de l'activité de liaison à l'ADN (Sчена et al., 1989). Parmi ces AAs, on distingue huit cystéines qui participent à la formation de deux structures en boucles à zinc. Ces structures sont maintenues en place par l'établissement de liaisons de coordination entre quatre cystéines et un atome de zinc (Hard et al., 1990; Schwabe et al., 1990; Freedman et al., 1988). La boucle N-terminale est riche en acides aminés hydrophobes alors que la boucle C-terminale est composée par des résidus basiques (Green et Chambon, 1988). La détermination de la conformation tridimensionnelle du  $RAR\beta$  par RMN a permis de montrer que le DBD est constitué par deux modules. Chaque module comprend une zone de nucléation du zinc et d'une hélice  $\alpha$  amphipatique immédiatement adjacente. Les deux modules s'imbriquent l'un à l'autre



a)



b)



**Figure 10 : Structure du domaine de liaison à l'ADN de hRAR $\alpha$ .**

a/ Structure tridimensionnelle du DBD de hRAR. Les deux doigts de zinc sont colorés en rouge et vert. Les atomes de zinc sont représentés par des cercles blancs. (Knegtel et al., 1993).

b/ Schéma représentant les différentes boîtes constituant le DBD de hRAR $\alpha$ .

pour former un seul domaine globulaire. Les hélices  $\alpha$  de chaque module sont disposées perpendiculairement l'une par rapport à l'autre (Figure 10a). Mais ces dernières années, la structure du DBD est apparue plus complexe, et dotée de multiples fonctions. Des régions spécifiques appelées "boîtes" ont été définies sur le DBD par la mutagenèse dirigée (Figure 10b).

#### **a/ LA BOÎTE P :**

Les récepteurs nucléaires reconnaissent des séquences spécifiques sur l'ADN, grâce essentiellement à trois acides aminés situés à l'extrémité C-terminale du premier doigt de zinc (Figure 10, Green et al., 1988). Ces AAs forment la boîte P. Ainsi, un GR dont la boîte P a été remplacée par celle de ER, est capable de reconnaître les mêmes séquences d'ADN que l'ER. L'ER peut aussi lier un GRE (éléments de réponse aux récepteurs des glucocorticoïdes), si on remplace sa boîte P par celle de GR (Mader et al., 1989). La Val462, le dernier des AAs de la boîte P du GR, établit des liaisons de Van der Waals avec le groupement méthyle de la thymidine en position 4 du demi site 3' du GRE, une base qui est très spécifique des GREs. Comme il est illustré dans le tableau-1, les RXRs, les RARs, TRs et VDR possèdent la même boîte P de séquence EGCKG et peuvent se lier au même demi site (Tableau-1). Mais, les demi-sites naturels d'ADN de ces récepteurs sont arrangés différemment (voir paragraphe "éléments de réponse").

#### **b/ LES BOÎTES D ET DR :**

Des études structurales menées sur le GR, ont aussi révélé l'importance d'autres résidus, situés à l'extrémité N-terminale de second doigt à zinc du DBD, pour l'interaction du récepteur avec l'ADN et la dimérisation (Figure 10). Ces résidus forment la boîte D, et sont très conservés au sein de chaque sous famille des récepteurs nucléaires, ce qui suggère l'existence de propriétés de dimérisation différentes pour les différentes sous familles. Une autre région, intitulé boîte DR a été définie par Perlmann et coll. Cette boîte est localisée dans la boucle du premier doigt à zinc des RARs et TRs, et interagit avec la boîte D du RXR, donnant ainsi naissance à un hétérodimère asymétrique, qui se fixe sur des éléments de réponse organisés en répétitions directes (DR) (Perlmann et al., 1993).

#### **c/ LA BOÎTE T :**

Les premiers travaux de cristallographie (Luisi et al., 1990) et de RMN (Hard et al., 1990) menés sur le GR, la RMN de l'ER (Schwabe et al., 1990) et du RAR $\beta$  (Katahira et al., 1992), ont mis en évidence deux hélices  $\alpha$  dans les DBDs. Mais récemment, une troisième hélice, qui fait partie d'une région appelée la boîte T (Figure 10, Wilson et al., 1992) a été révélée par des études de RMN sur le RXR $\alpha$  et s'avère être

Boîte P	Recepteur nucléaire	Boîte D	Sous-famille
CGSCKV	GR	AGRND	GLUCOCORTICOIDE
	MR	AGRND	
	PR	AGRND	
	AR	ASRND	
CEGCKA	ER	PATNQ	OESTROGENE
CEGCKG	THR $\alpha$	KYDSC	THYROIDE/RETINOIDE
	THR $\beta$	KYEGK	
	NGF1B	LANKD	
	VDR	PFNGD	
	ECR	KFGRA	
	RXR $\alpha$	RDNKD	
	RXR $\beta$	RDNKD	
	RXR $\gamma$	RDNKD	
	USP	RENRN	
	TR2	RGSKD	
	RAR $\alpha$	HRDKN	
	RAR $\beta$	HRDKN	
	RAR $\gamma$	HRDKN	
PPAR	-- DRS		

**Tableau 1 : Classification des récepteurs nucléaires en fonction de la séquence de la boîte P ( extrait à partir de Pfahl et al., 1994)**

	BOITE T	BOITE A
RXR $\alpha$	KREAVQEERQRG	KDRNENE
RXR $\beta, \gamma$	KREAVQEERQRG	KDKDGDG
RAR $\alpha$	SKESVRNDRNKK	KKEVKKEE
RAR $\beta$	SKESVRNDRNKK	KKETSKQ
RAR $\gamma$	SKEAVRNDRNKK	KKEVKKEE

**Figure 11 : Comparaison des boîtes T et A chez les récepteurs des rétinoïdes (Pfahl et al., 1994)**

nécessaire pour l'hétérodimérisation de RXR $\alpha$  (Lee et al., 1993) et RXR $\beta$  avec les RARs (Wilson et al., 1992). Cette région est très conservée à l'intérieur des sous-familles RARs et RXRs (Figure 11). De plus, Lee et coll. suggèrent que l'hélice 3 est nécessaire non seulement pour les interactions protéine-protéine mais aussi pour les interactions ADN-protéine (Lee et al., 1993). Ces observations étendent donc le DBD jusqu'à la région dite "charnière" (appelée aussi le domaine D).

#### **d/ LA BOÎTE A :**

Une autre région a été définie à l'extrémité C-terminale du DBD. Cette région, appelée boîte A (Figure 10), a été identifiée pour la première fois chez le récepteur orphelin NGFI-B (Figure 10)(Wilson et al., 1992). Cette boîte A intervient dans la reconnaissance des bases situées en amont de l'élément de réponse de NGFI-B. La comparaison de séquence a révélé que les résidus qui forment la boîte A sont assez bien conservés parmi les récepteurs nucléaires. Bien que la divergence entre les boîtes A de RAR et RXR soit notable, les deux contiennent approximativement 60% des résidus chargés (Figure 11). Jusqu'à tout récemment, on ne savait pas si la boîte A jouait un rôle dans la spécificité de la reconnaissance de l'ADN par les RXRs et les RARs, ou si ce n'était qu'une caractéristique des récepteurs orphelins tels que le NGFI-B et SFI (Wilson et al., 1992, 1993). Le rôle fonctionnel de la boîte A a été mis en évidence par Kurokawa et coll., qui ont montré que des mutations de la boîte A de TR $\beta$  ou RXR $\alpha$  affectaient considérablement leurs propriétés de reconnaissance de l'ADN. Ainsi, des mutations ponctuelles dans la boîte A sont suffisantes pour abolir la liaison d'un homodimère T3R à un élément DR-4 et un palindrome inversé de type 5. Les mêmes mutations ponctuelles sur le T3R affectent l'affinité de l'hétérodimère T3R/RXR pour un DR-4 et dans une moindre mesure pour le TREpal(Kurokawa et al., 1993). La mutation de la boîte A du RXR affecte également le comportement de l'hétérodimère TR/RXR. Ces mutations ne semblent pas modifier la stabilité des interactions protéine-ADN, mais diminuent la sélectivité de liaison (quand il est complexé en dimère avec T3R) au demi-site 5' des éléments de réponse (Kurokawa et al., 1993). Ces expériences suggèrent que les résidus basiques de la boîte A de T3R et RXR sont importants pour stabiliser la liaison à l'ADN et pour définir la position du récepteur dans un hétérodimère, probablement grâce à leur capacité à interagir avec le petit sillon de l'ADN en amont du demi site (Kurokawa et al., 1993).

En conclusion, des récepteurs capables de lier le même demi site (AGGTCA) par le biais de la boîte P, sont apparemment capables de reconnaître différemment l'espacement et l'orientation des deux demi sites de différents éléments de réponse grâce à une combinaison des sous domaines de DBDs (boîtes), de telle façon que les interactions protéine-protéine et protéine-ADN puissent se faire de manière appropriée.

## 2/ LES ELEMENTS DE REPONSES AUX RETINOÏDES (RARES ET RXRES) :

Les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires modulent l'expression des gènes en se fixant sur des séquences précises de l'ADN, appelées les éléments de réponse à l'hormone (HREs). Plusieurs de ces séquences ont été identifiés dans la région promotrice de plusieurs gènes. Le premier HRE réellement bien caractérisé a été le GRE (Glucocorticoid Response Element). D'autres HREs ont été ensuite identifiés comme les EREs (Estrogen Response Element), les TREs (Thyroid Response Element), les VDREs (Vitamin D Response Element), les RAREs (Retinoic Acid Response Elements) et les RXREs (Retinoic X Response Elements).

L'élément structural de base qui constitue les RAREs est la séquence AGG/TTCA, que l'on peut rencontrer soit sous forme de répétitions directes (DR), de palindromes ou de palindromes inversés (Figure 12). Les DRs sont parmi les RAREs les plus actifs *in-vivo* parmi ceux-ci on distingue les DRs séparés par deux ou cinq nucléotides (DR-2 ou DR-5 respectivement). Le DR-5 est l'un des premiers RAREs à avoir été identifiés. Il a été localisé en amont du gène codant pour le RAR $\beta$  (de The et al., 1990; Sucov et al., 1990). Depuis, ce motif a été découvert en amont de nombreux gènes contrôlés par l'ATRA, y compris les trois gènes codant pour les RARs. Le motif DR-5 est parmi les plus abondant de la classe des RAREs. Le DR-2 est aussi un RARE efficace, bien qu'il soit moins fréquent. Il a été localisé notamment dans le promoteur du gène codant pour la CRABP II chez la souris. Il semblerait que dans ce cas l'activité du DR-2 nécessite la présence d'autres facteurs (Macgregor et al., 1992). A côté des DRs, une autre classe de RAREs a été identifiée, elle présente une structure en palindrome. L'un des meilleurs exemples qui représente cette classe est l'élément de réponse synthétique pour l'hormone thyroïdienne (TREpal) (Figure 12). Cet élément de réponse dérive du TRE localisé en amont du gène de l'hormone de croissance (Glass et al., 1987; Umesono et al., 1988), du VDRE du promoteur de l'ostéocalcine (Schüle et al., 1990), et de l'ERE du promoteur de la vitellogénine (Klein-Hitpass et al., 1986). Les RAREs organisés en palindromes répondent plus faiblement à l'ATRA que les DR. Ils requièrent généralement une surexpression des RARs pour être activés. En plus des RAREs organisés en répétitions directes et en palindromes, il existe une autre classe qui présente une structure plus complexe. En effet, dans cette classe on a constaté des demi sites qui sont très différents de la séquence consensus AGG/TTCA et qui sont orientés apparemment au hasard dans les promoteurs. Ces RAREs complexes répondent faiblement à l'ATRA, et généralement présente une faible affinité pour le récepteur *in-vitro*, et leur activation nécessite la surexpression des RARs (Vasios et al., 1989; Lucas et al., 1991; Raisher et al., 1992; Richard et al., 1991).

A l'inverse de l'hétérogénéité des RAREs, les RXREs sont exclusivement présents sous forme de DR-1. La plupart des RXREs découverts à ce jour, ont été identifiés dans les promoteurs des gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine A, des lipides et des acides gras, ce qui suggère que que les RXRs

		<b>RAREs</b>	
<b>Homodimères + Hétérodimères</b>	TREpal	→	AGGTCATGACCT TCCAGTACTGGA ←
	ApoA1-RARE	→	GGGTCTAGGGTTCA CCCAGATCCAAGT
	CRBP11-RARE	→	AGGTCACAGGTCACAGGTCACAGTTCA TCCAGTGCCAGTGTCAGTGTCAGT
	HIV-1-RARE	→	GGGTCAGATATCCACTGACCT CCCAGTCTATAGGTGACTGGA ←
<b>Hétérodimères</b>	DR-5	→	AGGTCACCAGGAGGTCA TCCAGTGGTCTCCAGT
	β-RARE	→	GGTTCACCGAAAGTTCA CCAAGTGGCTTTCAAGT
	CRBPI-RARE	→	AGGTCAAAAGTCA TCCAGTTTTTCAGT
	γF-RARE	→	TGACCCTTTTAACCAGGTCA ACTGGGAAAATTGGTCCAGT ←

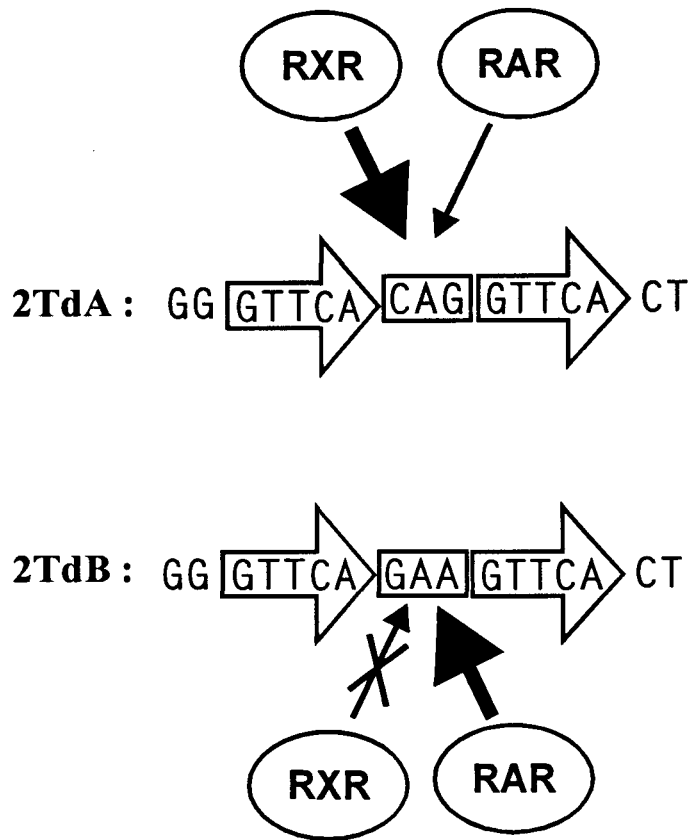
**Figure 12 : Eléments de réponse. Les récepteurs des rétinoïdes interagissent comme des homo- ou hétérodimères à une large variété d'éléments de réponse.**  
(D'après Pfahl et al., 1994)

pourraient réguler plusieurs voies métaboliques.

Les RARs et les RXRs reconnaissent différemment les DRs, indiquant ainsi que les propriétés intrinsèques des récepteurs interviennent dans la reconnaissance des RAREs. Les homodimères RXRs se lient préférentiellement à un DR-1. Les homodimères RAR-RAR et les hétérodimères RAR-RXR sont capables de se lier efficacement à des DR-5, DR-4, DR-3 ou DR-2, alors que leurs affinités pour un DR-1 est très faible (Mader et al., 1993). Par d'élégantes expériences, plusieurs groupes ont montré qu'en fonction de l'élément l'orientation de l'hétérodimère RAR-RXR est différente. En effet, sur un DR-2 ou DR-5 le RXR occupe le demi-site 5' de l'élément de réponse, alors que sur un DR-1 il occupe le demi-site 3' (Kurokawa et al., 1993; Zechel et al., 1994; Predki et al., 1994).

Des expériences menées par Mader et coll. ont montré que la reconnaissance par le complexe RAR/RXR des répétitions directes constituées par le motif PuGGTCA ou PuGTTCA peut dépendre à la fois de l'orientation relative et l'espacement des motifs mais également des séquences qui entourent l'élément de réponse (Mader et al., 1993). Ainsi un élément possédant un "bon" espacement mais un "mauvais" environnement en nucléotides sera reconnu moins efficacement qu'un élément avec un espacement défavorable et avec des séquences environnantes favorables. Par exemple, les RARs reconnaissent plus efficacement le RARE- $\alpha$ 2 que le RARE- $\beta$ 2, bien que ces deux éléments présentent les mêmes motifs répétés (PuGTTCA séparé par 5 pb). Un autre exemple montrant l'importance de l'environnement nucléotidique est illustré par deux éléments séparés par 2 pb, qui sont reconnus différemment par les RARs et les RXRs (Figure 13). Ces deux éléments diffèrent uniquement par l'identité de la séquence d'espacement et par l'identité de la purine qui précède le second motif GTTCA. Ainsi, les RARs sont capables de se lier et d'activer le 2TdB aussi efficacement que le RARE- $\alpha$ 2, alors qu'ils sont incapables de se lier et de fixer le 2TdA. Par contre, les RXRs activent préférentiellement 2TdA (Figure 13)(Mader et al., 1993). L'activation des RAREs semblent donc dépendre non seulement de la séquence du demi site, mais aussi des nucléotides voisins.

A côté des gènes activés par les RARs il existe plusieurs gènes qui sont réprimés par les RARs. Bien qu'ils soient mal caractérisés ces RAREs répresseurs ne présentent ni la même séquence ni la même organisation structurale des motifs que les RAREs classiques. D'un point de vue mécanistique, il semble que la répression de ces gènes soit due surtout à une interférence des RARs avec les facteurs activant la transcription des gènes réprimés par l'ATRA. Ainsi dans le cas des gènes de la collagénase et la stromelysine, les RARs répriment l'activité du facteur AP-1 (Schule et al., 1991; Nicholson et al., 1990). L'inhibition des promoteurs de CRBPII et de l'acétyl-CoA oxydase, se fait *via* une interférence des RARs avec les RXRs (Mangelsdorf et al., 1991). Enfin, on ne connaît pas encore de RXRE répresseurs.



**Figure 13 : La nature des nucléotides qui sépare les demi sites module la liaison des RARs et RXRs à leurs éléments de réponse**

(Adapté d'après les résultats de Mader et al., 1993)



### **3/ L'ACTIVITE DE TRANSACTIVATION**

Les fonctions de transactivation des récepteurs nucléaires, appelées AFs (Activation Function), ont été attribuées à deux domaines différents (Tora et al., 1989): AF1, situé dans la région N-terminale (ou le domaine A/B), ne nécessitant pas le ligand pour son activité, et AF2, qui est situé dans le LBD, dont l'activité dépend de la présence du ligand. Ces deux fonctions de transactivation ont été trouvées chez plusieurs récepteurs nucléaires, comme ER, PR, GR et aussi RARs et RXRs.

#### **a/ AF1 :**

AF1s a été défini pour les trois RARs ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ), mais seulement pour deux RXRs ( $\alpha$  et  $\beta$ ) (Nagpal et al., 1993). Par elles mêmes, les AF1s ne présentent qu'une faible activité transactivatrice, mais cette dernière est fortement stimulée en présence d'AF2s (Nagpal et al., 1993). Cet effet synergique des deux AFs a déjà été démontré dans le cas des ERs (Tora et al., 1989). Les AF1s ont une spécificité d'action dépendant du promoteur (Nagpal et al., 1992a; Kumar et al., 1987) et du type cellulaire (Tora et al., 1989; Folkers et al., 1993). Cette dernière particularité semble indiquer que les AF1s n'interagissent pas directement avec la machine transcriptionnelle, mais plutôt avec des intermédiaires qui sont spécifiques à un type cellulaire. Le domaine N-terminal des RXRs ainsi que celui des RARs est riche en proline (P) et sérine (S) (Figure 14A). Or, nous savons que plusieurs facteurs de transcription présentent des domaines de transactivation riche en prolines. Ainsi, le facteur constitutif CTF/NF-1 possède un domaine d'activation riche en proline (20 à 30%) (Mermod et al., 1989), ainsi que AP-2 (Williams et al., 1988), Oct-2 (Ko et al., 1988) et le facteur de réponse au sérum (Norman et al., 1988). Ces résidus prolines qui introduisent des "coudes" dans les hélices alpha, peuvent contribuer à la formation d'une structure spécifique à l'activité transcriptionnelle. Récemment, le groupe de Vandersaag a montré que les acides aspartiques sont nécessaire pour l'activité transcriptionnelle de AF1 du RAR $\beta$ 2 (Folkers et al., 1995). D'un autre côté, la présence de multiples sérine dans le domaine N-terminal, suggère que la phosphorylation pourrait réguler l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux rétinoïdes, comme c'est le cas pour plusieurs récepteurs nucléaires. La phosphorylation du domaine N-terminal a déjà été démontrée pour PR, GR, TR $\alpha$ , RAR $\gamma$  et récemment pour RAR $\alpha$  (voir chapitre "Phosphorylation et récepteurs nucléaires").

#### **b/ AF2, UN DOMAINE ACIDE IMPLIQUÉ DANS LA TRANSACTIVATION !**

AF2 est une fonction de transactivation dépendant du ligand, qui a été localisée dans le LBD de tous les récepteurs nucléaires ayant un ligand spécifique. En présence du 9cisRA ou l'ATRA, l'AF-2 de RAR est activée (Nagpal et al., 1993). Ainsi il semble que la liaison de l'hormone aux RARs induit un changement de conformation qui favorise l'exposition du domaine d'activation à la surface de la protéine. Ces changements

de conformation ont été montrés par des expériences de digestion par des protéases en présence ou en absence de ligand (Bhat et al., 1993; Allan et al., 1992; Keidel et al., 1994). Cette activité transcriptionnelle dépendant du ligand peut être inhibée par des délétions ou des mutations ponctuelles à l'extrémité C-terminale du LBD. Les mutations dans cette région n'affectent pas l'activité de liaison à l'ADN, ni au ligand, bien que les récepteurs mutés (ER, GR et T3R) montrent une affinité pour le ligand moindre par rapport au récepteur natif (Danielian et al., 1992; Saatcioglu et al., 1993; Zenke et al., 1990). Il est intéressant de noter que certains des mutants T3R sont des dominants négatifs (Saatcioglu et al., 1993; Zenke et al., 1990). L'alignement de la région C-terminale de plusieurs récepteurs nucléaires révèle l'existence de résidus acides hautement conservés, entourés par des résidus hydrophobes (Figure 14B). La modification des résidus hydrophobes ou acides peut abolir l'activation transcriptionnelle dépendant du ligand du TR (Saatcioglu et al., 1993) et ER (Danielian et al., 1992). Toutes ces observations suggèrent que l'AF-2 est finalement un domaine d'activation acide (AADs) comme celui de Gal4 (Gill et al., 1987), GCN4 (Hope et al., 1988) et VP16 (Sadowski et al., 1988; Triezenberg et al., 1988). Récemment, le groupe de Chambon en collaboration avec celui de Moras ont montré que l'AF-2 du RXR $\alpha$  (Bourguet et al., 1995) et de RAR $\gamma$  (Renaud et al., 1995) adopte une structure en hélice  $\alpha$  qui pourrait interagir avec les hélices  $\alpha$  amphipatiques basiques présentes dans les facteurs de transcription comme TFIID et TFIIB. A cet égard, on a déjà observé l'interaction directe de ER, PR et VDR avec TFIIB *via* leurs domaines de liaison au ligand (contenant AF-2). D'un autre côté, le concept du domaine acide d'activation est en train d'être remis en question à la lumière d'études qui montrent que le domaine d'activation de Gal4 ne forme pas une hélice alpha ou une région amorphe mais plutôt un feuillet bêta où les résidus acides ne sont pas nécessaires à l'activité transcriptionnelle (Leuther et al., 1993; Van Hoy et al., 1993). Enfin, dans certaines lignées cellulaires la protéine E1A semble jouer le rôle de médiateur entre RAR $\beta$  et TFIID (Berkenstam et al., 1992; Kruyt et al., 1993) ou TBP (TATA-binding protein, Folkers et al., 1995). Récemment, on a montré que AF-2 du RXR interagit directement avec la TBP, cette interaction dépend du ligand (Schulman et al., 1995).

Si on considère le fait que AF-1 montre généralement une spécificité cellulaire et n'interagit pas directement avec TFIIB, il est tentant d'imaginer l'existence d'une protéine E1A-like qui pourrait relier les domaines AF1 avec le facteur de transcription TFIID, alors que TFIIB interagirait directement avec AF-2 (Figure 15). Dans ce modèle, les récepteurs nucléaires se lient à leurs éléments de réponse en homo ou hétérodimère, et stabiliserait l'association de TFIIB avec TFIID sous l'effet synergique de deux AF-2 et une AF-1. Ces multiples interactions stabiliserait la formation du complexe de préinitiation (remarquons que dans le modèle une interaction stable entre TFIID et le récepteur nucléaire nécessite à la fois AF1 et AF2, alors qu'une interaction stable entre TFIIB et les autres récepteurs requiert uniquement AF-2).

Récemment, Le Douarin et coll. ont isolé une protéine nucléaire, appelée TIF1, qui augmente l'activité

**A)**

<u>DOMAINE A/B</u>	<u>RESIDUS SERINE ET PROLINE (%)</u>
hRXR $\alpha$	35%
mRXR $\beta$	49%
mRXR $\gamma$	31%
hRAR $\alpha$ 1	38%
hRAR $\beta$ 2	28%
hRAR $\gamma$ 1	33%

**B)**

<b>RXR<math>s</math></b>	I D T F L M E M L E A P H Q	<b>419</b>
<b>RAR<math>\alpha,\beta</math></b>	M P P L I Q E M L E N S E G	<b>419, 412</b>
<b>RAR<math>\gamma</math></b>	M P P L I R E M L E N P E M	<b>421</b>
<b>TR<math>\alpha</math></b>	F P P L F L E V F E D Q E V	<b>410</b>
<b>TR<math>\beta</math></b>	L P P L F L E V F E D	<b>456</b>
<b>ER</b>	L Y D L L L E M L D A H R L	<b>549</b>

**Figure 14 : (A) Pourcentage des résidus sérine (S) et proline (P) dans le domaine A/B des récepteurs nucléaires.**

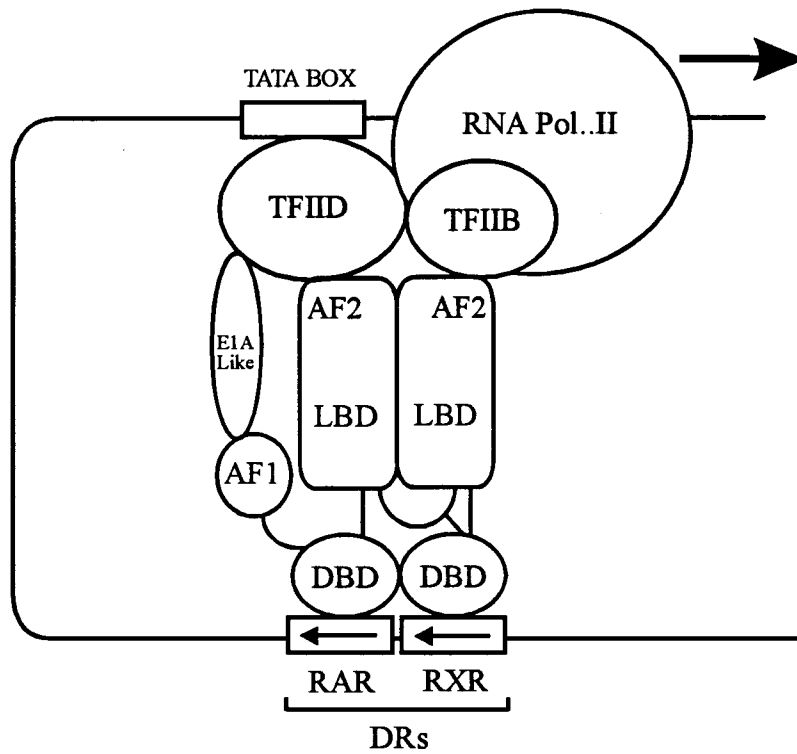
**(B) Alignement des résidus conservés de la région AF-2 chez plusieurs récepteurs nucléaires (Pfahl et al., 1994).**

de AF-2 de RAR et RXR en présence du ligand (Ledouarin et al.,1995). TIF1 n'interagit ni avec TFIID ni avec TFIIB *in vitro*, ce qui signifie que probablement il existe un médiateur entre TIF1 et la machinerie transcriptionnelle. L'équipe de Parker a également isolé une protéine, appelée RIP140, qui interagit fortement avec l'AF-2 du ER en présence du ligand (Cavailles et al.,1995). En présence d'oestrogène, RIP140 est capable de moduler l'activité transcriptionnelle du ER, bien qu'il soit incapable d'interagir directement avec TFIIB ou TBP (Cavailles et al.,1995).

#### **4/ ACTIVITE DE DIMERISATION ET DE LIAISON AU LIGAND :**

##### **a/ LE DOMAINE DE LIAISON AU LIGAND :**

Chez les RARs le domaine de liaison aux rétinoïdes est constitué par 220 aas situés à l'extrémité C terminale de la protéine. Cette région a été définie par homologie avec le LBD des autres récepteurs stéroïdiens (McDonnell et al.,1989; Petkovitch et al.,1987). Depuis, plusieurs groupes ont montré que ce domaine isolé est capable de lier l'ATRA (Cavey et al.,1990; Crettaz et al.,1990; Sucov et al.,1990). Dans ce domaine, certains AAs semblent jouer un rôle critique dans la liaison des ligands. Tairis et coll. ont montré que la mutation de l'Arg269 et de la Lys220 du RAR $\beta$  en alanine entraîne une augmentation (580 fois) du Kd pour l'ATRA (Tairis et al.,1994; 1995). Le remplacement de ces deux AAs par des résidus alanine ou glutamine entraîne une forte diminution de la transactivation et de la capacité du récepteur à lier son ligand (Tairis et al., 1995). En 1988, Brand et coll ont montré que RAR $\beta$  et RAR $\alpha$  présentent des caractéristiques de liaison différentes des rétinoïdes (Brand et al.,1988). Ces différences semblent être liées à une région de 70 AAs (192-261) située à l'extrémité N-terminale du domaine E (Ostrowski et al.,1995). Deux AAs, la Ser232 et la Thr239 pour RAR $\alpha$  et Ala225 et Ile232 pour RAR $\beta$  ont été identifiés comme étant à l'origine de ces différences entre les deux isoformes. Dans notre laboratoire, Lefebvre et coll (1995) ont montré que l'extrémité C-terminale du domaine D (186-198) du RAR $\alpha$  est nécessaire pour l'activité de liaison au ligand. L'extrémité C-terminale du domaine E semble moduler les constantes d'association des rétinoïdes naturels et synthétiques (Lefebvre et al.,1995). Lefebvre et coll ont également observé un phénomène de coopérativité positive pour la liaison au ligand naturel, qui semble être lié à la formation d'homodimère RAR $\alpha$  (Lefebvre et al.,1995). Récemment, le groupe de Grippo a mis en évidence l'importance de la Met406 et de l'Ileu410 dans la liaison de hRAR $\alpha$  à l'acide 9cis rétinoïque (Tate et al.,1995). Toutefois ce résultat est controversé par les récents résultats de Lefebvre et coll. qui montre que la substitution de la Met406 par une alanine induit une diminution d'affinité pour la plupart des rétinoïdes testés (Lefebvre et al en préparation). Enfin, le groupe de Chambon en collaboration avec celui de Moras ont réussi récemment



**Figure 15 : Modèle illustrant la stabilisation du complexe de préinitiation de la transcription par l'hétérodimère RXR/RAR .**  
 (D'après Pfahl et al., 1994)

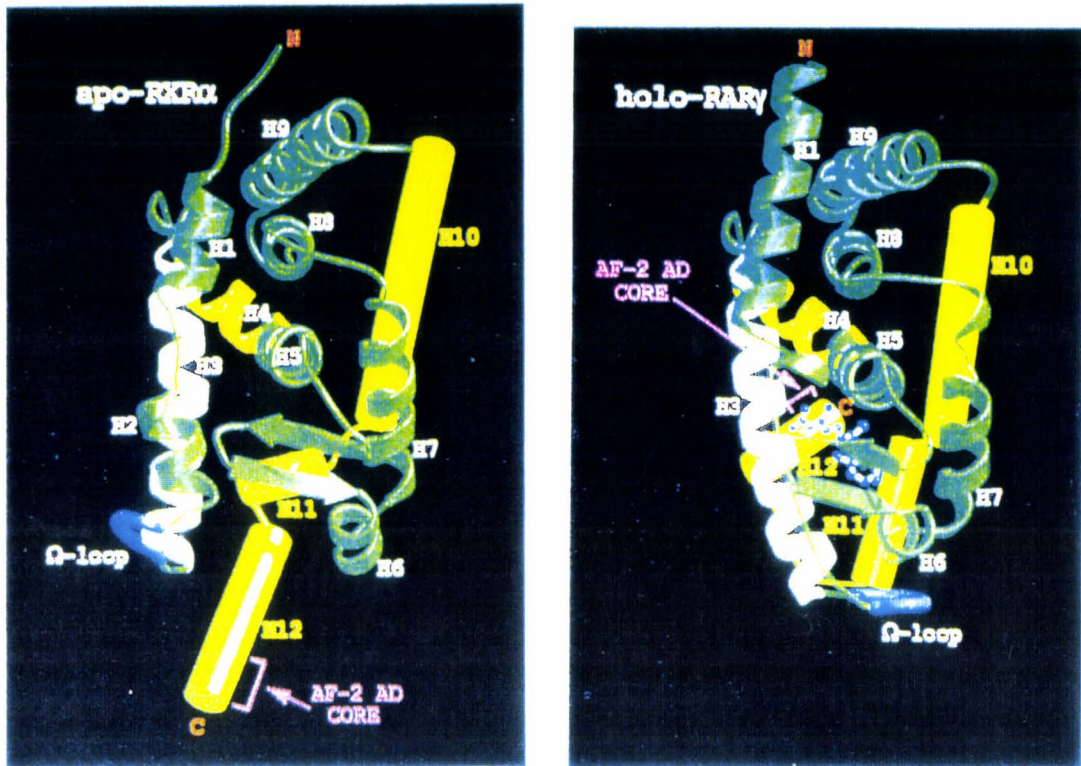


Figure 16 : Modèle représentant la structure tridimensionnelle du LBD de l'apo hRXR $\alpha$  (à gauche) et du LBD de l'holo hRAR $\gamma$  (à droite) (Renaud et al., 1995).

Ce schéma met l'accent sur les différences de conformation entre ces deux domaines. En particulier, on peut remarquer le redressement de l'extrémité C-terminale et le basculement de la boucle  $\Omega$ . Il faut aussi noter la légère torsion de l'hélice H3 qui permet d'obtenir une structure plus compacte du LBD hRAR $\gamma$ .

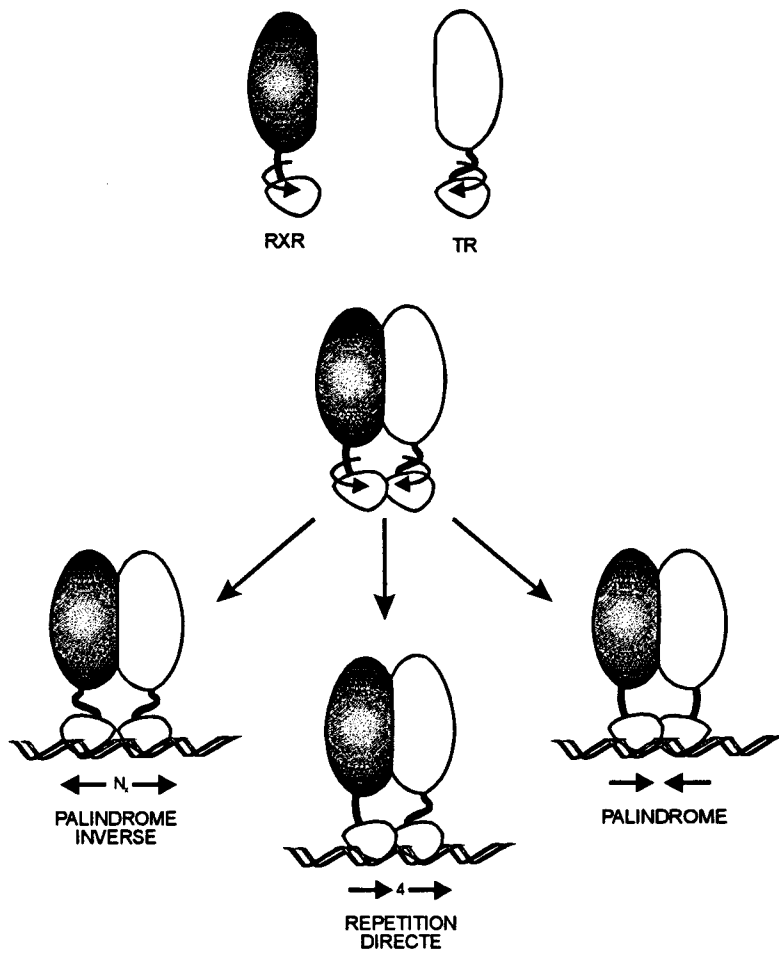
H3 est en blanc, H4 est en orange, H10, H11 et H12 sont représentées par des cylindres jaunes. La boucle  $\Omega$  est en bleue. Le domaine de transactivation (AF-2AD) est également représenté.

de cristalliser le LBD du RXR $\alpha$  (Bourguet et al., 1995) et du LBD de RAR $\gamma$  complexé à l'ATRA (Renaud et al., 1995). Ce domaine présente une structure dite "Sandwich d'hélices  $\alpha$ " constitué généralement par 12 hélices  $\alpha$  et deux plis  $\beta$  (Figure 16). Ce travail a montré que l'ATRA se loge dans une poche hydrophobe constituée par les résidus des hélices H1, H3, H5, la boucle entre H6 et H7, la boucle H11-H12 et l'hélice H12 (Figure 16). Des expériences de mutagenèse dirigée menées sur le LBD des autres récepteurs nucléaires (stéroïdiens, thyroïdiens et de l'acide rétinoïque) semblent confirmer l'existence d'une poche similaire. Cette réussite constitue une étape clé dans la compréhension de la structure tridimensionnelle du LBD. La structure du LBD du holo hRAR $\gamma$  et celle de l'apo hRXR $\alpha$  sont très similaire, la différence majeure réside dans la position de l'hélice H12. Il est donc tentant d'expliquer cette différence de structure non pas à des différences intrinsèques entre RAR et RXR, mais plutôt à une transition induite par le ligand qui va convertir la structure du LBD de l'apo hRAR $\gamma$ , similaire à celle de RXR $\alpha$ , en celle de l'actuel LBD de l'holo hRAR $\gamma$ .

#### **b/ L'INTERFACE DE DIMÉRISATION :**

L'hypothèse de la formation de dimères entre les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, a été initialement démontrée par l'étude de la coopération entre RAR et T3R vis à vis de la liaison à un TRE (Glass et al., 1989) et par la capacité de l'extrémité C-terminale de T3R à inhiber de façon dominante la transcription induite par RAR (Forman et al., 1989). Depuis, de nombreux travaux ont montré que le RAR, TR et VDR forment des hétérodimères avec des protéines nucléaires. Plusieurs groupes, ont montré indépendamment que RXR est l'un des partenaires le plus fréquent dans la formation des hétérodimères avec T3R, RAR et VDR *in vitro*.

Bien qu'en solution, l'extrémité C-terminale soit nécessaire aux interactions protéine-protéine et la liaison à l'ADN, ce domaine seul est insuffisant pour spécifier les préférences de dimérisation. Les RARs entiers sont incapables de former des homodimères en solution alors que le domaine C-terminal des RARs peut former des homodimères (Kurokawa et al., 1993; Glass et al., 1990). Ces expériences suggèrent que le DBD ou l'extrémité N-terminale de RAR inhibe la formation des homodimères. Bien que les AAs de l'extrémité C-terminale impliqués dans la dimérisation ne soient pas encore identifiés, deux régions semblent être importantes pour la dimérisation. L'une de ces régions, appelée Ti (inhibitor of transcription) (Forman et al., 1990), est très conservée parmi les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires et est localisée dans le LBD. Des mutations dans cette région inhibent la capacité de T3R à former des hétérodimères ou des homodimères, sans affecter sa capacité de liaison à l'hormone (O'Donnell et al., 1991; Lee et al., 1992; Rosen et al., 1993). Cette région est aussi importante dans la dimérisation du VDR et des RARs et l'hétérodimérisation



**Figure-17 : Modèle de liaison d'un hétérodimère à des éléments de réponse organisés en répétition directe, en palindrome ou en palindrome inversé.**

(Adapté à partir de Glass, 1994)



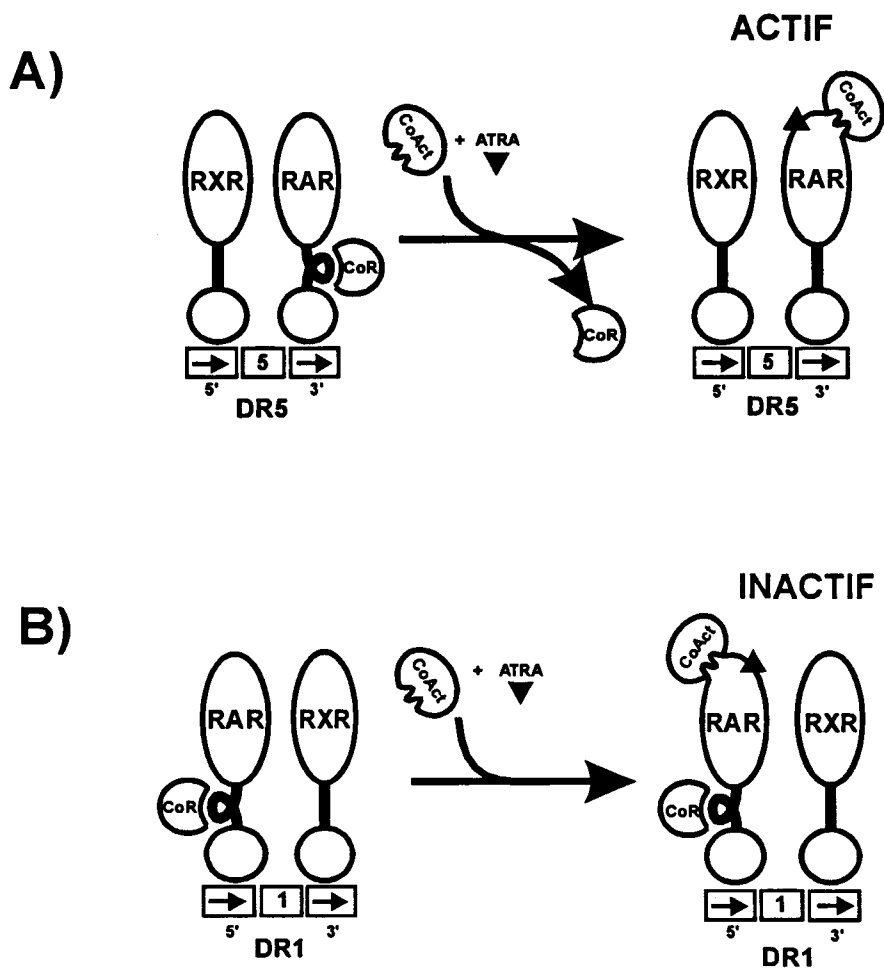
du RXR $\beta$  (Rosen et al., 1993).

L'extrémité C-terminale de T3R, RARs et RXRs est riche en acide aminés hydrophobes (leucine, isoleucine, valine, méthionine, phénylalanine) disposés régulièrement en 9 motifs appelés "heptad repeat" (Forman et al., 1989). Ces AAs sont repliés au sein d'une hélice alpha, de telles heptades vont former une surface hydrophobe d'un seul côté de l'hélice. on sait que de telles surfaces sont très favorables à la formation de dimères entre molécules, comme c'est le cas pour les protéines à "crémaillère à leucine" ou à motifs "hélice-boucle-hélice" (Busch et Sassone-corsi, 1990). La neuvième heptade est très conservée parmi les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, et joue un rôle déterminant dans l'homodimérisation de l'ER (Fawell et al., 1990), et T3Rs (Yu et al., 1991) ainsi que dans la formation des hétérodimères entre T3Rs, RARs et RXRs (Kurokawa et al., 1993; Katz et al., 1992). La cristallisation du LBD du RXR $\alpha$  a montré que les huit premières heptades sont plutôt impliquées dans la stabilisation de la structure tridimensionnelle du RXR $\alpha$  (Bourguet et al., 1995). La délétion à la fois de la région Ti et de la neuvième heptade, abolit la capacité de TR à former des homodimères et/ou des hétérodimères sur des sites en répétition directes, en palindromes ou en palindromes inversés (Kurokawa et al., 1993; Rosen et al., 1993). Des mutations ponctuelles réalisées sur les résidus hydrophobes conservés de la neuvième heptade de T3Rs et RARs inhibent leur capacité à former des hétérodimères en absence de ligand (Auflegner et al., 1993). Fait surprenant, la présence du ligand restaure la capacité d'hétérodimérisation de la plupart de ces mutants. Ces observations confortent l'idée que la liaison du ligand influence l'interface de dimérisation et les résidus de cette interface n'ont pas la même importance pour l'homo ou l'hétérodimérisation. Finalement, Kurokawa et coll ont suggéré que le DBD pourrait être capable d'effectuer une rotation de 180° par rapport à l'interface de dimérisation, ce qui permettrait aux récepteurs de dimériser et de se fixer à la fois sur des palindromes, des DRs ou des palindromes inverses (Figure 17).

Récemment, trois laboratoires ont identifiés deux facteurs qui interagissent avec les récepteurs nucléaires et répriment la transcription induite par ces récepteurs. Ces deux facteurs, appelés N-CoR (nuclear receptor corepressor, Hörlein et al., 1995; Kurokawa et al., 1995), et SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor, Chen et Evans, 1995), interagissent avec la région charnière (domaine D) de T3R et RAR (Figure 18). En présence des ligands, N-CoR et SMRT sont incapables d'interagir avec les récepteurs.

## **5/ LE ROLE CENTRAL DU RXR :**

Puisque le RXR est capable d'hétérodimériser avec T3R, RAR et VDR, son ligand 9cisRA, peut potentiellement réguler diverses voies de signalisation hormonale. Ainsi la spécificité d'action de ces hétérodimères peut être biaisé par la présence du 9cRA. Un début de réponse nous vient des travaux de Kurokawa et coll.,



**Figure 18 :** (A) Les hétérodimères RAR/RXR se fixe à un DR-5. En absence de l'ATRA le corepresseur (CoR) se lie au complexe et réprime la transcription. Le ligand induit à la fois la dissociation du CoR mais aussi le recrutement du coactivateur (CoAct), ainsi le complexe devient actif.

(B) Sur un élément DR-1, l'orientation du complexe est inversée, le RAR se fixe au demi site 5'. Dans cette configuration le ligand est incapable d'induire la dissociation du CoR, d'où inhibition de la transcription. (Perlmann et Vennström, 1995)

qui ont observé que dans l'hétérodimère RXR/RAR, qui se fixe à un DR-5 ou DR-1, seul le RAR est capable de fixer le ligand, alors que son partenaire RXR est incapable de le faire (Kurokawa et al., 1994). Dans ces circonstances, RXR fonctionne comme un facteur auxiliaire. Ce résultat corrobore le fait que l'activation du RXR par un ligand spécifique n'induit pas d'activité transcriptionnelle par le promoteur de RAR $\beta$ 2 inductible par ATRA *in vivo* dans les cellules du carcinome embryonnaire F9 (Davis et al., 1994) ou *in vitro* (Valcarcel et al., 1994). Le 9cis RA est incapable d'activer les gènes qui sont sous le contrôle de T3R, bien que ce dernier forme des hétérodimères avec RXR. D'autant plus que le T3R, en absence de T3, bloque l'activation induite par le ligand d'une chimère Gal4-RXR (Forman et al., 1995; Qi et al., 1995). Bien qu'un monomère RXR soit capable de lier le ligand 9cRA, sa capacité, dans un complexe avec RAR ou T3R à fixer son ligand est apparemment abolie par des interactions protéine-protéine. Ces travaux mettent en évidence un nouveau concept d'interaction des récepteurs nucléaires avec leurs ligands (Leblanc et Stunnenberg, 1995). Ainsi il semble que la spécificité de liaison au ligand n'est pas seulement déterminée par le LBD mais aussi par l'état de dimérisation. Des travaux menés sur le récepteur de l'ecdysone chez la Drosophile (EcR), ont montré que EcR a besoin de USP (l'homologue du RXR chez la Drosophile) pour lier l'ecdysone, EcR seul ne lie pas l'ecdysone (Koelle et al., 1992). Dans ce cas, USP ou RXR facilite la liaison du EcR à l'ADN, alors que l'ecdysone et le 9cRA augmente l'affinité du complexe EcR/RXR à un EcRE (Thomas et al., 1993; Yao et al., 1992). Bien que le dilemme de l'activation pléiotropique par le 9cRA soit en partie expliqué par le fait que RXR soit insensible à l'action de 9cRA dans les hétérodimères RAR/RXR, T3R/RXR et VDR/RXR, la question sur le rôle du 9cisRa reste toujours posée. Cependant certaines observation commencent à apporter un début de réponse. Ainsi le 9cRA et l'acide clofibrique semble agir de façon synergique sur l'hétérodimère RXR/PPAR (Keller et al., 1993; Kliewer et al., 1992). Les ligands de RAR et de RXR semblent avoir une action additive sur un DR2 (Durand et al., 1992). Une preuve plus directe sur l'effet du ligand sur l'activité transcriptionnelle du RXR a été apportée grâce à l'utilisation de rétinoïdes spécifiques du RXR (Lehmann et al., 1992). Enfin récemment, on a montré que RXR est capable d'hétérodimériser avec des récepteurs orphelins (NGF1 ou Nurr1) sans se lier à l'ADN. Les complexes NGF1/RXR ou Nurr1/RXR sont activés par le 9cisRA. Ces complexes se comportent comme des récepteurs multimériques, où la spécificité d'interaction avec l'ADN est sous le contrôle du récepteur orphelin alors que la propriété d'interagir avec le ligand est sous le contrôle du RXR (Perlmann et al., 1995). En résumé, le RXR peut jouer plusieurs rôles en fonction de son partenaire d'hétérodimérisation

- (i) les homodimères RXR/RXR qui sont activés par le 9cisRA.
- (ii) Dans les hétérodimères avec les récepteurs nucléaires (T3R, VDR et RARs), le RXR bien qu'il soit toujours capable de lier son ligand, est inactif. Dans ce cas, il joue

uniquement le rôle d'un coactivateur dans l'induction de la réponse transcriptionnelle.

(iii) Dans les hétérodimères RXR et récepteurs orphelins, le RXR est activé par son ligand.

**Chapitre II :**  
**PHOSPHORYLATION ET DEPHOSPHORYLATION**

## **A/INTRODUCTION :**

Au cours de ces dernières vingt années, notre compréhension des mécanismes moléculaires et de la diversité des systèmes de transduction du signal s'est considérablement accrue. Maintenant, nous sommes confrontés à des cellules munies de milliers de récepteurs membranaires, chacun d'entre eux étant connecté à un système de transduction particulier. La complexité de tels systèmes amène la question suivante : comment la cellule répond-elle à une variété de stimuli externes *via* les systèmes de transduction, et comment ces derniers communiquent-ils entre eux ? Dans le cas extrême, nous pouvons imaginer que les systèmes de transduction sont isolés complètement les uns des autres. D'un autre côté, le cas le plus vraisemblable serait d'envisager l'existence d'un contrôle réciproque qu'exercerait chacun des systèmes de transduction les uns sur les autres.

Parmi les mécanismes de régulation de l'activité des protéines les plus répandus, la phosphorylation joue un rôle crucial dans de nombreuses réponses cellulaires. Les protéines kinases, et leurs complémentaires fonctionnels, les phosphatases, représentent un groupe d'enzymes qui modulent l'activité biologique des protéines d'une manière rapide et réversible. Chez les eucaryotes, on distingue en général, deux types de protéines kinases, celles qui transfèrent un phosphate sur des résidus sérine ou thréonine, et celles qui transfèrent le phosphate sur des résidus tyrosine. Les protéines phosphatases sont également subdivisées en deux familles, les sérine/thréonine phosphatases et les tyrosines phosphatases. Dans ce chapitre, je vais me restreindre à l'étude des protéines kinases C et des sérine/thréonine phosphatases.

## **B/ LA FAMILLE DES PROTEINES KINASES C :**

La PKC a été identifiée et caractérisée initialement par le groupe de Nishizuka en 1977 (Takai et al., 1977). Il a ensuite montré que la PKC est une kinase dépendante du calcium et des phospholipides (Takai et al., 1979). Deux découvertes majeures au début des années 80 mettent en évidence l'importance de la PKC dans le mécanisme de transduction de signal et la promotion de tumeur. La première montre que la PKC est stimulée par le diacylglycérol, un produit du cycle des phosphoinositides (Kishimoto et al., 1980). Ensuite on a montré que la PKC est un récepteur intracellulaire des esters de phorbol (Castagna et al., 1982; Niedel et al., 1983). Plusieurs travaux, au début des années 80 ont clarifié les mécanismes par lesquels le calcium et les phospholipides activent la PKC. Ces travaux ont également permis de caractériser de nombreux activateurs, inhibiteurs et substrats de PKC. Depuis, on a mis en évidence des mécanismes d'autophosphorylation, d'inhibition par le pseudosubstrat et de translocation. Tous ces mécanismes sont traités dans les paragraphes suivants.

	<b>Isoformes</b>	<b>Nombre d'aas</b>	<b>Ca<sup>2+</sup> et activateurs lipidiques</b>	<b>Expression tissulaire</b>
<b>cPKC</b>	$\alpha$	672	Ca <sup>2+</sup> , DAG, PS, AGI, lysoPC	Ubiquitaire
	$\beta$ I	671	"	Quelques tissus
	$\beta$ II	671	"	Plusieurs tissus
	$\gamma$	697	"	Cerveau uniquement
<b>nPKC</b>	$\delta$	673	DAG, PS	Ubiquitaire
	$\epsilon$	737	DAG, PS, AGI, PIP <sub>3</sub>	Cerveau et d'autres
	$\eta$ (L)	683	DAG, PS, PIP <sub>3</sub> , Sulfate de cholestérol	Peau, poumon, coeur
	$\theta$	707	?	Muscle, cellules T, etc.
	$\mu$	912	?	Cellules NRK
<b>aPKC</b>	$\zeta$	592	PS, AGI, PIP <sub>3</sub>	Ubiquitaire
	$\lambda$ ( $\iota$ )	587	?	Plusieurs tissus

**Tableau 2 : Résumé des caractéristiques des isoformes de PKC**  
(Adapté à partir de Nishizuka, 1995)

DAG : diacylglycérol, PS : phosphatidylsérine, AGI : acides gras insaturés, PIP<sub>3</sub> : phosphatidylinositol triphosphate, LysoPC : Lysophosphatidylcholine.

## **I/ STRUCTURE :**

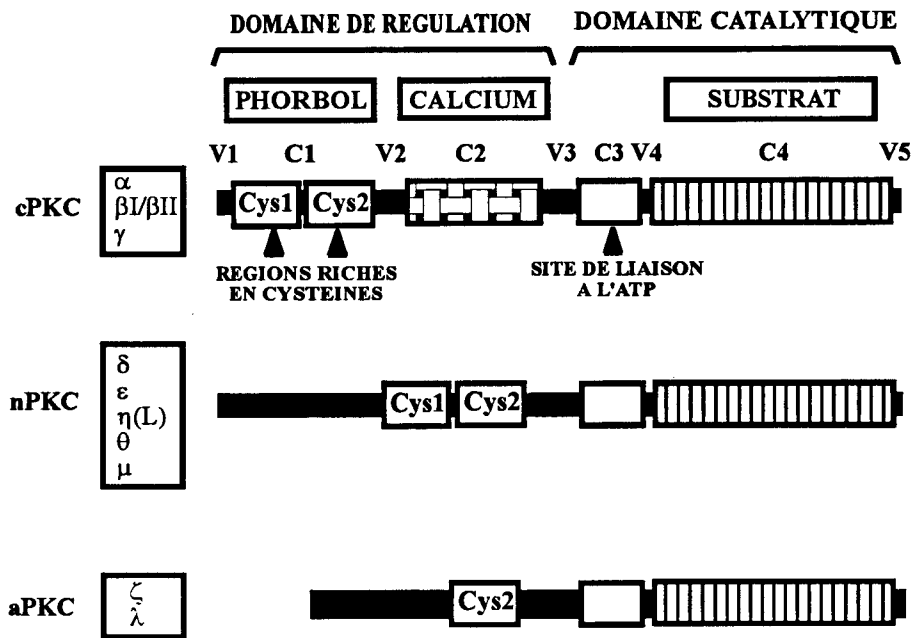
A ce jour, onze isoformes ont été identifiées dans les tissus des mammifères (Tableau-2). Ces isoformes sont subdivisées en trois groupes : les PKCs classiques ou conventionnelles (cPKC), les nouvelles PKCs (nPKC), et les PKCs atypiques (aPKCs) (Nishizuka, 1995). La moitié N-terminale du domaine de régulation des cPKCs contient deux régions conservées, C1 et C2, qui jouent un rôle important dans la régulation de l'activité de l'enzyme. La moitié C-terminale de l'enzyme contient deux autres régions très conservées, C3 et C4 (Figure 19). La région C3 contient la séquence consensus de liaison à l'ATP, et la région C4 est impliquée dans la reconnaissance et la liaison au substrat. Les cPKCs ont besoin de la phosphatidylsérine (PS), du diacylglycérol (DAG) et du calcium pour être activées (Figure 20). Les membres du groupe nPKC, qui sont dépourvus du domaine C2, ne requièrent pas de calcium pour leur activité (revue par Nishizuka 1992). L'isoforme PKC $\mu$  présente une extrémité N-terminale plus longue et un domaine transmembranaire potentiel que l'on ne retrouve pas chez les autres membres des nPKC. Les isoformes aPKC,  $\zeta$  et  $\lambda$ , présentent une seule région riche en cystéine. L'activité catalytique de l'isoforme  $\zeta$  dépend de PS, des acides gras insaturés (AGI), du phosphatidyl inositol biphosphate (PIP2) et du phosphatidyl inositol triphosphate (PIP3) (revue par Lisovitch et al., 1994). Cette isoforme ne répond pas au DAG et aux esters de phorbol. Toutes ces observations suggèrent que l'activité des différents isoformes de PKC peut être modulée différemment en fonction des combinaisons des différents cofacteurs (Ca<sup>2+</sup>, PS, DAG,... etc).

### **1/ LA REGION REGULATRICE :**

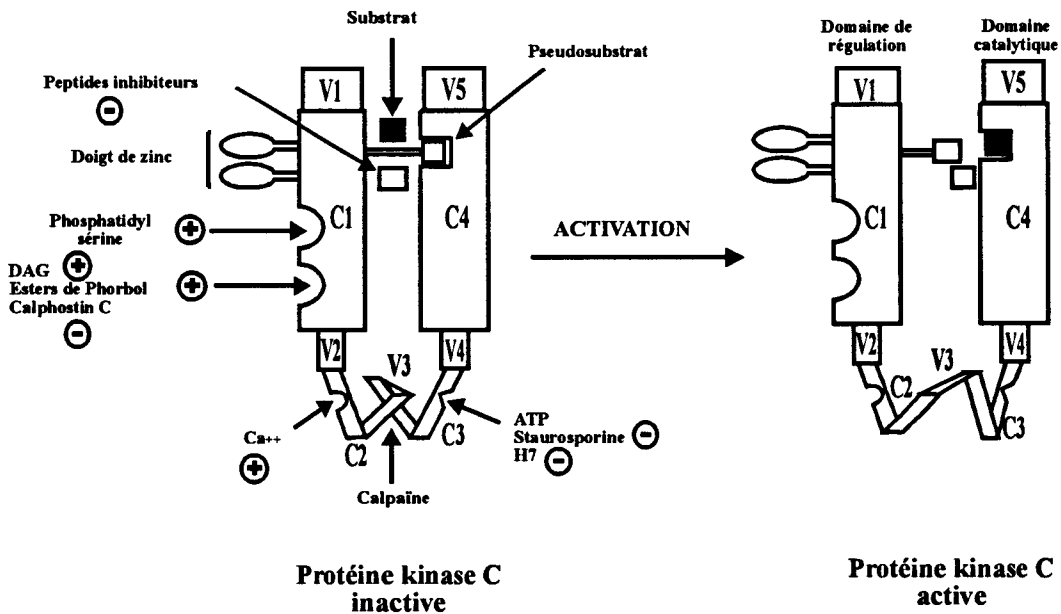
#### **a/ DOMAINE C1 :**

Dans la région régulatrice de la plupart des isoformes de PKC, il existe deux séquences conservées d'environ 50 AAs, qui contiennent chacune six cystéines et deux histidines très conservées parmi les membres de la famille des PKCs, exception faite des membres de la classe aPKC qui ne possèdent qu'une seule séquence (Hubbard et al., 1991). Ces deux séquences Cys1 et Cys2 sont impliquées dans la liaison des esters de phorbol (Burns et al., 1991). La région Cys2 semble contenir également des sites de liaison aux activateurs lipidiques physiologiques, comme la PS et le DAG (Quest et al., 1994b). Cys1 et Cys2 montrent une grande similitude avec des séquences fixant le zinc retrouvées chez certains facteurs transcriptionnels (Nishizuka, 1988; Burns et al., 1991). Le groupe de Quest a montré que la région régulatrice est capable de fixer quatre atomes de zinc (Quest et al., 1992). Le motif C6-H2 de Cys2 est capable de fixer deux atomes de zinc (Figure 21, Quest et al., 1994a). Des expériences de délétion menées sur Cys2 ont permis de mettre en évidence une séquence minimale de 43 AAs essentiels à la liaison du phorbol 12, 13-dibutyrate (PDBu) (Quest et al., 1994a). Le résidu His102 est requis à la fois pour la fixation du PDBu et la coordination avec le zinc, alors que la Cys151 est impliquée uniquement dans la coordination avec le zinc. Les Val147





**Figure 19 : Structure des isoformes de PKC.**  
(Nishizuka et al., 1992)  
(C : domaine conservé, V : domaine variable)



**Figure 20 : Mécanisme d'activation de la protéine kinase C**

Le schéma illustre le mécanisme d'activation de la PKC. Les activateurs de la PKC (PS, Ca<sup>++</sup>, DAG, ...etc) induisent un changement de conformation qui permet de libérer le centre actif. PS, phosphatidylsérine; DAG, Diacylglycérol; H7, 1-(S-isoquinolinesulfonyl-2-méthylpiperazine).

(proposé par Khalil and Morgan, 1992; modifié par Azzi et al. 1992)

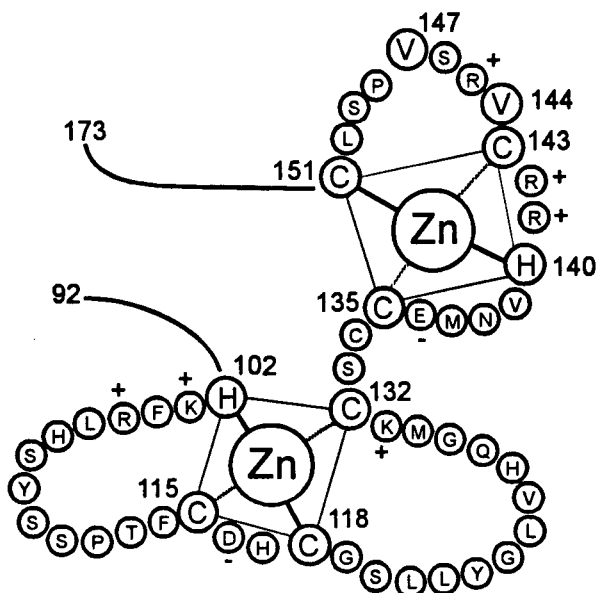
et 144 semblent également nécessaire à la fixation du PDBu (Quest et al., 1994a). Récemment, un travail de cristallographie réalisé sur le domaine Cys2 a montré que le TPA interagit avec les résidus Thr242, Leu251 et Gly253 du domaine Cys2 de PKC $\delta$  (Zhang et al., 1995). Le TPA ne semble pas produire de changements de conformation. Zhang et coll. ont proposé un modèle dans lequel le TPA masque une zone polaire et facilite ainsi l'interaction de la PKC avec la couche lipidique (Zhang et al., 1995).

#### **b/ PSEUDOSUBSTRAT :**

Des régions autoinhibitrices ont été identifiées et caractérisées chez plusieurs protéines kinases C. Ces domaines semblent inhiber l'activité kinase basale en interagissant avec les éléments du domaine catalytique incluant le site de liaison au substrat (Soderling, 1990). Ce domaine autoinhibiteur a été identifié entre les résidus 19 et 36 de la PKC $\alpha$  (House et Kemp, 1990). Un tel domaine a été également retrouvé chez tous les membres de la famille des PKCs. Il est situé entre les résidus 13 et 30 précédant le premier doigt de zinc du C1. Cette séquence contient un ou plusieurs résidus basiques qui sont hautement conservés et dont la répartition est similaire à celle retrouvée dans la séquence des substrats naturels des PKCs, sauf que le résidu sérine ou thréonine phosphorylable est remplacé par une alanine. Ce pseudosubstrat est un puissant inhibiteur de l'activité PKC et entre en compétition avec les substrats naturels de la PKC. La substitution de l'Ala25 du pseudosubstrat par une sérine transforme celui-ci en un substrat de la PKC. Un anticorps dirigé contre le pseudosubstrat entraîne une activation de l'enzyme en absence du calcium et des phospholipides (Makowske et al., 1989). Récemment, Orr et coll. ont montré que la PS et le DAG provoquent un changement de conformation qui dégage le pseudosubstrat du site catalytique rendant ainsi la PKC active (Orr et al., 1992, Figure 22).

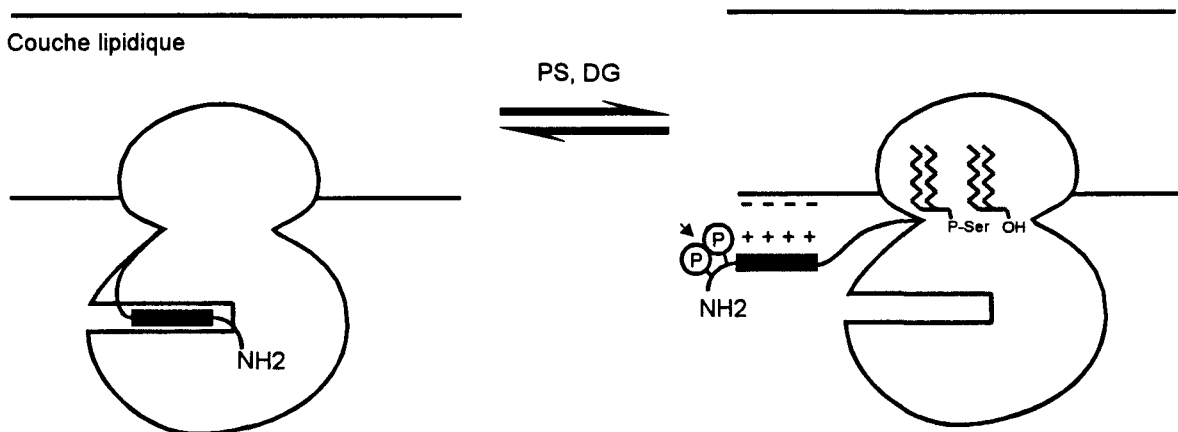
#### **c/ DOMAINE C2 :**

Ce domaine est conservé chez les membres de la classe cPKC alors qu'il est absent dans les classes nPKC et aPKC. Ces dernières ne nécessitent pas la présence du calcium pour leur activation (Bacher et al., 1991; Ono et al., 1988; Schaap et al., 1990), contrairement aux membres de la classe cPKC qui ont besoin du calcium à la fois pour l'activité kinase, la fixation des esters de phorbol et la translocation (Burns et al., 1990; Huang et al., 1988; Kiley et al., 1990; Marais et al., 1989; Sekiguchi et al., 1988). Ces résultats suggèrent que le domaine C2 conditionne la dépendance au calcium. Des expériences de délétion ont montré que l'élimination de C2 rend l'activité kinase et la fixation des esters de phorbol indépendante du calcium (Kaibuchi et al., 1989). Des expériences de délétion plus fines menées sur la PKC $\beta$ I, ont montré que C2 n'est pas le site majeur de fixation du calcium mais qu'il jouerait un rôle dans la sélectivité d'interaction avec celui-ci (Luo et al., 1993). Ces auteurs montrent également que le site majeur de fixation du calcium est localisé à l'extrémité C-terminale



**Figure 21 : Modèle de coordination du zinc dans le motif C6H2 de la région Cys2 de la PKC $\gamma$ .**

Le zinc établit quatre liaisons de coordination dans deux sphères de coordination indépendantes. La première sphère est constituée par l'His102 et trois cystéines conservées (Cys115, Cys118 et Cys132). la deuxième sphère est constituée par l'His140, et trois cystéines (Cys135, Cys143 et Cys151). Les liaisons de coordination avec le zinc de la première sphère sont essentielles pour la liaison au PDBu, alors que celles de la deuxième sphère n'affectent pas cette liaison. Cependant, les valines 144 et 147 sont cruciales pour la liaison au PDBu. (Quest et al., 1994)



**Figure 22 : Modèle illustrant le rôle de la phosphatidylsérine (PS) et du diacylglycérol (DAG) dans l'exposition réversible du pseudosubstrat de la PKC.**

Le pseudosubstrat est représenté par un rectangle noir à l'extrémité N-terminale. la tête de la flèche montre le site de digestion par l'Arg-C. Les sites d'autophosphorylation (cercles), protègent l'Arg19 de la protéolyse. PS et DAG semblent intervenir dans la libération du pseudosubstrat du site actif. Des interactions électrostatiques se font entre les résidus basiques du pseudosubstrat et les lipides acides de la membrane.

du domaine C1 (77 - 143) de PKC $\beta$ I, région incluant également le Cys2. Cette région, appelée aussi CalB, a été retrouvée dans plusieurs protéines comme la PLA2, la GAP, la PLC $\gamma$ , la synaptotagmine et la rabphilin. Elle interagit avec les phospholipides en fonction de la concentration de calcium et elle est également impliquée dans la translocation des cPKC vers la membrane après une augmentation du calcium (Luo et al., 1993).

## 2/LA REGION CATALYTIQUE :

La région catalytique est constituée d'environ 292 aas chez les PKCs, et comprend les domaines C3 et C4. Cette région présente de nombreuses homologies avec les autres protéines kinases (Parker et al., 1986). Le domaine C3 contient un site de liaison à l'ATP (Gly-X-Gly-X-X-Gly) hautement conservé parmi les protéines kinases (Hanks et al., 1995). Dans le domaine C4, un autre site de liaison à l'ATP a été prédit. Il est constitué par des résidus très conservés comme Asp166, Asn171 et la séquence DFG (Asp-Phe-Gly). DFG est une séquence caractéristique de toutes les kinases et semble être au coeur de l'activité catalytique. Des études d'alignement de séquences menées sur 65 protéines kinases suggèrent que les résidus situés entre Asp166 et Asn171 ainsi que les AAs situés à l'extrémité N-terminale du motif Ala-Pro-Gln jouent un rôle clé dans la discrimination entre l'activité tyrosine et sérine/thréonine kinase (Hanks et al., 1995). La comparaison des différents sites reconnus par la PKC sur plusieurs protéines substrats a permis de déterminer des sites consensus reconnus préférentiellement par la PKC (tableau 3). En général, on

MOTIFS	Rapport S/T*	Fréquence
S*/T*XK/R	31:6	30/37
K/RXXS*/T*		13/37
K/RXXS*/T*XK/R		7/37
K/RXS*/T*		10/37
K/RXS*/T*XK/R		6/37

**Tableau- 3 : Sites consensus de phosphorylation reconnus par la PKC**

L'analyse a été faite sur 37 protéines qui sont des substrats pour la PKC. a : le rapport S/T a été calculé pour la totalité des sites phosphorylés. Les astérisques montrent les sites phosphorylés. Les AAs qui déterminent la spécificité sont représentés en gras (Pearson et Kemp, 1991).

remarque la présence de résidus basiques (Arginine ou lysine) adjacents de la sérine ou thréonine phosphorylée. Par ailleurs, on a constaté la présence constante de résidus hydrophobes à l'extrémité C-terminale du site de phosphorylation .

## **II/ REGULATION DE L'ACTIVITE DES PKCs :**

L'activation de la PKC est un mécanisme complexe faisant intervenir plusieurs cofacteurs et activateurs comme le diacylglycérol, les phospholipides et le calcium (Figure 23B).

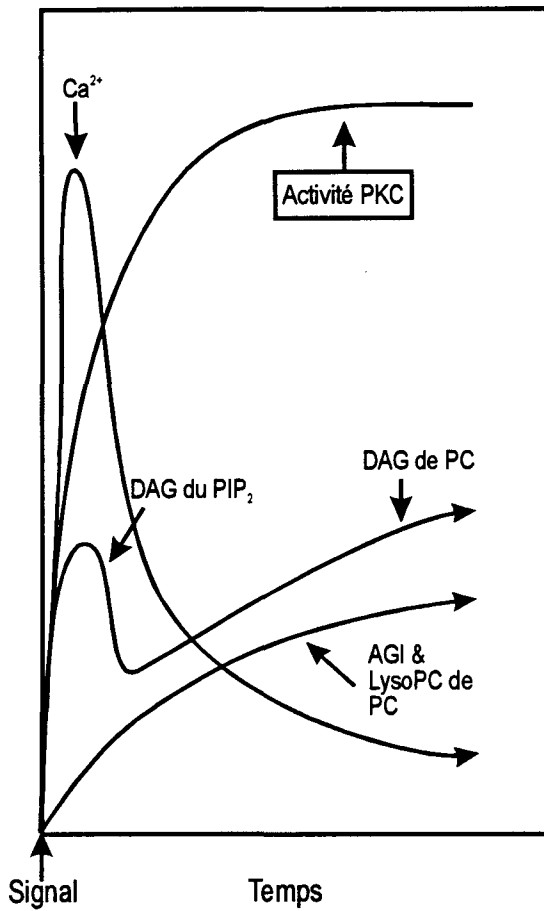
### **1/ DIACYLGLYCEROL ET PHOSPHOLIPIDES :**

Après la stimulation des récepteurs membranaires, le phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) est hydrolysé par la phospholipase C (PLC) en inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) et le sn-1, 2 diacylglycérol (DAG) (Berridge.1987). L'IP<sub>3</sub> entraîne la mobilisation du calcium qui va agir synergiquement avec le DAG pour activer les PKCs. En fait, la formation du DAG se produit en deux temps. Une première étape transitoire correspondant à l'hydrolyse du PIP<sub>2</sub> et qui coïncide avec une élévation du taux de l'IP<sub>3</sub>. Cette étape est suivie d'une synthèse soutenue du DAG (Figure 23A, pour revue voir Nishizuka.1995). Une analyse de la composition des acides gras révèle que le DAG de cette dernière phase provient probablement de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine. La phosphatidyléthanolamine est une source mineure de DAG. Cette élévation soutenue du taux de DAG est induite par des mitogènes et des facteurs de croissance (Rosoff et al.,1988; Leach et al.,1991), des esters de phorbol et l'oncogène Ras (Lacal et al.,1987; Price et al.,1989). Tous ces agents sont également des activateurs de PKC, d'où l'hypothèse de l'implication de la PKC dans cette élévation du taux de DAG (Figure 23B). Des études de marquage isotopique montrent que le DAG est métabolisé très rapidement après son entrée dans la cellule (Sano et al.,1983; Kaibuchi et al.,1983). Dans les plaquettes sanguines la plupart du DAG est converti en acide phosphatidique sous l'action de la diacylglycérol kinase, puis en phosphatidyl inositol (Kaibuchi et al.,1983), alors que dans les lymphocytes T, le DAG est rapidement hydrolysé par la diacylglycérol lipase et probablement par des estérases non spécifiques (Berry et al.,1990; Asaoka et al.,1991). Les esters de phorbol comme le TPA, qui mime l'action de DAG en activant la PKC sont métaboliquement stables, ce qui explique d'ailleurs leurs effets tumorigènes. De multiples additions de DAG sont nécessaires pour obtenir des réponses à long terme comme l'activation des lymphocytes T ou la différenciation des HL-60 en macrophage, alors qu'une seule dose d'ester de phorbol est suffisante pour obtenir les mêmes réponses (William et al.,1990; Aihara et al.,1991).

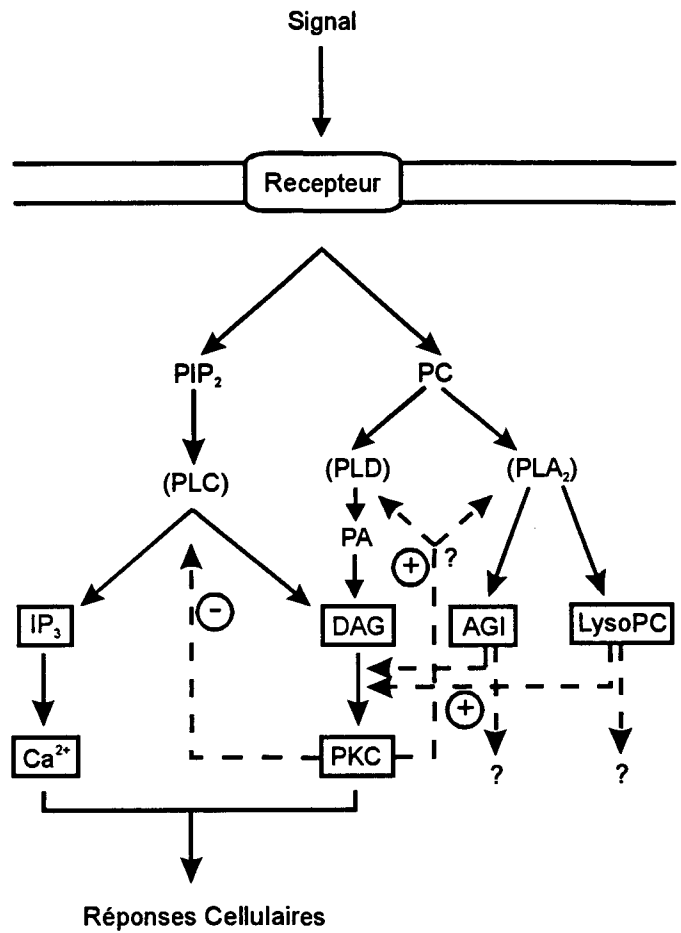
### **2/ LE CALCIUM :**

Dans la plupart des cellules stimulées, on observe une augmentation transitoire du calcium, alors que les réponses physiologiques persistent longtemps après le retour de la concentration calcique à son taux de base. La mobilisation du calcium et l'activation de la PKC agissent synergiquement pour induire une variété

A)



B)



**Figure 23 : Schéma illustrant la dégradation des phospholipides dans la membrane**

(A) Cinétique de formation du DAG, des acides gras insaturés (AGI) et de lysoPC à partir de  $PIP_2$  et PC (phosphatidylcholine).

(B) Modèle hypothétique des mécanismes intervenant dans l'activation de la PKC.  
 PA : Acide phosphatidique, PLD : Phospholipase D, PLA<sub>2</sub> : Phospholipase A<sub>2</sub>.

de réponses cellulaires, mais le mécanisme biochimique n'est pas entièrement élucidé (Nishizuka.1986). La mobilisation du calcium est intimement liée à la dégradation des phospholipides. En présence de fortes concentrations de calcium l'activation de la PKC requiert moins la dégradation des lipides, alors qu'en présence de phospholipides l'activation de la PKC ne nécessite pas le calcium. L'activation des récepteurs membranaires induit une oscillation du taux du calcium intracellulaire (Cuthbertson et al.,1991; Tsien et al.,1990). Plusieurs mécanismes, faisant intervenir l'IP3 et le calcium ont été avancés pour expliquer les fluctuations complexes de la concentration calcique intracellulaire (Missiaen et al.,1991). La PKC semble également contrôler les oscillations du calcium en exerçant un rétro-contrôle négatif sur l'hydrolyse des phospholipides (Woods et al.,1987). Cette hypothèse a été confortée par le fait que les oscillations calciques sont inhibées par les esters de phorbol, cette inhibition est levée par les inhibiteurs des PKCs. Les différentes isoformes des PKC réagissent différemment vis à vis du calcium. Ainsi, les enzymes de la classe cPKC sont activées par le calcium, la PS et le DAG ou les esters de phorbol. Cette activation est plus forte avec les acides gras insaturés et la lysophosphatidylcholine (PC). L'activation des membres de la classe nPKC ne nécessitent pas de calcium. Ces enzymes sont activées par des micelles composées uniquement de PS et DAG ou l'ester de phorbol. La PKC $\epsilon$  est activée par les acides gras cis insaturés alors que la PKC $\delta$  ne l'est pas. L'activation des enzymes de la classe aPKC requièrent uniquement la PS. L'isoforme  $\zeta$  est également activée par les acides gras cis insaturés (pour revue voir Nishizuka.1992).

### 3/ PHOSPHORYLATION DES PKCs:

La phosphorylation est un autre mode de régulation de l'activité des PKCs. Mais à l'inverse des phospholipides, la phosphorylation affecte toutes les isoformes de la famille des PKCs. Les PKCs sont phosphorylées sur plusieurs résidus sérine et thréonine localisés aux extrémités N et C terminales et dans la région charnière (Flint et al.,1990). Le traitement de la PKC $\alpha$  par la phosphatase alcaline inhibe complètement son activité enzymatique (Pears et al.,1992). La phosphorylation des PKCs se fait selon deux mécanismes: l'autophosphorylation et la transphosphorylation. L'autophosphorylation des PKCs augmente la liaison aux esters de phorbol, leur sensibilité au calcium et leur liaison au substrat *in vitro* (Huang et al.,1986; Mochly Rosen et al.,1987). Flint et coll. ont identifié six sites autophosphorylés sur la PKC $\beta$ II *in vitro*. La Ser16 et la Thr17 situés à l'extrémité N-terminale, les Thr314 et Thr324 localisés dans la région charnière et les Thr634 et Thr641 situés à l'extrémité C-terminale (Flint et al.,1990). Zhang et coll. ont montré que l'activité enzymatique de la PKC $\beta$ I est totalement inhibée par la mutation de la Thr642 (équivalent de la Thr641 chez la PKC $\beta$ II) en alanine (Zhang et al.,1994). Plusieurs données ont permis de mettre en évidence les mécanismes de transphosphorylation des PKCs. Chez la levure la PKC1 est phosphorylée *in vivo* par une autre kinase

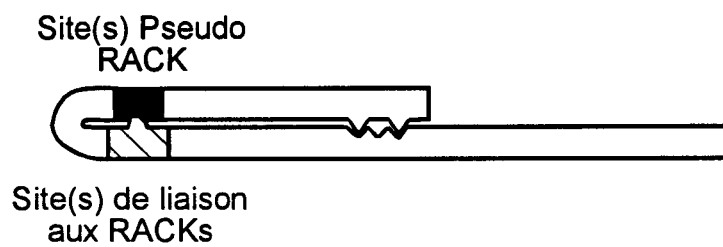
(Watanabe et al., 1994). Par ailleurs, la PKC $\alpha$  exprimée chez la bactérie est inactive bien qu'elle soit capable de fixer normalement le TPA (Cazaubon et al., 1990), probablement parce que les mécanismes adéquats de phosphorylation sont absents (Shayiq et al., 1994; Filipuzzi et al., 1993). Les résidus Thr497 et Thr495 semblent être transphosphorylés par une activité kinase encore inconnue et leur mutation en alanine inhibe l'activité de la PKC $\alpha$  (Cazaubon et al., 1994). Le remplacement de la Thr495 par l'acide glutamique nous donne une PKC intrinsèquement active dans la bactérie (Cazaubon et al., 1994). Orr et coll. ont montré que la présence d'une charge négative en position 500 est critique pour l'activation de la PKC $\beta$ II (Orr et al., 1994). La PKC est incapable de rephosphoryler la Thr500 après sa déphosphorylation par la sous unité catalytique de la phosphatase PP1 (Dutil et al., 1994), au contraire de la PKC déphosphorylée par la sous unité catalytique de la phosphatase PP2A qui est capable de s'autophosphoryler à nouveau, probablement parce que PP2A n'affecte que les sites autophosphorylés de l'extrémité C-terminale (Dutil et al., 1994). En résumé, toutes ces données suggèrent que la PKC est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif capable de se lier à la membrane (Borner et al., 1989). Ce précurseur est ensuite phosphorylé par une PKC kinase sur la "boucle d'activation" (Borner et al., 1989; Pears et al., 1992; Cazaubon et al., 1993; Cazaubon et al., 1994). Des interactions électrostatiques entre le groupement phosphate de la "boucle d'activation" et certains résidus du domaine d'activation déterminent le positionnement des résidus pour la catalyse (Orr et al., 1994). A ce stade, la PKC, toujours fixée à la membrane, est stimulée par la PS pour induire l'autophosphorylation de l'extrémité C-terminale. Cette autophosphorylation entraîne la libération dans le cytosol d'une PKC mature et régulable par le DAG (Zhang et al., 1994).

#### **4/ LES RECEPTEURS DE LA PKC ACTIVE :**

Gopalakrishna et coll. ont montré que les protéines localisées dans la membrane plasmique sont nécessaires pour la fixation des PKCs à la membrane (Gopalakrishna et al., 1986). De nombreux travaux ont montré que la PKC peut être localisée dans de nombreux compartiments cellulaires en dehors de la membrane plasmique. En effet, les PKCs peuvent être rencontrées en association avec les éléments du cytosquelette (Zalewski et al., 1988; Ito et al., 1989; Papadopoulos et al., 1989; Jaken et al., 1989), l'appareil de Golgi (Saito et al., 1989), l'espace périnucléaire (Mochly Rosen et al., 1990; Halsey et al., 1987; Chen et al., 1987; Thomas et al., 1988; Fields et al., 1989), et même dans le noyau (Capitani et al., 1987; Masmoudi et al., 1989). Plusieurs protéines de la fraction particulaire fixent les PKCs *in vivo* en présence des activateurs des PKC (Wolf et al., 1986, 1990, (Mochly Rosen et al., 1991a; Mochly Rosen et al., 1991b; Chapline et al., 1993). Moshly-Rosen et coll. ont réussi à identifier plusieurs protéines dans la fraction particulaire du coeur et du cerveau du rat, qui semblent être des récepteurs intracellulaires des PKCs activées (Mochly Rosen et al., 1991a; Mochly Rosen et al., 1991b; Mochly Rosen et al., 1992). Ces protéines ont été nommées récepteurs



A) PKC INACTIVE



B) PKC ACTIVE

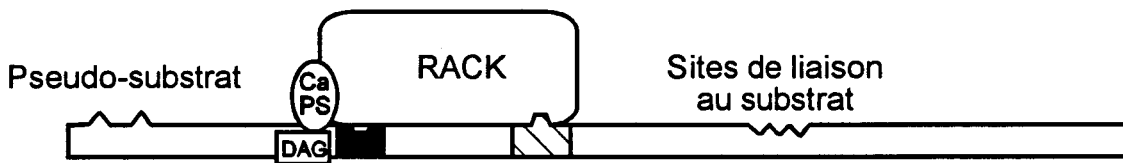


Figure 24 : Modèle d'interaction de la protéine RACK avec la PKC (Ron et al., 1994)

des PKCs activées ou RACKs (Receptors for Activated C-Kinases). Les RACKs fixent les PKCs uniquement en présence de leurs activateurs. Les PKCs interagissent avec les RACKs *via* leurs domaines C2 (Figure 24, Ron et al., 1992). Un peptide situé dans le domaine C2 présente une forte homologie avec une région de RACK1 (Ron et Mochly Rosen, 1995). Ce peptide (SVEIWD), nommé pseudo-RACK1, est capable de se lier à la PKC et de l'activer en absence des activateurs de PKC *in vivo* (Figure 24, Ron et Mochly Rosen, 1995). Ainsi il semble que l'activation des PKCs expose les sites de liaison aux RACKs qui vont permettre à l'enzyme de se fixer aux sites d'ancrage RACKs.

### **5/ PKCs ET PROTEASES :**

Plusieurs travaux ont montré que durant l'activation de la PKC, cette dernière est soumise à une protéolyse (Kishimoto et al., 1983; Parker et al., 1986). Cette protéolyse génère un fragment, nommé PKM possédant une activité catalytique. Le groupe de Nishizuka a identifié au moins deux sites de protéolyse par la calpaïne dans la zone charnière V3. Les différents isoformes réagissent différemment face à la protéolyse. Ainsi la PKC $\gamma$  est facilement clivée par la calpaïne I et II alors que la PKC $\alpha$  est relativement résistante à la protéolyse. La calpaïne I semble cliver préférentiellement les PKCs activées. La signification physiologique de cette protéolyse n'est pas encore bien élucidée. Deux hypothèses sont à considérer. Premièrement, sous l'action des protéases la PKC libère la partie catalytique PKM, dont une partie va migrer vers le noyau où elle va phosphoryler les facteurs de transcription (Li et al., 1992). Deuxièmement, la protéolyse de la PKC est un processus initialisant la dégradation de l'enzyme et éventuellement entraînerait la déplétion de la PKC cellulaire.

### **6/ PKC ET RETINOIDES :**

La voie des rétinoïdes et celle des PKCs sont toutes les deux fortement impliquées dans les processus de différenciation et de prolifération cellulaire. Hashimoto et coll. ont observé que le traitement des cellules HL-60 avec l'ATRA (1  $\mu$ M), entraîne une diminution rapide (24h) de la PKC $\gamma$  et une augmentation de l'expression de la PKC $\beta$  (Hashimoto, 1990a), alors que Seibenhener et coll. ont montré une augmentation du taux de l'expression des ARNm de plusieurs isoformes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ , Seibenhener et al., 1993). Dans tout les cas, ces expériences suggèrent que les différents isoformes de PKC ont chacune un rôle spécifique dans la différenciation induite par l'ATRA. La différenciation des cellules B16 du mélanome de souris est précédée par une forte augmentation du taux de l'ARNm de la PKC $\alpha$ . Cette augmentation est directement responsable de la différenciation de ces cellules induite par l'ATRA (Gruber et al., 1992). L'induction de la différenciation des cellules du neuroblastome humain (LAN-5) par IFN $\gamma$  ou l'ATRA s'accompagne d'une surexpression de la PKC $\epsilon$ . Apparemment, l'expression de la PKC $\epsilon$  est liée à la différenciation

neuronale (Ponzoni et al., 1993). Récemment, on a montré que l'ATRA est capable d'activer la PKC du cerveau en absence du  $Ca^{2+}$  et des phospholipides (Bouzinba Segard et al., 1994). En résumé, il semble que, dans certains cas, les PKCs jouent un rôle de médiateurs entre les rétinoïdes et les processus de différenciation.

### **III/ EFFETS BIOLOGIQUES DES PKC :**

#### **1/ PKC ET DIFFERENCIATION EPITHELIALE :**

Depuis longtemps, les esters de phorbol activateurs de la PKC sont connus pour leurs rôles dans la promotion du cancer de la peau. Des études plus récentes ont permis de lier la PKC non seulement aux cancers de la peau mais aussi dans les processus de croissance et de différenciation épithéliale. Les kératinocytes, qui constituent environ 99% de l'épithélium de la peau, suivent un processus bien défini de croissance et de différenciation qui permet le renouvellement de l'épithélium. A la jonction de l'épiderme et du derme, les cellules se divisent continuellement et migrent vers la surface au cours du processus de différenciation qui va transformer les kératinocytes de la couche spinocellulaire (KS) en kératinocytes de la couche granulaire (KG), puis en kératinocytes de la couche cornée (KC). Dans les modèles d'études de la différenciation de l'épiderme intact, l'activité PKC se manifeste durant la transition de KS vers KG (Dlugosz et al., 1993). La PKC $\eta$  est essentiellement détectée dans les cellules épithéliales de la peau et des poumons. Plus surprenant est le fait que la PKC $\eta$  soit localisée dans les cellules épithéliales différenciées ou en cours de différenciation, alors qu'elle est absente dans les cellules basales non différenciées (Osada et al., 1993). De plus, la PKC $\eta$  semble être localisée essentiellement dans le noyau (Grief et al., 1992). Une autre étude dans laquelle des kératinocytes transformées par H-ras et stimulées par le calcium montrent un taux élevé en PKC $\eta$  alors que celui de la PKC $\xi$  décroît (Dlugosz et al., 1992). Dans une autre expérience menée sur la phase terminale de différenciation, des kératinocytes induite par le TPA montrent également une augmentation du taux de PKC $\eta$ , alors que ceux des PKC $\alpha$  et PKC $\delta$  diminuent (Gherzi et al., 1992). Ces expériences indiquent que la modulation de l'expression des isoformes de PKC jouerait un rôle dans les processus complexes de différenciation de l'épithélium. Toutefois, elles ne nous permettent pas de savoir si cette modulation est la cause ou la conséquence des processus de différenciation.

#### **2/ PKC ET DIFFERENCIATION DES CELLULES HL-60 :**

La lignée HL-60 est probablement l'un des modèles les plus utilisés dans l'étude de la prolifération et de la différenciation cellulaire. En effet, ces cellules sont indifférenciées et sont capables de s'engager dans une voie de différenciation plutôt qu'une autre en fonction de la nature de l'agent inducteur (Collins, 1987).

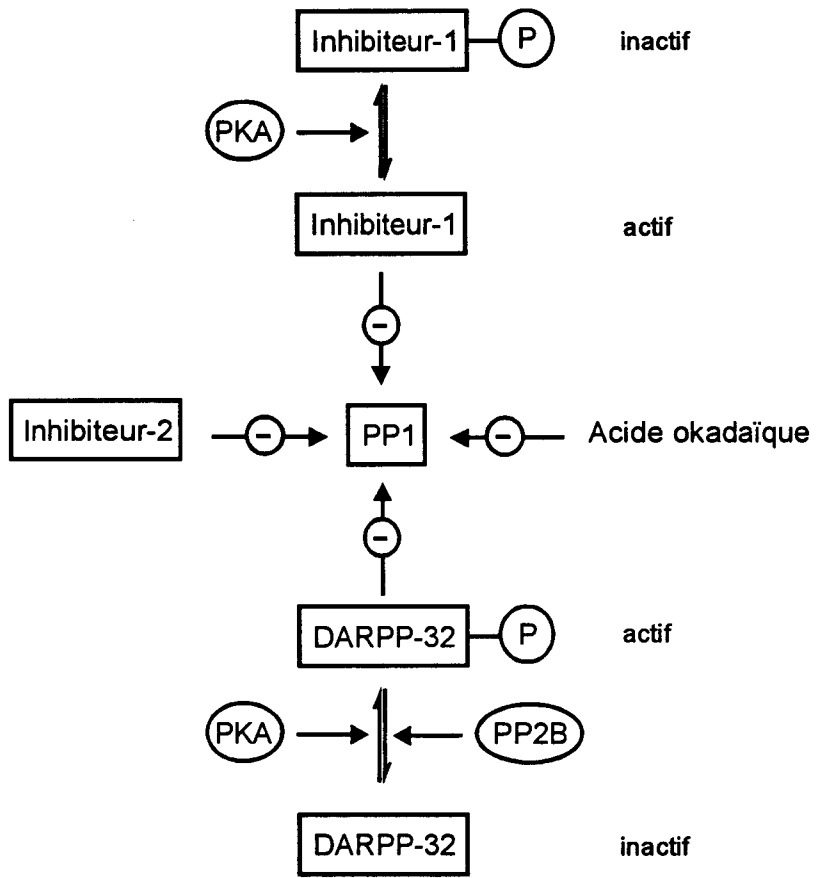
Ainsi, le traitement des HL-60 par la 1,25-dihydroxyvitamine D3 induit leur différenciation en monocytes alors que le TPA induit la formation de macrophages et monocytes. A côté de l'effet des esters de phorbol sur la différenciation des HL-60, de nombreux travaux ont mis en évidence l'implication des PKCs dans ce processus. Premièrement, des inhibiteurs de PKC, telle que la sphingosine, sont capables de bloquer l'effet du TPA sur HL-60 (Merril et al., 1986). Deuxièmement, l'exposition prolongée des cellules HL-60 au DAG est capable de reproduire l'effet du TPA sur ces cellules (Ebeling et al., 1985). Enfin, on a observé une augmentation du taux d'expression des PKCs dans les cellules HL-60 traitées par la vitamine D3 (Martell et al., 1987). Cette augmentation touche uniquement les isoformes PKC $\alpha$  et PKC $\beta$  (Obeid et al., 1990). L'utilisation de sondes anti-PKC $\alpha$  et anti-PKC $\beta$  a permis de montrer que l'expression de PKC $\beta$  est nécessaire au processus de différenciation induit par la vitamine D3, alors que la PKC $\alpha$  n'a pas d'effet sur ce processus. Dans tout les cas, la prolifération n'est pas affectée (Gamard et al., 1994). Les résultats de cette expérience constituent une étape fondamentale dans la compréhension du rôle fonctionnel de chaque isoforme de PKC et surtout de leurs mécanismes d'action, mais suscitent également des questions. En effet, comment la cellule malgré la très grande homologie structurale et fonctionnelle entre la PKC $\alpha$  et  $\beta$ , arrive-t-elle à impliquer uniquement la PKC $\beta$  dans le processus de différenciation ?

## **C/ LES PHOSPHATASES :**

L'activité nette d'une phosphoprotéine dépend de l'équilibre entre l'état phosphorylé et déphosphorylé qui dépend à son tour de l'activité d'autres kinases et de phosphatases. Ces dernières peuvent être subdiviser en deux familles : les protéines sérine/thréonine phosphatases et les protéines tyrosine phosphatases. Dans ce chapitre, nous aborderons uniquement la famille des sérine/thréonine phosphatases. Cette famille est composée essentiellement par quatre sous-familles: PP1, PP2A, PP2B et PP2C.

### **I/ PROTEINE PHOSPHATASE 1 (PP1) :**

PP1 possède une structure multimérique, composée d'une sous unité catalytique (C) complexée à plusieurs sous unités régulatrices. La première forme native de PP1 a été identifiée comme étant une protéine phosphatase dépendante de MgATP appelée PP1<sub>i</sub> et constituée de la sous unité C et de l'inhibiteur 2 (Ballou et al., 1983; Jurgensen et al., 1984; Tung et al., 1984). Cette forme de PP1 a une faible activité intrinsèque et est activée suite à la phosphorylation de l'inhibiteur 2 par la glycogène synthase kinase 3 (Bollen et al., 1992). La sous unité C peut également s'associer à une protéine fixatrice de glycogène, constituant la forme PP1<sub>G</sub> (Stralfors et al., 1985). Récemment, on a identifié une activité phosphatase associée à la myosine (PP1<sub>M</sub>). Cette forme est constituée de la sous unité C et de deux autres sous unités M1 et M2 (130 et 20kDa,



**Figure 25 : Mécanisme de régulation de la phosphatase 1 (PP1)**

respectivement) qui augmente la déphosphorylation de la myosine (Alessi et al.,1992). Enfin, PP1 a été aussi localisée dans le noyau (Jakes et al.,1986; Kuret et al.,1986). Cette localisation semble être due à l'association de la sous unité C avec des protéines nucléaires (Beullens et al.,1992). A côté de cette hétérogénéité générée par les différentes combinaisons d'association entre la sous-unité catalytique de PP1 et les différentes sous-unités régulatrices, il existe une hétérogénéité de la sous-unité catalytique elle-même. Plusieurs isoformes de PP1 sont codées par différents gènes chez les eucaryotes. Ces isoformes sont subdivisées en trois familles : PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta$  et PP1 $\gamma$ . La différence entre ces isoformes est située principalement à l'extrémité C-terminale. L'activité PP1 est régulée par plusieurs inhibiteurs (Figure 25). L'inhibiteur-1 est capable d'inhiber PP1 lorsqu'il est sous la forme non phosphorylée, et il est inactif sous sa forme phosphorylée. La PKA est capable de phosphoryler l'inhibiteur-1, ce qui suggère que cette kinase est capable de moduler l'activité de PP1. Un autre inhibiteur, DARPP-32, inhibe l'activité de PP1. DARPP-32 est actif quand il est phosphorylé (Figure 25).

## **II/ PROTEINE PHOSPHATASE 2A (PP2A) :**

La forme native de la PP2A est également constituée par un complexe oligomérique entre une sous-unité catalytique C (36kDa) et une ou plusieurs sous-unités régulatrices. Les interactions protéine-protéine sont importantes dans la régulation de l'activité et la spécificité de la sous-unité catalytique PP2A. Chez les mammifères, PP2A existe au moins sous quatre formes. Chacun de ces complexes est formé par la sous-unité catalytique C, la sous unité A (61kDa), et la sous-unité B qui peut exister sous trois formes (B1 : 54kDa, B2 : 74kDa et B3 : 55kDa). La spécificité de PP2A semble être contrôlé par la sous-unité B (Chen et al.,1989; Imaoka et al.,1980; Imaoka et al.,1983).

L'activité de PP2A est régulée par l'expression différentielle des sous unités B1, B2 et B3, qui contrôlent l'activité et la spécificité de la phosphatase. Récemment, on a montré que les territoires d'expression des sous unités B varient en fonction des stades de développement, alors que les sous unités A et C ont une expression constitutive. Ces observations suggèrent que l'activité de PP2A dépendrait de l'expression des sous unités B.

## **III/ PROTEINE PHOSPHATASE 2B (PP2B) :**

PP2B a été initialement identifiée comme une protéine liant la calmoduline (Klee et al.,1978; Wang et al.,1977) et capable de fixer le calcium (Klee et al.,1979). Elle est aussi appelée calcineurine car elle a été localisée principalement dans les tissus nerveux des mammifères (pour revue voir Klee.1988). La forme native de PP2B est constituée par un complexe équimolaire 1:1 entre la sous unité catalytique (A) et la sous unité régulatrice (B) (Cohen.1989; Klee.1988; Shenolikar et al.,1991). La structure primaire de la

sous-unité B est similaire à celle de la calmoduline et contient quatre sites de liaison au calcium (Aitken et al., 1984). En présence de concentrations physiologiques de calcium, la calmoduline s'associe avec PP2B et stimule son activité enzymatique (Klee, 1988).

#### **IV/ PROTEINE PHOSPHATASE 2C (PP2C) :**

A l'inverse des autres Ser/Thr phosphatases, PP2C est une protéine monomérique (pour revue voir Cohen, 1989; Shenolikar et al., 1991). Cette enzyme a aussi la particularité de nécessiter des ions divalents ( $Mg^{2+}$ ) pour son activité. Les séquences en acides aminés des isoformes de PP2C (PP2C1 et PP2C2) sont très différentes de celles des autres membres des Ser/Thr phosphatases et ne contiennent pas de domaine catalytique évident (Tamura et al., 1989). Bien que la fonction de PP2C reste obscure, des données récentes montrent qu'elle jouait un rôle clé dans le cerveau. Les territoires d'expression des ARNm de PP2C sont distincts de ceux de PP2B, suggérant ainsi que différentes protéines neuronales peuvent être déphosphorylées par deux phosphatases distinctes selon leurs localisation (Abe et al., 1992).

#### **V/ CONCLUSION :**

Bien que le nombre des protéines phosphatases connues à ce jour soit largement inférieur à celui des kinases, il semble que les phosphatases compensent cette infériorité numérique grâce à, premièrement, leur structure oligomérique, et, deuxièmement, leur localisation près de leurs substrats potentiels. Toutefois, de nombreux points restent à éclaircir. Notamment, il faudrait identifier les déterminants structuraux de la déphosphorylation des substrats et également élucider les mécanismes de régulation et de distribution tissulaire.

**Chapitre III :**  
**LA PHOSPHORYLATION ET LES RECEPTEURS**  
**NUCLEAIRES**



La plupart des récepteurs nucléaires sont des phosphoprotéines, dont certains deviennent hyperphosphorylés après la liaison au ligand, démontrant ainsi l'existence d'importantes connections entre les voies de phosphorylation et les activités fonctionnelles des récepteurs. Dans ce chapitre, j'ai essayé de résumer nos connaissances actuelles sur la phosphorylation des récepteurs nucléaires.

### **A/ Données indirectes :**

Les premières données sur l'implication des voies de phosphorylation dans le mécanisme d'action des récepteurs nucléaires nous ont été fournies par des expériences utilisant des phosphatases et des inhibiteurs de phosphatase. Le traitement du cytosol des cellules L avec la phosphatase alcaline inactive la capacité de liaison à l'hormone des GRs (Nielsen et al., 1977). Des résultats similaires ont été obtenus avec le cytosol de foie de rat (Housley et al., 1982). L'activité de liaison au ligand des récepteurs aux hormones thyroïdiennes est également réduite par la phosphatase alcaline (Faure et al., 1988). L'acide okadaïque, un puissant inhibiteur de PP1 et PP2A, est capable d'activer la transactivation induite par le PR en absence de la progestérone (Denner et al., 1990). Un résultat similaire a été obtenu avec le GR (DeFranco et al., ) et le TR $\beta$ 1 (Lin et al., 1992).

L'utilisation des activateurs et des inhibiteurs de kinases a également permis d'étudier l'interaction des kinases avec le mécanisme des récepteurs nucléaires. L'activité de liaison à l'hormone du GR est inhibée par l'AMPC, qui est un activateur de la voie de la PKA (Heller et al., 1986). Dans les cellules de lymphome, l'AMPC stimule l'activité transcriptionnelle du GR et augmente sa capacité de liaison à l'hormone (Gruol et al., 1986). L'activité transcriptionnelle de PR est également stimulé par un analogue de l'AMPC (8 Br-AMPC) en absence de l'hormone. Cette activation est inhibée par l'inhibiteur de la voie de PKA, PKI (protein kinase inhibitor, Denner et al., 1990).

Les activateurs et inhibiteurs de la voie de la PKC semble également affecter les fonctions des récepteurs stéroïdiens. Les esters de phorbol stimule l'induction des enzymes hépatiques par les glucocorticoïdes (Kido et al., 1987), alors que les inhibiteurs de la PKC réduisent cette induction et bloquent la translocation vers le noyau du GR (kido et al., 1987). Par contre dans les cellules NIH 3T3, les activateurs de la PKC inhibent la transcription induite par le GR (Vacca et al., 1989).

Toutes ces expériences mettent en évidence l'interaction des voies de phosphorylation dans le mécanisme d'action des récepteurs nucléaires. Pour élucider les mécanismes moléculaires de cette interaction, plusieurs groupes se sont intéressés à la détermination des sites de phosphorylation sur les récepteurs nucléaires *in vivo* et *in vitro*.

## **B/ PHOSPHORYLATION DIRECTE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES :**

### **1/ RECEPTEURS AUX GLUCOCORTICOIDES :**

En absence des glucocorticoïdes, le GR de souris est une phosphoprotéine (Housley et al., 1983). Les glucocorticoïdes induisent une hyperphosphorylation du GR (Orti et al., 1989; Orti et al., 1993). L'analyse des acides aminés phosphorylés montre que le GR est phosphorylé dans de nombreuses lignées cellulaires sur des résidus sérine. Certains groupes ont également montré qu'il existe une phosphorylation mineure sur des résidus thréonine dans les cellules de l'hépatome de rat, dans les cellules malignes du thymus et les CHO de souris. Une faible proportion de résidu tyrosine phosphorylé a aussi été mise en évidence dans les cellules épithéliales du poumon humain. Bodwell et coll. ont identifié sept sites phosphorylés dans le GR de souris (Bodwell et al., 1995). Ces sites semblent être identiques dans les cellules CHO, où le GR a été surexprimé, et dans les cellules WEHI-7. Tous ces sites sont situés dans le domaine N-terminal, et sont tous des sérines, sauf un seul site qui est une thréonine (Thr159). Les sérines 122, 150, 212 et 234 sont conservées dans le GR du rat et de l'homme, alors que la thréonine 159 et la sérine 315 n'ont pas d'homologue dans le récepteur humain. A l'exception de la sérine 315, les autres sites (Ser212, Ser220, et Ser234) sont situés dans la région acide et sont requis pour l'activité transcriptionnelle. Tous les sites phosphorylés, sauf les sérines 150 et 315, sont situés dans des séquences consensus reconnues par des kinases. La sérine 122 est située dans une séquence consensus reconnue par la caséine kinase II (XXX-Ser-XXX-XXX-Glu). Les Ser 212, 220, 234 et la Thr 159 sont localisées dans un site consensus pour la PDPK (p34cdc2-p58cycline A). Les sérines 212 et 220 se trouvent dans un site consensus pour la p34cdc2 - p62cycline B, qui joue un rôle clé dans la régulation du cycle cellulaire. Mais le rôle de la phosphorylation du GR reste encore indéfini, puisque la substitution de ces sites par l'alanine ou l'acide aspartique n'affecte que très faiblement l'activité transcriptionnelle du GR sur le promoteur de MMTV (Mason et al., 1993).

### **2/ RECEPTEURS A LA PROGESTERONE :**

Durant des expériences de transcription *in vitro*, le PR du poulet est rapidement phosphorylé par une kinase dépendante de l'ADN, présente dans les extraits nucléaires de HeLa utilisés comme source des facteurs de transcription (Weigel et al., 1992). Cette phosphorylation se produit avant l'activation des gènes cibles *in vitro* (Bagchi et al., 1992). Le PR de l'ovaire de poulet ou des cellules cancéreuses du poumon humain n'est phosphorylé que sur des résidus sérine. L'addition de la progestérone à des cellules intactes induit l'hyperphosphorylation des formes A et B du PR. Suite au traitement des cellules cancéreuses de poumon humain par un activateur de la PKC, on observe une augmentation de la phosphorylation et du nombre de sites de liaison au ligand de PR. La phosphorylation du PR de lapin a aussi été étudiée dans

les cellules COS-7 transfectées par le récepteur entier ou par des mutants. Cette étude a montré que même les mutants qui sont dépourvus du DBD sont hyperphosphorylés en présence du ligand, montrant ainsi que l'hyperphosphorylation ne dépend pas de la capacité du récepteur à lier l'ADN. Le PR sans HBD est constitutivement actif, mais il est très faiblement phosphorylé, alors que le récepteur natif est hyperphosphorylé en présence de l'antagoniste RU486. D'après ces résultats, il semble que l'hyperphosphorylation du PR n'est pas nécessaire pour son activité biologique.

La cartographie et le séquençage des phosphopeptides, résultant de la digestion de la forme A et B du PR phosphorylé par la trypsine, mettent en évidence l'existence de quatre résidus sérines dont l'état de phosphorylation est régulé par la présence de l'hormone (Ser211, 260, 367 et 530). Les Ser211, 260 et 367 sont localisées dans le domaine N-terminal. La Ser530 est située dans le domaine HBD, région connue pour contenir le domaine AF-2 qui est impliquée dans la transactivation du PR. Les trois sites sont situés dans des sites consensus pour la PDPK (proline directed protein kinase). Dans les cellules humaines du cancer de sein (T47D), deux nouveaux sites ont été identifiés uniquement sur PR-B, la Ser81 et la Ser162. La Ser81 est phosphorylée *in vitro* par la CKII (Zhang et al., 1994).

### **3/ LES RECEPTEURS AUX OESTROGENES :**

Auricchio et ses collaborateurs ont observé que le récepteur de l'oestrogène du veau, du rat et de l'homme sont phosphorylés exclusivement sur des résidus tyrosine (pour revue voir Orti et al., 1992). A l'opposé de ces observations, d'autres groupes ont montré que les récepteurs de l'utérus de souris marqués métaboliquement sont phosphorylés uniquement sur des résidus sérine (Orti et al., 1992). Le traitement de l'utérus de souris par l'oestrogène entraîne une hyperphosphorylation de la forme nucléaire du récepteur, et non de sa forme cytosolique. Mais dans les cellules MCF-7, l'oestrogène entraîne apparemment une déphosphorylation de ses récepteurs (Orti et al., 1992). Actuellement, on a identifié quatre sérines phosphorylés (Ser104, Ser106, Ser118 et Ser167) toutes situées à l'extrémité N-terminale (Legoff et al., 1994; Ali et al., 1993). La substitution des sérines 106 et/ou 106 et 118 par des alanines entraîne une faible réduction de l'activité transcriptionnelle de hER dans les cellules COS-1 (Legoff et al., 1994; Ali et al., 1993). Ceci indique que probablement il existe d'autres sites dont la phosphorylation peut moduler l'activité transcriptionnelle de hER. Arnold et coll. ont montré que la phosphorylation de la Ser167 est induite par la présence de l'hormone dans les cellules MCF-7 et SF9. Ils ont également observé que la CKII phosphoryle préférentiellement l'ER lié à l'hormone (Arnold et al., 1994). Récemment, le même groupe a montré que l'ER est phosphorylé sur un résidu tyrosine (Tyr537). La Tyr537 est phosphorylée *in vitro* par les membres de la famille Src des tyrosine kinases (p60<sup>src</sup> et p56<sup>lck</sup>) et déphosphorylée par la tyrosine phosphatase 1-B et la protéine Src homology-2 tyrosine phosphatase-1 (Arnold et al., 1995).

#### **4/ LES RECEPTEURS AUX ANDROGENES :**

Dans les cellules du carcinome du ganglion lymphatique humain de la prostate (LNCaP), le récepteur aux androgènes (RA) est rapidement phosphorylé après sa synthèse (Van Laar et al., 1990; Van Laar et al., 1991; Kuiper et al., 1991). Des expériences de marquage métabolique au  $^{32}\text{P}$ , menées dans ces cellules montrent que le RA est une phosphoprotéine en absence de l'hormone (Van Laar et al., 1990; Kemppainen et al., 1992). La protéolyse partielle du RA marqué au  $^{32}\text{P}$  révèle que la phosphorylation touche principalement le domaine N-terminal (Kuiper et al., 1993). Zhou et coll. ont identifié deux sites de phosphorylation dans la région N-terminale, la Ser94 et la Ser81. La Ser94 est fortement phosphorylée alors que la Ser81 est faiblement phosphorylée. Ils ont également identifié un autre site dans le domaine E, la Ser650, qui est un site majeur de phosphorylation (Zhou et al., 1995). Bien que le RA soit fortement phosphorylé, cette phosphorylation ne semble pas être nécessaire à son activité, tout au moins dans les expériences de transfection transitoire.

#### **5/ LES RECEPTEURS A LA VITAMINE D :**

Des études utilisant le VDR de souris (Haussler et al., 1988) ou de poulet (Brown et al., 1990) ont montré que la phosphorylation *in vivo* du récepteur est un événement rapide qui est stimulé par la vitamine D3. Hsieh et coll. ont observé que la Ser51, localisée entre les doigts de zinc, est phosphorylée par la PKC $\beta$  à la fois *in vivo* et *in vitro* (Hsieh et al., 1991). La substitution de la Ser51 par une glycine ou l'acide aspartique entraîne une forte diminution de la transactivation induite par la vitamine D ainsi qu'une perte de liaison à l'ADN, alors que le remplacement de la Ser51 par une alanine n'affecte pas les propriétés du récepteur par rapport au VDR sauvage (Hsieh et al., 1993). Ces résultats suggèrent que la Ser51 est située dans une région dont la structure secondaire joue un rôle clé dans l'activité du VDR. En effet, on pourrait imaginer que l'apport d'une charge négative *via* la phosphorylation de la Ser51 entraîne une perturbation de cette structure secondaire, qui va rendre le récepteur incapable de se lier à l'ADN, et donc d'activer les gènes cibles.

#### **6/ LES RECEPTEURS AUX HORMONES THYROIDIENNES :**

Comme les autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, le récepteur aux hormones thyroïdiennes (hT3R $\beta$ ) est une phosphoprotéine (Lin et al., 1992). Les sites de phosphorylation sont des résidus sérine, thréonine ou tyrosine dans une proportion de 85:10:5. Dans les érythroblastes, le hT3R $\beta$ 1 présente deux sites majeurs de phosphorylation dans son domaine N-terminal (Goldberg et al., 1988). L'un de ces sites (Ser12) est phosphorylé dans les cellules par la CKII (Glineur et al., 1989). Bien que la nature de la protéine kinase responsable de la phosphorylation du deuxième site (Ser28/29) soit encore inconnue, les activateurs

de la voie de PKA ou de PKC induisent une augmentation de la phosphorylation de la Ser28/29. Le groupe de Cheng a montré que la phosphorylation régule l'activité transcriptionnelle de T3R $\beta$ 1 à plusieurs niveaux. Premièrement elle augmente sa capacité de liaison à l'ADN. Deuxièmement, la phosphorylation de T3R $\beta$ 1 semble favoriser la formation d'homodimères (Lin et al.,1992; Bhat et al.,1994; Sugawara et al.,1994). L'effet de la phosphorylation du TR $\beta$ 1 sur la formation des hétérodimères T3R/RXR est controversée (Bhat et al.,1994; Sugawara et al.,1994).

## **7/ CONCLUSION :**

Ces dernières années l'étude de la phosphorylation des récepteurs nucléaires a connu un grand engouement. Nous savons maintenant que tous les récepteurs nucléaires qui ont été étudiés sont des phosphoprotéines. La sérine est le résidu préférentiellement phosphorylé *in vivo* et *in vitro*. Bien que tous les récepteurs soient phosphorylés dans le domaine N-terminal, les autres domaines sont également touchés. Finalement, il faut noter que nos connaissances restent encore fragmentaires sur le rôle joué par les processus de phosphorylation dans les fonctions de la plupart des récepteurs nucléaires. Nous venons juste de commencer à entre apercevoir l'éventail des possibilités qu'offre la phosphorylation dans la régulation de l'activité de ces récepteurs, et je crois que les futurs axes de recherche dans ce domaine seront orientés vers le côté fonctionnel que mécanistique de la phosphorylation.

RECEPTEURS	Sites de phosphorylation	Domaine	Protéines kinases	Effets
GR	S122, S150, S212, S220 S234, S315, T159 [1]	A/B	ND	Aucun [2]
PR	S211, S260, S367, S530 [3] S81*, S162* [4]	A/B	ND CKII [4]	ND
ER	S104, S106, S118, S167 [5] Y537 [7]	A/B E	CKII [6] c-Src [7]	Pas très significatif [5]
AR	S81, S94,[8] S735 [8]	A/B E	ND	ND
VDR	S51 [9]	C	PKC [9]	Stimule l'activité transcriptionnelle [9]
T3R	S12 S28/29 [10]	A/B	CKII [11] PKA/PKC [11]	Favorise la formation d'homodimère. Augmente sa capacité de liaison à l'ADN [12]

**Tableau 3 : Phosphorylation et récepteurs nucléaires**

(GR : récepteur aux glucocorticoïdes; PR : récepteurs à la progestérone; ER : récepteurs aux oestrogènes; RA : récepteurs aux androgènes; VDR : récepteurs à la vitamine D; T3R : récepteurs aux hormones thyroïdiennes). \* : sites identifiés uniquement chez PR-B.

[1], [2] : Bodwell et al., 1995; [3] ; [4] : Zhang et al., 1994; [5]: Legoff et al., 1994; Ali et al., 1993; [6] : Arnold et al., 1994; [7] : Arnold et al., 1995; [8] : Zhou et al., 1995; [9] : Hsieh et al., 1991; [10] : Goldberg et al., 1988; [11] : Glineur et al., 1989; [12] : Lin et al., 1992; Bhat et al., 1994; Sugawara et al., 1994.

# **RESULTATS**

Ce travail a été entamé dans notre laboratoire pour répondre à la question suivante : les voies de phosphorylation et déphosphorylation affectent-elles l'activité transcriptionnelle induite par les rétinoïdes ? En effet, plusieurs groupes avaient montré que certains récepteurs nucléaires (PR, GR, T3R) sont des phosphoprotéines. Dans certains cas, la modulation des voies de phosphorylation perturbait l'activité de ces récepteurs. Le groupe de Chambon a montré que les RARs ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) sont également des phosphoprotéines (Gaub et al., 1992; Rochette-Egly et al., 1991). En utilisant des anticorps anti-phosphotyrosine, il a observé que RAR $\beta$  est phosphorylé *in vivo* sur des résidus tyrosine (Rochette-Egly et al., 1992). Mais, on ne savait pas dans quelle mesure l'activité du récepteur était affectée par cette phosphorylation. Au cours de ce travail, nous avons abordé l'étude des interactions entre les voies de phosphorylation et le mécanisme d'action des rétinoïdes de façon plus systématique et approfondie. Nos résultats peuvent être subdivisés en deux parties :

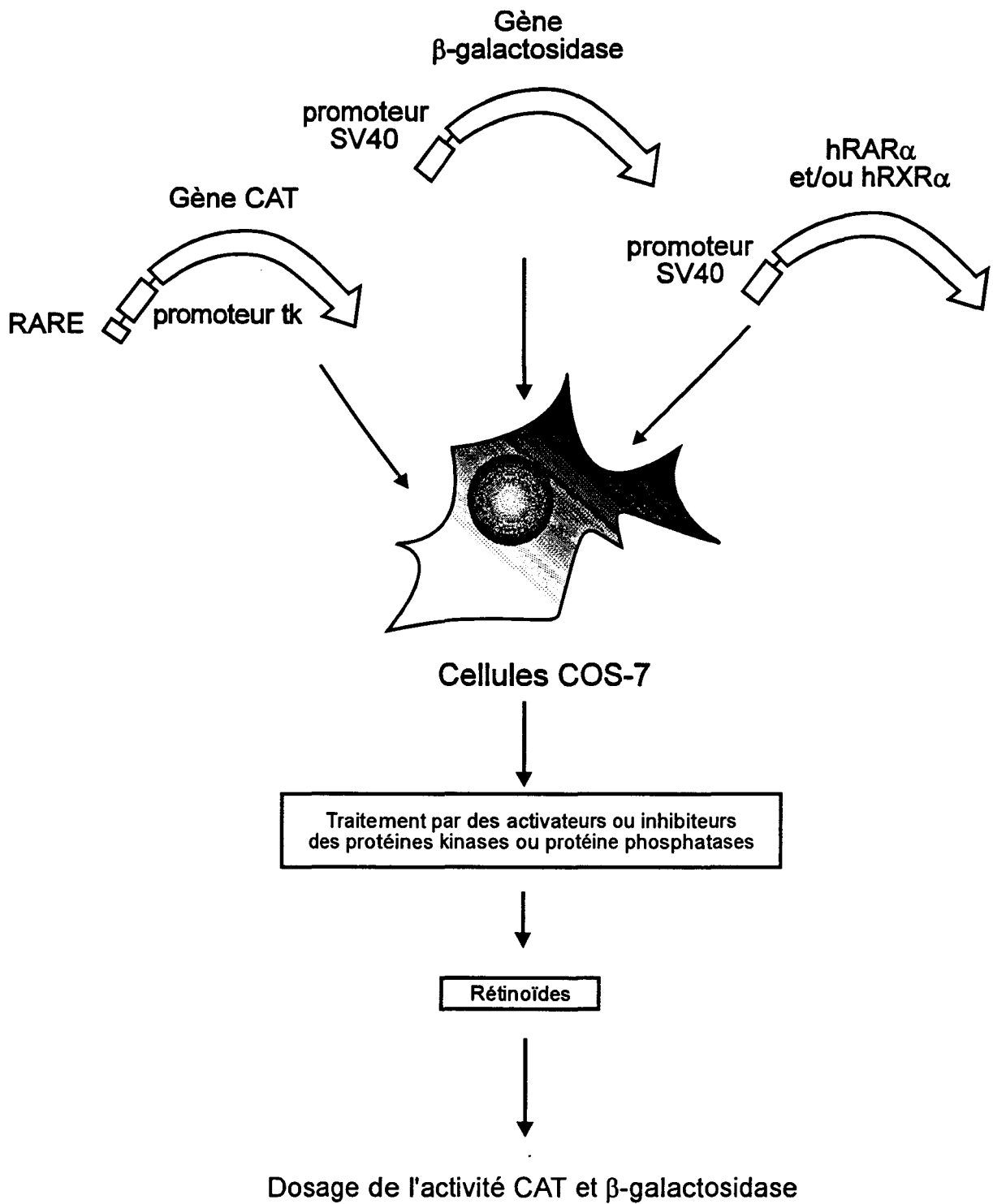
- Les protéines kinases et les RARs.
- Les phosphatases et les RARs.

## **PARTIE I : LES PROTEINES KINASES ET RETINOIDES**

### **A/ L'APPROCHE EXPERIMENTALE :**

Pour notre étude, nous avons choisi les cellules COS-7 en tant que modèle cellulaire. Ce sont des cellules de rein de singe transformées par le virus SV40 et qui ne sont plus capables de se différencier. Donc, l'état de différenciation des cellules n'interférait pas dans l'interprétation de nos résultats. Cette caractéristique est très importante car au cours de nos expériences nous étions amené à utiliser des agents différenciateurs comme le TPA ou le dbAMPc. Un autre avantage de ces cellules est l'expression d'un taux endogène très faible en récepteurs des rétinoïdes. Notre approche expérimentale a consisté à introduire dans les cellules COS-7, par la technique de transfection transitoire, un vecteur codant pour hRAR $\alpha$  sous le contrôle du promoteur SV40 et un vecteur contenant un gène reporter (en l'occurrence le gène de la chloramphénicol





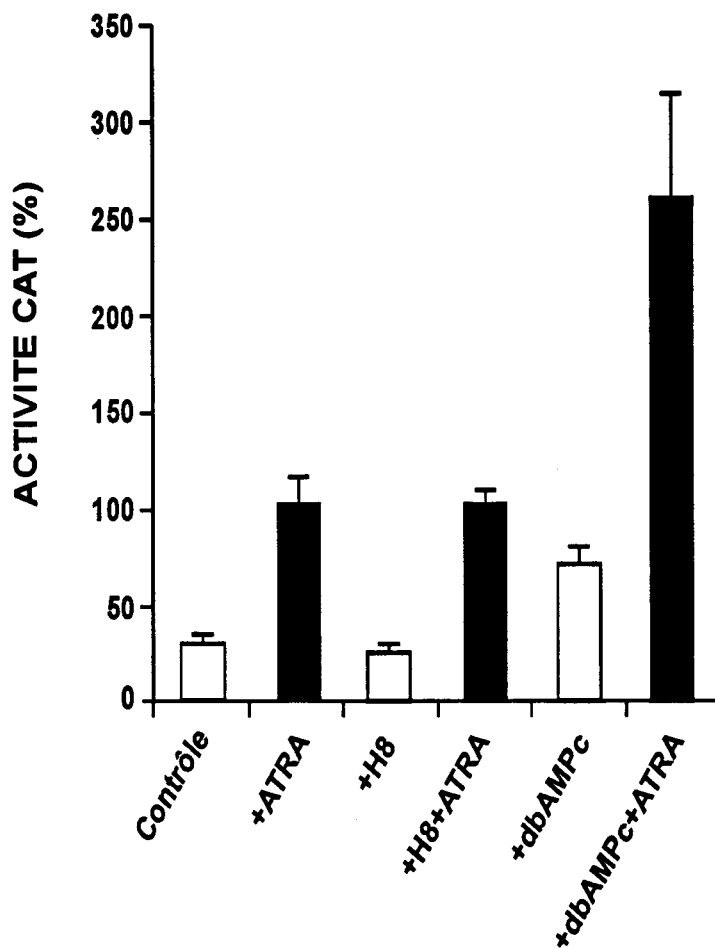
**Figure 26 : Schéma général de l'approche expérimentale**

acétyl transférase (CAT)), sous le contrôle d'un promoteur minimal constitué par une TATA box et un RARE (DR-5) répété deux fois). Les cellules COS-7 ont été également transfectées par un vecteur codant pour la  $\beta$ -galactosidase (pCHI10) qui sert de contrôle interne de l'efficacité de la transfection. Les cellules COS-7 transfectées ont été ensuite traitées par des inhibiteurs ou stimulateurs des voies de phosphorylation et déphosphorylation, puis par les rétinoïdes (ATRA et 9cisRA) (Figure 26). L'appréciation de l'activité transcriptionnelle des rétinoïdes se fait par dosage de l'activité CAT.

### **B/ LA VOIE DES PROTEINES KINASES AMPc DEPENDANTE (PKA) :**

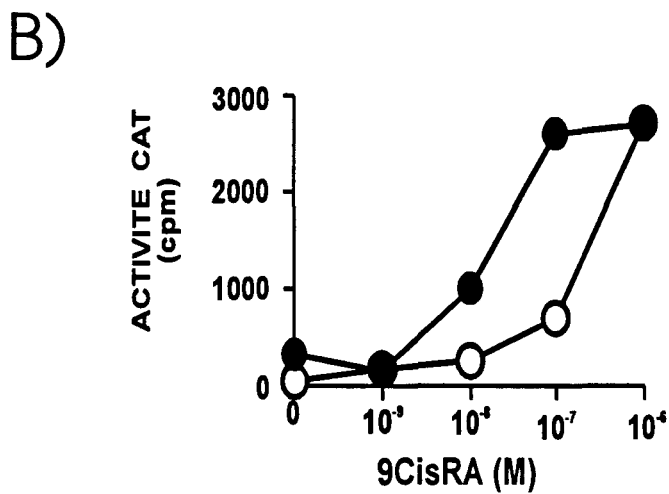
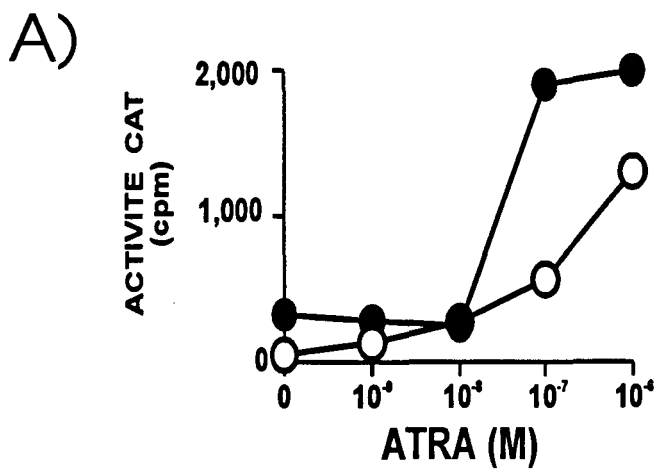
Les cellules COS-7 transfectées, comme décrit précédemment, sont traitées par un inhibiteur de PKA, le N-[2-méthylamino)éthyl]-5-isoquinoline-sulfonamide ou H8 ( $K_i = 1,2\mu\text{M}$ ). La spécificité de cet inhibiteur n'est pas stricte car il peut également inhiber les protéines kinases GTP dépendantes (Hidaka et al., 1984). Au cours de nos expériences, H8 a été utilisé à la concentration de  $10^{-6}\text{M}$  pendant 12 heures. Cet inhibiteur utilisé seul n'a d'effet ni sur le taux de base ni sur l'activité induite par l'acide rétinoïque (Figure 27).

L'AMPc est un messager secondaire naturel qui provient de l'hydrolyse de l'ATP et qui stimule la voie de la PKA. Dans le but d'activer cette voie nous avons utilisé le dibutyrylAMPc (dbAMPc), qui a la propriété d'être plus hydrophobe que l'AMPc et de pouvoir ainsi traverser plus facilement les membranes plasmiques. Dans notre expérience, le dbAMPc provoque une augmentation de la transactivation induite par l'ATRA (2,5 fois). Le taux de base subit également une augmentation de 60% (Figure 27). Ces résultats suggèrent que la voie de la PKA est impliquée dans le mécanisme d'action des rétinoïdes. Nos observations ont été confortées par le travail de Huggenvik et coll. qui ont observé que la surexpression de la sous unité catalytique C $\beta$  de la PKA dans les cellules CV-1 et Hela augmente la transactivation induite par les RARs en absence et en présence de l'ATRA (Huggenvik et al., 1993). Récemment, le groupe de Chambon a montré que l'isoforme RAR $\alpha$ 1 est phosphorylé *in vitro* par la PKA sur la sérine 369. La mutation de cette sérine par une alanine réduit l'activité de liaison du complexe RAR $\alpha$ 1/RXR $\alpha$  à un DR-5, DR-2 et DR-1, alors que le remplacement de cette sérine par l'acide glutamique augmente la liaison de l'hétérodimère au DR-5



**Figure 27 : Le rôle de la voie de la PKA dans l'activité transcriptionnelle induite par l'ATRA.**

Les cellules COS-7, transfectées par le vecteur d'expression pour hRAR et le gène reporter (RARE)<sub>2</sub>-tk-CAT, sont traitées par H8 (1  $\mu$ M) ou par le dbAMPC (1 mM) et par l'ATRA pendant 12 heures. La valeur de l'activité CAT des cellules traitées par l'ATRA constitue la référence 100%. Chaque valeur représente la moyenne de trois résultats obtenus au-cours de trois expériences indépendantes.



**Figure 28 : Effet du calcium sur la transactivation induite par les rétinoïdes sur un DR-5.**

Les cellules COS-7 transfectées sont mises en présence (●) ou en absence (○) de l'ionophore A23178 (100 nM).

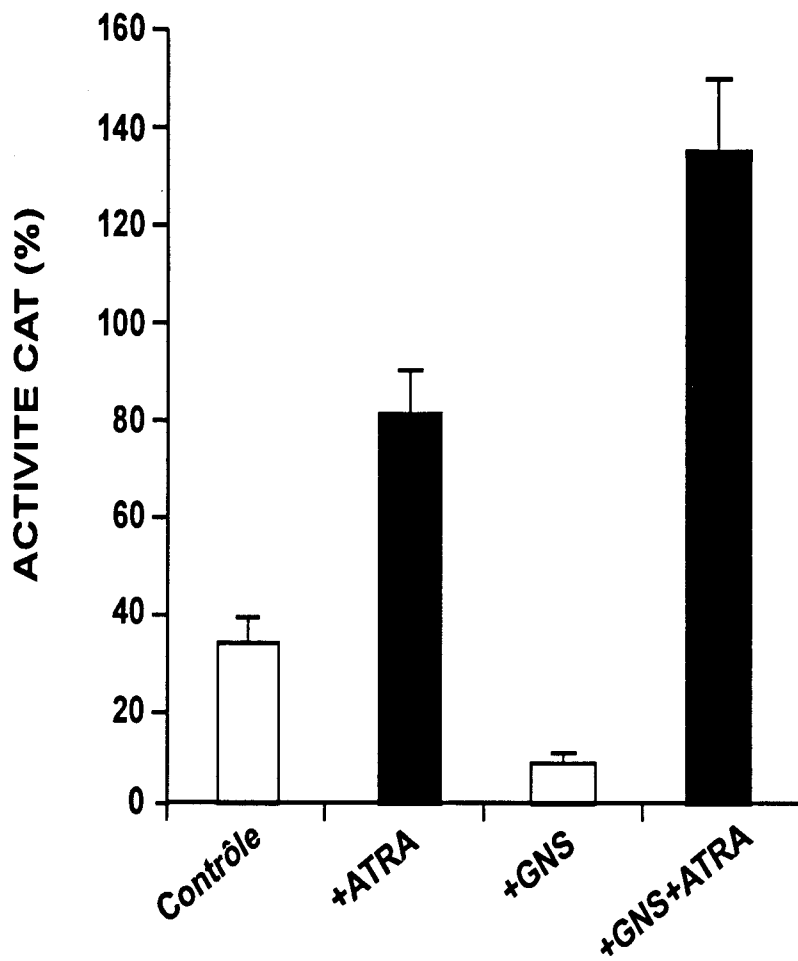
(Rochette-Egly et al., 1995).

### **C/ LE CALCIUM :**

Sachant que de nombreuses kinases et phosphatases sont des enzymes dont l'activité dépend du calcium, nous avons testé l'implication du calcium dans le mécanisme d'action des rétinoïdes. Nous avons utilisé l'ionophore A23178, qui possède la propriété de masquer les charges positives du calcium et donc facilite son passage à travers la membrane plasmique. L'ionophore utilisé à une concentration de 100nM provoque une stimulation de la transactivation à  $10^{-7}$ M d'ATRA et 9cisRA, alors que cette activation a tendance à devenir insignifiante à  $10^{-6}$ M (Figure 28). Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce résultat. Premièrement, le flux du calcium induit une augmentation de l'affinité du récepteur à ses ligands. Deuxièmement, le calcium entraînerait une stimulation de l'activité transactivatrice intrinsèque du récepteur. En conclusion, le calcium active probablement des protéines calcium dépendantes, comme la PKC, qui pourraient interagir directement sur les récepteurs des rétinoïdes.

### **D/ LA VOIE DES TYROSINE KINASES :**

Pour explorer cette voie nous avons utilisé un inhibiteur des tyrosines kinases, la génistéine [5, 7-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one, 4,5, 7-trihydroxyisoflavone], à une concentration de 50  $\mu$ M (Figure 29). La génistéine n'a pas d'effet significatif sur la transactivation. Or, Rochette-Egly et coll. ont montré que parmi les RARs seul RAR $\beta$ 2 est phosphorylé sur des résidus tyrosine *in vivo* et donc susceptible d'être affecté par les voies des tyrosine kinases. Il serait intéressant de refaire notre expérience ci-dessus mais en transfectant les cellules par le vecteur d'expression pour RAR $\beta$ 2 !



**Figure 29 : Effet des tyrosine kinases sur le mécanisme des rétinoïdes**

Les cellules COS-7 transfectées sont traitées par la génistéine (50 $\mu$ M), en absence ou en présence de l'ATRA (10<sup>-6</sup>).

## **E/ VOIE DES PROTEINES KINASES C ET hRAR $\alpha$ :**

### **1-RESUME DE L'ARTICLE I:**

Les PKCs, comme les rétinoïdes, sont très impliquées dans les processus de différenciation et de prolifération cellulaire (voir généralités). Par la technique de transfection transitoire, nous nous sommes attachés à étudier les interactions possibles entre ces deux voies. Nous avons observé que l'inhibition sélective de la PKC ou la déplétion de celle-ci par le TPA (12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acétate) entraîne une forte diminution de la transcription induite par l'ATRA ( $\approx 65\%$ ). La surexpression de la PKC $\alpha$  est capable d'inhiber l'effet de la déplétion de la PKC sur la transactivation induite par l'ATRA. Cette diminution est due essentiellement à une perte de la capacité de liaison à l'ADN de hRAR $\alpha$  en présence du ligand. Des expériences d'immunofluorescence indirecte montrent qu'en absence de la PKC la localisation intracellulaire est perturbée. Nous avons aussi observé que la phosphorylation *in vitro* de hRAR $\alpha$  par la PKC induit une diminution de la capacité du récepteur à former des hétérodimères ou homodimères sur un élément de réponse aux rétinoïdes. Ce travail établit une relation entre la voie des rétinoïdes et celle des PKCs. Ces dernières sont capables de moduler plusieurs activités fonctionnelles de hRAR $\alpha$ .

### **2-ARTICLE I :**

# A Protein Kinase C-Dependent Activity Modulates Retinoic Acid-Induced Transcription

Ali Tahayato\*, Philippe Lefebvre\*, Pierre Formstecher, and Michel Dautrevaux

INSERM-CJF 92-03  
Faculté de Médecine de Lille  
59045 Lille Cedex, France

The retinoic acid receptors (RARs) and retinoid X receptors, which are members of the nuclear receptor family, mediate the effects of vitamin A derivatives on cellular growth and differentiation. The protein kinase C isozyme family also controls these processes in response to extracellular stimuli. We have investigated the relationship between these two signal transducing pathways using gene transfer techniques. We show that selective inhibition of protein kinase C (PKC) and its depletion by prolonged treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate lead to the loss of ligand-dependent transcription of an RA-inducible promoter. The effect of the depletion in cellular PKC could be counteracted by overexpression of PKC $\alpha$  and is directly correlated to the loss of the DNA-binding activity of complexes containing the human RAR $\alpha$  (hRAR $\alpha$ ). Indirect immunofluorescence studies demonstrated an altered subcellular localization of hRAR $\alpha$ . However, direct *in vitro* phosphorylation of hRAR $\alpha$  by PKC diminished its ability to form heterodimeric or homodimeric complexes on a retinoic acid response element, suggesting that the DNA-binding capacity of hRAR $\alpha$  in intact cells is indirectly controlled by a PKC-dependent mechanism. Thus our observations establish a functional link between the PKC and retinoid pathways, which are generally considered to have antagonistic activities on differentiation processes. (*Molecular Endocrinology* 7: 1642-1653, 1993)

## INTRODUCTION

Phospholipase C-dependent hydrolysis of inositol phospholipids is triggered by the binding of extracellular ligands to their surface receptors. This reaction generates two second messengers, inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol (DAG). While inositol 1,4,5-triphosphate causes dramatic effects on intracellular Ca<sup>++</sup> mobilization (1), DAG activates protein kinase C

(PKC). The PKC gene family codes for at least nine serine/threonine protein kinases (2) that are present, in quiescent cells, as cytosolic inactive enzymes. Each isoform has specific requirements for calcium, DAG, and phosphatidylserine (PS) and displays specific tissue expression (2, 3). Some PKC isoforms are known to be the intracellular receptors for phorbol ester tumor promoters such as 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (3, 4), demonstrating a crucial role of these enzymes in cell growth and differentiation (reviewed in Ref. 5). Sustained activation of PKC by phorbol esters, which are metabolically stable analogs of DAG, or repeated treatment of target cells by DAG is required to observe proliferative and differentiation responses (reviewed in Ref. 6). Chronic activation of PKC by phorbol esters also leads to cellular depletion in PKC. This effect is most likely mediated by a calpain-like protease that would cleave the activated PKC polypeptide at the hinge region (7 and references therein). From this proteolysis ensues the release of the C terminal domain of the enzyme that bears the catalytic domain. This truncated form of PKC, termed PKM, is constitutively active because it lacks its regulatory domain and is released in the cytosol. PKM is, however, readily degraded in these conditions (8 and cited references therein). Part of this PKM pool is translocated to the nuclear envelope, leading to the phosphorylation of nuclear proteins involved in transcriptional regulation. The nuclear translocation of PKC can therefore provide an explanation for its effects on nuclear events. The DNA-binding activity and *trans*-activating potential of MyoD, a transcription factor involved in myogenesis, is negatively regulated by FGF via phosphorylation by nuclear PKC $\alpha$  (9).

Retinoic acid (RA) has also been shown to be a molecule inducing differentiation processes (10) in various cell lines such as HL-60, a human leukemia cell line, and F9 teratocarcinoma cells (11). RA's effects are known to be mediated by nuclear receptors that act as ligand-regulated transcription factors (12). Several types of receptors have been identified (reviewed in Ref. 13) and are believed to have specific roles in vertebrate development in view of their specific tissue distribution during embryogenesis (14, 15). RA recep-

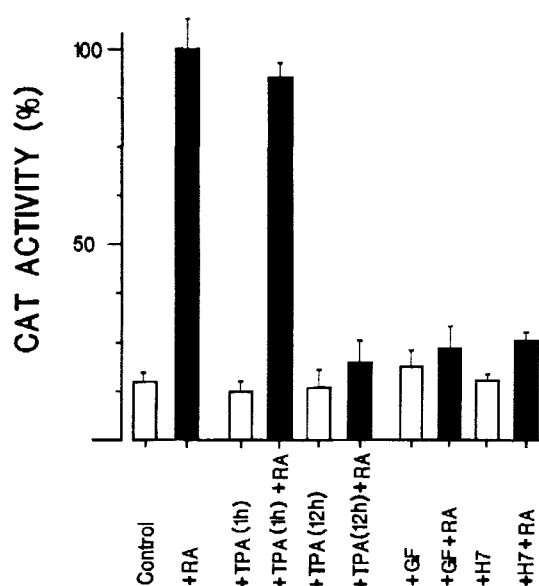


tor- $\alpha$  (RAR $\alpha$ ) is the receptor that mediates RA differentiating effects in the HL-60 cell line (16, 17). HL-60 cells differentiate toward the macrophage phenotype after TPA treatment, whereas RA treatment commits them toward the granulocyte cell type. RA-induced differentiation of this cell line is accompanied by an early increase in PKC concentration and activity (18–20). The B16 mouse melanoma cell line is also induced to differentiate by RA, and again, differentiation is preceded by a large increase in PKC $\alpha$ , which appeared to be controlled by a posttranscriptional mechanism (21). Overexpression of PKC $\alpha$  mimics RA-induced phenotypic transformations (22). Similarly, a prolonged treatment of B16 cells by TPA counteracted RA-induced biological responses (23). Thus the RA and PKC pathways seem to be intermingled during differentiation processes, and other members of the nuclear receptor family have been reported to be affected in their function via the PKC pathway (see *Discussion*). In the present report, we investigated the role of PKC in RA-induced transcription. We show that decreasing the PKC activity by inhibition or depletion of the enzyme negatively regulates RA-inducible transcription of a reporter gene and induces the loss of the DNA-binding activity of the receptor, and we discuss the relevance of these observations with respect to differentiation processes.

## RESULTS

### Prolonged Treatment by TPA and Inhibitors of PKC Repress RA-Induced Transcription

COS7 cells were transiently transfected by a reporter gene subsequently referred to as (RARE)<sub>2</sub>tkCAT. Two copies of the RA-responsive element (RARE) from the RAR $\beta$  gene promoter (24) were inserted upstream of the thymidine kinase (tk) promoter driving the bacterial chloramphenicol acetyl transferase (CAT) gene. The  $\beta$ -RARE is an imperfect direct repeat [AAGTTC(N)<sub>5</sub>-AAGTTC] that confers RA inducibility to a heterologous promoter. The low level of endogenous RARs found in COS cells is sufficient to activate this promoter in response to RA treatment (Fig. 1). Transfected cells were treated for various times, in the presence or not of 10<sup>-6</sup> M RA, with 100 nM TPA, a phorbol ester. Phorbol esters are structurally analogous to DAG but are resistant to metabolic inactivation processes. These compounds therefore activate permanently the PKC pathway in intact cells. From this sustained activation results a cellular depletion in PKC via the activation of a proteolytic pathway (see *Introduction*). TPA can thus be considered as a molecule having a dual effect on cellular PKC activity: at very short incubation times (1–60 min), TPA behaves as an activator of PKCs, whereas at prolonged incubation times (more than 2 h), TPA triggers a depletion in PKC activity. When COS cells were transfected with (RARE)<sub>2</sub>tkCAT and treated with 100 nM TPA for 1 h at the beginning of the RA treatment, no significant alteration of the reporter gene activity in



**Fig. 1.** Prolonged Treatment with TPA or PKC Inhibitors Decreases RA Responsiveness of the Reporter Gene p(RARE)<sub>2</sub>tkCAT

COS7 cells were plated in 35-mm dishes and transfected with 2  $\mu$ g p(RARE)<sub>2</sub>tkCAT as described in *Materials and Methods*. Cells were then treated with PKC inhibitors for 12 h (15  $\mu$ M H7 or 10  $\mu$ M GF109203X, noted as GF) or 100 nM TPA for 1 or 12 h, in the presence or not of 10<sup>-6</sup> M RA (■ or □, respectively). The 1-h treatment with TPA was performed at the beginning of the RA treatment; cells were then extensively washed with 1 $\times$  PBS and further incubated with RA alone. CAT activity is expressed as a percentage of the RA-induced CAT activity in untreated cells. Values in this and following experiments represent the average of three independent experiments performed in triplicate.

response to RA treatment was observed (Fig. 1). However, when transfected cells were treated with TPA and RA for 12 h, a dramatic decrease of the RA-induced CAT activity was observed. We concluded that when TPA was used as a down-regulator of the cellular PKC activity, it induced a decrease of the promoter responsiveness to RA. Transfected cells were then treated with H7, an inhibitor of protein kinases displaying a fair specificity for PKC (25), or with a highly specific PKC inhibitor (GF109203X; Ref. 26). A strong inhibition of the RA-induced transcription was observed in the presence of both inhibitors (Fig. 1), showing that an inhibition of the PKC activity also causes a loss of responsiveness of the promoter to RA treatment. These results demonstrate that the loss of cellular PKC activity, induced either by direct inhibition or by a TPA-induced depletion, resulted in the loss of ligand-dependent transcription of an RA-inducible promoter.

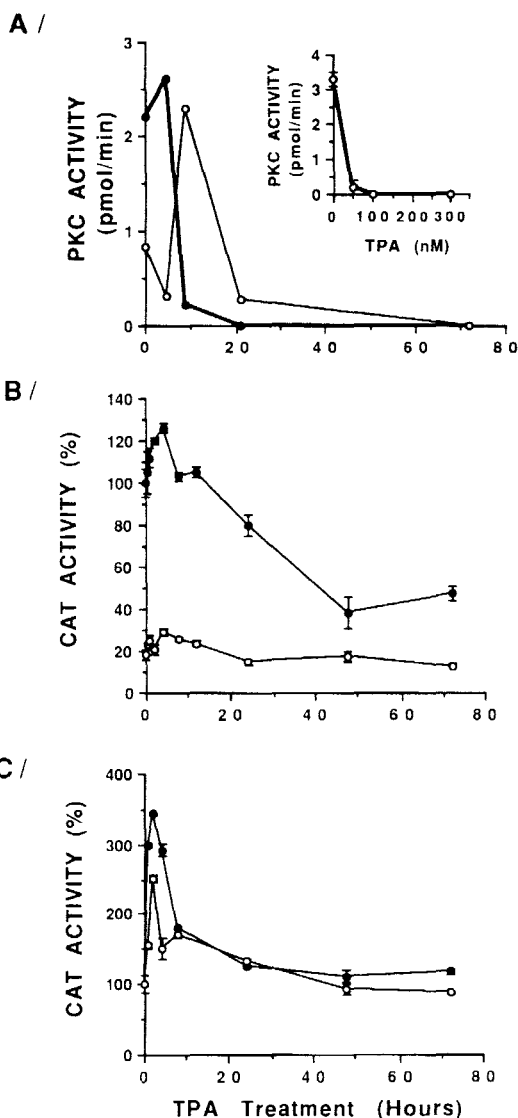
### PKC Depletion Is Correlated with the Loss of RA Responsiveness of a RARE-Driven Promoter

To establish whether TPA effect was indeed due to PKC depletion, we designed a set of experiments in

which COS cells were treated with 100 nM TPA for various times before the transfection procedure. This concentration was determined to be optimal in terms of its effect on cellular PKC activity (Fig. 2A, inset) and its cellular toxicity (Tahayato, A, unpublished observations). This protocol was designed to obtain cells de-

pleted in PKC activity throughout the transfection procedure. Therefore, COS cells were treated for various duration with TPA, and the PKC activity was assayed 36 h after the end of TPA treatment (Fig. 2A), which is the time necessary to perform the transfection procedure (see *Materials and Methods* for more details). In these conditions, PKC activity in the cytosoluble fraction rapidly decreased after a 2-h treatment, to reach an undetectable level after a TPA treatment of 20 h. Conversely, the PKC activity in the particulate fraction increased as the activity in the soluble fraction decreased, to reach a 2- to 3-fold higher level when compared to that of untreated cells after a 2- to 4-h treatment. The enzyme activity then decreased to become eventually negligible after a 48-h treatment (Fig. 2A). Thus a 48-h pretreatment with 100 nM TPA is required to observe a complete cellular depletion in PKC, and this procedure therefore allowed us to generate COS cells in which no detectable PKC activity was observed until completion of the transfection procedure.

A pretreatment of 48 h was required to achieve an inhibition of the RA-induced response of the reporter gene (RARE)<sub>2</sub>tkCAT similar to that observed in Fig. 1 (Fig. 2B). The basal level of expression of the reporter gene was not affected, and the RA-induced CAT activity steadily decreased with time to reach 20–30% of its initial level (Fig. 2B). This pattern of loss of inducibility by RA adequately matches that of PKC down-regulation (Fig. 2A). The activity of another reporter gene, pSV2CAT, was also assayed as a control (Fig. 2C). The CAT gene is, in this plasmid, under the control of the SV40 promoter that contains canonical TPA-responsive elements (27). As expected, only a short treatment of cells before transfection induced a rise in CAT activity, independently of the presence of RA (Fig. 2C). Longer treatment with TPA (more than 2 h) did not affect the SV40 promoter activity. This burst in SV40 promoter activity (1–2 h TPA treatment) is very likely to reflect a transient increase in AP-1 DNA binding activity of TPA-stimulated cells (28). In similar conditions, the Rous sarcoma virus promoter activity was not affected at all by TPA treatment (data not shown). From these observations, we conclude that the effect of prolonged treatment of cells by phorbol esters is specific for a RARE-driven gene. Our observations therefore establish a strong and direct correlation between cellular PKC activity and RA inducibility of the (RARE)<sub>2</sub>tkCAT reporter gene.



**Fig. 2.** Correlation between RA Inducibility by RA and PKC Status of COS Cells

COS cells were pretreated for the indicated times with 100 nM TPA, and the PKC activity was assayed 36 h after completion of the TPA treatment. A, The PKC activity of the soluble (●) or the particulate fraction (○) was assayed as described in *Materials and Methods*. Results are expressed as picomoles of <sup>32</sup>P transferred to the substrate per min/mg protein. The inset depicts the dose-effect relationship between TPA concentration and PKC activity in the soluble fraction. TPA treatment in this case was for 24 h. After extensive washing, TPA-treated cells were transfected with p(RARE)<sub>2</sub>tkCAT (B) or pSV2CAT (C), and treated with vehicle (○) or 10<sup>-6</sup> M RA (●). CAT activity is expressed as a percentage of the reporter gene activity in the presence of RA in untreated cells.

### Overexpression of PKC $\alpha$ Counteracts TPA's Effect on RA-Induced Transcription

Prolonged exposure of cells to TPA induces a cellular depletion of PKC enzymatic activity. One way to reestablish a higher level of this enzyme in depleted cells is to introduce an expression vector coding for one isoform of this enzyme. COS cells are known to contain only one subtype of TPA-sensitive isoenzyme, which is the  $\alpha$ -isoform (29). COS cells were treated with various concentrations of phorbol ester for 48 h, transfected

with the reporter gene with or without the expression vector pMT2-PKC $\alpha$  (30) (Fig. 3). The introduction of this vector in untreated COS cells caused a 2- to 3-fold increase in cytosolic PKC activity (data not shown). PKC $\alpha$  overexpression in untreated cells did not induce significant changes in RA-induced and basal activities of the reporter gene, as well as for a TPA concentration of 50 nM. On the contrary, PKC-depleted cells by prolonged incubation with 100 nM TPA regained ability to fully activate the reporter gene in response to RA treatment. The effect of treatment with a higher dose of TPA (300 nM) could not however be relieved by overexpression of PKC $\alpha$ . PKC overexpression can thus reestablish RA inducibility of the reporter gene. This result brings further support to the involvement of a PKC-dependent mechanism controlling RA-induced gene transcription.

### Prolonged Exposure of COS Cells to TPA and RA Lowers Human RAR $\alpha$ (hRAR $\alpha$ ) Binding to DNA

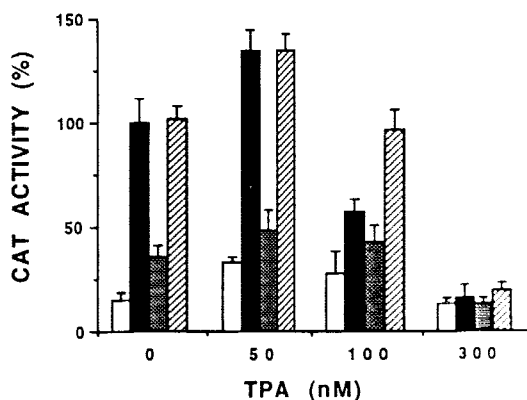
TPA-treated COS cells were transfected with an expression vector coding for the hRAR $\alpha$ , following the procedure described in Fig. 2. Nuclear extracts were analyzed for their ability to generate specific receptor/DNA complexes (Fig. 4A). The overexpression of RAR $\alpha$  was necessary to achieve detectable levels of RAR/DNA complexes by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) but did not affect the outcome of TPA treatment on the transcriptional activity of the reporter gene (Tahayato, A., unpublished results). Treatment of cells by RA did not alter the amount of specific  $\beta$ RARE/protein complexes (indicated by a *filled arrowhead*). These complexes contain hRAR $\alpha$ , since incubation with an anti-hRAR $\alpha$  polyclonal antibody decreased the protein/DNA complex mobility (Fig. 4A, lane 10). TPA treat-

ment decreased the ability of nuclear extracts to form these specific hRAR $\alpha$ /DNA complexes in a time- and RA-dependent manner (Fig. 4A, lanes 6–9): this effect was observed only when TPA pretreatment allowed for a total depletion in PKC activity (refer to Fig. 2A) and required the presence of the ligand. The loss of the ability of nuclear extracts to form specific hRAR $\alpha$ / $\beta$ RARE complexes therefore parallels the loss in RA-induced activity of the reporter gene observed in intact cells in similar conditions (Figs. 1 and 2).

The same nuclear extracts (200  $\mu$ g proteins) were analyzed for their content in hRAR $\alpha$  by Western blot analysis (Fig. 4B). Two immunoreactive polypeptides were detected with a polyclonal anti-hRAR $\alpha$  antibody, with estimated molecular masses of 54 and 58 kilodaltons (kDa). The amount of hRAR $\alpha$  remained constant upon TPA treatment in both types of extracts, irrespective of the presence of RA, demonstrating that the loss in DNA-binding activity is not due to a decreased level of receptor. We also noted that TPA treatment for 2 h yielded predominantly the 58-kDa species and observed that the 58-kDa and 54-kDa species are converted into a 52-kDa species upon phosphatase treatment (Lefebvre, P., unpublished observations), in agreement with a previous report (31). Thus a short TPA treatment may increase the phosphorylation state of hRAR $\alpha$ , but this was not correlated with any alteration of the specific DNA-binding activity. These data show that depletion of the cellular pool of PKC significantly altered the ability of nuclear extracts to generate specific complexes on an RA response element, without altering the cellular level of receptor. Our results thus support the hypothesis that PKC activity is required for full DNA-binding activity of hRAR $\alpha$ -containing complexes.

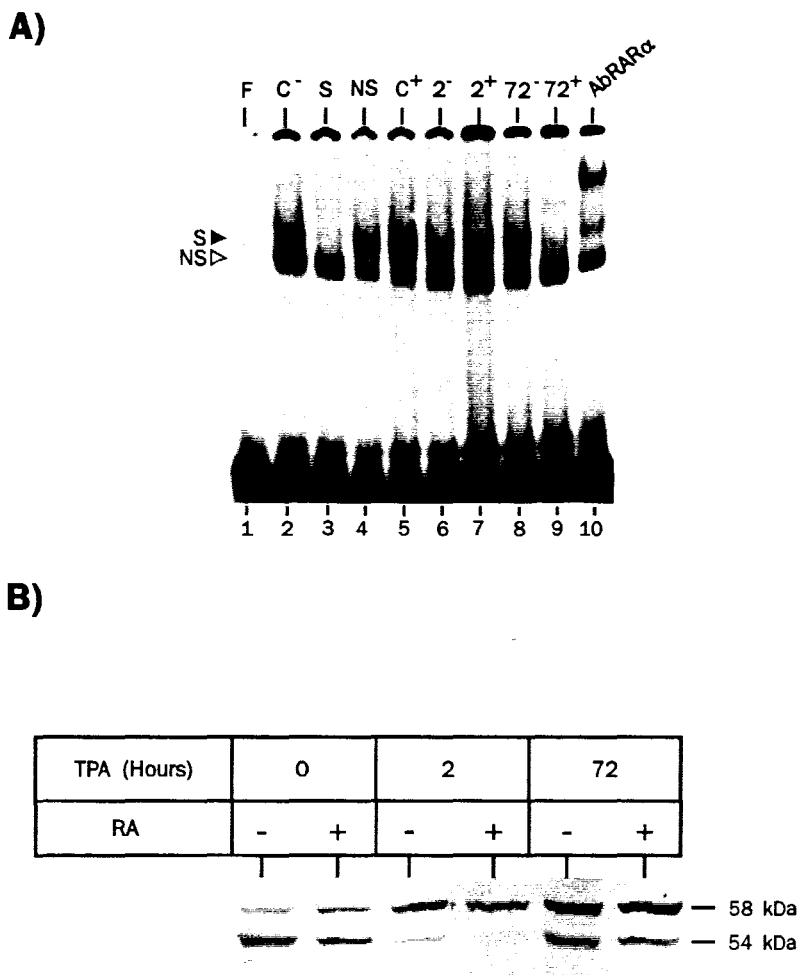
### PKC Depletion of COS Cells Inhibits RA-Induced Nuclear Localization of hRAR $\alpha$

Results from transient transfection experiments (32, 33), as well as immunostaining of transfected COS cells (34), led to the conclusion that RARs are localized in the nuclear compartment and very likely to be constitutively bound to their cognate DNA sequences. Since the results described above show that TPA treatment reduced the ability of nuclear extracts to generate hRAR $\alpha$ -DNA complexes, we also considered the possibility that the receptor subcellular localization might be affected by such a treatment. Cells were transfected with plasmid encoding hRAR $\alpha$  and the subcellular distribution of the receptor examined by indirect immunostaining using a polyclonal antibody directed against the domain F. As presented in Fig. 5, untreated COS cells displayed a strong perinuclear staining (Fig. 5A). This staining became entirely nuclear after treatment with RA for 4 h (Fig. 5B). Although treatment with TPA alone did not alter the cellular localization of the receptor when compared to untreated cells, which remained perinuclear (Fig. 5C), we noted that simultaneous treatment of cells with TPA and RA did not induce a nuclear



**Fig. 3.** Overexpression of PKC $\alpha$  Relieves the Effect of TPA Treatment on RA-Induced CAT Activity

COS cells were pretreated for 48 h with variable concentrations in TPA and transfected with p(RARE)<sub>2</sub>tkCAT alone (□ and ■ bars) or together with pMT2-PKC $\alpha$  (▨ and ▩) as described in Fig. 2. RA (10<sup>-6</sup> M) or vehicle was added to the transfected cells for 12 h (■ and ▩ or □ and ▨, respectively). The results represent the mean of two independent experiments performed in triplicate.



**Fig. 4.** Prolonged TPA Treatment Diminishes the DNA-Binding Activity of hRAR $\alpha$  in COS Cells in the Presence of RA

A, Twenty micrograms of proteins from nuclear extracts from COS cells were analyzed for their capacity to form specific DNA-protein complexes on the  $\beta$ RARE sequence. Cells were treated for 0, 2, or 72 h with 100 nM TPA, washed extensively, and transfected with an hRAR $\alpha$  expression vector (hRAR) and treated with  $10^{-6}$  M RA or vehicle (dimethylsulfoxide). The filled arrowhead indicates the specific protein-DNA complexes, and the empty arrowhead indicates nonspecific complexes. Specifically bound complexes were shown to contain hRAR $\alpha$  by supershift experiments using an anti-hRAR $\alpha$  polyclonal antibody (lane 10). F, Free probe; C, control extract (no TPA treatment) incubated with labeled  $\beta$ RARE alone; S, control extract incubated with the labeled  $\beta$ RARE and a 50-fold excess of the same DNA; NS, control extract incubated with the labeled RARE and a 50-fold excess of an unrelated oligonucleotide (glucocorticoid response element). +, Cells were treated by  $10^{-6}$  M RA. B, Western-blot analysis of nuclear extracts from transfected COS cells treated with TPA alone or TPA + RA for the indicated times before the transfection procedure. Molecular masses are indicated on the right.

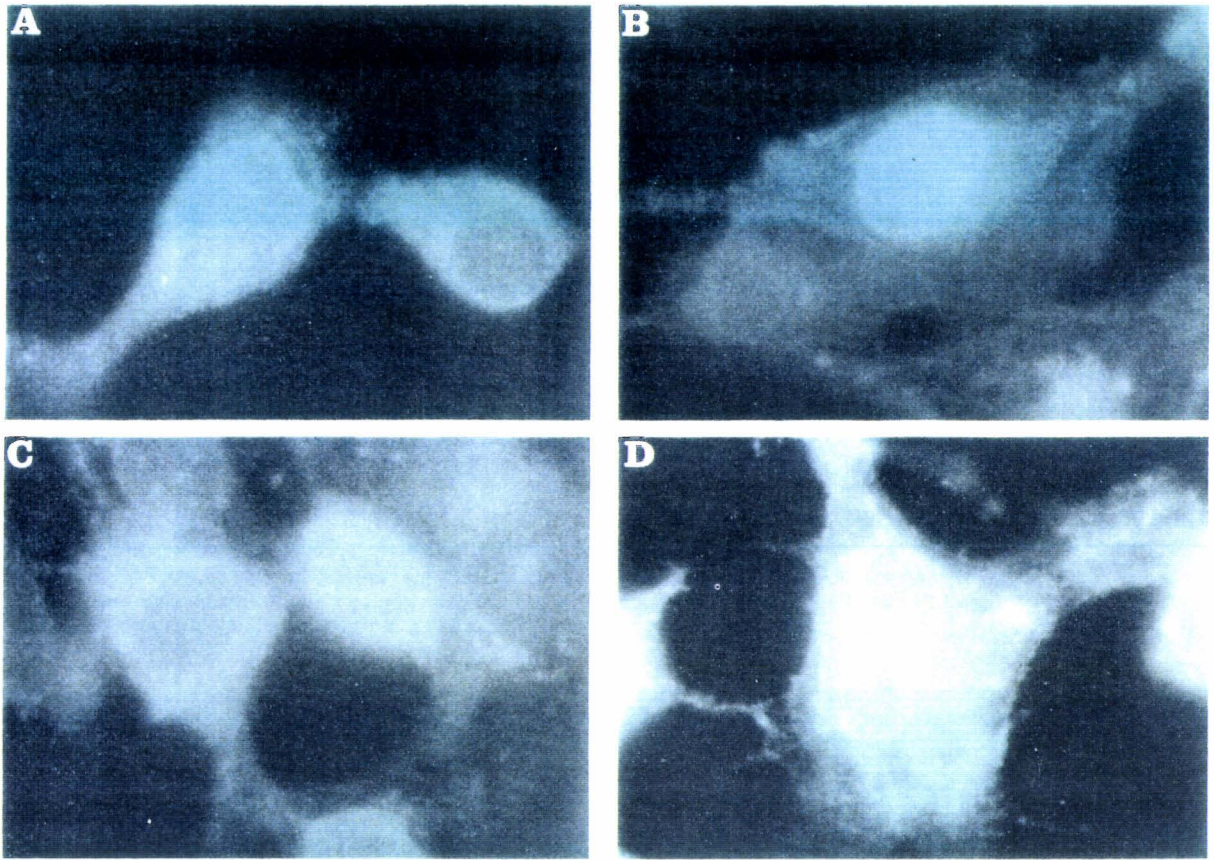
localization of the receptor as did RA treatment alone (Fig. 5, compare B and D). Moreover, we observed no significant morphological changes of COS cells after TPA treatment. PKC depletion therefore reduced the affinity of hRAR $\alpha$  for the nuclear compartment, and this result is consistent with a loss in DNA-binding affinity as detected by EMSA (see Fig. 4).

**RAR $\alpha$  Is a Target for *in Vitro* PKC-Catalyzed Phosphorylation**

Our results show that abrogation of PKC activity is detrimental to RA-induced transcription. A likely hypothesis is that the receptor is a target for PKC, and that the direct phosphorylation by this kinase maintains,

or increases, the DNA-binding activity of the receptor. We treated the partially purified receptor from *Escherichia coli* extracts by three different purified kinases [cAMP-PK, PKC, and casein kinase II (CKII)]. The receptor was then immunoprecipitated and analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Fig. 6A). All three kinases were able to phosphorylate the full-length receptor (52 kDa). Noticeably, PKC displayed a high kinasing activity on the intact receptor when compared to cAMP-PK and CKII and was able to phosphorylate smaller fragments of the receptor, which likely results from the proteolysis of the A/B domain, that were also detected by Western blot (Fig. 6A, middle panel). The ligand-binding domain (LBD) of RAR $\alpha$  (domains E and F, see Fig. 8) was also





**Fig. 5.** PKC Depletion Inhibits RA-Induced Nuclear Localization of hRAR $\alpha$

COS cells grown on microscope slides were transiently transfected with 0.5  $\mu$ g of an expression vector encoding hRAR $\alpha$ , after a 48-h treatment with 100 nM TPA (C and D) or vehicle (A and B). Sixteen hours after transfection,  $10^{-6}$  M RA (B and D) or vehicle (A and C) were added to the culture medium. Immunostaining was performed as described in *Materials and Methods*. A, Untreated COS cells; B, RA-treated cells; C, TPA-treated cells; D, RA- and TPA-treated cells. Nontransfected COS cells did not display detectable levels of immunofluorescence (data not shown).

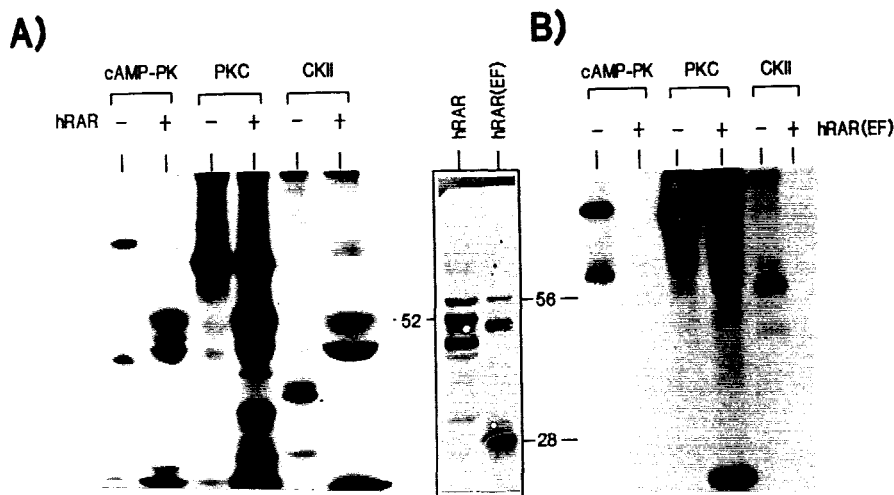
used as a substrate for cAMP-PK, PKC, and CKII. The LBD was a fusion protein made of the glutathione-S-transferase hooked to the E and F domains of RAR $\alpha$  [GST-hRAR $\alpha$ (E/F)]. This chimeric protein was partially cleaved by thrombin to yield a mixture of GST-hRAR $\alpha$ (E/F) (56 kDa) and free E/F domains (28 kDa). In analogous conditions, no phosphorylation of either the GST-fused or free E/F domains was detected for any of the three kinases (Fig. 6B). This observation is in agreement with a previous report showing that a fusion protein GAL4-mRAR (E/F) was not phosphorylated *in vivo*, whereas the full-length receptor or a GAL4-mRAR (D/E/F) fusion protein were isolated as phosphoproteins (35). Similarly, preliminary results suggested that PKC catalyzed the transfer of 3–4 mol phosphate/mol receptor, the phosphorylated residues being mostly located in the A/B domain (data not shown).

#### The *in Vitro* Phosphorylation of hRAR $\alpha$ by PKC lowers its DNA-Binding Affinity

In order to assess the consequences of the phosphorylation of the receptor by PKC, we set up a reconsti-

tution assay in which partially purified receptor from *E. coli* extracts was added to COS cell nuclear extracts and analyzed for its DNA-binding capacity to a well defined RARE ( $\beta_2$ RARE; Ref. 24) (Fig. 7A). Purified receptor does not bind avidly to DNA, but addition of nuclear extracts from mammalian cells allows the formation of a high affinity, heterodimeric complex made of RAR $\alpha$  and retinoid X receptor (36–41; Lefebvre, P., unpublished data). Purified hRAR $\alpha$  was mixed with COS cell nuclear extracts and the complexes analyzed by EMSA (Fig. 7A). Native hRAR $\alpha$ , which was incubated in the absence of protein kinases in conditions similar to those described in Fig. 6, bound DNA with a high affinity (Fig. 7A, lane C). Addition of CKII to the receptor preparation before the DNA binding reaction did not alter its DNA-binding capacity (Fig. 7A, lane CKII), whereas purified rat brain PKC considerably reduced the DNA-binding affinity of the heterodimeric complex.

*E. coli* extracts contain a PKC-like activity, which is calcium dependent, stimulated by phosphatidyl serine and TPA, and inhibited by sphingosine (42). Bacterial



**Fig. 6. PKC Phosphorylates hRAR $\alpha$  *in Vitro***

A, Partially purified, full-length hRAR $\alpha$  from bacterial extracts was submitted to kinasing reactions in the presence of cAMP-PK, PKC, or CKII and [ $^{32}$ P]ATP. Samples containing the receptor (+) or not (-) were immunoprecipitated with an anti-RAR $\alpha$  polyclonal antibody and resolved on 12% SDS-PAGE. B, Similar phosphorylation reactions were performed on a partially cleaved GST-hRAR $\alpha$ (E-F) fusion protein [hRAR $\alpha$ (EF)]. The *middle panel* is a Western blot analysis of the full-length receptor (hRAR) or of the GST-hRAR $\alpha$  fusion protein. Molecular masses (in kilodaltons) of the polypeptides are indicated on both sides of this panel.

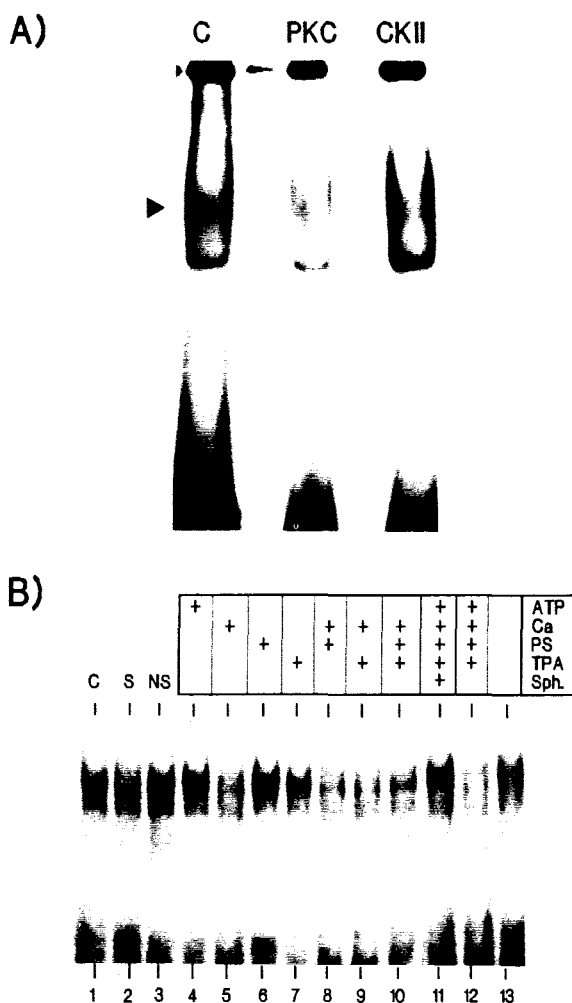
extracts containing overexpressed hRAR $\alpha$  were therefore submitted to various treatments with PKC activators and inhibitors and then tested for their ability to generate specific DNA-binding complexes onto the  $\beta$ -RARE (Fig. 7B, *upper band*). A strong decrease in the DNA-binding affinity of hRAR $\alpha$  was again observed in conditions where PKC is known to be activated. This decline in DNA binding was calcium dependent (Fig. 7B, lanes 5 and 8–12) and was noticeable when calcium alone was added. This effect is very likely due to endogenous levels of ATP (40  $\mu$ M on average in our preparations) and phospholipids (42) that are sufficient to partially stimulate the enzyme. The effect was maximal in the presence of 1 mM ATP, PS, and TPA (lane 12). Moreover, this decrease could be prevented by the addition of sphingosine, an inhibitor of PKC (lane 11). Thus, PKC activation also has an inhibitory effect on the formation of specific hRAR $\alpha$ / $\beta$ RARE complexes in conditions where only homodimeric complexes can be formed.

From these experiments, we conclude that *in vitro* phosphorylation of hRAR $\alpha$  by PKC isoenzymes decreases its capacity to bind to DNA either as a homo- or a heterodimer.

## DISCUSSION

The present study provides evidence that the cellular level of PKC has a profound effect on the inducibility by RA of a transiently transfected reporter gene in COS cells. This experimental procedure was deliberately chosen to avoid any perturbation of the receptor status

due to cellular differentiation processes commonly observed in cells responsive to RA and TPA treatment like HL-60, F9, or P19 cell lines. We showed that treatment of COS cells with inhibitors of PKC, as well as TPA-induced PKC depletion, caused a strong decrease in the activity of the RA-regulated reporter gene (Fig. 1). This effect is specific for the RARE-containing promoter and is directly correlated with a depletion of cellular PKC (Fig. 2). Moreover, a full inducibility of the reporter gene could be restored by introducing an expression vector for PKC $\alpha$ . We conclude that PKC activity is necessary to confer RA responsiveness to a promoter driven by a RARE, and that this activity is mediated by PKC $\alpha$  in our system. We addressed then the question whether a defined function of the hRAR $\alpha$  was impaired by such a treatment. DNA-binding assays revealed that hRAR $\alpha$  lost its DNA-binding activity upon TPA treatment in a time-dependent manner (Fig. 4). Again, this time course parallels the observed decrease of responsiveness of the reporter gene to RA. Intriguingly, this effect was dependent upon the presence of RA, suggesting that the ligand might induce changes in the receptor structure that confer its high sensitivity to the PKC-dependent activity. Moreover, immunofluorescence studies showed that hRAR $\alpha$  is not properly translocated to the nucleus upon treatment with RA and TPA (Fig. 5). Based on these findings, we propose that PKC activity affects the ability of hRAR $\alpha$  to interact productively with DNA sequences involved in the regulation of transcription. To test whether PKC catalytic activity promotes hRAR $\alpha$  DNA-binding activity by a direct phosphorylation, we performed *in vitro* experiments using purified PKC and receptor. These studies demonstrated that the intact receptor, but not the LBD,



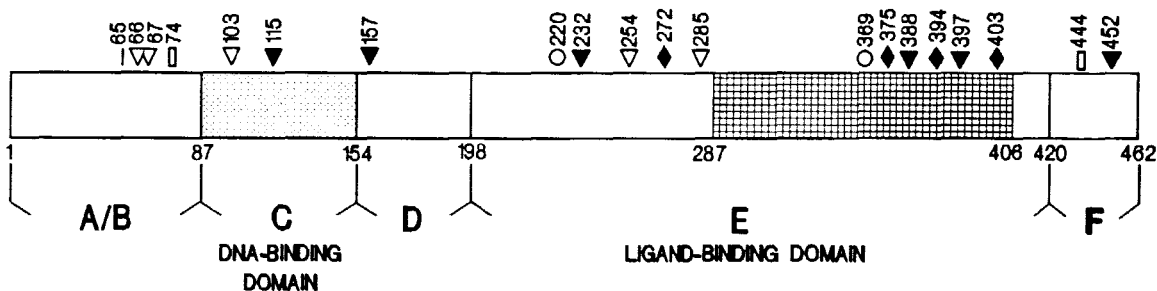
**Fig. 7.** Phosphorylation of hRAR $\alpha$  by PKC Diminishes its Affinity for DNA

A, Bacterially expressed hRAR $\alpha$  (~100 fmol) was submitted to kinasing reactions as described in Fig. 6. The control lane (C) contains hRAR $\alpha$  that has been incubated in parallel in 50 mM HEPES, 10 mM MgCl $_2$ , 1 mM DTT, and 2.5 mM ATP in the absence of protein kinase. The receptor preparation was then added to COS nuclear extracts (30  $\mu$ g protein) and incubated on ice for 30 min. Reconstituted extracts were then submitted to the DNA-binding reaction and analyzed for specific protein-DNA complexes formation by EMSA (see *Materials and Methods*). COS cell extracts and purified receptor did not display detectable binding activity (Lefebvre, P., unpublished observations). The filled arrowhead indicates the specific hRAR $\alpha$ -containing complexes. B, A bacterial PKC-like activity inhibits the DNA-binding activity of hRAR $\alpha$ . Whole cell extracts from bacteria overexpressing hRAR $\alpha$  (40  $\mu$ g protein) were submitted to PKC activating agents for 30 min at 37 C. Treated extracts were tested for their DNA-binding activity by EMSA. Concentrations of agents were 1 mM ATP, 10 mM MgCl $_2$ , 100 nM TPA, 50  $\mu$ g/ml PS, and 100  $\mu$ g/ml sphingosine (Sph). C, Extracts incubated with the labeled RARE only; S, extracts incubated with the labeled probe and a 100-fold excess of the same unlabeled probe; NS, extracts incubated with the labeled RARE and a 100-fold excess of an unrelated oligonucleotide (glucocorticoid response element).

is a good substrate for PKC. We then reasoned that if a direct phosphorylation of the receptor by PKC is required for its DNA-binding activity, thus a nonphosphorylated form of hRAR $\alpha$  should have a DNA-binding activity increased after phosphorylation by PKC. We used bacterially expressed hRAR $\alpha$ , which is not phosphorylated (data not shown), and observed that the phosphorylation of hRAR $\alpha$  by PKC reduced its affinity for its cognate DNA sequence. Very interestingly, Hsieh *et al.* (43) recently reported similar results with the human vitamin D receptor (VDR). They showed that phosphorylation of serine 51 by PKC $\beta$  abolished the interaction of VDR with DNA. This residue, as well as the surrounding sequence (FFRRS), is highly conserved in thyroid hormone, estrogen receptors, and hRAR $\alpha$ . Serine 51 of VDR corresponds to serine 115 of hRAR $\alpha$  and is located between the two zinc fingers of the DNA-binding domain. By analogy, our results described in Fig. 7 could therefore be explained by the phosphorylation of serine 115. However, *in vitro* phosphorylation experiments rule out the possibility that a direct *in vivo* phosphorylation of hRAR $\alpha$  by PKC is required to maintain the hRAR $\alpha$  under a DNA-binding form. It is more likely that a PKC-dependent mechanism indirectly modulates the affinity of hRAR $\alpha$  for DNA. Indirect regulation by a PKC-dependent mechanism of the *trans*-activating function of transcription factors has already been documented. *c-Jun* is rapidly activated by TPA treatment of target cells, which causes the rapid dephosphorylation of three specific serine and threonine residues localized close to its DNA-binding domain. An increased *trans*-activating ability of *c-jun* by at least 10-fold is observed in response to TPA treatment (44). The activation of some nuclear receptors has also been shown to be dependent on PKC activity (45). The dioxin-dependent activation of transcription of the cytochrome P $_4$ 50 gene is abolished by PKC inhibitors and prolonged TPA treatment (46), and this effect is mediated by a cytosolic PKC-dependent kinasing activity (47). It is also established that kinases can interact with each other to affect their cellular localization. For example, PKC activation has been shown to inhibit the migration of cAMP-PK to the nucleus of thyroid cells (48), whereas the stimulation of cAMP-PK induces the translocation of PKC to the nucleus of normal B lymphocytes (49). Several functions of RARs are likely to be modulated by phosphorylation catalyzed by different kinases. Indeed, multiple potential phosphorylation sites for cAMP-PK, PKC, CKII, and other kinases can be identified along the hRAR $\alpha$  sequence (Fig. 8), and one can easily imagine that *trans*-activation, as well as DNA-binding or dimerization properties, are affected by phosphorylation of serine and threonine residues.

The VDR is, on the contrary, directly phosphorylated by PKC on Ser-51, and mutation of this residue severely affected the VDR *trans*-activating properties (43, 50). Interestingly, we note that vitamin D, as well as RA, induces the differentiation of HL-60 promyelocytic cells lines. Both hormones increase the expression of PKC isoforms that mediate at least part of their differentiating





**Fig. 8.** Potential Phosphorylation Sites of hRAR $\alpha$

The amino-acid sequence deduced from the hRAR $\alpha$  cDNA (61) was scanned for potential phosphorylation site using the Prosite program (PC Gene, IntelliGenetics, Geneva, Switzerland) and consensus sequences (62). The following symbols indicate potential phosphorylation sites for:  $\nabla$ , glycogen-synthase kinase III;  $\blacktriangledown$ , PKCs;  $|$ , CKII;  $\circ$ , cAMP-PK;  $\square$ , CKI; and  $\blacklozenge$ , calmodulin-dependent kinase. The 286–406 region contains the heptad repeats potentially involved in dimer formation (63).

properties. Inhibition of PKC by sphingosine blocked the ability of HL60 cells to respond to vitamin D treatment (51), and we observed that the expression of *trans*-glutaminase, a marker of HL-60 cells RA-induced differentiation, is strongly inhibited in the presence of H7 (Manechez, D., W. Bourguet, N. Tbarka, J. L. Bernier, P. Formstecher, and M. Davtrevaux, submitted). RA and phorbol esters are considered as antagonists with respect to differentiation processes. Intriguingly, RA treatment generally increases PKC activity in differentiating cells, with the notable exception of neuronal cell types that display a decreased PKC content upon differentiation. On the other hand, various pathological states like psoriasis are associated to a decreased PKC concentration in the affected tissues. Our results thus emphasize the importance of the PKC pathway in RA-mediated transcription, and it will be of interest to explore further the role of PKC isozymes in RA-mediated differentiation, as well as the identification of the PKC-dependent activity that favors the DNA-binding activity of hRAR $\alpha$ -containing complexes.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Culture

COS7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (ICN-Flow Laboratories, Irvine, Scotland) supplemented with penicillin/streptomycin and 10% fetal calf serum.

### Nuclear Extract Preparation

Nuclear extracts from COS7 cells were prepared as previously described (53) with minor modifications; NP-40 was omitted from the cell lysis buffer, and phosphatase inhibitors were added to the extraction buffer (10 mM sodium molybdate, 10 mM sodium pyrophosphate, and 10 mM sodium vanadate). Protein concentration was estimated by the Bradford assay (54) and was usually found in the 3- to 5-mg/ml range.

### Overexpression and Purification of hRAR $\alpha$ from Bacteria

hRAR $\alpha$  was expressed in the bacterial strain BL21(DE3) pLysS transformed with plasmid pET3-RAR $\alpha$  (kindly provided

by Prof. P. Chambon, LGME, Strasbourg, France). Bacteria were grown in chloramphenicol- and ampicillin-containing LB medium and induced at midlog phase ( $A_{600} = 0.6$ ) by addition of isopropyl- $\beta$ -D-galactoside to 0.5 mM final. After 4 h of induction, cells were pelleted and resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 5 mM dithiothreitol (DTT), 0.4 M NaCl, 10  $\mu$ g/ml aprotinin and pepstatin A, and 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride. Phosphatase inhibitors were also included: 10 mM sodium molybdate, 10 mM sodium pyrophosphate, and 10 mM sodium vanadate. Lysozyme was added to 150  $\mu$ g/ml, and cells were finally lysed by addition of deoxycholate to a final concentration of 0.05%. Cell debris was pelleted at 60,000  $\times$  g, 4 C for 2 h. Supernatant usually contained 2–5 mg/ml protein. Extracts from transformed bacteria were submitted to a single-step purification by ligand-affinity chromatography. Elution was performed in the presence of  $10^{-6}$  M RA, and eluate was analyzed for its ligand-binding activity, its homogeneity by SDS-PAGE analysis, and receptor content by immunoblotting. In most cases, receptor concentration was around 40 pmol/ml, as judged by RA binding, and its homogeneity estimated in the range of 35–65% (55).

### EMSA

A 31-mer oligonucleotide containing the RARE from the promoter of the RAR- $\beta$  gene ( $\beta$ -RARE; Ref. 24) was synthesized and used as a probe in DNA-binding assay. The sequence of the oligonucleotide (upper strand) is gATCgggTAg ggTTCACCgA AAgTTCACCTC g. The double-stranded  $\beta$ -RARE oligonucleotide was end-filled with the Klenow fragment of DNA polymerase and 25  $\mu$ Ci [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP (3000 Ci/mmol). Typically, 40  $\mu$ g protein were incubated with 20 fmol of the labeled probe, in the presence of 5  $\mu$ g poly(dI-dC) and a binding buffer giving a final concentration of 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, and 10% glycerol. DNA binding reaction was for 45 min on ice, in a final vol of 40  $\mu$ l. Protein-DNA complexes were then resolved on a 5% nondenaturing polyacrylamide gel run at 150 V for 3 h at 4 C. The running buffer was 0.5 $\times$  TAE (1 $\times$  TAE is 40 mM Tris-acetate, pH 7.5, 2 mM EDTA). Gels were dried and autoradiographed at  $-70$  C.

### Transient Transfections, $\beta$ -Galactosidase (Gal), and CAT Assays

COS7 cells were transfected by the calcium phosphate precipitation method as follows:  $10^4$  cells were plated per 35-mm dish. The following day, cells were fed with 1 ml fresh medium, and calcium-DNA coprecipitate was added 4 h later. The mixture contained 2  $\mu$ g pSV- $\beta$ -gal plasmid (CH110; Pharmacia,



Piscataway, NJ), 5  $\mu$ g (RARE)<sub>2</sub>tk CAT plasmid, and 5  $\mu$ g hRAR $\alpha$  expression vector. DNA concentration was adjusted to 20  $\mu$ g final with carrier DNA. Incubation with the coprecipitate was for 16 h, after which cells were glycerol shocked. Cells were incubated for 10 h in complete medium and then submitted to various treatments as indicated in the text.

$\beta$ -Gal assay was performed as described (56), and enzyme activity was used to normalize CAT activity results. Cytosolic extracts for CAT assays were processed as described (57). CAT activity was quantified by the xylene extraction method (56) with [<sup>14</sup>C]chloramphenicol (55 mCi/mmol) and *N*-butyryl coenzyme A (Sigma, St. Louis, MO). A reaction time of 30 min was used to maintain the reaction within its linear range.

#### PKC Assay

PKC assay was performed according to the method of Yasuda *et al.* (58). The assay was performed using a kit from GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD) as suggested by the manufacturer. PKC activity is determined by phosphate transfer from labeled  $\gamma$ ATP to the synthetic peptide Ac-MBP(4–14), and the specificity checked by inhibition with the peptide PKC(19–36). Cytosolic PKC was prepared according to the manufacturer's protocol. Nuclear PKC was extracted from the nuclear pellet (100,000  $\times$  g, 30 min at 4 C) by 0.5% NP40 and 0.4 M NaCl. Ionic strength was adjusted to 0.2 M NaCl and PKC activity assayed as described above. Results are expressed in picomoles of phosphate incorporated per mole of peptide/min and corrected according to protein concentration (54).

#### Western Blotting Procedure

Proteins were resolved on 12% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Immunorevelation was performed as previously described using the IS39 polyclonal antibody and a secondary horseradish peroxidase-coupled antirabbit immunoglobulin G (59). The peroxidase activity was detected using the IBI Enzygraphic Web HS system, according to the manufacturer's recommendations (Eastman Kodak, New Haven, CT). The anti-hRAR $\alpha$  polyclonal antibody IS39 was raised against a synthetic peptide from the F domain of hRAR $\alpha$  (amino acids 425–443) and will be described in detail elsewhere.

#### In Vitro Labeling of hRAR $\alpha$ and Immunoprecipitation

Partially purified hRAR $\alpha$  was incubated for 20 min at 30 C with 10  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP diluted to reach a specific activity of 40 Ci/mmol (2.5 mM ATP final) and purified cAMP-PK (Sigma, St. Louis, MO), PKC (purchased from Calbiochem, La Jolla, CA) CKII (a kind gift of Prof. E. M. Chambaz, INSERM U244, Grenoble, France) in the following buffers: cAMP-PK buffer was 50 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, and 1 mM EDTA; PKC buffer was 50 mM HEPES, pH 7.4, 1.7 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, and 20  $\mu$ g/ml phosphatidylserine. CKII buffer was 25 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM DTT. Immunoprecipitations were as follows: 30  $\mu$ g partially purified immune serum (IS39) were added to a final volume of 250  $\mu$ l in RIPA buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM KCl, 5 mM DTT, and 0.25% NP-40) and incubated 2 h at 4 C. One hundred micrograms of protein A-Sepharose were added to the mix and incubated for the same duration. Pellets were washed five times in RIPA buffer and resolved on a 12% SDS-PAGE gel. Gels were then fixed, dried, and autoradiographed for 12 h.

#### Immunofluorescence

COS cells were grown on microscope slides and transfected as described above, washed twice with PBS, and fixed with methanol (5 min at –20 C) then with acetone (10 min at –20 C). Cells were permeabilized by treatment with 5% Tween 80

for 5 min at 20 C. Preparations were saturated with 3% BSA, 5% goat nonimmune serum in 1 $\times$  PBS for at least 4 h at 4 C. Incubation with the anti-RAR $\alpha$  antibody was performed at a 1:20 dilution in a 5% BSA solution. The anti-RAR $\alpha$  antibody was then detected with a goat antirabbit fragment antigen binding coupled to fluorescein isothiocyanate (Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA).

#### Plasmids

p(RARE)<sub>2</sub>tk-CAT was obtained by inserting two repeats of the  $\beta$ -RARE oligonucleotide into the *Bam*H1 site of pBLCAT2 (60). Expression vectors coding for hRAR $\alpha$  were obtained from Prof. P. Chambon, and pMT2-PKC $\alpha$  from Prof. P. J. Parker (ICRF, London, UK).

#### Acknowledgments

We wish to thank Prof. P. Chambon for the gift of the RAR $\alpha$  expression vectors, Dr. P. J. Parker for the gift of the PKC $\alpha$  expression vector as well as for helpful suggestions, and Prof. E. M. Chambaz for the gift of purified recombinant CKII. We are indebted to Drs. N. Dallery, W. Bourguet, and B. Sablonniere for providing us with receptor preparations and antibodies, and Dr. M. T. Belin for help with immunofluorescence experiments. We also thank Dr. J. Kirilowski, who kindly provided us with GF109203X.

Received May 28, 1993. Rerevision received September 17, 1993. Accepted September 22, 1993.

Address requests for reprints to: Dr. Philippe Lefebvre, Faculte de Medecine de Lille, INSERM-CJF 92–03, 1, place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France.

This work was supported by grants from the University of Lille II, INSERM CJF 92–03, Association pour la Recherche sur le Cancer, and Federation Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer.

\* These authors made equal contribution to this work.

#### REFERENCES

1. Taylor CW, Marshall ICB 1992 Calcium and inositol 1,4,5 triphosphate receptors: a complex relationship. *Trends Biochem Sci* 17:403–407
2. Nishizuka Y 1992 Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 258:607–614
3. Gschwendt M, Kittstein W, Marks F 1992 Protein kinase C activation by phorbol esters: do cysteine-rich regions and pseudosubstrate motifs play a role? *Trends Biochem Sci* 16:167–169
4. Parker PJ, Stabel S, Waterfield MD 1984 Purification to homogeneity of protein kinase C from bovine brain. Identity with the phorbol ester receptor. *EMBO J* 3:953–959
5. Clemens MJ, Trayner I, Menaya J 1992 The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation. *J Cell Sci* 103:881–887
6. Asakoa Y, Nakamura S-I, Yoshida K, Nishizuka Y 1992 Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. *Trends Biochem Sci* 17:414–417
7. Azzi A, Boscoboinick D, Hensy C 1992 The protein kinase C family. *Eur J Biochem* 208:547–557
8. James G, Olson EN 1992 Deletion of the regulatory domain of protein kinase C alpha exposes regions in the hinge and catalytic domains that mediate nuclear targeting. *J Cell Biol* 116:863–874
9. Li L, James G, Heller-Harrison R, Czech MP, Olson EN 1992 FGF inactivates myogenic helix-loop-helix proteins through phosphorylation of a conserved protein kinase-C

- site in their DNA-binding domains. *Cell* 71:1181-1194
10. Gudas LJ 1992 Retinoids, retinoid-responsive genes, cell differentiation, and cancer. *Cell Growth Differ* 3:655-662
  11. Strickland S, Smith KK, Marotti KR 1980 Hormonal induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells: generation of parietal endoderm by retinoic acid and dibutyl cAMP. *Cell* 21:347-355
  12. Glass CK, Drenth J, Kurokawa R, Han Z 1991 Regulation of gene expression by retinoic acid receptors. *DNA Cell Biol* 10:623-638
  13. Leid M, Kastner P, Chambon P 1992 Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci* 17:427-433
  14. Mendelsohn C, Ruberte E, Chambon P 1992 Retinoid receptors in vertebrate limb development. *Dev Biol* 152:50-61
  15. Summerbell D, Maden M 1990 Retinoic acid, a developmental signalling molecule. *Trends Neurosci* 13:142-147
  16. Tsai S, Bartelmez S, Heyman R, Damm K, Evans R, Collins SJ 1992 A mutated retinoic acid receptor-alpha exhibiting dominant-negative activity alters the lineage development of a multipotent hematopoietic cell line. *Genes Dev* 6:2258-2269
  17. Collins SJ, Robertson KA, Mueller L 1990 Retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells is mediated directly through the retinoic acid receptor (RAR-alpha). *Mol Cell Biol* 10:2154-2163
  18. Tanaka Y, Yoshihara K, Tsuyuki M, Itayahironaka A, Inada Y, Kamiya T 1992 Retinoic acid specific induction of a protein kinase-C isoform during differentiation of HL-60 cells. *J Biochem (Tokyo)* 111:265-271
  19. Hashimoto K, Kishimoto A, Aihara H, Yasuda I, Mikawa K, Nishizuka Y 1990 Protein kinase C during differentiation of human promyelocytic leukemia cell line, HL-60. *FEBS Lett* 263:31-34
  20. Makowski M, Ballester R, Cayre Y, Rosen OM 1988 Immunochemical evidence that three protein kinase C isozymes increase in abundance during HL-60 differentiation induced by dimethyl sulfoxide and retinoic acid. *J Biol Chem* 263:3402-3410
  21. Rosenbaum SE, Niles RM 1992 Regulation of protein kinase-C gene expression by retinoic acid in B16 mouse melanoma cells. *Arch Biochem Biophys* 294:123-129
  22. Gruber JR, Ohno S, Niles RM 1992 Increased expression of protein kinase-C alpha plays a key role in retinoic acid-induced melanoma differentiation. *J Biol Chem* 267:13356-13360
  23. Niles RM, Loewy BP 1989 Induction of protein kinase C in mouse melanoma cells by retinoic acid. *Cancer Res* 49:4483-4487
  24. de The H, Vivanco-Ruiz MM, Tiollais P, Stunnenberg H, Dejean A 1990 Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature* 343:177-180
  25. Hidaka H, Kobayashi R 1992 Pharmacology of protein kinases inhibitors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32:377-397
  26. Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Peret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, Duhamel L, Charon D, Kirilovski J 1991 The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 266:15771-15781
  27. Chiu R, Imagawa M, Imbra RJ, Bockoven JR, Karin M 1987 Multiple *cis*- and *trans*-acting elements mediate the transcriptional response to phorbol esters. *Nature* 329:648-651
  28. Lamph WW, Wamsley P, Sassone-Corsi P, Verma I 1988 Induction of the proto-oncogene *jun/AP-1* by serum and TPA. *Nature* 334:629-631
  29. Ogita K, Ono Y, Kikkawa U, Nishizuka Y 1991 Expression, separation and assay of protein kinase C subspecies. *Methods Enzymol* 200:228-234
  30. Olivier P, Parker PJ 1991 Expression and characterization of protein kinase C-delta. *Eur J Biochem* 200:805-810
  31. Gaub MP, Rochette-Egly C, Lutz Y, Ali S, Matthes H, Scheuer I, Chambon P 1992 Immunodetection of multiple species of retinoic acid alpha: evidence for phosphorylation. *Exp Cell Res* 201:335-346
  32. Graupner G, Wills KN, Tzukerman M, Zhang XK, Pfahl M 1989 Dual regulatory role for thyroid-hormone receptors allows control of retinoic-acid receptor activity. *Nature* 340:653-656
  33. Graupner G, Zhang X, Tzukerman M, Wills K, Hermann T, Pfahl M 1991 Thyroid hormone receptors repress estrogen receptor activation of a TRE. *Mol Endocrinol* 5:365-372
  34. Gaub MP, Lutz Y, Ruberte E, Petkovich M, Brand N, Chambon P 1989 Antibodies specific to the retinoic acid human nuclear receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3089-3093
  35. Rochette-Egly C, Lutz Y, Saunders M, Scheuer I, Gaub MP, Chambon P 1991 Retinoic acid receptor  $\gamma$ : specific immunodetection and phosphorylation. *J Cell Biol* 115:535-545
  36. Husmann M, Hoffmann B, Stump DG, Chytil F, Pfahl M 1992 A retinoic acid response element from the rat CRBPI promoter is activated by an RAR/RXR heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun* 187:1558-1564
  37. Kliever SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM 1992 Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin-D3 signalling. *Nature* 355:446-449
  38. Leid M, Kastner P, Lyons R, Nakshatri H, Saunders M, Zacharewski T, Chen JY, Staub A, Garnier JM, Mader S, Chambon P 1992 Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68:377-395
  39. Yen PM, Sugawara A, Chin WW 1992 Triiodothyronine ( $T_3$ ) differentially affects  $T_3$ -receptor/retinoic acid receptor and  $T_3$ -receptor/retinoid-X receptor heterodimer binding to DNA. *J Biol Chem* 267:23248-23252
  40. Zhang XK, Hoffmann B, Tran PBV, Graupner G, Pfahl M 1992 Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature* 355:441-446
  41. Yu VC, Delsert C, Andersen B, Holloway JM, Devary OV, Naar AM, Kim SY, Boutin JM, Glass CK, Rosenfeld MG 1991 RXRbeta—a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin-D receptors to their cognate response elements. *Cell* 67:1251-1266
  42. Norris V, Baldwin TJ, Sweeney ST, Williams PH, Leach KL 1991 A protein kinase-C-like activity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5:2977-2981
  43. Hsieh J-C, Jurutka PW, Nakajima S, Galligan MA, Hausler CA, Shimizu Y, Shimizu N, Whitfield GK, Hausler MR 1993 Phosphorylation of the human vitamin D receptor by protein kinase C. *J Biol Chem* 268:15118-15126
  44. Boyle WJ, Smeal T, Libert LKH, Angel P, Woodget JR, Karin M, Hunter T 1991 Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of *c-jun* at sites that negatively regulates its DNA-binding activity. *Cell* 64:573-584
  45. Orti E, Bodwell J, Munck A 1992 Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocr Rev* 13:105-128
  46. Carrier F, Owens RA, Nebert DW, Puga A 1992 Dioxin-dependent activation of murine Cyp1a-1 gene transcription requires protein kinase-C-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol* 12:1856-1863
  47. Berghard A, Gradin K, Pongratz I, Whitelaw M, Poellinger L 1993 Cross-coupling of signal transduction pathways—the dioxin receptor mediates induction of cytochrome P-450IA1 expression via a protein kinase-C-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 13:677-689
  48. Gallo A, Benusiglio E, Bonapace IM, Feliciello A, Cassano S, Garbi C, Musti AM, Gottesman ME, Avvedimento EV 1992 v-Ras and protein kinase-C dedifferentiate thyroid cells by down-regulating nuclear cAMP-dependent protein

- kinase-A. *Genes Dev* 6:1621-1630
49. Cambier JC, Newell MK, Justement LB 1987 Ia binding ligands and cAMP stimulate nuclear translocation of PKC in B lymphocytes. *Nature* 327:629-632
  50. Hsieh JC, Jurutka PW, Galligan MA, Terpening CM, Hausler CA, Samuels DS, Shimizu Y, Shimizu N, Haussler MR 1991 Human vitamin D receptor is selectively phosphorylated by protein kinase C on serine 51, a residue crucial to its *trans*-activation function. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9315-9319
  51. Simpson RU, Hsu T, Wendt MD, Taylor JM 1989 1-25-Dihydroxy vitamin D3 regulation of *c-myc* protooncogene transcription. *J Biol Chem* 264:19710-19715
  52. Deleted in proof
  53. Lefebvre P, Berard DS, Cordingley MG, Hager GL 1991 Two regions of the mouse mammary tumor long terminal repeat regulate the activity of its promoter in mammary cell lines. *Mol Cell Biol* 11:2529-2537
  54. Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
  55. Bourguet W, Sablonniere B, Formstecher P, Chen JY, Bernier JL, Henichart JP 1992 Synthesis of a biospecific adsorbent for the purification of the 3 human retinoic acid receptors by affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun* 187:711-716
  56. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K 1991 *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Liss, New York
  57. Pothier F, Ouellet M, Julien JP, Guerin SL 1992 An improved CAT assay for promoter analysis in either transgenic mice or tissue culture cells. *DNA Cell Biol* 11:83-90
  58. Yasuda I, Kishimoto A, Tanaka S, Tominaga M, Sakurai A, Nishizuka Y 1990 A synthetic peptide substrate for selective assay of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 166:1220-1227
  59. Lefebvre P, Danze PM, Sablonniere B, Richard C, Formstecher P, Dautrevaux M 1988 Association of the glucocorticoid receptor binding subunit with the 90K nonsteroid-binding component is stabilized by both steroidal and nonsteroidal antigluocorticoids in intact cells. *Biochemistry* 27:9186-9194
  60. Lukow B, Schütz G 1987 CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 15:5490-5496
  61. Giguere V, Ong ES, Segui P, Evans RM 1987 Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330:624-629
  62. Hunter T 1991  $\uparrow$ protein Kinases classification. *Methods Enzymol* 200:27-37
  63. Forman BM, Yang CR, Au M, Casanova J, Ghysdael J, Samuels HH 1989 A domain containing leucine-zipper-like motifs mediate novel *in vivo* interactions between the thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Mol Endocrinol* 3:1610-1626

### 3-DISCUSSION :

Ce travail montre que l'activité intracellulaire de la PKC affecte profondément la transactivation induite par l'ATRA d'un gène reporter transfecté dans les cellules COS-7. Le traitement des cellules COS-7 par des inhibiteurs de la PKC ou la déplétion de l'activité PKC par le TPA entraîne une forte diminution de l'activité induite par l'ATRA. Cet effet n'est observé qu'en présence de l'élément de réponse RARE et il est corrélé à la déplétion de l'activité PKC intracellulaire. La surexpression de la PKC $\alpha$  est capable de contrecarrer l'effet de la déplétion de la PKC sur l'activité induite par l'ATRA du gène reporter. Ainsi l'activité de la PKC $\alpha$  est nécessaire pour l'activité transcriptionnelle de hRAR $\alpha$ .

A ce stade, nous avons entrepris de déterminer les fonctions du récepteur qui sont affectées par les PKCs. Des expériences de gel retard ont révélé que la déplétion de la PKC par le TPA induit une perte de la capacité du récepteur à lier l'ADN en présence du ligand, suggérant que le changement de conformation induit par le ligand rend le récepteur très sensible à l'activité PKC.

En outre, des expériences d'immunofluorescence indirecte montrent que la translocation vers le noyau du hRAR $\alpha$  est perturbée en présence du TPA et de l'ATRA. Nous avons également montré que hRAR $\alpha$  est phosphorylé *in vitro* directement par la PKC alors que le LBD du hRAR $\alpha$  ne l'est pas. La phosphorylation directe de hRAR $\alpha$  *in vitro* par la PKC entraîne une diminution de l'affinité du récepteur à son élément de réponse. Un résultat similaire a été observé dans le cas du récepteur à la vitamine D (Hsieh et al., 1993). Hsieh et coll. ont montré que la phosphorylation de la sérine 51 par la PKC $\beta$  abolissait l'interaction du VDR avec l'ADN. Ce résidu, ainsi que la séquence environnante, est très conservé chez les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, aux oestrogènes et hRAR $\alpha$ . La sérine 51 du VDR correspond à la sérine 115 de hRAR $\alpha$ , qui est localisée entre les deux doigts de zinc. Par analogie, la réduction de l'activité de liaison à l'ADN de hRAR $\alpha$  après sa phosphorylation par la PKC pourrait être due à la phosphorylation de la sérine 115. Ce résultat semble être en contradiction avec le fait qu'*in vivo* la PKC est requise pour l'activité de liaison à l'ADN en présence du ligand. Mais ce paradoxe est probablement dû au fait que dans la cellule l'affinité de hRAR $\alpha$  pour l'ADN est modulée par des mécanismes indirects dépendants de la

PKC. D'autre part il ne faut pas oublier que dans les cellules il existe plusieurs autres kinases qui peuvent soit directement affecter les fonctions du récepteur, soit moduler l'activité des PKCs.

En se basant sur ces résultats, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet de la PKC sur la capacité d'hétérodimérisation de RAR et nous avons également entrepris de déterminer les sites de phosphorylation *in vitro* par les PKCs.

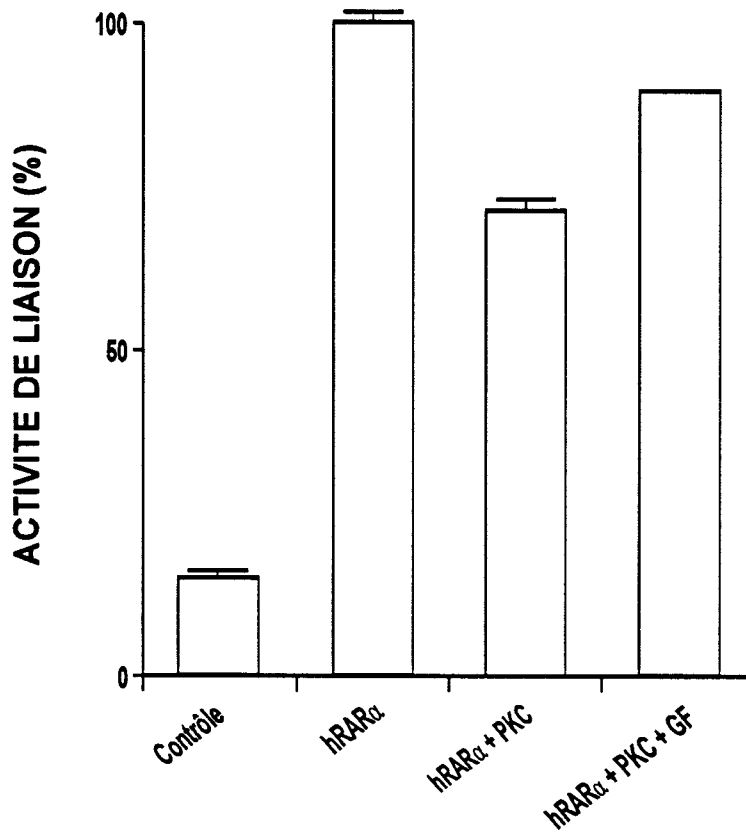
## **F/ VOIE DES PROTEINES KINASES C ET hRAR $\alpha$ : travaux non publiés**

### **1-La phosphorylation de hRAR $\alpha$ par la PKC réduit sa capacité de dimérisation avec RXR:**

Dans l'article nous n'avons pas abordé l'effet que peut avoir la phosphorylation du hRAR $\alpha$  sur son activité de dimérisation. En effet, nous pouvons supposer que la présence de résidus phosphorylés sur hRAR $\alpha$  pourrait induire un changement de conformation du récepteur, qui abolirait ou stimulerait sa capacité de dimérisation. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé la technique dite de l' "hétérodimérisation en milieu hétérogène" mise au point par le groupe de Glass (Kurokawa et al., 1993) et adaptée dans notre laboratoire par Christophe Rachez (voir matériels et méthodes). Ainsi, nous avons montré que la phosphorylation de hRAR $\alpha$  par la PKC induit une diminution de 30% de sa capacité de dimérisation avec RXR. Cette diminution disparaît presque totalement en présence d'un inhibiteur spécifique de PKC (Figure 30). La détermination des sites phosphorylés et la création de mutants ponctuels pour ces sites nous a permis de mieux apprécier le rôle de la phosphorylation sur l'activité de dimérisation de hRAR $\alpha$ .

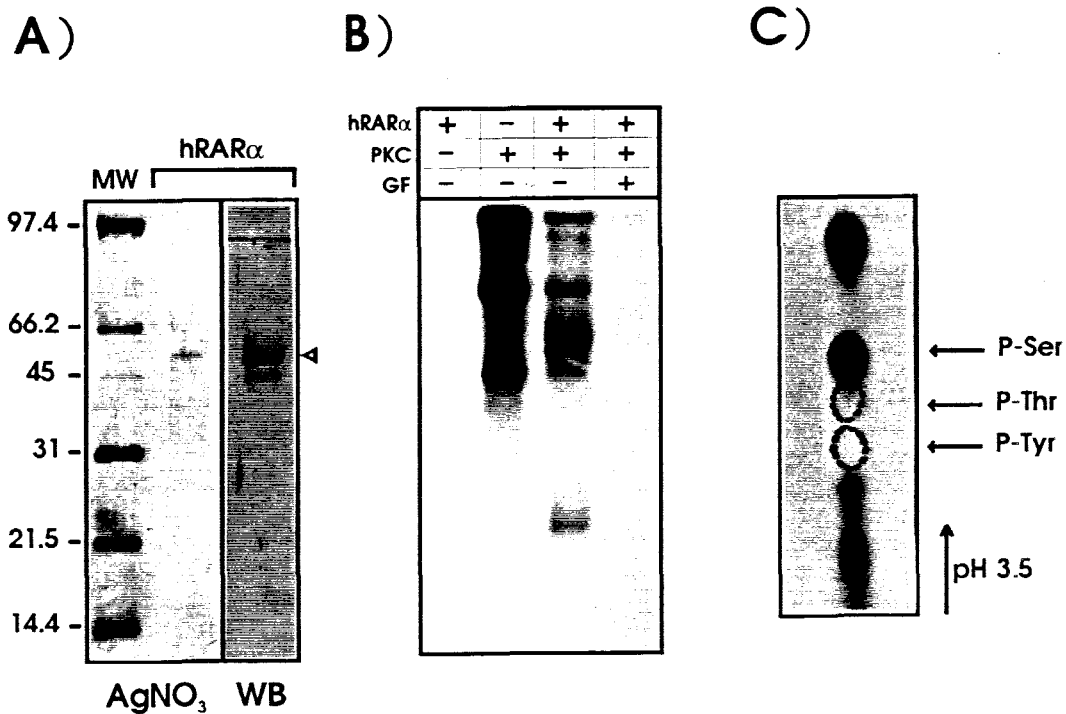
### **2-hRAR $\alpha$ est phosphorylé *in vitro* par la PKC sur des résidus sérine :**

La recherche des sites consensus pour la PKC par le programme "PROSITE" nous a permis de mettre en évidence six sites consensus pour les PKCs (Figure 32), cinq sérines (S115, S157, S232, S388 et S452) et une thréonine (T397). Néanmoins, ces programmes de prédiction ne détectent que des sites potentiels,



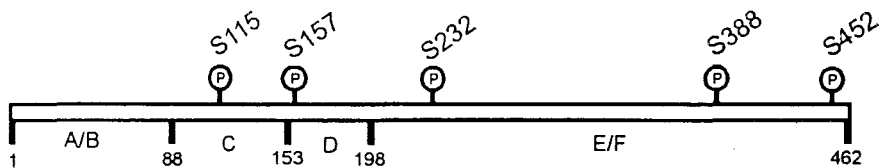
**Figure 30 : La phosphorylation de hRAR par la PKC induit une diminution de la formation du complexe RAR/RXR**

hRAR $\alpha$  purifié a été phosphorylé ou non par la PKC et adsorbé sur une plaque ELISA. Ensuite du RXR<sup>[835]</sup> traduit in vitro est ajouté au hRAR $\alpha$  adsorbé. Après lavage on dose la quantité du RXR<sup>[835]</sup> qui reste dans les puits (voir matériels et méthodes).



**Figure 31 : RAR $\alpha$  est phosphorylé par la PKC *in vitro* sur des résidus sérine.**

- A- hRAR $\alpha$  purifié à homogénéité par la résine NiTA (panneau de gauche) et l'identité de la protéine est confirmé par western blot (panneau de droite).
- B- Le récepteur purifié est soumis à une réaction de phosphorylation par la PKC, en présence de [32P]ATP et en absence ou présence de l'inhibiteur spécifique de la PKC, GF109203X. Les produits de la réaction sont séparés par PAGE-SDS 12% et soumis à une autoradiographie pendant 2 heures à -80°C.
- C- Le récepteur hRAR $\alpha$  purifié et phosphorylé a été soumis à une hydrolyse acide (HCl 5,7N) pendant 1 heure à 105°C. L'hydrolysats est mélangé avec des phosphoaminoacides standards. Le mélange est séparé par électrophorèse sur une plaque TLC à pH 3,5 (1000 volts, 30 min). Cette plaque est ensuite soumise à une autoradiographie. Les acides aminés standards sont détectés par la coloration à la ninhydrine.



**Figure 32 : Les sérines de hRAR $\alpha$  potentiellement phosphorylées par la PKC.**

La séquence en acides aminés déduite à partir du cDNA de hRAR $\alpha$  a été analysée par le programme "Prosite" (PC Gene, IntelliGenetics, Genève, Suisse).

Ⓟ : Sites potentiels de phosphorylation.

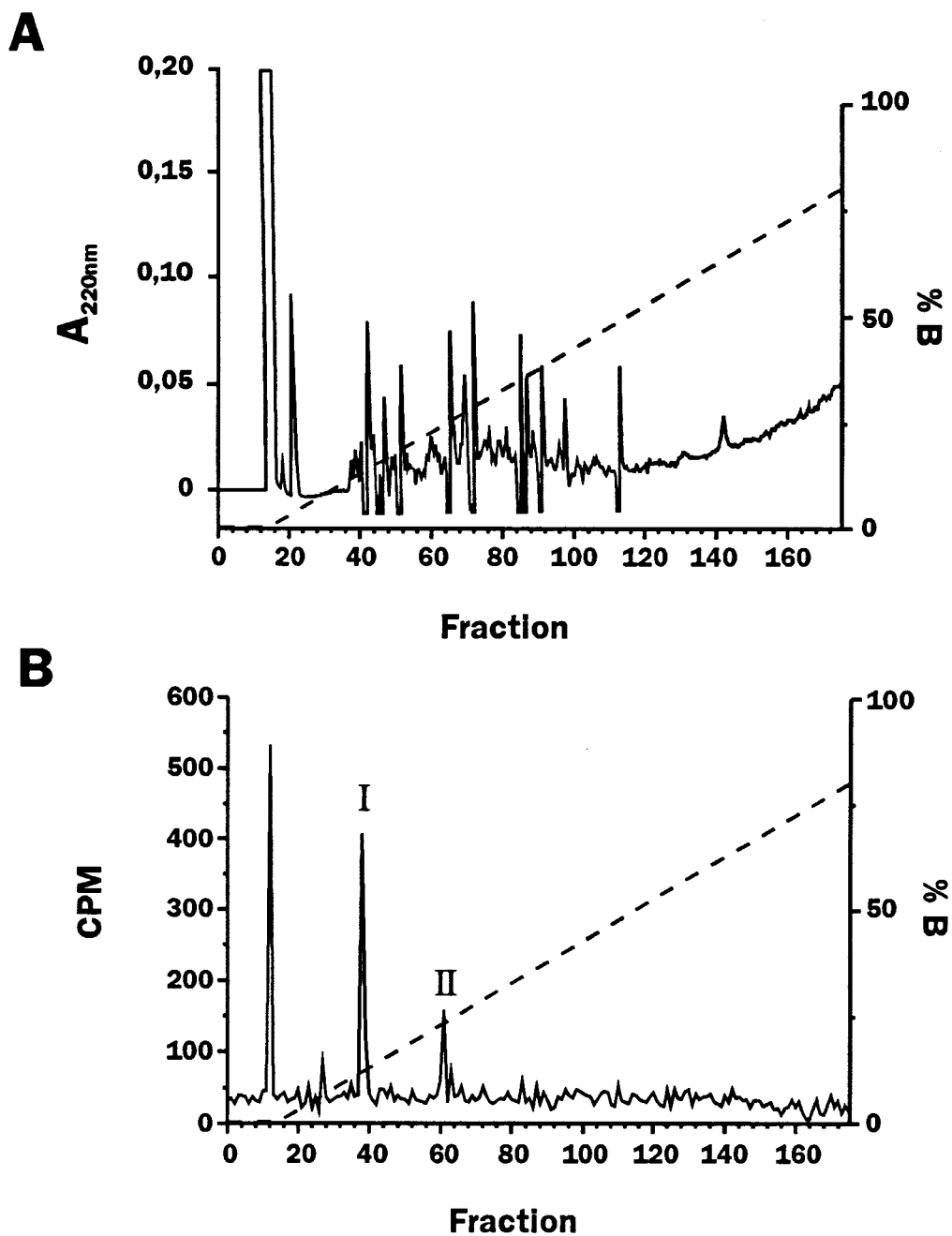
qu'ils restent à confirmer expérimentalement. La PKC est capable de phosphoryler les protéines sur des résidus sérine ou thréonine. Dans le but d'identifier le type de l'acide aminé du hRAR $\alpha$  phosphorylé par la PKC, nous avons procédé à une hydrolyse acide du hRAR $\alpha$  marqué au  $^{32}\text{P}$  par la PKC. L'hydrolysats est mélangé avec les AAs témoins (phosphosérine, phosphothréonine et phosphotyrosine) et déposé sur une plaque de phosphocellulose, puis soumis à un champs électrique de 1000 Volts pendant 25 minutes. Les acides aminés témoins sont visualisés par une coloration à la ninhydrine et les AAs marqués au  $^{32}\text{P}$  sont révélés par autoradiographie. Ainsi, la PKC ne phosphoryle hRAR $\alpha$  que sur des résidus sérine *in vitro*, on peut donc éliminer la thréonine (Figure 31).

Par ailleurs, parmi les cinq sites restant, nous pouvons d'orès et déjà exclure les sites Ser232, 388, 397 et 452 puisque nous avons montré auparavant que les domaines E/F ne sont pas phosphorylés *in vitro* par les PKCs (voir article, Figure -6). Donc, Il reste les Ser157 et 115. Hsieh et coll. ont montré que la sérine 51, l'homologue de la sérine 115 chez le récepteur de la vitamine D3, est phosphorylée *in-vitro* et *in vivo* par la PKC. La présence d'une charge négative à la position 51 entraîne une inhibition de la liaison à l'ADN du VDR (Hsieh et al., 1991; 1993).

### **3-La PKC phosphoryle hRAR $\alpha$ *in vitro* sur la sérine 157et/ou 154 :**

Nous avons poursuivi nos recherches pour déterminer le ou les sites exacts de phosphorylation de hRAR $\alpha$  par les PKCs. Le récepteur hRAR $\alpha$  purifié à homogénéité (voir appendice technique) a été mélangé avec du hRAR $\alpha$  $^{32}\text{P}$  (récepteur phosphorylé par la PKC en présence de l'[ $^{32}\text{P}$ ]ATP) et soumis a une digestion trypsique. Les peptides trypsique sont ensuite séparés par RP-HPLC (C18 deltapack, Millipore, Figure 33). Nous obtenons deux pics marqués I et II, qui sont soumis au microséquençage (Tableau 4). Le pic I correspond au peptide : CFEVGMS, alors que la séquence du pic II semble correspondre au peptide : CQYCR, qui ne contient pas de sérine. Ce résultat suggère que ce peptide est le produit d'une digestion partielle (Figure 34). En effet, dans nos conditions la digestion de hRAR $\alpha$  par la trypsine n'a pas été totale,





**Figure 34 : Cartographie par HPLC en phase inverse des phosphopeptides tryptique de hRAR $\alpha$  phosphorylé par la PKC.**

**A-** Visualisation des peptides résultant de la digestion par la trypsine de hRAR $\alpha$ .

**B-** Visualisation des peptides phosphorylés.

hRAR $\alpha$ [ $^{32}$ P] purifié est digéré par 4  $\mu$ g de TPCK-Trypsine toute la nuit à 37°C. Le mélange est séparé par un gradient d'acétonitrile sur une colonne C18 Deltapak semipréparative (voir matériels & méthodes).

Cycle n°	Pic I		Pic II	
	Acide aminé	pmol	Acide aminé	pmol
1	_a	-	_a	-
2	Phe	2,9	Gln	32,9
3	Glu	4,2	Tyr	15,1
4	Val	1,1	_b	-
5	Gly	2,8	_b	-

**Tableau 4 : Résultat du microséquençage du peptide I et II**

a : plusieurs acides aminés sont détectés au premier cycle de la dégradation d'Edman.

b : on ne peut pas détecter les cystéines car hRAR $\alpha$  n'a pas été alkylé.

```

1-MASNSSSCPT PGGGHLNGYP VPPYAFFFP MLGGLSPPGA LTTLQHQLPV SGYSTPSPAT
 IETQSSSSEE IVPSPSPPP LPRIYKPCVF CQDKSSGYHY GVSACEGCKG FFRRSIQKNM
 VYTCHRDKNC IINKVTRNRC QYCRLQKCFE VGMSKESVRN DRNKKKKEVP KPECSESYTL
                    I
                    II
TPEVGELIEK VRKAHQETFP ALCQLGKYTT NNSSEQRVSL DIDLWDFSE LSTKCIKTV
EFAKQLPGFT TLTIAOQITL LKAACLDILI LRICTRYTPE QDTMTFSDGL TLNRTQMHNA
GFGPLTDLVF AFANQLLPLE MDDAETGLLS AICLICGDRQ DLEQPDRVDM LOEPLLEALK
VYVRKRRPSR PHMFPKMLMK ITDLRSISAK GAERVITLKM EIPGIMPPLI QEMLENSEGL
DTLSGQPGGG GRDGGGLAPP PGSCSPSLSP SSNRSSPATH SP-462

```

**Figure 35 : Localisation du peptide I et II sur la séquence en acides aminés de hRAR $\alpha$ .**

Les acides aminés identifiés par séquençage sont en gras. Les pointillés indiquent la taille probable des peptides.

néanmoins les séquences des deux peptides sont situées à l'extrémité N-terminale de la boîte T (Figure 35). Sachant que le domaine EF n'est pas phosphorylé par la PKC *in vitro* (voir Figure 6 de l'article I), ces résultats suggèrent que la PKC phosphoryle hRAR $\alpha$  sur la sérine 154 et/ou 157. Le fait que la phosphorylation de hRAR $\alpha$  par la PKC ait lieu dans la boîte T suggère que la phosphorylation pourrait réguler l'activité de dimérisation et l'activité de liaison à l'ADN du récepteur. Par ailleurs la sérine 157 est conservée chez hRAR $\beta$ , alors qu'elle est absente chez hRAR $\gamma$  et chez les RXRs (Figure 35). Ceci suggère que les récepteurs aux rétinoïdes ont une sensibilité différente vis-à-vis des PKCs.

#### **4-Conclusion:**

Cette étude nous a permis de démontrer l'implication des PKCs dans le mécanisme d'action de l'ATRA. En effet, l'activité PKC intracellulaire est nécessaire pour observer une transcription induite par l'ATRA. Il semble que la PKC soit requise pour la translocation du RAR $\alpha$  vers le noyau et la fixation à l'ADN. De plus RAR $\alpha$  est phosphorylé directement par la PKC sur les sérines 157 et/ou 154, ce qui implique que la PKC pourrait intervenir directement dans la modulation de l'activité de dimérisation et de liaison à l'ADN de RAR $\alpha$ . Des expériences de mutagenèse dirigée sont actuellement menées sur ces sites pour mieux apprécier les effets de leurs phosphorylation sur les fonctions du RAR $\alpha$ .

						T Box	A Box																					
hRAR $\alpha$ 1	143	-	CRLQKCFEVG	M	S	KES	V	R	N	D	R	N	K	K	K	K	E	V	P	K	P	E	C	S	E	S	-	177
hRAR $\beta$ 2	136	-	CRLQKCFEVG	M	S	KES	V	R	N	D	R	N	K	K	K	K	E	T	S	K	Q	E	C	T	E	S	-	170
hRAR $\gamma$ 2	137	-	CRLQKCFEVG	M	S	KEA	V	R	N	D	R	N	K	K	K	K	E	V	K	E	E	G	S	P	D	S	-	178
hRXR $\alpha$	190	-	CRYQKCLAMG	M	K	REA	V	Q	E	E	R	Q	R	G	K	D	R	N	E	N	E	V	E	S	.	.	-	224
hRXR $\beta$ 1	224	-	CRYQKCLATG	M	K	REA	V	Q	E	E	R	Q	R	G	K	D	K	.	D	G	D	G	E	G	.	.	-	259

**Figure 35 : Alignement de séquence au niveau des boîtes T et A des isoformes RAR et RXR.**

## **PARTIE II : LES PHOSPHATASES ET LES RETINOÏDES**

### **1-RESUME DE L'ARTICLE II :**

L'état de phosphorylation d'une protéine dépend également de l'activité des phosphatases. L'acide okadaïque (AO) est un promoteur de tumeur qui inhibe spécifiquement les protéines phosphatases PP1 et PP2A, à la fois *in-vitro* et dans les cellules en culture (Hardie et al., 1991). Cette molécule constitue un outil très utile pour l'étude de PP1 et PP2A. Ces dernières peuvent être localisées dans le noyau (Cohen, 1989; Kuret et al., 1986). D'ailleurs, il a été montré récemment que PP1 régule l'activité du facteur CREB (Hagiwara et al., 1992). D'autre part, l'inhibition de PP1 et PP2A par l'AO entraîne une activation du récepteur à la progestérone (Denner et al., 1990) et des glucocorticoïdes (Somers et al., 1992) en absence du ligand. Dans ce travail, nous avons étudié l'effet des phosphatases sur le mécanisme d'action des rétinoïdes. L'inhibition des phosphatases (PP1 et PP2A) par l'AO induit une activation de l'activité des gènes reporter. Cet effet dépend à la fois du RARE et du récepteur utilisé. La surexpression de PP1 ou PP2A entraîne une diminution de l'inductibilité des gènes reporter testés. L'AO augmente, de 2 à 5 fois, l'activité de liaison des récepteurs à leurs éléments de réponse *in vitro*, ce qui suggère que l'inhibition des phosphatases augmente l'activité de liaison à l'ADN des récepteurs aux rétinoïdes. Le traitement des récepteurs, extraits des cellules COS-7, par la phosphatase alcaline ou par PP1/PP2A partiellement purifié diminue leurs capacités de liaison à l'ADN. Des expériences de reconstitution montrent que la phosphorylation à la fois de RAR et de RXR augmente l'activité de liaison à l'ADN de l'hétérodimère RAR/RXR. Ces résultats montrent que l'état de phosphorylation de RAR et de RXR constitue un nouveau niveau de régulation de la voie des rétinoïdes.

### **2-ARTICLE II :**

# Protein Phosphatases 1 and 2A Regulate the Transcriptional and DNA Binding Activities of Retinoic Acid Receptors\*

(Received for publication, December 9, 1994, and in revised form, January 24, 1995)

Philippe Lefebvre<sup>§</sup>, Marie-Pierre Gaub<sup>¶</sup>, Ali Tahayato<sup>‡</sup>, Cécile Rochette-Egly<sup>¶</sup>, and Pierre Formstecher<sup>‡</sup>

From <sup>‡</sup>CJF INSERM 92-03, Laboratoire de Biochimie Structurale Faculté de Médecine de Lille 1, place de Verdun, 59045 Lille Cédex and <sup>¶</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, INSERM U184, Laboratoire de Génétique Moléculaire des Eukaryotes du CNRS Parc d'Innovation, BP 163, 67404 Illkirch Cedex, France

To determine which factors may regulate the DNA binding and transcriptional properties of retinoic acid receptors (RARs and RXRs), we investigated the sensitivity of reporter genes bearing various retinoic acid response elements (RAREs) to protein phosphatases (PPases) inhibition. PPases inhibition by okadaic acid led to an increase of the reporter genes activity in a RARE-dependent and ligand-independent manner and was dependent on the type of response element used. Overexpression of protein phosphatases 2A and 1 (PP2A and PP1) decreased the inducibility of the reporter genes tested. Nuclear extracts from okadaic acid-treated COS cells displayed a 2–5-fold increased level of receptor binding to RAREs *in vitro*, suggesting that PPases inhibition increased the DNA binding activity of retinoid receptors. Treatment of receptors extracted from COS cells by alkaline phosphatase and partially purified PP1 and PP2A decreased their DNA binding activity, but heterodimers bound to DNA were not sensitive to phosphatase treatment. Reconstitution experiments showed that phosphorylation of both receptors increased the DNA binding activity of RXR/RAR heterodimers. Taken together, these data show that the modulation of the phosphorylation state of RARs and RXRs represents an other level of regulation of the retinoid signaling pathway.

heterodimers to cognate DNA binding sequences (retinoic acid-responsive elements or RAREs) is required to observe transcriptional activation of ATRA-controlled promoters. The recognition code is less stringent than for steroid hormone receptors, since natural RAREs have a half-site spacing which ranges from 2 to 5 bases (4), and RAR/RXR heterodimers can bind to half-sites arranged into palindromes, inverted palindromes (5), and direct or inverted repeats. In addition, their cis-acting properties vary according to the promoter context (4, 6) and transcriptional activation may require additional "bridging" factors like E1A (7, 8).

An additional level of control of the transcriptional activity of these receptors may also be provided by extracellular signals, as reported for the progesterone receptor (9) and the estrogen receptor (10). Most of the nuclear receptors have been shown to be phosphoproteins (11), including RAR $\gamma$ , RAR $\alpha$ , and RAR $\beta$  (12–14). Treatment of COS cells with retinoic acid did not induce detectable changes in the phosphorylation state of overexpressed mRAR $\alpha$ , mRAR $\gamma$ , and mRAR $\beta$ 2. On the contrary, mRAR $\beta$ 1 and mRAR $\beta$ 3 are strongly phosphorylated upon agonist treatment (12), like steroid receptors (11). In addition, we have recently shown that the protein kinase C pathway is involved in the regulation of retinoid-induced transcription (15), and Huggenvik *et al.* (16) reported that the cAMP-dependent protein kinase pathway alters the transcriptional response to ATRA. Although these observations suggest that phosphorylation processes could be regulating retinoid receptors functions, it is not yet clear by which mechanism(s) kinases and phosphatases modulate their trans-activating function.

The phosphorylation state of a given protein is the result of both phosphorylation and dephosphorylation reactions. The tumor promoter okadaic acid (OA) is a complex fatty acid polyketal that specifically inhibits protein phosphatases PP1 and PP2A, both *in vitro* and in cultured cells (17). PP2A is responsible for a significant protein phosphatase activity in various tissues and has a broad spectrum of substrates *in vitro*. Significant amounts of PP1 and PP2A are located in the nucleus (18, 19). PP1 has a 5-fold higher specific activity in the nuclear compartment than in the cytosolic fraction (19), and is associated with chromatin (see (18) and references therein). Inhibition of PP1 and PP2A by OA has also been shown to cause hormone-independent activation of progesterone (9, 20) and glucocorticoid-regulated reporter genes (21). However, the strong effect on transcription could not be correlated with detectable alterations of the phosphorylation state of PR (22) and GR (21), and was, in the latter case, attributed to a post-translational modification of a putative GR-associated factor.

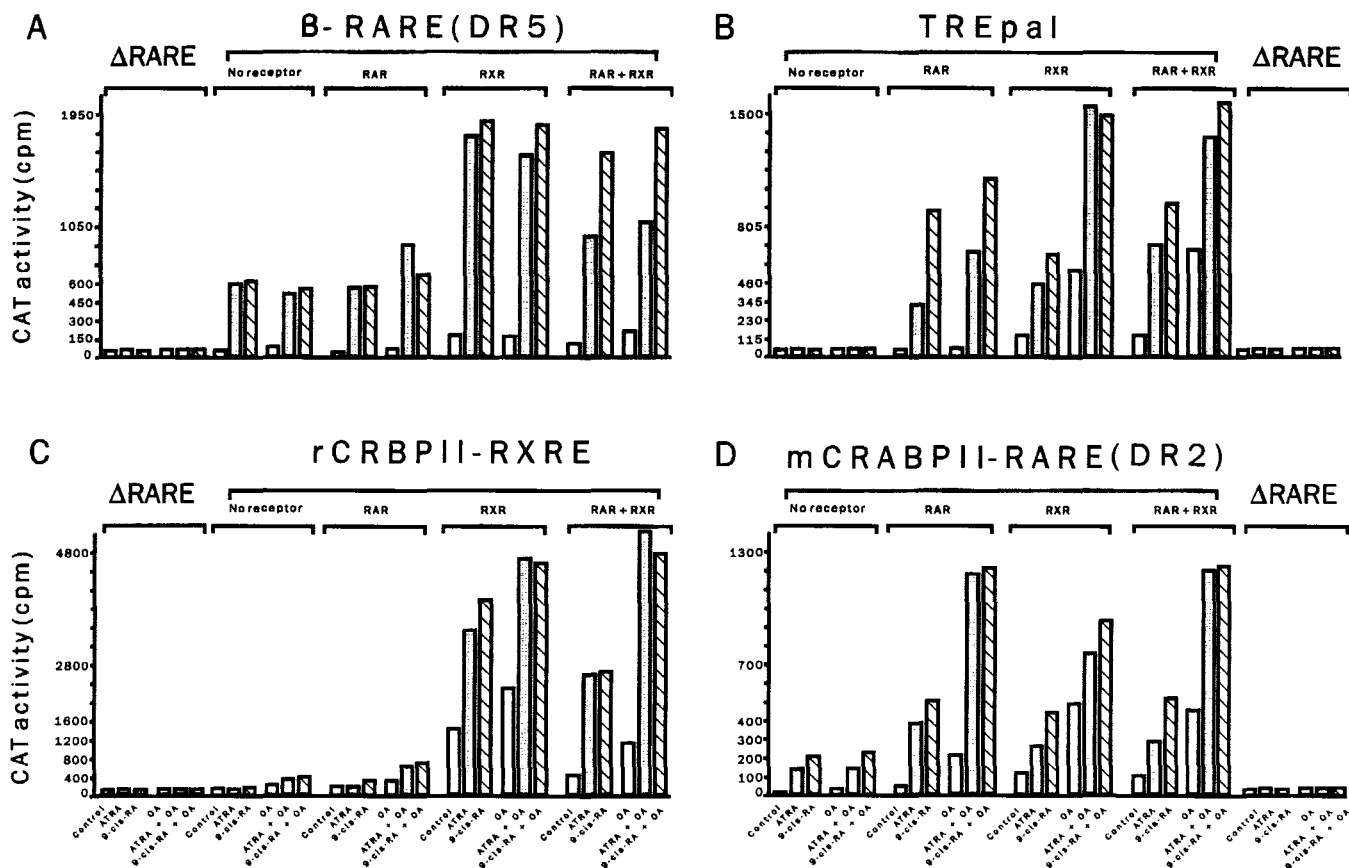
We therefore used OA to oppose the activity of protein kinases constitutively active in COS cells, which were transfected with different RA-responsive reporter genes and expres-

All-*trans*-retinoic acid (ATRA)<sup>1</sup> receptors  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , and RAR $\gamma$ ) and 9-*cis*-retinoic acid receptors (RXR $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ) are ligand-inducible transcription factors that belong to the nuclear receptor superfamily (1, 2). The heterodimerization properties of RARs and RXRs, as well as their relative affinity for retinoids, can account for the multiple effects of retinoids observed *in vivo* (reviewed in (3)). Binding of RAR-containing

\* This work was supported by grants from INSERM, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Federation Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer, the Université de Lille II, C.H.U de Lille, and the Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>§</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-20-62-68-87; Fax: 33-20-62-68-68.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: ATRA, all-*trans*-retinoic acid; RA, retinoic acid; OA, okadaic acid; RAR, all-*trans* retinoic acid receptor; RXR, 9-*cis*-retinoic acid receptor; PP1, protein phosphatase 1, PP2A, protein phosphatase 2A; DR<sub>n</sub>, direct repeat retinoic acid response element with a spacer of n bases; CRABP, cellular retinoic acid-binding protein; CRBP, cellular retinol-binding protein; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; RARE, retinoic acid response element; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; CIP, calf intestine alkaline phosphatase; EMSA, electrophoretic mobility shift assay.



**FIG. 1. Effect of okadaic acid on RAR and RXR-mediated transcription.** COS cells were cotransfected with 0.5  $\mu\text{g}$  of the indicated reporter gene and with or without 1  $\mu\text{g}$  of pSG5hRAR $\alpha$  and pSG5RXR $\alpha$ . Cells were treated with 100 nM OA for 16 h 24 h after transfection, either with vehicle ( $\text{Me}_2\text{SO}$ , empty bars), 50 nM ATRA (dotted bars), or 50 nM 9-cis-RA. CAT activity was assayed and normalized to  $\beta$ -galactosidase activity as described under "Materials and Methods." CAT activity is expressed as a percentage of the ATRA-induced transcription level for cells in the absence of overexpressed receptors, except for the TREpal-CAT construct. In this latter case, 100% CAT activity is the level of enzymatic activity detected in cells transfected with pSG5-hRAR alone and treated with 50 nM ATRA. Values represent the mean of at least three independent experiments performed with triplicate assays, and standard deviations did not exceed 15% of the mean values. Values are indicated in CAT activity normalized to  $\beta$ -galactosidase activity.

sion vectors coding for RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$ . The role of basal phosphorylation was further tested by an *in vitro* approach in which RAR $\alpha$  or RXR $\alpha$  were selectively treated with phosphatases and tested for their DNA binding and heterodimerization activities.

#### MATERIALS AND METHODS

**Cell Culture**—COS and HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (ICN-Flow Laboratories, Scotland) supplemented with penicillin/streptomycin and 10% fetal calf serum. Sf9 cells were propagated in suspension in Grace's insect medium (Life Technologies, Inc.) supplemented with 10% fetal calf serum, 1 mM glutamine, 50 mg/ml gentamicin, and 2.5 mg/ml amphotericin B.

**Nuclear Extract Preparation**—Nuclear extracts from Sf9, COS, and HeLa cells were performed as described previously (23) with minor modifications. Nonidet P-40 was omitted from the cell lysis buffer and phosphatases inhibitors were added to the extraction buffer (10 mM sodium molybdate, 10 mM sodium pyrophosphate, and 10 mM sodium vanadate). Protein concentration was estimated by the Bradford assay (24) and usually found to be in the 3–5 mg/ml range.

**Overexpression of hRAR $\alpha$  and hRXR $\alpha$  in Bacteria and Sf9 Cells**—hRAR $\alpha$  and  $\Delta\text{A/B}$  hRXR $\alpha$  were expressed in the bacterial strain BL21(DE3) pLysS transformed with plasmid pET3DRAR $\alpha$  and pET31-RXR $\alpha$ . Bacteria were grown in chloramphenicol and ampicillin-containing LB medium and induced at mid-log phase ( $\text{OD}_{600} = 0.6$ ) by addition of isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside to 0.5 mM final. After 4 h of induction, cells were pelleted and resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 5 mM dithiothreitol, 0.4 M NaCl, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin and pepstatin A, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (25). Phosphatases inhibitors were also included: 10 mM sodium molybdate, 10 mM sodium pyrophosphate, and 10 mM sodium vanadate. Lysozyme was added to 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and cells were finally lysed by addition of

deoxycholate to a final concentration of 0.05%. Cells debris were pelleted at 60,000  $\times g$ , 4  $^\circ\text{C}$  for 2 h. Supernatant usually contained 2–5 mg/ml protein.

Sf9 cells were infected with a recombinant baculovirus encoding for the hRAR $\alpha$ . Nuclear extracts from infected cells were prepared as described above. Purified  $\Delta\text{A/B}$  RXR $\alpha$  and  $\Delta\text{A/B}$  RAR $\alpha$  were a kind gift from H. Gronemeyer.

**Phosphatase Treatment**—Extracts were treated with either agarose-immobilized calf intestine alkaline phosphatase (CIP) or soluble CIP (Sigma). When agarose immobilized-CIP was used (Figs. 5 and 6), 75  $\mu\text{g}$  of COS cell extracts were incubated for 15 min at 37  $^\circ\text{C}$  with 22 units of enzyme in 150  $\mu\text{l}$  of EMSA buffer. Beads were spun down and supernatants brought to 20 mM di-sodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) and 5 mM  $\text{NaVO}_3$ . When soluble CIP was used (Figs. 4 and 7), 25  $\mu\text{l}$  of extracts ( $\sim 75 \mu\text{l}$ ) were diluted 4-fold in EMSA buffer and incubated 20 min at 30  $^\circ\text{C}$  with 50 units of the enzyme. The reaction was stopped by transferring samples at 4  $^\circ\text{C}$  and bringing the mix to 20 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 20 mM  $\text{NaVO}_3$ , and 20 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ . These conditions were found to reduce CIP activity by more than 95% as assayed by *p*-nitrophenylphosphate hydrolysis.

**EMSA**—Oligonucleotides containing the various response elements (see below) were end-filled with the Klenow fragment of DNA polymerase. Typically, 40  $\mu\text{g}$  of protein was incubated with 20 fmol of the labeled probe, in the presence of 2.5  $\mu\text{g}$  of salmon sperm DNA and a binding buffer giving a final concentration of 20 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, and 10% glycerol. When purified *Escherichia coli* RAR or RXR were used, 0.05–0.1  $\mu\text{g}$  of purified receptor was added to 4  $\mu\text{g}$  of CIP-treated or control extracts and incubated 15 min on ice prior to the binding reaction. Control experiments were performed with heat-inactivated phosphatase (5 min at 100  $^\circ\text{C}$ ) according to the same protocol. This treatment allowed for a complete inactivation of CIP as judged by its lack of activity on 5'-

labeled probes (data not shown). DNA binding reactions were for 30 min on ice or 15 min at 20 °C, in a final volume of 20 or 40  $\mu$ l. When required, 1  $\mu$ l of mouse monoclonal ascites fluid Ab9( $\alpha$ )F directed against RAR $\alpha$  (13) or 4RX-1D12 directed against each type of RXR, was added for a further 15-min incubation as described previously (13). Protein-DNA complexes were then resolved on a 5% nondenaturing polyacrylamide gel run at 150 V for 3 h at 4 °C. The running buffer was 0.5  $\times$  TAE (1  $\times$  TAE is 40 mM Tris acetate, pH 7.5, 2 mM EDTA) (Figs. 3, 4, 7, and 8). Alternatively, gels were run in 0.5  $\times$  TBE at room temperature (45 mM Tris base, 45 mM boric acid, and 2 mM EDTA) (Figs. 5 and 6).

**Transient Transfections,  $\beta$ -Galactosidase, and CAT Assays**—COS cells were transfected by the calcium phosphate precipitation method as follows:  $10^4$  cells were plated per 35-mm dish. The following day, cells were fed with 1 ml of fresh medium, and calcium-DNA coprecipitate was added 4 h later. The mixture contained 1  $\mu$ g pSV- $\beta$ gal plasmid (pCH110, Pharmacia), 1  $\mu$ g of the reporter gene, 1  $\mu$ g of pSG5-hRAR $\alpha$  (26) and pSG5-mRXR $\alpha$  expression vector (6). The DNA concentration was adjusted to 10  $\mu$ g final with carrier DNA. Incubation with the coprecipitate was for 16 h, after which cells were glycerol-shocked. Cells were incubated for 10 h in complete medium and then submitted to various treatments as indicated in the text.  $\beta$ -Galactosidase and CAT assays were performed as previously reported (15, 27).

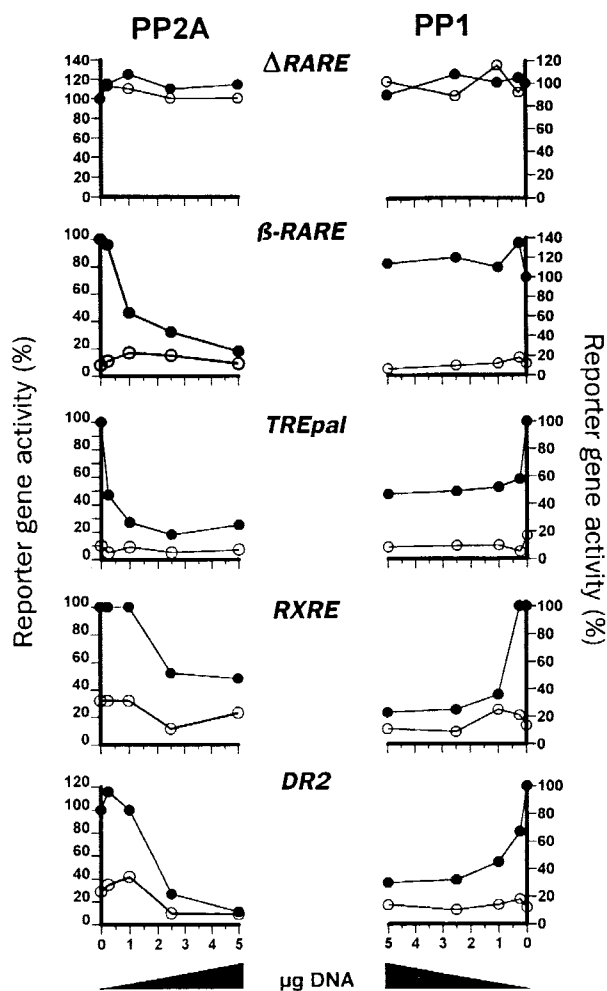
**Western Blotting Procedure and Antibodies**—Immunoblotting of RAR $\alpha$  was performed using the IBI Enzygraphic Web system (15) or  $^{125}$ I-protein A (13). The anti-hRAR $\alpha$  polyclonal antibody IS39 was raised against synthetic peptides from the F domain of hRAR $\alpha$ . Anti-RAR $\alpha$  monoclonal antibody Ab9( $\alpha$ )F and antiRXR monoclonal antibodies 4RX-1D12 and 1RX-6G12 are described elsewhere (13, 28).

**Protein Phosphatase Purification**—PP1 and PP2A were partially purified from rat livers. Purification steps were performed as described by Silberman *et al.* (29). Fractions eluting from a DEAE-Sepharose column (6  $\times$  10 cm) between 0.2 and 0.35 M NaCl were pooled, concentrated on a Centricon 10 filter, and dialyzed against buffer PPB (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 20% glycerol, 5 mM DTT, and 100 mM NaCl). The catalytic activity of the preparation was estimated by its alkaline phosphatase activity with *p*-nitrophenyl phosphate as a substrate. The specific activity of the preparation used in the presented experiments was 85 units/mg protein, and protein concentration was around 12 mg/ml. Inhibition by okadaic acid was used to identify the phosphatase activity as PP1 and PP2A.

**Oligonucleotides and Plasmids**—The following oligonucleotides and their complements, flanked by *Bam*HI sites, were synthesized: (i) a DR5 retinoic acid response element from the promoter P2 of the RAR- $\beta$  gene (30), (ii) a TREpal thyroid response element (31), (iii) a RXRE from the rat CRBPII gene promoter (32), and (iv) a DR2 from the mouse CRABP-II gene promoter (4). Sequences of these oligonucleotides are as follows: (i)  $\beta$ -RARE (DR5), gatcGGGTAGGGTTCACCGAAAGTTCACTCG; (ii) TREpal, gatcTTCAGGTCATGACCTGAA; (iii) rCRBPII-RXRE, gatcTGAACCTGTGACCTGTGACCTGTGACCTGTGACAGCA; and (iv) mCRBPII-DR2, gatcGTACAGGTCATCAGGTCAAG. These response elements were cloned into pBLCAT2 (33), and this plasmid is referred to as  $\Delta$ RAREtk-CAT in the text. p(RARE)<sub>2</sub>tk CAT was obtained by inserting two copies of the DR5 oligonucleotide into the *Bam*HI site of  $\Delta$ RAREtk-CAT. A similar procedure was used to clone the TREpal and DR2 sequences as tandem copies into the same reporter gene, whereas the rCRBPII-RXRE was cloned as a single element between the *Bam*HI and *Hind*III sites. The SV40-based expression vectors pSG5-RAR $\alpha$  and pSG5-RXR $\alpha$  are described elsewhere (6, 26, 34). pCMV5-PP2A was kindly provided by Dr. M. Mumby (University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas, TX). pCMV5-PP1 was created by inserting the PP1 $\alpha$  cDNA as an *Eco*RI-*Bam*HI fragment in pCMV5. The PP1 cDNA was amplified from pRSET-PP1 (35) to generate a 1000-base pair DNA using the following primers: 5'-CCGGAATTCGCCACCATGTCCGACAGC-3' (upstream primer) and 5'-CGCGGATCCCTATTCTTGGCTTTGGC-3' (downstream primer).

## RESULTS

**Inhibition of PP1 and PP2A Alters Retinoic Acid-induced Transcription**—The effect of OA, an inhibitor of phosphatases PP1 and PP2A (18) on retinoid-induced transcription, was investigated in a cotransfection assay (Fig. 1). Various RA-inducible reporter genes were introduced in COS cells, in the presence or absence of expression vectors coding for RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$ . We have used deliberately high amounts of DNA (1  $\mu$ g) in these experiments. Although this does not allow for a clear



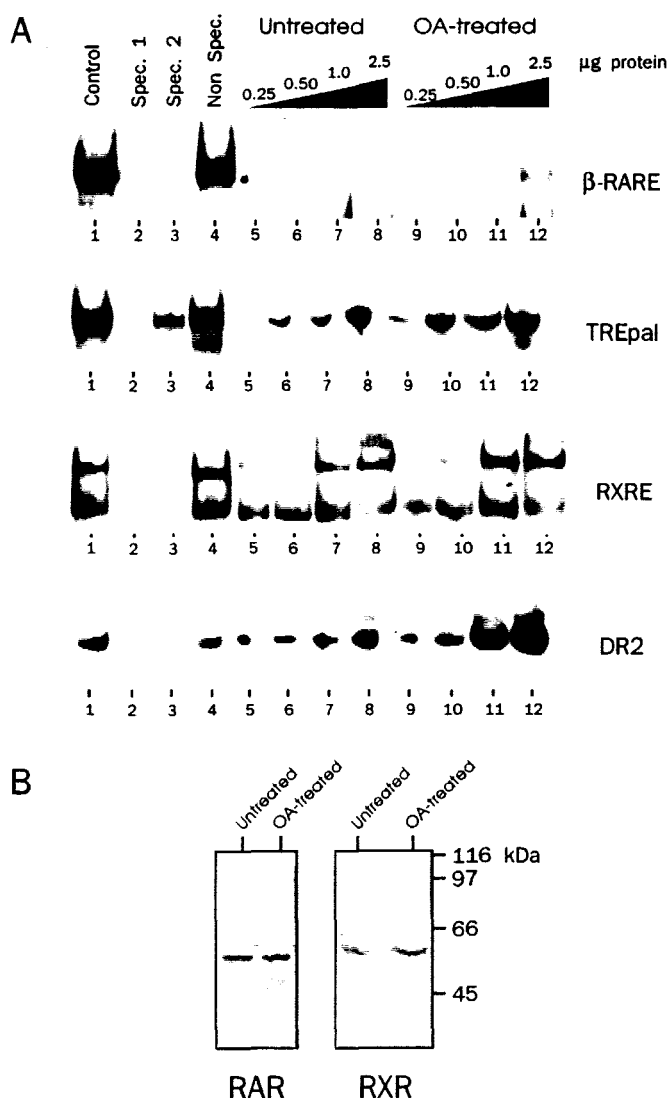
**FIG. 2. PP2A and PP1 overexpression decrease the transcriptional activity of RARE-driven promoters.** COS cells were transfected with 0.5  $\mu$ g of the indicated reporter gene and 1  $\mu$ g of each expression vector coding for RAR and RXR, with increasing amounts of CMV-PP2A (left column) or CMV-PP1 $\alpha$  (right column) plasmids. Cells were then treated with vehicle (open circles) or with 1  $\mu$ M ATRA (filled circles). Levels of CAT activity as a percentage of the CAT activity detected in COS cells transfected without PP1 or PP2A expression vectors and treated with 1  $\mu$ M ATRA. Graphic data are averaged from four independent experiments.

detection of a synergy between RAR and RXR, it allowed the detection of reporter gene activity in the presence of only one overexpressed receptor or both, thereby reflecting preferentially the transcriptional activity of homodimers or heterodimers. At lower DNA concentrations (25 ng), a synergy was observed.<sup>2</sup> In preliminary experiments, we noted that the OA effect increased with concentration up to 100 nM and became cytotoxic above 150 nM. We therefore used OA at a concentration of 100 nM to selectively block PP1 and PP2A activities in transfected cells. Moreover, this concentration did not affect the activity of the parental vector pBLCAT2, designed  $\Delta$ RAREtkCAT thereafter (Fig. 1). Cells, with or without OA treatment, were treated with 50 nM ATRA or 50 nM 9-*cis*-RA. 50 nM ATRA exclusively activates RARs while 9-*cis*-RA activates both RARs and RXRs, due to its high affinity for both receptors (36).

We first examined the effect of inhibition of protein phosphatases on the  $\beta$ RARE<sub>2</sub>tkCAT (DR5) reporter gene activity. This reporter gene is bearing a DR5 response element that can be activated by the low level of endogenous RARs and RXRs present in COS cells (Fig. 1A). Overexpression of RAR $\alpha$  did not

<sup>2</sup> P. Lefebvre, unpublished observations.





**FIG. 3. OA treatment increases the affinity of retinoic acid receptors for various retinoic acid response elements.** **A.** Nuclear extracts were prepared from untreated or OA-treated COS cells transfected with RAR and RXR expression vectors. Their ability to form specific complexes on a  $\beta$ -RARE, TREpal, RXRE, or DR2 response element was tested by electrophoretic mobility shift assay. Nuclear extracts (20  $\mu\text{g}$  of protein) from untreated cells were used for competition experiments in which a 50-fold excess of the same oligonucleotide (Spec. 1, lanes 2), of the  $\beta$ -RARE probe (Spec. 2, lanes 3) or the DR2 probe when the  $\beta$ -RARE was the labeled probe, and of a palindromic glucocorticoid response element (Non Spec., lanes 4) were used. Increasing amounts of nuclear extracts from untreated cells (lanes 5–8) or OA-treated cells (lanes 9–12) were incubated with the indicated probe and resolved on a 5% nondenaturing acrylamide gel. **B.** Western blot analysis of RAR and RXR in control and OA-treated COS cell nuclear extracts. 100  $\mu\text{g}$  of protein was resolved on a 12% SDS-PAGE and immunodetected with the anti-RAR $\alpha$  polyclonal antibody IS39 or the anti-RXR monoclonal antibody 1RX-6G12.

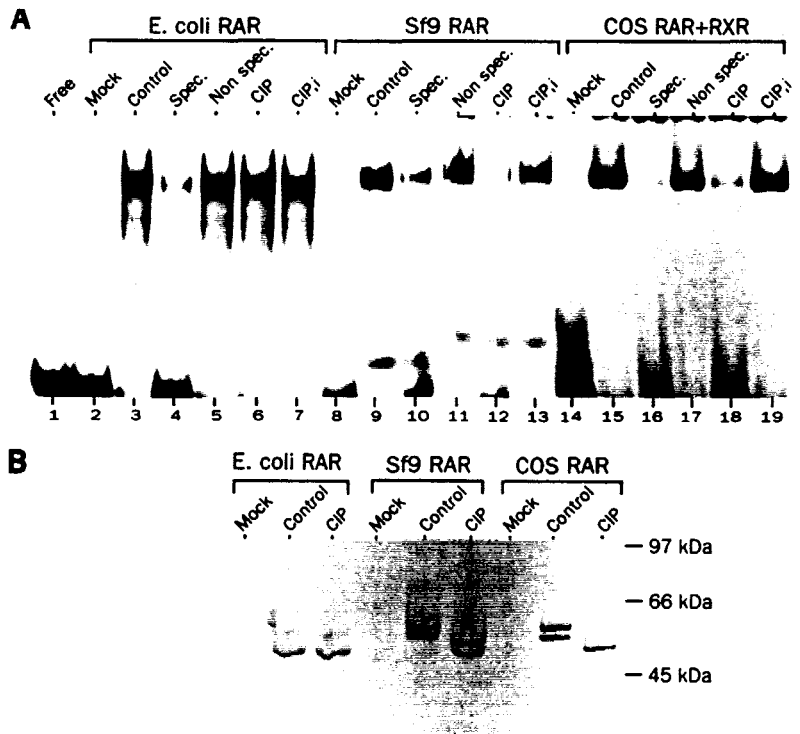
significantly increase the promoter activity in response to ATRA or 9-*cis*-RA, whereas overexpression of RXR $\alpha$  increased the  $\beta$ -RARE CAT activity by 3–4-fold. Coexpression of both receptors did not further increase the level of activation of the promoter in response to 9-*cis*-RA treatment, although we noted that ATRA yielded a lower CAT activity than in the presence of RXR alone. This could suggest that RAR has a moderate inhibitory effect under these conditions, a result comparable to the one obtained with the rCRBP-II-RXRE construct (Fig. 1C). In no case did addition of 100 nM OA significantly modify the detected CAT activity either in the presence or the absence of ligand.

A similar analysis was performed with the TREpal-CAT construct, which is not inducible in the absence of overexpressed RAR or RXRs (Fig. 1B). Overexpression of RAR, RXR, or both receptors conferred a significant inducibility by retinoic acid on this promoter, indicating that the observed activation is due solely to transfected receptors. This result is in agreement with previously reported results and reflects the low concentrations of RAR and RXR in nontransfected COS cells (37). 9-*cis*-RA was a better activator than ATRA, showing that RXR activation increases the promoter activity. In the absence of transfected receptors, OA displayed virtually no effect on the TREpal-CAT activity. On the contrary, OA caused a clear increase in TREpal-CAT expression in response to ATRA (2-fold) and 9-*cis*-RA (1.3-fold) in the presence of RAR $\alpha$ . More strikingly, overexpression of RXR $\alpha$  alone caused a ligand-independent activation by OA of the reporter gene to a level similar to that achieved in the presence of 50 nM ATRA or 9-*cis*-RA alone. The ligand-induced transcription, in the presence of OA, was boosted to a similar extent (3–4-fold). Coexpression of RAR and RXR increased the inducibility of the TREpal-CAT promoter, when compared to the level reached upon overexpression of a single receptor, as previously reported (38). Phosphatases inhibition caused a further increase in CAT activity similar to that observed with RXR alone.

The rCRBP-II-RXRE-CAT construct, containing five repeats of the sequence AGGTCA spaced by one nucleotide, is poorly activated in the absence of transfected receptors or in the presence of RAR alone. OA was nevertheless able to increase the CRBP-II promoter activity in the absence of receptors or in the presence of RAR, and it increased the basal activity to a level similar to the one observed with ATRA or 9-*cis*-RA. This effect was noticeable, although the CAT activity was much lower than that seen in the presence of RXR. Indeed, this reporter gene became highly inducible in the presence of transfected RXR, to reach a 25–30-fold higher activity in the presence of both ATRA and 9-*cis*-RA (Fig. 1C). Initially described as a RXRE, the rCRBP-II-RARE is, in our experimental conditions, activated by a RAR-specific ligand, indicating that RAR is a component of the activation complex. The activation of a CRBP-II-driven promoter by ATRA was also reported, although this could be due, in the reported conditions, to a metabolic conversion of ATRA to 9-*cis*-RA (32). Thus our results suggest that this particular response element can be activated by hRAR $\alpha$ , in opposition to a “true” DR1 (39). Coexpression of RAR and RXR lowered the rCRBP-II-CAT promoter activity, in agreement with the proposed inhibitory role of RXR transactivation by RAR (32). Phosphatases inhibition by OA increased CRBP-II-CAT activity in the presence of overexpressed RXR, albeit to a lower extent, and counteracted the inhibitory activity of RAR in the presence of RXR.

DR2 response elements have been shown, by random selection of binding sites for RAR/RXR heterodimers, to bind heterodimers with a lower affinity than a DR5 (40). However, the mCRBP-II DR2 conferred a significant inducibility to the thymidine kinase promoter in response to ATRA and 9-*cis*-RA in the absence of transfected receptors (Fig. 1D). 9-*cis*-RA was in all cases a better inducer than ATRA in the absence of OA, and RAR overexpression yielded a higher level of CAT activity than RXR overexpression. Coexpression of RAR and RXR did not significantly increase the CRBP-II-CAT promoter activity. In that promoter context, OA increased the basal level of CAT activity, which reached values similar to that obtained in the presence of ligand alone when RXR was overexpressed. At the specified concentrations, ligand and OA effects on the promoter activity were cumulative. This result is analogous to that of TREpal-CAT (see Fig. 1B).

**FIG. 4. Phosphatase treatment of crude nuclear extracts inactivates DNA binding activity of hRAR $\alpha$  synthesized in eukaryotic cells.** *E. coli*, Sf9 cells, or COS cells nuclear extracts were tested for their DNA binding activity by EMSA. Samples from nuclear extracts containing 20  $\mu$ g of protein were incubated with 20 fmol of labeled  $\beta$ -RARE oligonucleotide (lanes C), with a 50-fold excess of cold  $\beta$ -RARE (lanes S), or with a 100-fold excess of a nonspecific oligonucleotide (lanes NS). The same amount of extract was either treated with 50 units of native calf intestine alkaline phosphatase (CIP) or with CIP in the presence of inhibitors (CIP, i). F (free) lane, DNA alone; M (mock) lanes: DNA probe incubated with nontransformed (*E. coli*), noninfected Sf9 cells, or nontransfected COS cells extracts. Lower panel, mock, control or phosphatase-treated extracts were analyzed in parallel for their content in hRAR $\alpha$ . Forty  $\mu$ g of nuclear extract from *E. coli*, Sf9 cells, or COS cells nuclear extracts was resolved on a 8% SDS-PAGE and blotted onto a nitrocellulose membrane. Immunodetection was performed using the antiRAR $\alpha$  polyclonal antibody IS39. Molecular masses (in kDa) are indicated on the right.



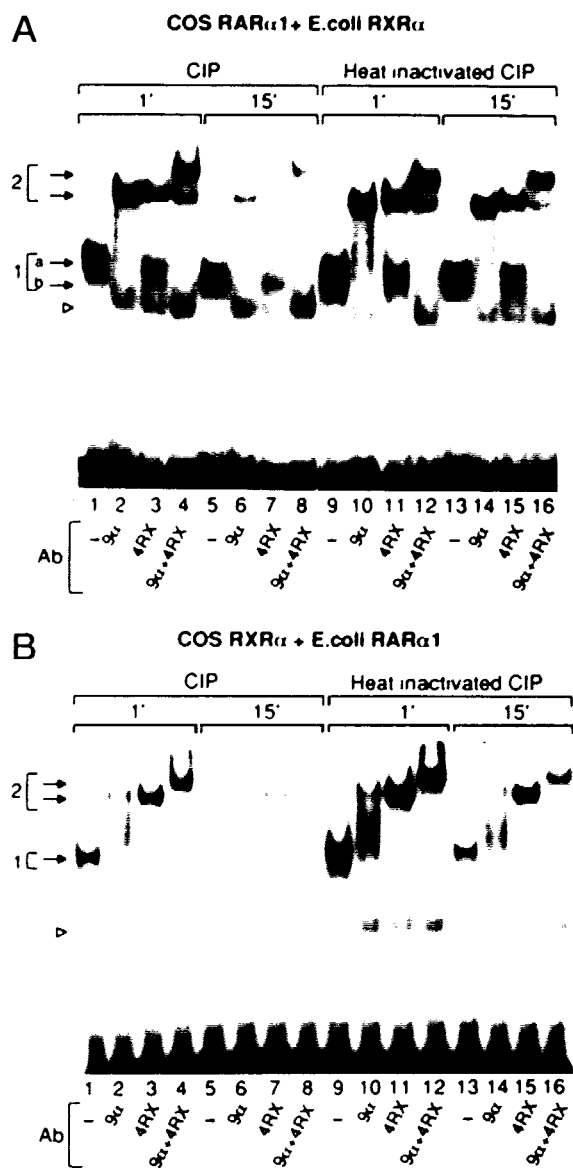
This set of experiments demonstrates several interesting features of retinoid-induced transcription in response to OA treatment in COS cells: (i) the observed effects are specific for RARE-containing promoters since the OA effect was not detected when the parental reporter gene  $\Delta$ RAREtkCAT was used or when the TREpal-CAT plasmid was used in the absence of overexpressed receptors, indicating that the thymidine kinase promoter activity is not significantly altered upon phosphatases inhibition. Furthermore, we<sup>3</sup> and others (9, 20–22) did not detect any effect of OA on Rous sarcoma virus or SV40 promoter-controlled genes. (ii) OA did not increase the activity of the  $\beta$ -RARE CAT construct, whatever combination of receptors and ligands was used. (iii) The TREpal and DR2-driven promoters, which can be considered to be equally activated by agonists in the presence of overexpressed RAR or RXR, and which have a lower affinity for RAR/RXR heterodimers *in vitro* than the  $\beta$ -RARE, are strongly activated by OA. Remarkably, phosphatases inhibition was able to bring transcription, in the absence of ligand, to a level similar to that induced by retinoids in the presence of overexpressed RXR. (iv) The CRBPII-RXRE-CAT construct is highly inducible upon expression of RXR. The OA effect was less marked in the presence of overexpressed RXR than in the presence of overexpressed RAR, and the inhibitory effect of RAR on RXR-mediated transcription could be relieved by OA treatment of transfected cells. These results suggest that phosphatases inhibition is able to activate low affinity RARE-driven promoters to a maximum activity in a ligand-independent manner.

**Overexpression of PP2A and PP1 Inhibits Retinoic Acid-Induced Transcription**—Although okadaic acid is a valuable tool to study the role of PP1 and PP2A in various cellular processes, its use has some potential drawbacks such as its cellular toxicity (41). Thus we analyzed the ability of each enzyme to modulate retinoic acid-induced transcription from each type of reporter gene (Fig. 2). Exponentially growing COS cells were transfected with a RARE-containing reporter plasmid or the parental reporter gene  $\Delta$ RARE tkCAT, expres-

sion vectors coding for both RAR and RXR and increasing amounts of PP2A or PP1 expression vectors. As it could be expected, PP2A and PP1 overexpression markedly and specifically reduced the inducibility by ATRA of RARE-driven reporter genes in a dose-dependent manner. PP2A overexpression inhibited the ATRA-induced CAT activity of all reporter genes, although the RXRE-CAT construct appeared consistently less sensitive. The basal level of CAT activity for the DR2 and RXRE-driven reporter genes was also lowered upon PP2A overexpression, although low levels of enzymatic activity made quantitation of the results difficult for the  $\beta$ -RARE and TREpal constructs. PP1 also inhibited the activity of all reporter genes except that of the  $\beta$ RARE-tk CAT reporter gene. Furthermore, RARE-driven reporter genes displayed a differential sensitivity to each catalytic subunit of these enzymes (compare left and right columns, for the 5  $\mu$ g of plasmid concentration). Thus the retinoic acid inducibility of each reporter gene was differentially affected by the type of protein phosphatase used in this assay.

**OA Treatment Increases the DNA Binding Affinity of RAR/RXR Heterodimers**—Nuclear extracts from COS cells, treated or untreated with OA and transfected with both RAR and RXR expression vectors, were used to perform *in vitro* RARE-binding assays (Fig. 3). As shown by Western blot analysis, OA treatment did not modify the receptor content of the extracts (Fig. 3B). However, specific binding to each response element tested was found to be increased upon OA treatment of COS cells. This increase in DNA binding activity was especially apparent for the TREpal and DR2 probes (3–4-fold increase), but less obvious for the  $\beta$ -RARE (DR5) and RXRE probes (1.5–2-fold). The latter probe yielded two specific complexes. The upper band migrated with a mobility similar to RXR homodimers, whereas the fastest species migrated as RAR/RXR heterodimers.<sup>1</sup> Since RAR and RXR have been shown to be the only RARE-binding proteins in COS cells extracts (34), we conclude that phosphatases inhibition led to an increased DNA binding activity of RAR and RXR *in vitro*. This is in agreement with transient transfection results which showed

<sup>3</sup> A. Tahayato and P. Lefebvre, unpublished observations.



**FIG. 5. Alkaline phosphatase treatment impaired the DNA binding activities of both RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$  overexpressed in COS cells.** Whole cell extracts from COS cells transfected either with RAR (panel A) or RXR expression vectors (panel B) were treated with active (panels A and B, lanes 1–8) or heat-inactivated CIP (lanes 9–16) for 1 or 15 min at 37°C. Treated COS extracts containing RAR $\alpha$  (panel A) and RXR $\alpha$  (panel B) were then mixed with purified  $\Delta$ A/B RXR or  $\Delta$ A/B RAR, respectively, and resolved by EMSA. The protein composition of the retarded complexes (arrow 1) was determined by supershift experiments using monoclonal antibodies directed against RAR $\alpha$  (9 $\alpha$ ) or RXR (4RX). Supershifted complexes are indicated by arrow 2. The empty arrowhead indicates nonspecific complexes.

a clear increase of the DR2-CAT and TREpal-CAT expression in the presence of 100 nM OA (see Fig. 1). This observation prompted us to further investigate the role of basal phosphorylation in the *in vitro* DNA-binding properties of RAR/RXR heterodimers.

**In Vitro Phosphatase Treatment of Nuclear Extracts Prevents Specific Binding to a Retinoic Acid Response Element.** Crude extracts containing overexpressed hRAR $\alpha$  in *E. coli*, Sf9 cells or RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$  in COS cells were submitted to a DNA-binding assay before and after treatment with calf intestine alkaline phosphatase (CIP, Fig. 4). Since alkaline phosphatase has a broad substrate specificity, its use can be compared favorably with that of PP1 and PP2A. No  $\beta$ -RARE-specific binding activity was detected in mock transformed bacteria, infected Sf9 cells, or

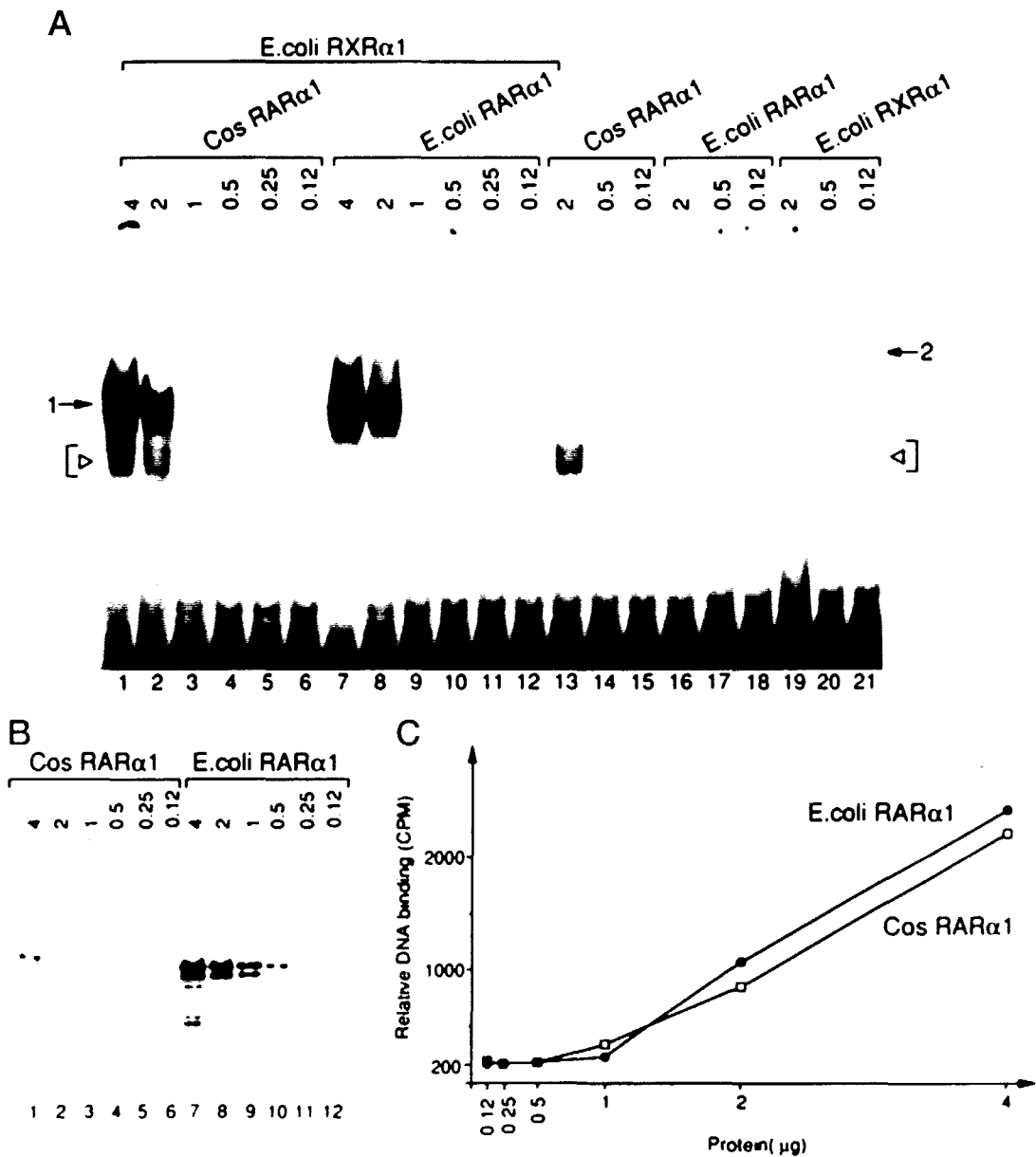
in nuclear extracts from native COS cells (Fig. 4, upper panel, lanes 2, 8, and 14MDRV). Upon introduction of a vector coding for hRAR $\alpha$  in *E. coli* and Sf9 cells or vectors coding for RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$  in COS cells, protein-DNA complexes were formed specifically on the  $\beta$ -RARE oligonucleotide (lanes 3, 9, and 15). The specific DNA binding activity detected in bacterial extracts, resulting from RAR homodimer formation onto the  $\beta$ -RARE (lane 3) was not sensitive to phosphatase treatment (lane 6). Western blot analysis (lower panel) of native or phosphatase-treated *E. coli* extracts (lanes 3 and 6, respectively) identified a single immunoreactive species revealed by a polyclonal anti-hRAR $\alpha$  antibody, with a molecular mass of 52 kDa. No difference in SDS-PAGE electrophoretic mobility was detected after CIP treatment, indicating that the *E. coli*-expressed hRAR $\alpha$  is not phosphorylated.

In contrast, the DNA binding activity of hRAR $\alpha$  synthesized in eukaryotic cells (Sf9 and COS) appeared to be sensitive to phosphatase treatment (compare lane 9 to lane 12 and lane 15 to lane 18). A 75–90% decrease in DNA binding activity was consistently observed which was concomitant with an increase of the electrophoretic mobility of RAR $\alpha$  in SDS-PAGE of the phosphatase-treated sample (lower panel). This increased mobility is indicative of the removal of several phosphate groups from the RAR $\alpha$  molecule. We showed previously that treatment of  $^{32}$ P-labeled RAR $\alpha$  in COS cells led to a significant, but not complete, loss of phosphate groups (13). Similar results were obtained with RXRs.<sup>4</sup> The effect of phosphatase treatment on the DNA binding activity was also observed using potato acid phosphatase and agarose-immobilized alkaline phosphatase, and for nuclear extracts from HEL, HL-60, and HeLa cells.<sup>5</sup> The DNA binding activity was not affected when the phosphatase was inhibited by 10 mM inorganic phosphate, 10 mM sodium molybdate and vanadate (Fig. 4, lanes 13 and 19). Thus hRAR $\alpha$  is a phosphoprotein when synthesized in eukaryotic cells, and phosphatase treatment of extracts strongly decreased its DNA binding affinity under these conditions. The concomitant dephosphorylation of hRAR $\alpha$  implies that phosphorylation of the receptor is required for DNA binding. Alternatively, this could mean that an inhibitory activity was unmasked after CIP treatment. This hypothesis can be ruled out, however, since when *E. coli* RAR and RXR are combined to native or CIP-treated COS cells extract, they bind to DNA with a similar efficiency. The apparent molecular masses of native RAR $\alpha$  synthesized in Sf9 and COS cells were identical. In each case, RAR $\alpha$  migrated as a doublet and was detected as 54- and 58-kDa polypeptides, and both forms appeared to be sensitive to CIP treatment. As shown by Western blot analysis of the extracts, overexpression of RAR $\alpha$  in each system yielded similar amounts of RAR polypeptide. Receptors extracted from these cells bound ATRA with a similar dissociation constant ( $\sim 3$  nM) and yielded an equivalent amount of ATRA-binding sites (5–10 pm receptor/mg protein, data not shown). This indicates that whatever the system used, receptors have similar properties and stability. We cannot, however, be sure in this system that hRAR $\alpha$  is the only substrate for the alkaline phosphatase, which could also dephosphorylate other proteins necessary for the DNA binding activity of the receptor.

**Dephosphorylation of Both RAR and RXR Reduces the Affinity of RAR/RXR Heterodimers for DNA.** To further determine the importance of the phosphorylation state of each partner in the heterodimerization process, RAR and RXR were expressed either in *E. coli*, in a nonphosphorylated form, or in COS cells in which polypeptides are fully processed. Nuclear extracts from COS cells containing RAR $\alpha$  (Fig. 5A) or RXR $\alpha$  (Fig. 5B) were treated with

<sup>4</sup> C. Rochette-Egly, manuscript in preparation.

<sup>5</sup> E. Talybault and A. Talybault, unpublished observations.

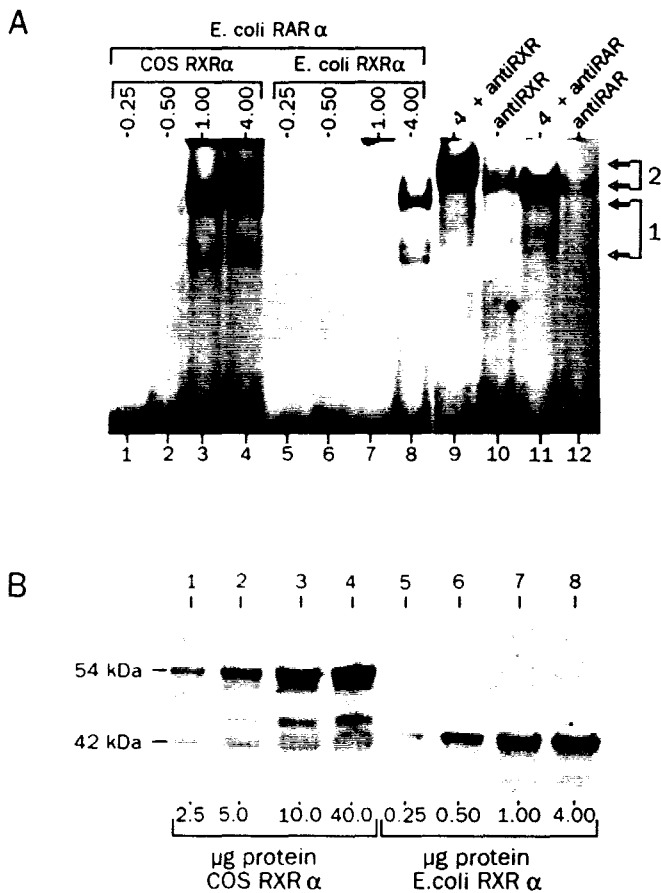


**FIG. 6. RAR $\alpha$  synthesized in bacteria forms RAR/RXR heterodimers less efficiently than RAR $\alpha$  extracted from COS cells.** *A*, increasing amounts of whole cell extracts from COS cells (lanes 6 to 1) or from *E. coli* (lanes 12 to 7) overexpressing RAR $\alpha$  were added to a constant amount of  $\Delta$ A/B RXR $\alpha$  purified from *E. coli*. Protein-DNA complexes formed on the  $\beta$ -RARE probe were analyzed by EMSA. The ability of each component to bind to this probe was also assessed in a similar manner (COS RAR, lanes 15 to 13; *E. coli* RAR, lanes 18 to 16; purified RXR, lanes 21 to 19). Protein concentration is given in  $\mu$ g/20  $\mu$ l of EMSA mix. Arrow 1 indicates RAR/RXR heterodimers, whereas arrow 2 points to RAR homodimers (lane 16). The empty arrowhead shows nonspecific complexes. *B*, quantification of RAR $\alpha$  in COS and *E. coli* extracts by Western blot. Extracts used to run the gel retardation assay were analyzed for their content in RAR $\alpha$  as described under "Materials and Methods." The membrane was probed with the polyclonal antibody Rpa(F). *C*, quantification of the retarded bands shown in panel *A* from lanes 1 to 12. The autoradiogram was scanned using a PhosphorImager and data plotted as a graph showing the variation of the amount of the retarded complexes versus the protein concentration of RAR containing extracts.

CIP for 1 or 15 min, mixed with purified  $\Delta$ A/B RXR $\alpha$  or  $\Delta$ A/B RAR $\alpha$ , respectively, and analyzed by EMSA. Heterodimeric complexes formed on the  $\beta$ -RARE probe were identified by supershifts using monoclonal anti-RAR $\alpha$  antibody (9 $\alpha$ , lanes 2, 6, 10, and 14), an antiRXR antibody (4RX, lanes 3, 7, 11, and 15), or both (9 $\alpha$ +4RX, lanes 4, 8, 12, and 16). Complexes were totally supershifted in the presence of both antibodies (lanes 4, 8, 12, and 16 in both panels), showing that these complexes are made of RAR and RXR. CIP treatment of COS cell extract for 15 min caused a strong decrease in the amount of RAR-RXR-DNA complexes, regardless of which receptor was present in the CIP-treated extract (compare lanes 4 to lanes 8 in panels *A* and *B*). Interestingly, we also noted that heat inactivation of CIP was not

sufficient to prevent a partial loss of the DNA binding activity (compare lanes 12 to lanes 16 in both panels), in opposition to phosphatase inhibitors (sodium phosphate, sodium molybdate, and vanadate, see Fig. 4). This is suggestive of the presence of an endogenous phosphatase activity in COS extracts that remains to be identified. Thus, phosphorylation of both RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$  appeared to be important for the DNA binding activity of RAR/RXR heterodimers. However, this post-translational modification is not an absolute requisite for dimerization since RAR and RXR produced in *E. coli* can generate similar complexes (see below), suggesting that phosphorylation may increase the affinity of one receptor for its dimerization partner.

*Bacterially Expressed RAR and RXR Are Less Efficient at*



**FIG. 7. RXR synthesized in bacteria forms RAR/RXR heterodimers less efficiently than RXR extracted from COS cells.** *A*, increasing amounts (indicated in  $\mu\text{g}$  of proteins) of  $\Delta\text{A/B RXR}\alpha$  extracted from bacteria (*E. coli RXR*) or full-length  $\text{RXR}\alpha$  extracted from COS cells was incubated in the presence of a constant amount of hRAR $\alpha$  and protein-DNA complexes were analyzed by EMSA. Supershift experiments were performed using an antiRXR monoclonal antibody in the presence (lane 9) or the absence (lane 10) of nuclear extracts. Similarly, a polyclonal antiRAR antibody was used in the presence (lane 11) or the absence of nuclear extract (lane 12). In these experiments, the amount of nuclear extract was similar to that used in lane 4. Arrows 1 indicate the retarded complexes, whereas arrows 2 indicate complexes supershifted by either a polyclonal antiRAR $\alpha$  antibody (lane 11) or a monoclonal antiRXR antibody (lane 9). *B*, assay of the  $\text{RXR}\alpha$  content of COS and *E. coli* extracts. 2.5, 5, 10, or 40  $\mu\text{g}$  of COS extracts or 0.25, 0.5, 1, and 4  $\mu\text{g}$  of bacterial extracts were analyzed by Western blotting. The full-length mRXR migrated as a 54 kDa species, whereas the  $\Delta\text{A/B RXR}\alpha$  migrated as a 42-kDa polypeptide. The nitrocellulose membrane was probed with the monoclonal antiRXR antibody 1RX-6G12.

**Forming Heterodimers than RAR and RXR Extracted from Eukaryotic Cells**—Receptors synthesized in eukaryotic cells and in bacteria were used in EMSA experiments to further answer the question whether post-translational modifications alter the ability of RAR/RXR heterodimers to form on a RARE. To test this hypothesis, we performed experiments comparing the ability of RAR and RXR, expressed either in bacteria or in COS cells, to generate heterodimers on the  $\beta$ -RARE. The amount of RAR or RXR extracted from *E. coli* or COS cells extracts necessary to generate an equivalent amount of receptor-DNA complex in the presence of its nonphosphorylated dimerization partner was titrated by EMSA. As shown in Fig. 6, none of the individual components of the binding reaction bound to DNA by itself, when used at the indicated concentrations (lanes 13–21). When COS or *E. coli* RAR $\alpha$ 1 was added to a constant amount of non phosphorylated (*i.e.* from *E. coli* extracts)  $\Delta\text{A/B RXR}\alpha$  (Fig. 6A), an identical level of heterodimer formation could be reached with both type of extracts

(compare lanes 1–6 and lanes 7–12). However, quantification of RAR $\alpha$  by Western blotting revealed that a much higher amount (8–10-fold) of the RAR $\alpha$  polypeptide was present in the bacterial extract (Fig. 6B, compare lane 1 to lane 7), indicating that a higher concentration of nonphosphorylated RAR is necessary to yield an identical level of heterodimer binding to DNA. Quantification of the retarded bands formed for each condition (Fig. 6C) demonstrated that *E. coli* or COS-expressed RAR $\alpha$  yielded an equal amount of receptor-DNA complexes, suggesting that the binding of RAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  heterodimers to DNA is not affected by post-translational modifications once the heterodimers are formed.

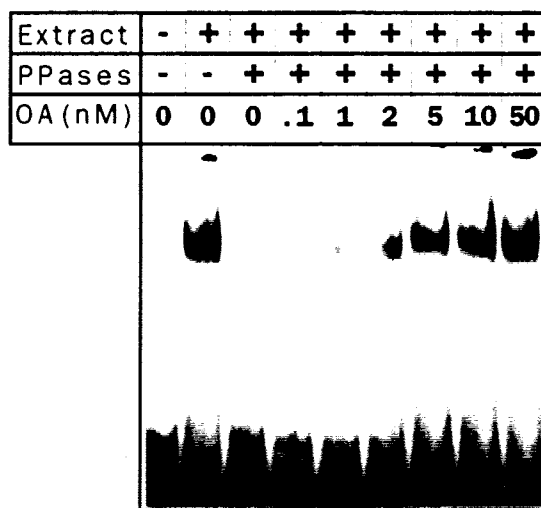
An analogous titration experiment was done to compare the capacity of nonpurified *E. coli* and COS RXR $\alpha$  to interact with RAR present in crude *E. coli* extracts (Fig. 7). In this experiment, we first estimated the concentration of RXR present in both type of extracts by Western blot analysis. RXR concentration in *E. coli* extracts was 10-fold higher in this typical experiment, since 40  $\mu\text{g}$  of protein from COS cell extracts had to be loaded to yield a signal equivalent to that observed with 4  $\mu\text{g}$  of *E. coli* extracts, as shown by Western blot analysis (Fig. 7B). However, both types of RXR were able to form heterodimers on the  $\beta$ -RARE oligonucleotide, as shown by supershift experiments (Fig. 7, lanes 9 and 11, arrow 2). COS RXR was able to generate a higher amount of heterodimeric complexes than *E. coli* RXR despite its lower concentration in COS cell extracts (Fig. 7A, compare lanes 1–4 to lanes 5–8). Quantification of the results showed that COS RXR formed heterodimeric complexes with a 10–15-fold higher efficiency than *E. coli* RXR. Thus it appeared from the experiments presented in Figs. 6 and 7 that nonphosphorylated RAR and RXR bound to DNA, in the presence of their dimerization partner, with a lower efficiency (at least 10-fold) when compared to the fully processed polypeptide. This lower efficiency could be overcome by using a higher amount of the nonphosphorylated receptor form, which have, by all other criteria, the same functionality. Indeed, receptors were expressed at the same rate in *E. coli* and COS cells (see Fig. 4) and bound ATRA<sup>6</sup> and DNA (Fig. 6C) with similar affinities. Moreover, RAR homodimer formation on the same RARE was not compromised by the lack of post-translational modifications (see Fig. 4), suggesting that its affinity for DNA in the presence of its dimerization partner is decreased with respect to that of the fully processed polypeptide in COS cells.

**PP1 Efficiently Inhibits RAR/RXR Binding to  $\beta$ -RARE in Vitro**—Transient transfection experiments showed that protein phosphatases exert a noteworthy influence on the inducibility of RARE-driven reporter genes. *In vitro* DNA binding experiments showed that both RAR and RXR are the target for phosphatase action. To address the question as to whether PP1 or PP2A are equally active in abolishing the DNA binding activity of RAR/RXR heterodimers, we partially purified PP1 and PP2A and used them as the source of dephosphorylating enzymes. The PP1/PP2A mix turned out to be as efficient as alkaline phosphatase (and potato acid phosphatase<sup>2</sup>) to abolish the formation of RARE-receptor complexes (Fig. 8, panel A). When OA was added at various concentrations to selectively block PP2A and PP1, we noted that the DNA binding activity was preserved for OA concentrations of 10–50 nM. Since PP2A and PP1 are inhibited by  $I_{50}$  of 0.2 and 20 nM, respectively (18), we infer that PP1 is, under these specific conditions, the most likely candidate as a receptor-dephosphorylating enzyme.

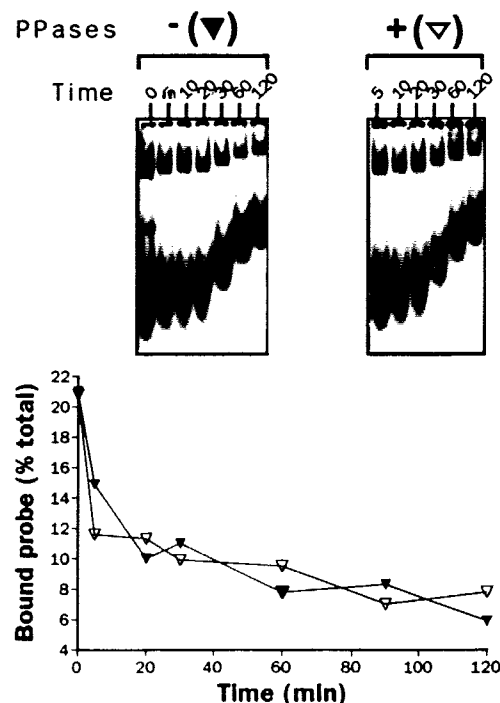
The loss of binding to DNA upon phosphatase treatment can be potentially explained by two modes of action for these enzymes: (i) they increase the dissociation rate of the ternary

<sup>2</sup> B. Lefebvre, personal communication.

A



B



**FIG. 8. Okadaic acid prevents the loss of DNA binding activity of RAR/RXR complexes treated with purified PP1 and PP2A *in vitro*.** *A*, nuclear extracts from HeLa cells were treated with partially purified PP2A and PP1 for 1 h at 37 °C in the presence of the indicated concentration of OA. Samples were then analyzed by EMSA for their ability to bind to the  $\beta$ -RARE probe. *B*, decay of the RAR/RXR complexes in the presence of PP1 and PP2A. HeLa nuclear extracts were submitted to DNA-binding conditions in the presence of labeled  $\beta$ -RARE, then treated for 1 h in the presence or absence of PP1 and PP2A at 37 °C, as described above. Samples were transferred at 4 °C, and a 200-fold excess of cold probe was added. Samples were loaded on a 5% nondenaturing gel at the indicated times. Results were quantified by excision of the radioactive bands and scintillation counting. Results are expressed as a percentage of total probe input.

complex RAR/RXR-RARE, or (ii) phosphatase treatment lowers the on-rate of the association of heterodimers with RAREs. To test the first hypothesis, we preassembled complexes on the  $\beta$ -RARE, treated them with or without with PP1 and PP2A, and followed the dissociation of RAR/RXR complexes by addition of an excess of the same radioinert probe (Fig. 8B). The off-rate was similar, indicating that while RAR and RXR in solution are highly sensitive to phosphatases action assembled heterodimers do not display such a sensitivity.

#### DISCUSSION

Molecular mechanisms controlling cellular fate determination and proliferation are subject to various levels of regulation. These processes are either triggered by molecule-binding to membrane receptors or by liposolubles hormones (vitamin A and derivatives, vitamin D, and steroid hormones) that bind to intracellular receptors. Both types of signals affect, directly or indirectly, the expression rate of key regulatory genes. An understanding of interactions occurring between these two signaling pathways is therefore required to decipher cellular responses at the nuclear level in response to mitogenic or differentiating signals.

We present here evidence that alteration of the intracellular equilibrium between phosphorylation and dephosphorylation processes leads to the modulation of the activity of different RA-responsive reporter genes in COS cells. The effects of OA (Fig. 1) and that of PP1 and PP2A (Fig. 2) were variable depending on the response element used. In contrast to the high affinity  $\beta$ -RARE (DR3) sequence, the TREpal and mCRABP2-CAT (DR2) construct, were activated by OA in a ligand-independent, RXR dependent manner to a level equal to that reached in the presence of NERA or 9-*cis*-RA. This activation was also detected for the mCRABP2/RXRE-CAT construct in

the presence of overexpressed RAR, and OA relieved the inhibitory effect of RAR upon RXR-mediated transcription. PP2A and PP1 therefore play a role in the modulation of the activity of RARE-driven promoters, and this control appeared to be dependent upon the type of RARE and the ratio between the intracellular concentration of RAR *versus* that of RXR. Conversely, overexpression of the PP2A and PP1 catalytic subunit significantly lowered the inducibility of all the reporter genes tested. The sensitivity varied for each phosphatase in the order TREpal >  $\beta$ -RARE > DR2 > RXRE (PP2A), DR2 = RXRE > TREpal >  $\beta$ -RARE (PP1). The lack of sensitivity of the  $\beta$ -RARE construct to PP1 overexpression was unexpected considering the effect of this enzyme on the *in vitro* DNA binding activity of receptors, but it has been reported that overexpression of these enzymes yield mostly insoluble proteins (42). It is therefore likely that the phosphatase to receptor ratio was not identical in these two experiments. Thus, the cis-acting properties of a RARE could be affected by physiological conditions that alter endogenous PP1 and PP2A expression. In that respect, we note that the expression of PP2A is decreased upon ATRA-induced differentiation of HL-60 cells (43), and we hypothesize that this down-regulation could potentially favor the activation of RA-regulated genes directly implicated in the differentiation process. Similarly, PP1 and PP2A activities are regulated by insulin in rat skeletal muscle cells in a differentiation-dependent manner (44). Our data therefore suggest that, in target cells, subsets of RA-controlled genes will be differentially affected by the phosphorylation state of retinoic acid receptors.

Reports from various laboratories identified RXRs in mammalian cells (34, 38, 45, 46) as the primary dimerization part-

ners of all-*trans*-retinoic acid receptors. Our *in vitro* DNA-binding experiments showed that (i) OA treatment increased the DNA binding activity of RAR/RXR dimers and (ii) that RAR and RXR dephosphorylation is detrimental to RAR/RXR heterodimers binding to RAREs, lowering the heterodimer-DNA complex formation efficiency by at least 10-fold. While this work was under review, Bhat and colleagues (47) reported similar values for heterodimer formation of T<sub>3</sub>R/RXR in solution. Taken together, these data suggest that while phosphorylation of RXR or RAR is required neither for homodimer nor for heterodimer formation *per se*, it may modulate their heterodimerization properties when one partner is present in limiting concentrations.

OA is a powerful pharmacological tool which has been used to demonstrate the involvement of phospho/dephosphorylation processes in the regulation of the transactivating potential of transcription factors. Initial reports from B. O'Malley's (9, 20) laboratory established the importance of phosphorylation processes in PR-mediated transcription using this compound and other modulators of kinases. OA was able to induce ligand free activation of the PR, and to potentiate the ligand-inducible transcription by GR (21, 48). Because of the lack of correlation between OA treatment and the phosphorylation state of GR, it has been proposed that phosphorylation of coactivators involved in GR-mediated transcription could be responsible for this potentiation. Alternatively, processes such as the nuclear/cytoplasmic shuttling of receptors could be modified as well (49). The difficulty to establish a clear role for phosphorylation of steroid receptors is undoubtedly linked to the multiplicity of the experimental systems used, as well as technical limitations. For example, PP1 and PP2A have recently been reported to be histidine phosphatases (50). Phosphohistidine residues are present in proteins in quantities comparable to that of phosphoserine and phosphothreonine. However, phosphohistidine residues are acid labile and thus not detected by the standard procedures of phosphoamino acid analysis. Indeed, multiple phosphorylation sites have been identified and mutated in the GR, without strongly altering its transactivating potential (51). On the contrary, critical serine or threonine residues have been identified in *v-erb-A* (52) and the estrogen receptor (53). Lin and colleagues (54) have also demonstrated a correlation between OA-induced hyperphosphorylation of hT<sub>3</sub>R- $\beta$ 1 and an increase in transcriptional activity of this receptor. This effect has been recently attributed to a more efficient homodimerization of hT<sub>3</sub>R- $\beta$ 1 (55). Our observations further substantiate the regulatory role of the phosphorylation state of dimerization partners of retinoid receptors and demonstrated its role on their transactivating potential. Given the intricacy of the retinoid signaling pathway, which is controlled by specific ligands and regulated by a delicate balance between heterodimer and homodimer formation (56) which can either potentiate (reviewed in (3, 57)) or inhibit (37, 58–62) RAR activity, establishing a well-defined role for a given phosphorylated amino acid from each receptor will be necessary.

Our observations thus show that phosphorylation of RARs and RXRs provides another level of regulation of the function of these receptors, in addition to that already provided by multiple receptors isoforms, multiple dimerization partners, distinct response elements, diverse promoter contexts, and ligand variety.

**Acknowledgments**—We are indebted to Dr. J. Grippo (Hoffman-Laroche) for 9-*cis*-RA, to Dr. B. Sablonniere who supplied us with anti RAR $\alpha$  polyclonal antibody IS39, and Dr. H. Gronemeyer who provided us with purified RAR and RXR. We also acknowledge Pr. P. Chambon for stimulating discussions and Dr. J. Clifford for critically reading the manuscript. We are also grateful to Drs. B. Wadzinski

and L. Peruski for the gift of the PP1 cDNA and to Dr. M. Mumby who provided us with the CMV-PP2a construct.

## REFERENCES

- Glass, C. K., DiRenzo, J., Kurokawa, R., and Han, Z. (1991) *DNA Cell Biol.* **10**, 623–638
- Petkovich, M. (1992) *Annu. Rev. Nutr.* **12**, 443–471
- Leid, M., Kastner, P., and Chambon, P. (1992) *Trends Biochem. Sci.* **17**, 427–433
- Durand, B., Saunders, M., Leroy, P., Leid, M., and Chambon, P. (1992) *Cell* **71**, 73–85
- Tini, M., Otulakowski, G., Breitman, M. L., Tsui, L. C., and Giguere, V. (1993) *Genes & Dev.* **7**, 295–307
- Nagpal, S., Saunders, M., Kastner, P., Durand, B., Nakshatri, H., and Chambon, P. (1992) *Cell* **70**, 1007–1019
- Keaveney, M., Berkenstam, A., Feigenbutz, M., Vriend, G., and Stunnenberg, H. G. (1993) *Nature* **365**, 562–566
- Berkenstam, A., del Mar Vivanco-Ruiz, M., Barretino, D., Horikoshi, M., and Stunnenberg, H. G. (1992) *Cell* **69**, 401–412
- Power, R. F., Mami, S. K., Codina, J., Conneely, O. M., and O'Malley, B. W. (1991) *Science* **254**, 1636–1639
- Ignar-Trowbridge, D. M., Nelson, K. G., Bidwell, M. C., Curtis, S. W., Washburn, T. F., McLachlan, J. A., and Korach, K. S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4658–4662
- Orti, E., Bodwell, J., and Munck, A. (1992) *Endocr. Rev.* **13**, 105–128
- Rochette-Egly, C., Gaub, M. P., Lutz, Y., Ali, S., Scheuer, I., and Chambon, P. (1992) *Mol. Endocrinol.* **6**, 2197–2209
- Gaub, M. P., Rochette-Egly, C., Lutz, Y., Ali, S., Matthes, H., Scheuer, I., and Chambon, P. (1992) *Exp. Cell Res.* **201**, 335–346
- Rochette-Egly, C., Lutz, Y., Saunders, M., Scheuer, I., Gaub, M. P., and Chambon, P. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 535–545
- Tahayato, A., Lefebvre, P., Formstecher, P., and Dautrevaux, M. (1993) *Mol. Endocrinol.* **7**, 1642–1653
- Huggenvik, J. L., Collard, M. W., Kim, Y. W., and Sharma, R. P. (1993) *Mol. Endocrinol.* **7**, 543–550
- Hardie, D. G., Haystead, T. A. J., and Sim, A. T. R. (1991) *Methods Enzymol.* **201**, 469–476
- Cohen, P. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 453–508
- Kuret, J., Bell, H., and Cohen, P. (1986) *FEBS Lett.* **203**, 197–202
- Denner, L. A., Weigel, N. L., Maxwell, B. L., Schrader, W. T., and O'Malley, B. W. (1990) *Science* **250**, 1740–1743
- Somers, J. P., and DeFranco, D. B. (1992) *Mol. Endocrinol.* **6**, 26–34
- Beck, C. A., Weigel, N. L., and Edwards, D. P. (1992) *Mol. Endocrinol.* **6**, 607–620
- Lefebvre, P., Berard, D. S., Cordingley, M. G., and Hager, G. L. (1991) *Mol. Cell Biol.* **11**, 2529–2537
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–54
- Bourguet, W., Sablonniere, B., Formstecher, P., Chen, J. Y., Bernier, J. L., and Henichart, J. P. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 711–716
- Zelent, A., Krust, A., Petkovich, M., Kastner, P., and Chambon, P. (1989) *Nature* **339**, 714–717
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1991) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York
- Rochette-Egly, C., Lutz, Y., Pfister, V., Heiberger, S., Scheuer, I., Chambon, P., and Gaub, M.-P. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 525–536
- Silberman, S. R., Speth, M., Nemani, R., Ganapathi, M. K., Dombradi, V., Paris, H., and Lee, E. Y. C. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 2913–2922
- de The, H., Vivanco-Ruiz, M. M., Tiollais, P., Stunnenberg, H. G., and Dejean, A. (1990) *Nature* **343**, 177–180
- Umesono, K., Giguere, V., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., and Evans, R. M. (1988) *Nature* **336**, 262–265
- Mangelsdorf, D. J., Umesono, K., Kliewer, S. A., Borgmeyer, U., Ong, E. S., and Evans, R. M. (1991) *Cell* **66**, 555–561
- Lukow, B., and Schütz, G. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 5490–5496
- Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., Chen, J. Y., Staub, A., Garmier, J. M., Mader, S., and Chambon, P. (1992) *Cell* **68**, 377–395
- Wadzinski, B. E., Wheat, W. H., Jaspers, S., Peruski, L. F., Lickteig, R. L., Johnson, G. L., and Klemm, D. J. (1993) *Mol. Cell Biol.* **13**, 2822–2834
- 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. A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 30–34
- Husmann, M., Lehmann, J., Hoffmann, B., Herrmann, T., Tzukerman, M., and Pfahl, M. (1991) *Mol. Cell Biol.* **11**, 4097–4103
- Zhang, X. K., Hoffmann, B., Tran, P. B. V., Graupner, G., and Pfahl, M. (1992) *Nature* **355**, 441–446
- Kurokawa, R., DiRenzo, J., Boehm, M., Sugarman, J., Gloss, B., Rosenfeld, M. G., Heyman, R. A., and Glass, C. K. (1994) *Nature* **371**, 528–531
- Kurokawa, R., Yu, V. C., Naar, A., Kyakumoto, S., Han, Z. H., Silverman, S., Rosenfeld, M. G., and Glass, C. K. (1993) *Genes & Dev.* **7**, 1423–1435
- Schonthal, A. (1992) *New Biol.* **4**, 16–21
- Mumby, M. C., and Walter, G. (1993) *Physiol. Rev.* **73**, 673–699
- Tawara, I., Nishikawa, M., Morita, K., Kobayashi, K., Toyoda, H., Omay, S. B., Shima, H., Nagao, M., Kuno, T., Tanaka, C., and Shirakawa, S. (1993) *FEBS Lett.* **321**, 224–228
- Srinivasan, M., and Begum, N. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 12514–12520
- Khewer, S. A., Umesono, K., Mangelsdorf, D. J., and Evans, R. M. (1992) *Nature* **355**, 446–449
- Yu, V. C., Doherty, C., Anderson, B., Holloway, J. M., Devary, O. V., Naar, A. M., Kim, S. Y., Boutin, J. M., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1994) *Cell* **67**, 1251–1266
- Bhat, M. K., Aizawa, K., and Cheng, S.-Y. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 1251–1256

- U. S. A.* **91**, 7927-7931
48. Moyer, M. L., Borrer, K. C., Bona, B. J., DeFranco, D. B., and Nordeen, S. K. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22933-22940
49. DeFranco, D. B., Qi, M., Borrer, K. C., Garabedian, M. J., and Brautigam, D. L. (1991) *Mol. Endocrinol.* **5**, 1215-1228
50. Kim, Y., Huang, J., Cohen, P., and Matthews, H. R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 18513-18518
51. Mason, S. A., and Housley, P. R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 21501-21504
52. Glineur, C., Zenke, M., Beug, H., and Ghysdael, J. (1990) *Genes & Dev.* **4**, 1663-1676
53. Ah, S., Metzger, D., Bornert, J. M., and Chambon, P. (1993) *EMBO J.* **12**, 1153-1160
54. Lin, K. H., Ashizawa, K., and Cheng, S. Y. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 7737-7741
55. Sugawara, A., Yen, P. M., Aprelletti, J. W., Ribeiro, R. C. J., Sacks, D. B., Baxter, J. D., and Chin, W. W. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 433-437
56. Lehmann, J. M., Zhang, X. K., Graupner, G., Lee, M. O., Hermann, T., Hoffmann, B., and Pfahl, M. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7698-7707
57. Zhang, X. K., and Pfahl, M. (1993) *Trends Endocrinol. Metab.* **4**, 156-162
58. Baretino, D., Bugge, T. H., Bartunek, P., Ruiz, M. D. M. V., Sonntagbuck, V., Beug, H., Zenke, M., and Stunnenberg, H. G. (1993) *EMBO J.* **12**, 1343-1354
59. Chen, H. W., and Privalsky, M. L. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5970-5980
60. Cooney, A. J., Leng, X. H., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W., and Tsai, M. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 4152-4160
61. Kliewer, S. A., Umesono, K., Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., and Evans, R. M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 1448-1452
62. Tran, P., Zhang, X. K., Salbert, G., Hermann, T., Lehmann, J. M., and Pfahl, M. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 4666-4676



### 3-DISCUSSION :

Dans ce travail, nous démontrons que l'altération des voies de déphosphorylation module l'activité transcriptionnelle de différents gènes reporter contrôlés par les rétinoïdes. Les effets de l'AO (inhibiteur des phosphatases) varient en fonction des gènes reporter utilisés et des récepteurs aux rétinoïdes présents (RAR et/ou RXR). L'activité du gène reporter DR-5 n'est pas affectée par l'AO. Les gènes reporter TREpal et DR-2, qui présentent une faible affinité pour le complexe RAR/RXR, sont fortement activés en présence de l'AO. L'inhibition des phosphatases entraîne une transactivation de ces gènes reporter similaire à celle induite par les ligands. Le rCRBP<sub>II</sub>-RXRE est fortement induit par le 9cisRA. L'effet de l'AO est plus significatif lors de la surexpression du RAR que du RXR. Initialement décrit comme un RXRE, le rCRBP<sub>II</sub>-RXRE est, dans nos expériences, activé par des ligands spécifiques aux RARs, indiquant que RAR fait partie du complexe d'activation. Une activation par l'ATRA du promoteur de la CRBP<sub>II</sub> a déjà été observée, bien que cette activation soit probablement due à une conversion métabolique de l'ATRA en 9cisRA (Mangelsdorf et al., 1991). Ainsi nos résultats suggèrent qu'à l'opposé d'un "vrai" DR-1 (Kurokawa et al., 1994), l'élément de réponse rCRBP<sub>II</sub>-RXRE est aussi activé par hRAR $\alpha$ . Nous avons également observé que l'inhibition des phosphatases par l'AO augmente l'activité du gène reporter CRBP<sub>II</sub>-CAT lors de la surexpression du RXR. L'AO est capable de bloquer l'effet inhibiteur de RAR sur l'activité induite par RXR. Par ailleurs, la surexpression de la sous unité catalytique de PP1 et PP2A diminue l'activité de tous les gènes reporter testés. Nous avons établi un ordre de sensibilité des différents éléments de réponse aux phosphatases :

PP2A            TREpal >  $\beta$ -RARE > DR2 > RXRE

PP1            DR-2 = RXRE > TREpal >>  $\beta$ -RARE

Ces résultats montrent que l'activité des RAREs et RXREs peut être affectée par les conditions physiologiques qui altèrent l'expression des phosphatases endogènes. Ainsi l'expression de PP2A diminue lors de la différenciation des cellules HL-60 induite par l'ATRA (Tawara et al., 1993) et nous pouvons supposer que cette diminution pourrait favoriser l'activation des gènes régulés par l'ATRA et qui sont impliqués dans le processus de

différenciation.

Par des expériences de retard sur gel, nous avons montré que :

(i) l'AO augmente l'activité de liaison à l'ADN de l'hétérodimère RAR/RXR .

(ii) la déphosphorylation de RAR ou RXR entraîne une diminution de la formation du complexe hétérodimère/ADN (environ 10 fois). Bhat et coll. ont observé des valeurs similaires pour la formation de l'hétérodimère T3R/RXR

en solution (Bhat et al., 1994). Ces résultats suggèrent que la phosphorylation de RAR et RXR n'est pas requise pour la formation des homo. et hétérodimères, mais semble plutôt intervenir dans la modulation des propriétés d'hétérodimérisation quand un des partenaires est présent à des concentrations limitantes.

L'AO est un puissant agent pharmacologique qui a été utilisé pour démontrer l'implication des processus de phospho/déphosphorylation dans la régulation des facteurs transcriptionnels. Le laboratoire de O'Malley, en utilisant l'AO ainsi que d'autres modulateurs de kinases, avait montré l'importance des processus de phosphorylation dans la transcription induite par le PR (Denner et al., 1990; Power et al., 1991). L'AO est capable de stimuler la transactivation induite par le PR même en absence du ligand. Il active également l'activité transcriptionnelle du GR en présence du ligand (Somers et al., 1992; Moyer et al., 1993). A cause de l'absence de corrélation entre l'effet de l'AO et l'état de phosphorylation du GR, on pense que l'AO affecte plutôt l'état de phosphorylation de coactivateurs qui interviendraient dans la transcription induite par le GR. La diversité des systèmes expérimentaux et les limites techniques rendent difficile l'élucidation du rôle exact des phosphatases. Néanmoins, ce travail nous a permis de mieux comprendre les relations existantes entre les phosphatases et le mécanisme des rétinoïdes. En particulier, nous avons montré que les phosphatases ont un rôle inhibiteur sur l'activité transcriptionnelle induite par les récepteurs des rétinoïdes et que cette inhibition s'exerce au-niveau de la liaison à l'ADN et la dimérisation. Cette relation doit être intégrée dans une vision globale où la modulation des phosphatases régulerait l'activité des rétinoïdes durant les processus biologiques complexes comme la différenciation et la prolifération cellulaire.

## DISCUSSION GENERALE

L'objectif de ce travail était d'étudier les relations existantes entre la voie des rétinoïdes et les processus de phosphorylation et déphosphorylation. Ainsi, comme première approche, nous avons analysé l'influence des voies de phosphorylation et déphosphorylation sur le mécanisme d'action des rétinoïdes.

Nous avons montré que la stimulation de la voie de la PKA augmente l'activité transcriptionnelle induite par l'ATRA. Le groupe de Sharma a montré que RAR $\alpha$  est phosphorylé directement par la PKA (Huggenvik et al., 1993). Cette phosphorylation se fait sur la sérine 369 situé dans le domaine E/F (Rochette-Egly et al., 1995). Le remplacement de cette sérine par un acide aminé chargé négativement, l'acide glutamique, augmente l'affinité du complexe RAR $\alpha$ 1/RXR $\alpha$  à l'élément de réponse DR-5. Du fait que la Ser369 est localisée à proximité de l'heptade 9, qui est connu pour être requise dans la formation des hétérodimères RAR/RXR (Durand et al., 1994), on peut concevoir que l'introduction d'une charge négative à la position 369 peut modifier la conformation de l'interface de dimérisation de RAR $\alpha$ , facilitant sa capacité à hétérodimériser et à lier l'ADN.

Nous nous sommes également intéressés à la voie des tyrosine kinases car le groupe de Chambon avait montré que le RAR $\beta$  humain est phosphorylé *in vivo* sur des résidus tyrosine. Mais dans nos expériences la voie des tyrosine kinases n'est pas impliquée dans le mécanisme d'action contrôlé par hRAR $\alpha$ . Ce résultat peut être expliqué par le fait que RAR $\alpha$  et RAR $\gamma$  ne sont pas phosphorylés sur des résidus tyrosine. Ainsi, la voie des tyrosine kinases exercerait une régulation spécifique sur RAR $\beta$  et pas sur RAR $\alpha$  ou RAR $\gamma$ . La détermination des résidus tyrosine phosphorylés sur RAR $\beta$  permettrait de mieux comprendre le rôle joué par cette voie.

L'étude du rôle joué par les PKC dans le mécanisme d'action des rétinoïdes a constitué une grande partie

de notre travail. Nous avons observé que la déplétion des PKCs entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle des rétinoïdes. Cette diminution est due premièrement à une perte d'affinité de RAR $\alpha$  à son élément de réponse (DR-5) en présence du ligand. Ce résultat suggère que les PKCs ou des facteurs activés par les PKCs sont requis pour stabiliser la liaison du complexe récepteur/ligand à son élément de réponse. Deuxièmement, cette diminution peut également être expliquée par une perturbation des processus intervenant dans la translocation vers le noyau des récepteurs aux rétinoïdes. En effet, les PKCs pourrait intervenir dans ce mécanisme, mais les expériences que nous avons menées nous ne permettent pas d'être catégorique car le TPA, promoteur de tumeurs, pourrait entraîner une perturbation globale des voies de transport de protéines de manière indépendante de la voie des PKCs. Cette question pourrait être résolue par l'utilisation de mutants ponctuels pour les sites de phosphorylation par la PKC.

Des expériences d'hétérodimérisation *in vitro* entre RAR et RXR ont montré que la phosphorylation de RAR $\alpha$  par la PKC diminue sa capacité à former des hétérodimères RAR/RXR. Il faudrait également étudier l'effet de la PKC sur la formation des homodimères RAR/RAR. Cependant, il faut rester prudent devant ces résultats car le rendement de la phosphorylation de hRAR $\alpha$  par les PKC *in vitro* est très faible et ne permet pas de bien apprécier l'ampleur du rôle des PKCs dans l'activité de dimérisation de RAR. Encore une fois, les mutants ponctuels pourront apporter des réponses plus précises sur le rôle de la PKC dans les propriétés de dimérisation des récepteurs des rétinoïdes.

Par des réactions de phosphorylation *in vitro* nous avons montré que RAR $\alpha$  est phosphorylé par les PKCs sur des résidus sérines. L'analyse par RP-HPLC de RAR $\alpha$  phosphorylé par les PKC et digéré par la trypsine a montré que les PKCs phosphorylent *in vitro* le RAR $\alpha$  sur les sérines 157 ou/et 154. Ces deux sites sont localisés dans la boîte T, qui est connue pour intervenir dans les interactions protéine-protéine et protéine-ADN (voir généralité "boîte T"). L'absence de la sérine 157 chez hRAR $\gamma$  suggère que celui ci pourrait être régulé différemment par la voie des PKC. Il serait intéressant d'étudier le comportement de cette isoforme vis à vis de la voie des PKC dans des cellules dépourvues de RARs. Actuellement, nous construisons des mutants ponctuels pour ces deux sites et nous sommes impatients de pouvoir étudier leurs activités

fonctionnelles.

Le deuxième volet de ce travail est l'étude du rôle joué par les phosphatases (PP1 et PP2A) dans le mécanisme d'action des rétinoïdes. L'inhibition des phosphatases par l'AO a des effets divers sur l'activité transcriptionnelle des rétinoïdes en fonction des éléments de réponse. Le TREpal et le DR-2 sont fortement activés par l'AO en présence respectivement du RXR ou du RAR. Le DR-1 est stimulé par l'AO uniquement en présence de RAR et RXR, alors que le DR-5 n'est pas affecté par l'AO. Le groupe de Christakos a également observé que l'AO stimule la transactivation par les RARs ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et les RXRs ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ), mais l'AO ne semble affecter la transactivation de RAR $\gamma$  (Matkovits et al., 1995). Ce résultat suggère que les phosphatases ne répriment pas l'activité de RAR $\gamma$ , probablement parce que celui-ci n'est pas phosphorylé sur un site précis. La sérine 157 pourrait être ce site car elle est remplacée par une alanine chez RAR $\gamma$ .

La surexpression des phosphatases (PP1 et PP2A) entraîne une inhibition de l'activité transcriptionnelle induite par l'ATRA de tous les gènes reporter, exception faite de DR-5 qui n'est pas affecté par la surexpression de PP1.

Par des expériences de retard sur gel, nous avons montré que l'AO augmente l'affinité du complexe RAR/RXR aux différents éléments de réponse. Avec le RXRE, nous obtenons deux bandes spécifiques correspondant à l'homodimère (RXR/RXR) et l'hétérodimère (RAR/RXR). L'AO augmente uniquement l'affinité de l'homodimère RXR/RXR, ce qui suggère que l'effet inhibiteur des phosphatases s'exerce plus fortement sur RXR. Enfin, nous avons également observé que la phosphorylation de RAR et RXR est nécessaire pour la liaison du complexe à son élément de réponse (Lefebvre et al., 1995).

Toutes ces expériences montrent que les phosphatases ont un effet inhibiteur sur l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux rétinoïdes. Or ces dernières années, plusieurs groupes avaient montré que l'AO stimule fortement l'activité de transactivation de plusieurs récepteurs nucléaires même en absence de ligand. Tous ces résultats donnent l'impression que la voie des phosphatases est un système général de répression de la transcription régulée par les récepteurs nucléaires.

Grâce à ce travail, un modèle impliquant les phosphatases et les kinases commence à prendre forme. En

effet, l'activité transcriptionnelle des rétinoïdes est généralement stimulée par les kinases (PKA, PKC et peut être les tyrosine kinases) et réprimée par les phosphatases.

Finalement, nous croyons que la suite logique de ce travail serait de s'intéresser aux comportements des isoformes RAR $\beta$  et RAR $\gamma$  vis à vis des voies de phosphorylation / déphosphorylation. Du fait que RXR hétérodimérise et régule la transactivation de nombreux récepteurs nucléaires (T3R et VDR), il faudrait également étudier son état de phosphorylation. Il serait aussi intéressant de déterminer précisément la ou les isoformes PKCs qui sont impliquées dans le mécanisme des rétinoïdes. Enfin un axe de recherche s'intéressant au rôle joué par les PKCs dans les processus de différenciation et d'apoptose induits par les rétinoïdes, pourrait être développé dans notre laboratoire.

# **MATERIELS & METHODES**

## **PARTIE I : BACTERIES ET PREPARATION DE PLASMIDES**

### **A/ PREPARATION DE BOITES DE PETRI A AGAROSE :**

#### **i- Conseils et astuces :**

Vous devrez remplir les boîtes et ajouter le ou les antibiotiques appropriés à l'agar pendant que celui-ci est encore fluide (environ 50°C).

#### **ii- Matériels et Solutions :**

LB broth 5X

Agar

10N NaOH

#### **iii- Protocole :**

- 1- Dissoudre 15 g d'agar dans 800ml d'H<sub>2</sub>O.
- 2- Autoclaver pendant 30 min.
- 3- Laisser refroidir jusqu'à 50°C et ajouter 200 ml de LB broth.
- 4- Ajouter le ou les antibiotiques adéquats.
- 5- Verser 15 à 20 ml dans les boîtes de pétri (100mm de diamètre).
- 6- Laisser polymériser et stocker à 4°C.

#### **Note :**

Alternativement, on peut utiliser une poudre LB-agar déjà prête à l'emploi, vendue par Sigma (dissoudre 32g par litre).

### **B/ PREPARATION DES BACTERIES COMPETENTES :**

#### **i- Conseils et astuces :**

Rendre les bactéries compétentes est une étape préalable et nécessaire à l'introduction d'un plasmide. Deux techniques sont couramment utilisées : le chlorure de calcium ou l'électroporation. La technique du chlorure de calcium est facile à mettre en oeuvre et demande peu de moyen. L'électroporation présente un rendement plus élevé, mais nécessite un appareillage plus sophistiqué. Enfin, actuellement, toutes les grandes compagnies de biologie moléculaire proposent plusieurs souches bactériennes hautement compétentes (si vous avez le choix n'hésiter pas !).



**i- Matériels et solutions :**

Souche bactérienne

0,1M CaCl<sub>2</sub>.

LB broth.

**ii- Protocole :**

- 1- Inoculer 50 ml de LB broth avec une colonie de la souche bactérienne. Laisser pousser toute la nuit à 37°C avec une agitation modérée.
- 2- Prélever 4 ml de la culture et inoculer 400 ml de LB broth. Laisser pousser la culture bactérienne jusqu'à DO<sub>600</sub>=0,6.
- 3- Aliquoter la culture dans huit tubes de 50 ml stérile et incuber pendant 10 min dans la glace.
- 4- Centrifuger les bactéries à 3000 rpm pendant 7 min à 4°C.
- 5- Resuspendre chaque culot dans 10 ml de 0,1 M CaCl<sub>2</sub>, incuber pendant 2 min dans la glace.
- 6- Centrifuger à 2500 rpm pendant 5 min à 4°C, resuspendre le culot dans 10 ml de 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. Incuber pendant 30 min dans la glace (incuber toute la nuit augmente le degré de compétence des bactéries).
- 7- Centrifuger à 2500 pendant 5 min et resuspendre le culot par 2 ml de 0,1 M CaCl<sub>2</sub> supplémenté avec 30% de glycérol.
- 8- Stocker des aliquotes de 250 µl à -80°C.

**C/ TRANSFORMATION DES BACTERIES COMPETENTES :**

**i- Protocole :**

- 1- Un aliquot de 15 ng d'ADN dans un volume de 10 à 25 µl, est placé dans un tube stérile. Ce dernier est placé dans de la glace.
- 2- Décongeler dans la glace des bactéries compétentes. Prélever 50 µl de la solution bactérienne et l'ajouter au tube contenant de l'ADN. Mélanger doucement et incuber 30 min dans la glace.
- 3- Le mélange est placé à 42°C pendant exactement 50 secondes et laisser ensuite refroidir pendant 2 min dans la glace.
- 4- Ajouter 500 µl du milieu SOC ou du LB broth normal. Laisser incuber pendant 1 heure à 37°C sous agitation.
- 5- Etaler les bactéries transformées sur des boîtes de pétri contenant le ou les antibiotiques adéquats.
- 6- Incuber toute la nuit à 37°C.

## **D/ TRANSFORMATION DES BACTERIES PAR ELECTROPORATION :**

**i- Références :** EUROGENTEC

**ii- Conseils et astuces :**

Pour éviter la formation d'arcs électriques, travailler toujours avec des solutions à très faible forces ioniques

**iii- Matériels :**

Appareil d'électroporation "Cellject" d' EUROGENTEC.

**iv- Protocole :**

1- Régler les paramètres de l'appareil d'électroporation :

Largeur de la cuvette (mm)	0,2	0,4
Capacité ( $\mu$ F)	40	40
Voltage (v)	2500	2500
Résistance (ohm)	192	412
Temps (ms)	20	20

2- Décongeler les bactéries dans la glace.

3- Mélanger 40  $\mu$ l de la solution bactérienne avec 5  $\mu$ l d'ADN ( $\approx$  10 ng). Laisser dans la glace pendant une minute.

4- Appliquer la décharge électrique.

5- Ajouter immédiatement du LB broth ou du SOC.

6- Transférer la solution dans un tube 17x100mm de polypropylène et incuber à 37°C pendant heure.

7- Etaler sur des boîtes de pétri contenant les antibiotiques adéquats.

## **E/ PREPARATION DE PLASMIDE :**

Il existe plusieurs variantes de techniques pour la préparation de plasmide. La majorité de ces techniques utilise la lyse alcaline.

## **I/ PREPARATION DE PLASMIDE SELON QUIAGEN :**

**i- Conseils et astuces :**

Cette méthode donne de l'ADN très propre et ne nécessite pas l'utilisation de phénol et chloroforme.

## ii- Matériels et solutions :

Colonnes qiagen (existent en plusieurs taille : 20, 100 et 500)

Isopropanol

Tampon P1 (tampon de resuspension):

50mM Tris-HCl, pH 7.5

10mM EDTA

100 µg/ml RNase A

Tampon P2 (tampon de lyse) :

0,2 N NaOH

1% SDS

Stocker à température ambiante

Tampon P3 (Solution de neutralisation) :

1,32M Acétate de potassium

11% Acide acétique

Tampon QBT (tampon d'équilibration de colonne) :

750mM NaCl

50mM MOPS, pH 7.4

0,15% Triton X100

15% éthanol

Tampon QC (tampon de lavage) :

1M NaCl

50mM MOPS, pH 7.4

15% éthanol

Tampon QF (tampon d'élution) :

1,25M NaCl

50mM Tris-HCl, pH 8.5

15% éthanol

iii- Protocole : Pour une culture bactérienne de 500 ml.

### α/ Lyse cellulaire :

- 1- Faire pousser 500 ml d'une culture bactérienne toute la nuit.
- 2- Centrifuger à 3500 rpm pendant 30 min.
- 3- Resuspendre le culot par 10 ml du tampon P1.
- 4- Incuber 20 min dans la glace.
- 5- Ajouter 10 ml du tampon P2 et incuber 5 min à température ambiante.
- 6- Ajouter 10 ml du tampon P3, bien mélanger.
- 7- Incuber 10 min dans la glace.
- 8- Centrifuger à 10 000 g pendant 30 min.

### β/ Purification d'ADN :

- 9- Equilibrer la colonne (Quiatip 500) avec 30 ml du tampon QBT.
- 10- Appliquer le surnageant de l'étape 8 sur la colonne.
- 11- Laver deux fois avec le tampon QC (2x 30ml).
- 12- Eluer l'ADN avec 15 ml du tampon QF.
- 13- Ajouter 10,7 ml d'isopropanol (0,7 vol).
- 14- Bien mélanger et centrifuger à 10 000 g pendant 30 min.
- 15- Enlever le surnageant et sécher le culot d'ADN au speedvac (sans chauffage).
- 16- Resuspendre le culot dans 300 µl d'H<sub>2</sub>O bidistillée.

## **II/ MINIPREPARATION DE PLASMIDE PAR CHLORURE DE LITHIUM :**

### **i- Conseils et astuces :**

Cette technique a donné, entre nos mains, un ADN très propre. Son grand avantage c'est sa rapidité (moins de deux heures). Elle n'utilise pas la lyse alcaline.

### **ii- Matériels et solutions :**

#### **-Solution TELT :**

2,5M LiCl

50mM Tris-HCl, pH 8

62,5mM Na<sub>2</sub>EDTA

4% Triton X-100

Faire des aliquotes de 5 ml et stocker à -20°C

-Phénol/chloroform (1:1)

-Ethanol froid (-20°C)

-Tris-EDTA, pH 8

### **iii- Protocole :**

- 1- Faire pousser 30 ml de culture bactérienne à 37°C toute la nuit.
- 2- Centrifuger la culture à 3000 rpm, pendant 20 min.
- 3- Reprendre le culot par 700 µl de la solution TELT.
- 4- Ajouter 700 µl du phénol/ chloroform, fraîchement préparé, vortexer pendant 5 secondes.
- 5- Incuber 15 min à température ambiante.
- 6- Centrifuger à 15 000 g (maximum) pendant 2 min.

- 7- Prélever 600 µl de la phase supérieure et y ajouter 1 ml d'éthanol froid, bien mélanger.
- 8- Centrifuger à 10 000 g pendant 10 min.
- 9- Sécher le culot d'ADN et le reprendre par 30 µl de TE.

### **III/ MINIPREPARATION DE PLASMIDE PAR PEG :**

#### **i- Conseils et astuces :**

Cette méthode est rapide et facile à mettre en oeuvre. Elle utilise la lyse alcaline.

#### **ii- Matériels et solutions :**

Tampon P1, P2 et P3 (voir protocole Quiagen)

Phénol/chloroform (1:1)

Tris-EDTA, pH 8

Solution polyéthylène glycol (PEG) :

30% PEG 8000 (Sigma)

1,6M NaCl

stocker à 4°C

#### **iii- Protocole :**

- 1- Faire pousser 30 ml de culture bactérienne toute la nuit à 37°C
- 2- Centrifuger à 3000 rpm pendant 30 min
- 3- Resuspendre le culot par 200 µl de tampon P1
- 4- Ajouter 200 µl de tampon P2, mélanger doucement et incubé 5 min à température ambiante
- 5- Ajouter 200 µl de tampon P3, bien mélanger et incubé 15 min à 4°C
- 6- Centrifuger à 12 000 rpm pendant 30 min
- 7- Collecter 500 µl du surnageant dans un nouveau tube
- 8- Ajouter 500 µl de phénol/chloroform. Vortexer pendant 5 secondes
- 9- Centrifuger à 15 000 rpm pendant 30 min
- 10-Collecter la phase supérieure dans un nouveau tube et y ajouter 50 µl d'acétate d'ammonium
- 11-Ajouter 1 ml d'éthanol, bien mélanger et incubé à -80°C pendant 30 min.
- 12-Centrifuger à 15 000 rpm pendant 30 min
- 13-Reprendre le culot par 500 µl de Tris-EDTA, pH 8.0
- 14-Ajouter 500 µl de solution PEG
- 15-Incuber à 4°C pendant 1 heure.
- 16-Centrifuger à 15 000 rpm pendant 20 min

17-Laver le culot par 500 µl d'éthanol à 70%

18-Centrifuger à 15 000 rpm pendant 10 min, sécher le culot au speedvac (sans chauffage)

19-Prendre le culot par 20 µl d'H<sub>2</sub>O

#### **IV/ PURIFICATION DE FRAGMENTS D'ADN PAR MEMBRANE DEAE :**

**i- Références :** Schleicher & Schuell.

**ii-Matériels et solutions :**

Membrane DEAE (S&S NA-45).

Tampon NET :

0,15M NaCl

0,1mM EDTA

20mM Tris, pH 8

Tampon High salt NET :

1,0M NaCl

0,1mM EDTA

20mM Tris, pH 8

**iii- Protocole :**

- 1- Après séparation des différents fragments d'ADN sur un gel d'Agarose, insérer un fragment de la membrane DEAE devant la bande d'ADN qu'on veut purifier.
- 2- Continuer l'électrophorèse, jusqu'à ce que la bande d'ADN soit adsorbée sur la membrane DEAE.
- 3- La membrane est lavée rapidement par le tampon NET.
- 4- Placer la membrane DEAE dans un tube d'ependorf et ajouter 300 µl du tampon high salt NET.
- 5- Incuber à 75°C pendant 45 min.
- 6- Récupérer le tampon et précipiter l'ADN avec 2,5 volumes d'éthanol (30 min à -70°C).
- 7- Centrifuger à 10 000 g pendant 30 min.
- 8- Sécher le culot d'ADN et le reprendre dans 20 µl d'H<sub>2</sub>O.

#### **PARTIE II: CULTURE CELLULAIRE ET TRANSFECTION TRANSITOIRE:**

**A/ LIGNÉE CELLULAIRE :** COS 7 (cellules du rein de singe transformées par SV40)

N°ATCC : CRL 1651

N°ECACC : 87021302

Cette lignée est mise en culture dans le milieu DMEM à 10% de sérum de veau foetal.

**B/ TRANSFECTION TRANSITOIRE :**

**i- Références :**

Ce protocole a été adapté à partir de celui proposé par Pothier et coll.(1993).

## **ii-Conseils et astuces :**

Ce protocole a été adapté pour les cellules COS-7. Pour l'appliquer à d'autres lignées cellulaires, il faut déterminer le pH optimal du tampon HBS (entre 6,90 et 7,40).

## **iii-Matériels et solutions :**

Boîtes à six puits

Milieu de culture DMEM, supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal, 2mM glutamine, 100U/ml penicilline et 20U/ml streptomycine.

PBS 1X stérile et froid.

ADN carrier 10mg/ml (ADN du sperme de saumon).

Plasmides à transférer, purifier par colonnes quiagen.

### Solution HBS 2X :

280mM NaCl

40mM HEPES

1,4mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Filtré et stocké à -20°C.

### 2M CaCl<sub>2</sub> :

2M CaCl<sub>2</sub>

10mM HEPES

Ajuster au pH 5.5, filtré et stocké à -20°C.

## **iv-Protocole :**

1- Mettre 10<sup>4</sup> cellule par puit (diamètre 35 mm), ajouter 2ml du milieu DMEM complet.

2- Incuber toute la nuit à 37°C dans l'étuve à 5% CO<sub>2</sub>.

3- Changer le milieu, les cellules doivent être à 50% de la confluence.

4- Préparer le précipité ADN/calcium :

Pour chaque puit, mélanger dans cet ordre,

H<sub>2</sub>O (qsp 200 µl)

100 µl 2X HBS

1 µg pCH110 (vecteur codant pour la β-galactosidase)

les autres plasmides

Ajuster la quantité d'ADN finale à 20 µg par l'ADN carrier.

Ajouter 10 µl CaCl<sub>2</sub> au mélange (goutte à goutte)

5- incuber le mélange à température ambiante pendant 30 min (jusqu'à l'apparition d'un précipité blanchâtre).

6- Enlever le milieu des cellules

- 7- répartir uniformément le mélange de l'étape 5 sur les cellules
- 8- Incuber 15 min à 37°C
- 9- Ajouter 2 ml de DMEM complet
- 10-Incuber 16 heures à 37°C et 5%CO<sub>2</sub>.
- 11-Enlever le milieu et ajouter 10% de glycérol dans PBS 1X
- 12-Incuber 10 min à 37°C
- 13-Enlever la solution de glycérol et laver deux fois avec PBS 1X.
- 14-Ajouter 2 ml de DMEM complet.
- 15-Après 4 heures d'incubation, les cellules sont prêtes pour être soumises à nos conditions expérimentales.

### **C/ DOSAGE DE L'ACTIVITÉ CAT :**

#### **i-Conseils et astuces :**

A l'inverse de la technique qui utilise les plaques TLC, celle-ci fait appel à l'extraction par xylène. cette technique est rapide et donnent des résultats quantitatifs.

#### **ii-Matériels et solutions :**

Compteur de scintillation liquide (LKB 1214 Rackbeta)

##### Solution A :

15 mM Tris-HCl, pH8

60mM KCl

15mM NaCl

2mM EDTA

0,15mM Spermine

1mM DTT

0,5mM PMSF

ButyrylCoA (Sigma), 5mg/ml dans du DMSO

<sup>14</sup>C chloramphénicol (200 µCi/ml)

Xylène 100%

#### **iii-Protocole :**

- 1- Laver les cellules par du PBS 1X froid
- 2- Récupérer les cellules dans 1 ml de PBS 1X
- 3- Centrifuger à 3500 rpm pendant 10 min



- 4- Resuspendre le culot dans 150  $\mu$ l du tampon A
- 5- Réaliser 4 cycles de congélation/décongélation
- 6- Centrifuger à 15 000 rpm pendant 15 min à 4°C
- 7- Incuber le surnageant à 70°C pendant 10 min
- 8- Centrifuger à 15 000 rpm pendant 10 min, et récupérer le surnageant
- 9- Mélanger (par tube):
  - 2,5  $\mu$ l 2M Tris-HCl, pH 8
  - 2,5  $\mu$ l ButyrylCoA
  - 10 à 25  $\mu$ l d'extrait de l'étape 8
  - 10  $\mu$ l de 0,01  $\mu$ Ci/ $\mu$ l C<sup>14</sup> chloramphénicol
  - Qsp 50  $\mu$ l par H<sub>2</sub>O
- 10-Incuber pendant 90 min à 37°C
- 11-Ajouter 200  $\mu$ l de xylène. Vortexer pendant 15 secondes
- 12-Centrifuger à 10 000 rpm pendant 10 min
- 13-Récupérer la phase supérieure (contient le chloramphénicol acétylé)
- 14-Ajouter 100  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O, vortexer et centrifuger à 10 000 rpm pendant 5 min
- 15-Collecter la phase supérieure et mesurer la quantité de [14C]chloramphénicol acétylé au compteur à scintillation.

## **PARTIE III : PURIFICATION ET ANALYSE DE PROTEINES :**

### **A/ SUREXPRESSON ET PURIFICATION DE PROTEINES RECOMBINANTES :**

**i-Références :** Quiagen et Christophe Rachez.

**ii-Notes :** Ce protocole a été mis au point dans notre laboratoire par Christophe Rachez pour la purification du récepteur de l'acide rétinoïque humain (hRAR $\alpha$ ), mais il peut être appliqué également à n'importe quelle protéine portant six histidines.

**iii-Matériels et solutions :**

Milieu LB et antibiotiques (ampicilline et kanamycine)

2M IPTG (1g/2ml)

Lysozyme (200 mg/ml dans du PBS)

Deoxycholate (DOC) 5%

DNase I

1M MgCl<sub>2</sub>

Résine NiTA (Quiagen)

Imidazole

PBS 10X

Tampon PNI<sub>0</sub> :

2X PBS

0,4M NaCl

5mM β-mercaptoéthanol

Ajuster au pH 7.3

Tampon PNGI<sub>0</sub> :

2X PBS

0,4M NaCl

20% glycérol

Ajuster au pH 7.3

Tampon I<sub>1000</sub> :

1M Imidazole

2X PBS

Ajuster au pH 7.3

Tampon PNGI<sub>40</sub> (50ml) :

10ml I<sub>1000</sub> + 40 ml PNGI<sub>0</sub>

Tampon PNGI<sub>200</sub> (50ml) :

2ml I<sub>1000</sub> + 48 ml de PNGI<sub>0</sub>

**iv-Protocole :**

**α/ Préparation de l'extrait :**

- 1- Lancer une préculture bactérienne (50 ml) toute la nuit à 37°C.
- 2- Inoculer 500 ml de LB par la préculture.
- 3- Induire la culture par 1mM IPTG, quant la DO<sub>600</sub> de celle-ci atteint 0,6 à 0,8.
- 4- Laisser incuber à 37°C pendant 4 à 5 heures.
- 5- Centrifuger à 4000 rpm pendant 30 min, à 4°C.
- 6- Resuspendre le culot par du PBS 1X froid.
- 7- Centrifuger comme dans l'étape 5.
- 8- Reprendre le culot par 10 ml de PNI<sub>0</sub>β froid.
- 9- Ajouter du Lysozyme (150µg/ml).
- 10- Incuber 30 min dans la glace.
- 11- Ajouter du DOC (0,05%) et incuber 30 min dans la glace.
- 12- Soumettre l'extrait à 5 cycle d'ultasons (amplitude = 15%, temps = 5 secondes).
- 13- Centrifuger à 10 000g, pendant 30 min à 4°C.

Le surnageant est prêt pour l'étape de phosphorylation.

### **β/Purification de la protéine recombinante :**

- 14-500 µl de la résine NiTA est placé dans une colonne.
- 15-La résine est lavée par 10 ml de PNGI<sub>0</sub>.
- 16-Appliquer 5 ml du surnageant de l'étape 13 sur la résine (avec un débit de 10ml/heure).
- 17-Laver la résine par PNGI<sub>0</sub> jusqu'à ce que la DO<sub>280</sub> = 0 (environ 80 ml).
- 18-Laver avec PNGI<sub>40</sub> toute la nuit (environ 200ml).
- 19-Eluer la protéine recombinante par PNGI<sub>200</sub> (collecter des fractions de 2ml).

### **B/ HETERODIMERISATION DE RAR/RXR DANS UN MILIEU HETEROGENE :**

**i-Référence :** (Kurokawa et al., 1993) et Christophe Rachez

#### **ii-Matériels et solutions :**

- Plaque ELISA
- [35S] RXR traduit in vitro
- PBS 1X
- Tampon de liaison :

-Hepes	: 20mM (pH 7.8)
-KCl	: 130mM
-βmercaptoéthanol	: 1mM
- Nonidet-P40	: 0,05%
-Glycérol	: 20%

- Tampon A : 0,1% SDS + 0,4M HCl.

#### **iii\_Protocole :**

- 1- Déposer 50 µl de hRARα purifié (20µg/ml) dans chaque puit d'une plaque ELISA. Diluer par 100µl de PBS 1X et incuber toute la nuit à 4°C sur un agitateur rotatif.
- 2- Laver deux fois par 100µl PBS 1X.
- 3- Ajouter 150 µl de 5% sérum dans du PBS 1X, incuber à 4°C pendant 2 à 3 heures.
- 4- Laver deux fois par 100µl PBS 1X.
- 5- Mélanger 25 µl [<sup>35</sup>S]RXR et 725µl du tampon de liaison, déposer 30µl du mélange par puit, incuber 1 à 2 heures à 4°C sur un agitateur rotatif.
- 6- Laver 3 à 4 fois par le tampon de liaison.
- 7- Reprendre les protéines par 100µl du tampon A. Déterminer la radioactivité des échantillons par

le compteur à scintillation.

## **C/ PHOSPHORYLATION IN VITRO DE hRAR $\alpha$ PAR LA PKC :**

### **i-Matériels et Solutions :**

- hRAR $\alpha$  purifié par le système His-tag en conditions non dénaturantes.
- PKC (1860U/mg; 59,14 $\mu$ g/ml)(#CALBIOCHEM)
- Tampon de phosphorylation (10X) :

Hepes	: 200mM
CaCl <sub>2</sub>	: 20mM
$\beta$ -mercaptoéthanol	: 100mM
MgCL <sub>2</sub>	: 100mM
Phosphatidylsérine	: 15 $\mu$ g/ml
TPA	: 100mM

- [32P]ATP (1mCi/ml)

### **ii-Protocole :**

#### **1- Réaction de phosphorylation :**


hRAR $\alpha$	: 20 $\mu$ g (20 $\mu$ l)
PKC	: 0,5 $\mu$ l
Tampon	: 2,5 $\mu$ l
[32P]ATP	: 2,5 $\mu$ l

#### **2- Incuber 20 min à 30°C**

#### **3- Stopper la réaction en ajoutant par 25% TCA.**

## **D/HYDROLYSE ACIDE DES PROTEINES MARQUEES AU [32P] :**

**i-Note :** Ce protocole nous permet d'identifier les résidus phosphorylés sur une protéine (phosphosérine, phosphotyrosine et phosphothréonine). Les résidus phosphohistidine sont instables dans les conditions acides.

 la pyridine est très toxique, travailler sous une hotte chimique.

### **ii-Matériels et solutions :**

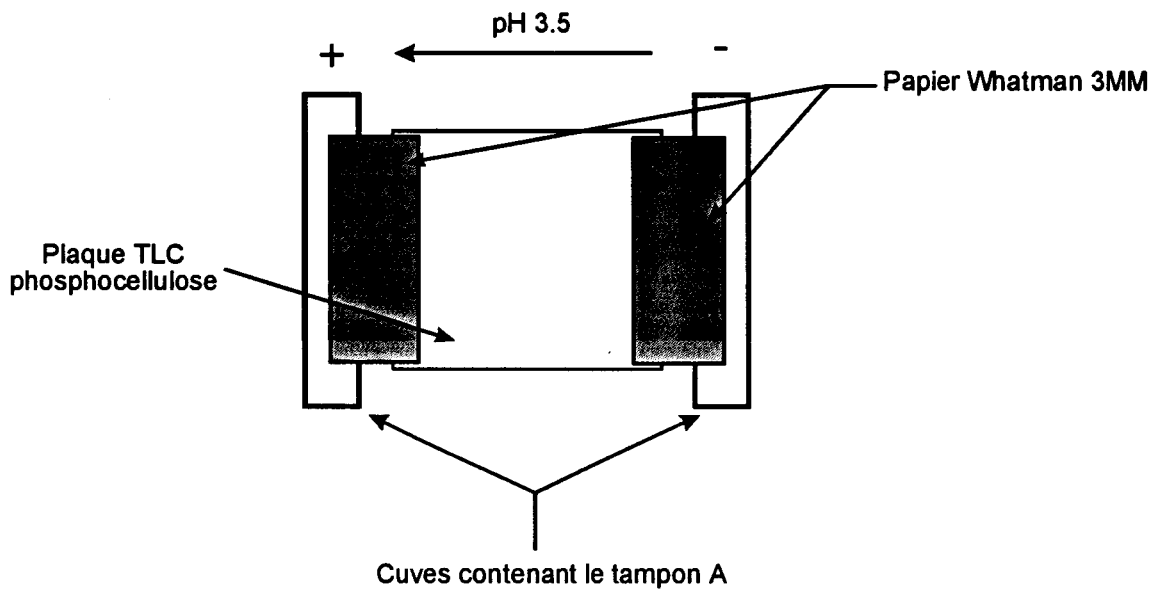
- Membrane PDVF
- Phosphotyrosine, phosphosérine et phosphothréonine (#Sigma)
- Méthanol
- Plaque TLC cellulose (#Aldrich)

- Pyridine
- [32P]ATP
- HCl 5,7N
- Azote (gaz)
- Ninhydrine et un vaporisateur
- Matériel d'électrophorèse et de transfert
- Appareil d'électrophorèse horizontal

**Tampon A** : Acide acétique 5%  
 Pyridine 0,5%  
 pH 3,5

**iii-Protocole :**

- 1- Après phosphorylation, les protéines sont séparées par PAGE-SDS 12%.
- 2- Electrotransfert sur membrane PVDF :
  - a- Laver la membrane pendant 10 min avec du méthanol
  - b- Laver la membrane pendant 30 min avec le tampon de transfert
  - c- Assembler l'appareil de transfert et effectuer l'électrotransfert pendant 3 heures à 60 volts
- 3- Récupérer la membrane et laver 3 fois avec de l'eau distillé (1 litre)
- 4- Sécher et autoradiographier la membrane
- 5- Couper les bandes de la membrane qui contiennent la protéine marquée
- 6- Imbiber ces morceaux de la membrane par du méthanol (1 min) puis avec de l'eau (1 min)
- 7- Enlever l'excès d'eau par un papier whatman
- 8- Placer les morceaux dans un nouveau tube Eppendorf contenant 200 µl d'HCl 5,7N
- 9- Incuber à 110°C pendant 1heure
- 10-Centrifuger à 15000 rpm pendant 2 min
- 11-Transférer le surnageant vers un nouveau tube et sécher au speedvac
- 12-Reprendre le culot par 10 à 20µl du tampon A et ajouter 10µg de chaque acide aminé phosphorylé
- 13-Déposer l'échantillon sur une plaque TLC (en minimisant la surface du dépôt, diamètre inférieur à 5 mm). Sécher avec un sèche cheveux.



**Figure 40 : Assemblage de l'appareil d'électrophorèse pour la séparation des phosphoaminoacides**

- 14-Remplir les cuves d'électrophorèse avec le tampon A
- 15-Imbiber 4 feuilles de papier whatman 3MM avec le tampon A
- 16-Disposer les comme c'est illustré dans la Figure 36
- 17-Lancer l'électrophorèse pendant 30 min à 1000 volts (30mA) à température ambiante
- 18-La plaque TLC est séchée et colorée à la ninhydrine :
  - a- Vaporiser de façon homogène de la ninhydrine sur la plaque
  - b- Chauffer la plaque pendant 5-10 min à 100°C, jusqu'à l'apparition des taches bleues correspondant aux acides aminés.
- 19-La plaque est soumise à une autoradiographie à -70°C.

## **E/ DETERMINATION DES SITES PHOSPHORYLES :**

### **i-Notes :**

Ce protocole est très long, mais il permet de répondre à deux exigences fondamentales : la pureté et la quantité. En effet, pour pouvoir déterminer sans ambiguïté les sites de phosphorylation il faudrait veiller à travailler avec une protéine très pur ( $\approx 100\%$ ) et en quantité suffisante (minimum 50 $\mu$ g). Ce protocole est subdivisé en deux parties :

- La purification à homogénéité
- La digestion enzymatique, analyse par RP-HPLC et microséquençage

### **ii-Purification :**

- 1- hRAR partiellement purifié par le système His-tag est mélangé avec du hRAR<sup>[32P]</sup>, et analysé sur un gel préparatif PAGE-SDS 12%.
- 2- Ce gel est coloré par une solution de KCl :
  - a- Rincer le gel avec de l'eau
  - b- Incuber le gel à 4°C pendant 30 min avec 0,25M KCl, 1mM DTT, les bandes correspondantes aux protéines apparaissent blanches sur un fond noir

☞ - Eviter la coloration au bleu de coomassie. C'est une technique qui fixe les protéines et entraîne une diminution très importante du rendement d'électroélution

- 3- Couper les bandes qui contiennent la protéine qui nous intéressent et les soumettre à une électroélution dans l'appareil "BIOTRAP" (Scheleicher & Schuell), pendant 4-5 heures à 200volts dans du TAE 0,5X.

-Pour obtenir une solution de protéine exempté de tris et de glycine on effectue une contre électroélution dans 10mM bicarbonate d'ammonium, 0,1% SDS à 200volts, 2 fois 2 heures.

-Pour se débarrasser de l'excès du SDS, l'électroéluat est soumis à une précipitation au TCA:

a- Ajouter du TCA 50%, goutte à goutte à l'électroéluat jusqu'à atteindre 20%

b- Bien mélanger et incubé 2 heures à 4°C

c- Centrifuger à 10000g pendant 15 min à 4°C

d- Laver le culot par 500µl d'Ethanol froid

e- Centrifuger à 10000g pendant 5 min à 4°C

f- Sécher le culot au speedvac

### iii-Digestion enzymatique, RP-HPLC et microséquençage :

1- Le culot est repris par 50µl de l'acide performique, incubé 1 heure à 4°C

2- Diluer par 0,5ml d'eau distillée, sécher au speedvac

3- Resuspendre le culot (contenant la protéine oxydée) dans 50µl de bicarbonate d'ammonium pH 8.15

4- Ajouter 2µg de TPCK-Trypsin (1/50e) et incubé à 37°C pendant 3 heures

5- Vortexer 40 secondes, centrifuger 1 min à 10000g. Ajouter encore 2 µg (1/25e) de TPCK-Trypsine et incubé à 37°C toute la nuit.

6- Le mélange tryptique est séché au speedvac et repris dans le tampon A (100% H<sub>2</sub>O et 0,1% TFA)

7- L'échantillon est analysé par RP-HPLC :

a- Une colonne C18 Deltapak semipréparative est équilibrée par le tampon A pendant 2 heures avec un débit de 2 ml/min.

b- La séparation des peptides tryptique se fait par un gradient d'acétonitrile :

Temps (min)	A (%)	B (%)
0 - 5	100	0
15 - 175	20	80
175 - 177	100	0

Tampon B : 20% H<sub>2</sub>O + 80% Acétonitrile (Baker) + TFA (0,085%)

Les paramètres de l'analyse sont :

- AUFs : 0,250
- Pression : 500 psi
- Débit : 0,5ml/min
- Longueur d'onde : 220 nm

8- Les pics radioactifs sont collectés, lyophilisés et microséquencés dans le service du Dr. Sautière



## **BIBLIOGRAPHIE**

- Abe, H., S. Tamura, and H. Kondo.** 1992.  
Localization of mRNA for protein phosphatase 2C in the brain of adult rats.  
*Brain Res. Mol. Brain Res.* **13**:283-288.
- Aihara, H., Y. Asaoka, K. Yoshida, and Y. Nishizuka.** 1991.  
Sustained activation of protein kinase C is essential to HL-60 cell differentiation to macrophage.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:11062-11066.
- Aitken, A., C. B. Klee, and P. Cohen.** 1984.  
The structure of the B subunit of calcineurin.  
*Eur. J. Biochem.* **139**:663-671.
- Alessi, D., L. K. Macdougall, M. M. Sola, M. Ikebe, and P. Cohen.** 1992.  
The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1.  
*Eur. J. Biochem.* **210**:1023-1035.
- Ali, S., D. Metzger, J. M. Bornert, and P. Chambon.** 1993.  
Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor-A/B region.  
*EMBO J.* **12**:1153-1160.
- Allan, G. F., S. Y. Tsai, M. J. Tsai, and B. W. O'Malley.** 1992.  
Ligand-Dependent conformational changes in the progesterone receptor are necessary for events that follow DNA binding.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:11750-11754.
- Alles, A. J. and K. K. Sulik.** 1990.  
Retinoic acid-induced spina bifida: evidence for a pathogenetic mechanism.  
*Development* **108**:73-81.
- Arens, J. F. and D. A. van Dorp.** 1946.  
*Nature* **157**:190-191.
- Arnold, S. F., J. D. Obourn, H. Jaffe, and A. C. Notides.** 1994.  
Serine 167 is the major estradiol-induced phosphorylation site on the human estrogen receptor.  
*Mol. Endocrinol.* **8**:1208-1214.
- Arnold, S. F., J. D. Obourn, H. Jaffe, and A. C. Notides.** 1995.  
Phosphorylation of the human estrogen receptor on tyrosine 537 in vivo and by src family tyrosine kinases in vitro.  
*Mol. Endocrinol.* **9**:24-33.
- Asaoka, Y., M. Oka, K. Yoshida, and Y. Nishizuka.** 1991.  
Metabolic rate of membrane-permeant diacylglycerol and its relation to human resting T-lymphocyte activation.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:8681-8685.
- Aufliegner, M., E. Helmer, J. Casanova, B. M. Raaka, and H. H. Samuels.** 1993.  
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.* **13**:5725-5737.
- Azzi, A., Boscoboinik, D., and Hensey, C.** 1992.  
The protein kinase C family  
*Eur. J. Biochem.* **208** : 547-557.
- Bacher, N., Y. Zisman, E. Berent, and E. Livneh.** 1991.  
Isolation and characterization of PKC-L, a new member of the protein kinase C-related gene family specifically expressed in lung, skin, and heart [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1992 Mar;12(3):1404].  
*Mol. Cell Biol.* **11**:126-133.
- Bagchi, M. K., S. Y. Tsai, M. J. Tsai, and B. W. O'Malley.** 1992.  
Ligand and DNA-Dependent Phosphorylation of Human Progesterone Receptor In vitro.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:2664-2668.
- Ballou, L. M., D. L. Brautigan, and E. H. Fischer.** 1983.  
Subunit structure and activation of inactive phosphorylase phosphatase.  
*Biochemistry* **22**:3393-3399.
- Bavik, C. O., U. Eriksson, R. A. Allen, and P. A. Peterson.** 1991.  
Identification and partial characterization of a retinal pigment epithelial membrane receptor for plasmal retinol-binding protein.  
*J. Biol. Chem.* **266**:14978-14985.
- Bentley, D. L. and M. Groudine.** 1986.  
A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells.  
*Nature* **321**:702-706.
- Berkenstam, A., M. del Mar Vivanco-Ruiz, D. Barrettino, M. Horikoshi, and H. G. Stunnenberg.** 1992.  
Cooperativity in transactivation between retinoic acid receptor and TFIID requires an activity analogous to E1A.  
*Cell* **69**:401-412.
- Berridge, M. J.** 1987. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers.  
*Annu. Rev. Biochem.* **56**:159-193.
- Berry, N. and Y. Nishizuka.** 1990.

Protein kinase C and T cell activation.  
*Eur. J. Biochem.* **189**:205-214.

**Buellens, M., A. Van Eynde, W. Stalmans, and M. Bollen.** 1992.  
The isolation of novel inhibitory polypeptides of protein phosphatase 1 from bovine thymus nuclei.  
*J. Biol. Chem.* **267**:16538-16544.

**Bhat, M. K., K. Ashizawa, and S. Y. Cheng.** 1994.  
Phosphorylation enhances the target gene sequence-dependent dimerization of thyroid hormone receptor with retinoid X receptor.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:7927-7931.

**Bhat, M. K., C. Parkison, P. Mcphie, C. M. Liang, and S. Y. Cheng.** 1993.  
Conformational changes of human beta-1-Thyroid hormone receptor induced by binding of 3,3',5-Triiodo-L-thyronine.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**:385-392.

**Blomhoff, R., M. H. Green, T. Berg, and K. R. Norum.** 1990.  
Transport and storage of vitamin A.  
*Science* **250**:399-404.

**Blumberg, B., D. J. Mangelsdorf, J. A. Dyck, D. A. Bittner, R. M. Evans, and E. M. De Robertis.** 1992.  
Multiple Retinoid-Responsive Receptors in a Single Cell -Families of Retinoid X Receptors and Retinoic Acid Receptors in the *Xenopus* Egg.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:2321-2325.

**Bodwell, J. E., J. M. Hu, E. Orti, and A. Munck.** 1995.  
Hormone-induced hyperphosphorylation of specific phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor.  
*J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **52**:135-140.

**Boise, L. H., K. M. Gorse, and E. H. Westin.** 1992.  
Multiple mechanisms of regulation of the human c-myc gene during myelomonocytic differentiation.  
*Oncogene* **7**:1817-1825.

**Bollag, W. and E. E. Holdener.** 1992.  
Retinoids in cancer prevention and therapy.  
*Ann. Oncol.* **3**:513-526.

**Bollen, M. and W. Stalmans.** 1992.  
The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases.  
*Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**:227-281.

**Boncinelli, E., A. Simeone, D. Acampora, and F. Mavilio.** 1991.  
HOX Gene Activation by Retinoic Acid.  
*Trends Genet.* **7**:329-334.

**Borner, C., I. Filipuzzi, M. Wartmann, U. Eppenberger, and D. Fabbro.** 1989.

Biosynthesis and posttranslational modifications of protein kinase C in human breast cancer cells.  
*J. Biol. Chem.* **264**:13902-13909.

**Bourguet, W., M. Ruff, P. Chambon, H. Gronemeyer, and D. Moras.** 1995.  
Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha.  
*Nature* **375**:377-382.

**Bousquet, I. and P. Sarthou.** 1995.  
Un suicide sous contrôle.  
*Biofutur Juillet-Août*:16-22.

**Bouzinba Segard, H., X. T. Fan, M. Perderiset, and M. Castagna.** 1994.  
Synergy between phorbol esters and retinoic acid in inducing protein kinase C activation.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**:112-119.

**Boylan, J. F. and L. J. Gudas.** 1991.  
Overexpression of the cellular retinoic acid binding protein-I (CRABP-I) results in a reduction in differentiation-specific gene expression in F9 teratocarcinoma cells.  
*J. Cell. Biol.* **112**:965-979.

**Brand, N., M. Petkovich, A. Krust, P. Chambon, H. de The, A. Marchio, P. Tiollais, and A. Dejean.** 1988.  
Identification of a second human retinoic acid receptor.  
*Nature* **332**:850-853.

**Brown, T. A. and H. F. DeLuca.** 1990.  
Phosphorylation of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor. A primary event in 1,25-dihydroxyvitamin D3 action.  
*J. Biol. Chem.* **265**:10025-10029.

**Burns, D. J. and R. M. Bell.** 1991.  
Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains.  
*J. Biol. Chem.* **266**:18330-18338.

**Burns, D. J., J. Bloomenthal, M. H. Lee, and R. M. Bell.** 1990.  
Expression of the alpha, beta II, and gamma protein kinase C isozymes in the baculovirus-insect cell expression system. Purification and characterization of the individual isoforms.  
*J. Biol. Chem.* **265**:12044-12051.

**Busch, S. J. and P. Sassone-Corsi.** 1990.  
Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains.  
*Trends Genet.* **6**:36-40.

**Capeillere Blandin, C., G. Chauvet, F. Tresset, and B. Descamps Latscha.** 1990.  
Development of cytochrome b558 and oxidative metabolism in human granulocytes, monocytes and during differentiation of HL-60 and U 937 cells.  
*Biol. Cell* **69**:73-82.

- Capitani, S., P. R. Girard, G. J. Mazzei, J. F. Kuo, R. Berezney, and F. A. Manzoli.** 1987.  
Immunochemical characterization of protein kinase C in rat liver nuclei and subnuclear fractions.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**:367-375.
- Castagna, M., Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa, and Y. Nishizuka.** 1982.  
Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters.  
*J. Biol. Chem.* **257**:7847-7851.
- Cavaillès, V., S. Dauvois, F. Lhorset, G. Lopez, S. Hoare, P. J. Kushner, and M. G. Parker.** 1995.  
Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor.  
*EMBO J.* **14**:3741-3751.
- Cavey, M. T., B. Martin, I. Carlván, and B. Shroot.** 1990.  
In vitro binding of retinoids to the nuclear retinoic acid receptor alpha.  
*Anal. Biochem.* **186**:19-23.
- Cazaubon, S., F. Bornancin, and P. J. Parker.** 1994.  
Threonine-497 is a critical site for permissive activation of protein kinase C alpha.  
*Biochem. J.* **301**:443-448.
- Cazaubon, S., C. Webster, L. Camoin, A. D. Strosberg, and P. Parker.** 1990.  
Effector-dependent conformational changes in protein kinase C gamma through epitope mapping with inhibitory monoclonal antibodies.  
*Eur. J. Biochem.* **194**:799-804.
- Cazaubon, S. M. and P. J. Parker.** 1993.  
Identification of the phosphorylated region responsible for the permissive activation of protein kinase C.  
*J. Biol. Chem.* **268**:17559-17563.
- Chambon, P.** 1995.  
The molecular and genetic dissection of the retinoid signaling pathway.  
*Recent. Progress. in Hormone. Re.* **50**:317-332.
- Chapline, C., K. Ramsay, T. Klauck, and S. Jaken.** 1993.  
Interaction cloning of protein Kinase-C substrates.  
*J. Biol. Chem.* **268**:6858-6861.
- Chen, J. D. and R. M. Evans.** 1995.  
A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors.  
*Nature* **377**:454-457.
- Chen, S. C., G. Kramer, and B. Hardesty.** 1989.  
Isolation and partial characterization of an Mr 60,000 subunit of a type 2A phosphatase from rabbit reticulocytes.  
*J. Biol. Chem.* **264**:7267-7275.
- Chen, Z. X., Y. Q. Xue, R. Zhang, R. F. Tao, X. M. Xia, C. Li, W. Wang, W. Y. Zu, X. Z. Yao, and B. J. Ling.** 1991.  
A clinical and experimental study on all-trans retinoic acid-treated acute promyelocytic leukemia patients.  
*Blood* **78**:1413-1419.
- Chen, Z. Z., J. C. McGuire, K. L. Leach, and J. C. Cambier.** 1987.  
Transmembrane signaling through B cell MHC class II molecules: anti-Ia antibodies induce protein kinase C translocation to the nuclear fraction.  
*J. Immunol.* **138**:2345-2352.
- Cohen, P.** 1989.  
The structure and regulation of protein phosphatases.  
*Annu. Rev. Biochem.* **58**:543-508.
- Collins, S. J.** 1987.  
The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression.  
*Blood* **70**:1233-1244.
- Conlon, R. A. and J. Rossant.** 1992.  
Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic expression of murine Hox-2 genes in vivo.  
*Development* **116**:357-368.
- Crettaz, M., A. Baron, G. Siegenthaler, and W. Hunziker.** 1990.  
Ligand specificities of recombinant retinoic acid receptors RAR alpha and RAR beta.  
*Biochem. J.* **272**:391-397.
- Cuthbertson, K. S. and T. R. Chay.** 1991.  
Modelling receptor-controlled intracellular calcium oscillators.  
*Cell Calcium* **12**:97-109.
- Danielian, P. S., R. White, J. A. Lees, and M. G. Parker.** 1992.  
Identification of a Conserved Region Required for Hormone Dependent Transcriptional Activation by Steroid Hormone Receptors.  
*EMBO J.* **11**:1025-1033.
- Davies, P. J., M. P. Murtaugh, W. T. Moore, Jr., G. S. Johnson, and D. Lucas.** 1985.  
Retinoic acid-induced expression of tissue transglutaminase in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells.  
*J. Biol. Chem.* **260**:5166-5174.
- Davis, K. D., T. J. Berrodin, J. E. Stelmach, J. D. Winkler, and M. A. Lazar.** 1994.  
Endogenous retinoid X receptors can function as hormone receptors in pituitary cells.  
*Mol. Cell. Biol.* **14**:7105-7110.
- de The, H., M. M. Vivanco-Ruiz, P. Tiollais, H. G. Stunnenberg, and A. Dejean.** 1990.

- Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene.  
*Nature* **343**:177-180.
- Denner, L. A., N. L. Weigel, B. L. Maxwell, W. T. Schrader, and B. W. O'Malley.** 1990.  
 Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation.  
*Science* **250**:1740-1743.
- Devalia, V., N. S. B. Thomas, P. J. Roberts, H. M. Jones, and D. C. Linch.** 1992.  
 Down-Regulation of Human Protein Kinase-C-alpha Is Associated with Terminal Neutrophil Differentiation.  
*Blood* **80**:68-76.
- Dlugosz, A. A., H. Mischak, J. F. Mushinski, and S. H. Yuspa.** 1992.  
 Transcripts encoding protein kinase C-alpha, -delta, -epsilon, -zeta, and -eta are expressed in basal and differentiating mouse keratinocytes in vitro and exhibit quantitative changes in neoplastic cells.  
*Mol. Carcinog.* **5**:286-292.
- Dlugosz, A. A. and S. H. Yuspa.** 1993.  
 Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C.  
*J. Cell Biol.* **120**:217-225.
- Dolle, P., E. Ruberte, P. Kastner, M. Petkovich, C. M. Stoner, L. J. Gudas, and P. Chambon.** 1989.  
 Differential expression of genes encoding alpha, beta and gamma retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse.  
*Nature* **342**:702-705.
- Dolle, P., E. Ruberte, P. Leroy, G. Morriss Kay, and P. Chambon.** 1990.  
 Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis.  
*Development* **110**:1133-1151.
- Dollé, P., E. Ruberte, P. Kastner, M. Petkovich, C. M. Stoner, L. J. Gudas, and P. Chambon.** 1989.  
 Differential expression of genes encoding alpha, beta and gamma retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse.  
*Nature* **342**:702-705.
- Dollé, P., E. Ruberte, P. Leroy, G. Morriss-Kay, and P. Chambon.** 1990.  
 Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis.  
*Development* **110**:1133-1151.
- Durand, B., M. Saunders, C. Gaudon, B. Roy, R. Losson, and P. Chambon.** 1994.  
 Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cisretinoic acid receptor: Presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity.  
*EMBO J.* **13**:5370-5382.
- Durand, B., M. Saunders, P. Leroy, M. Leid, and P. Chambon.** 1992.  
 All-Trans and 9-Cis Retinoic Acid Induction of CRABP II Transcription Is Mediated by RAR-RXR Heterodimers Bound to DR1 and DR2 Repeated Motifs.  
*Cell* **71**:73-85.
- Dutil, E. M., L. M. Keranen, A. A. DePaoli Roach, and A. C. Newton.** 1994.  
 In vivo regulation of protein kinase C by trans-phosphorylation followed by autophosphorylation.  
*J. Biol. Chem.* **269**:29359-29362.
- Ebeling, J. G., G. R. Vandenberg, L. J. Kuhn, B. R. Ganong, R. M. Bell, and J. E. Nield.** 1985.  
 Diacylglycerols mimic phorbol diester induction of leukemic cell differentiation.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**:815-819.
- Eckhoff, C., W. Wittfoht, H. Nau, and W. Slikker, Jr.** 1990.  
 Characterization of oxidized and glucuronidated metabolites of retinol in monkey plasma by thermospray liquid chromatography/mass spectrometry.  
*Biomed. Environ. Mass. Spectrom.* **19**:428-433.
- Eichele, G.** 1989.  
 Retinoids and vertebrate limb pattern formation.  
*Trends Genet.* **5**:246-251.
- Eriksson, U., E. Hansson, M. Nilsson, K. H. Jönsson, J. Sundelin, and P. A. Peterson.** 1986.  
 Increased levels of several retinoid binding proteins resulting from retinoic acid-induced differentiation of F9 cells.  
*Cancer Res.* **46**:717-722.
- Evans, R. M.** 1988.  
 The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.  
*Science* **240**:889-895.
- Fawell, S. E., J. A. Lees, R. White, and M. G. Parker.** 1990.  
 Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor.  
*Cell* **60**:953-962.
- Fields, A. P., S. M. Pincus, A. S. Kraft, and W. S. May.** 1989.  
 Interleukin-3 and bryostatin 1 mediate rapid nuclear envelope protein phosphorylation in growth factor-dependent FDC-P1 hematopoietic cells. A possible role for nuclear protein kinase C.

- J. Biol. Chem. **264**:21896-21901.
- Filipuzzi, I., D. Fabbro, and R. Imber.** 1993.  
Unphosphorylated alpha-PKC exhibits phorbol ester binding but lacks protein kinase activity in vitro.  
J. Cell Biochem. **52**:78-83.
- Fiorella, P. D. and J. L. Napoli.** 1991.  
Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in *Escherichia coli*.  
J. Biol. Chem. **266**:16572-16579.
- Flint, A. J., R. D. Paladini, and D. E. Koshland, Jr.** 1990.  
Autophosphorylation of protein kinase C at three separated regions of its primary sequence.  
Science **249**:408-411.
- Folkers, G. E., B. M. Vanderleede, and P. T. Vandersaag.** 1993.  
The retinoic acid receptor-beta-2 contains 2 separate Cell-Specific transactivation domains, at the N-Terminus and in the Ligand-Binding domain.  
Mol. Endocrinol. **7**:616-627.
- Folkers, G. E., and P. T. Vandersaag.** 1995.  
Adenovirus E1A functions as a cofactor for retinoic acid receptor  $\beta$  (RAR $\beta$ ) through direct interaction with RAR $\beta$ .  
M.C.B. **15**:5868-5878.
- Forman, B. M. and H. H. Samuels.** 1990.  
Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: the leucine regulatory zipper model.  
Mol. Endocrinol. **4**:1293-1301.
- Forman, B. M., K. Umesono, J. Chen, and R. M. Evans.** 1995.  
Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors.  
Cell **81**:541-550.
- Forman, B. M., C. R. Yang, M. Au, J. Casanova, J. Ghysdael, and H. H. Samuels.** 1989.  
A domain containing leucine-zipper-like motifs mediate novel in vivo interactions between the thyroid hormone and retinoic acid receptors.  
Mol. Endocrinol. **3**:1610-1626.
- Freedman, L. P., B. F. Luisi, Z. R. Korszun, R. Basavappa, P. B. Sigler, and K. R. Yamamoto.** 1988.  
The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain.  
Nature **334**:543-546.
- Gamard, C. J., G. C. Blobe, Y. A. Hannun, and L. M. Obeid.** 1994.  
Specific role for protein kinase C beta in cell differentiation.  
Cell Growth Differ. **5**:405-409.
- Gaub, M. P., C. Rochette-Egly, Y. Lutz, S. Ali, H. Matthes, I. Scheuer, and P. Chambon.** 1992.  
Immunodetection of multiple species of retinoic acid alpha: evidence for phosphorylation.  
Exp. Cell Res. **201**:335-346.
- Gehring, W. J.** 1987.  
Homeo boxes in the study of development.  
Science **236**:1245-1252.
- Gehring, W. J., M. Muller, M. Affolter, A. Percival Smith, M. Billeter, Y. Q. Qian, G. Otting, and K. Wuthrich.** 1990.  
The structure of the homeodomain and its functional implications.  
Trends. Genet. **6**:323-329.
- Gherzi, R., B. Sparatore, M. Patrone, A. Sciutto, and P. Briata.** 1992.  
Protein kinase C mRNA levels and activity in reconstituted normal human epidermis: relationships to cell differentiation.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. **184**:283-291.
- Gibson, G., A. Schier, P. LeMotte, and W. J. Gehring.** 1990.  
The specificities of Sex combs reduced and Antennapedia are defined by a distinct portion of each protein that includes the homeodomain.  
Cell **62**:1087-1103.
- Giguere, V., S. Lyn, P. Yip, C. H. Siu, and S. Amin.** 1990.  
Molecular cloning of cDNA encoding a second cellular retinoic acid-binding protein.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**:6233-6237.
- Giguere, V., E. S. Ong, P. Segui, and R. M. Evans.** 1987.  
Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid.  
Nature **330**:624-629.
- Giguere, V., M. Shago, R. Zirngibl, P. Tate, J. Rossant, and S. Varmuza.** 1990.  
Identification of a novel isoform of the retinoic acid receptor gamma expressed in the mouse embryo.  
Mol. Cell. Biol. **10**:2335-2340.
- Gill, G. and M. Ptashne.** 1987.  
Mutants of GAL4 protein altered in an activation function.  
Cell **51**:121-126.
- Glass, C. K.** 1994.  
Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers.  
Endocrine Rev. **15**:391-407.
- Glass, C. K., O. V. Devary, and M. G. Rosenfeld.** 1990.  
Multiple cell type-specific proteins differentially regulate target sequence recognition by the alpha retinoic acid receptor.  
Cell **63**:729-738.
- Glass, C. K., R. Franco, C. Weinberger, V. R. Albert, R. M. Evans, and M. G. Rosenfeld.** 1987.

A c-erb-A binding site in rat growth hormone gene mediates trans-activation by thyroid hormone.  
*Nature* **329**:738-741.

**Glass, C. K., S. M. Lipkin, O. V. Devary, and M. G. Rosenfeld.** 1989.

Positive and negative regulation of gene transcription by a retinoic acid-thyroid hormone receptor heterodimer.  
*Cell* **59**:697-708.

**Glineur, C., M. Bailly, and J. Ghysdael.** 1989.  
The c-erbA $\alpha$ -encoded thyroid hormone receptor is phosphorylated in its amino terminal domain by casein kinase II.  
*Oncogene* **4**:1247-1254.

**Goldberg, Y., C. Glineur, J.-C. Gesquiere, A. Ricouart, J. Sap, B. Venström, and J. Ghysdael.** 1988.  
Activation of protein kinase C or cAMP-dependent protein kinase increases phosphorylation of the c-erbA-encoded thyroid hormone receptor and of the v-erbA-encoded protein.  
*EMBO J.* **7**:2425-2433.

**Goodman, D. S.** 1984.  
Plasma retinol-binding protein.  
The retinoids, edited by M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman. Orlando, FL, Academic Press. **2**:41-88.

**Gopalakrishna, R., S. H. Barsky, T. P. Thomas, and W. B. Anderson.** 1986.  
Factors influencing chelator-stable, detergent-extractable, phorbol diester-induced membrane association of protein kinase C. Differences between Ca<sup>2+</sup>-induced and phorbol ester-stabilized membrane bindings of protein kinase C.  
*J. Biol. Chem.* **261**:16438-16445.

**Green, S., V. Kumar, I. Theulaz, W. Wahli, and P. Chambon.** 1988.  
The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity.  
*EMBO J.* **7**:3037-3044.

**Grief, H., J. Ben-Chaim, T. Shimon, E. Bechor, H. Eldar, and E. Livneh.** 1992.  
*Mol. Cell Biol.* **12**:1304-1311.

**Gruber, J. R., S. Ohno, and R. M. Niles.** 1992.  
Increased Expression of Protein Kinase-C alpha Plays a Key Role in Retinoic Acid-Induced Melanoma Differentiation.  
*J. Biol. Chem.* **267**:13356-13360.

**Grunberg, S. M. and L. M. Itri.** 1987.  
Phase II study of isotretinoin in the treatment of advanced non-small cell lung cancer.  
*Cancer Treat. Rep.* **71**:1097-1098.

**Gudas, L. J.** 1994.  
Retinoids and vertebrate development.  
*J. Biol. Chem.* **269**:15399-15402.

**Hagiwara, M., A. Alberts, P. Brindle, J. Meinkoth, J. Feramisco, T. Deng, M. Karin, S. Shenolikar, and M. Montminy.** 1992.  
Transcriptional Attenuation Following cAMP Induction Requires PP-1-Mediated Dephosphorylation of CREB.  
*Cell* **70**:105-113.

**Halsey, D. L., P. R. Girard, J. F. Kuo, and P. J. Blackshear.** 1987.  
Protein kinase C in fibroblasts. Characteristics of its intracellular location during growth and after exposure to phorbol esters and other mitogens.  
*J. Biol. Chem.* **262**:2234-2243.

**Hard, T., E. Kellenbach, R. Boelens, B. A. Maler, K. Dahlman, L. P. Freedman, J. Carlstedt-Duke, K. R. Yamamoto, J. Å. Gustafsson, and R. Kaptein.** 1990.  
Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain.  
*Science* **249**:157-160.

**Hardie, D. G., T. A. J. Haystead, and A. T. R. Sim.** 1991.  
Use of Okadaic Acid to Inhibit Protein Phosphatases in Intact Cells.  
*Meth. in Enzymol.* **201**:469-476.

**Hashimoto, K.** 1990.  
Differential regulation of protein kinase C subspecies in human promyelocytic leukemia cell line HL-60 during differentiation induced by retinoic acid.  
*Kobe J. Med. Sci.* **36**:87-101.

**Hashimoto, K., A. Kishimoto, H. Aihara, I. Yasuda, K. Mikawa, and Y. Nishizuka.** 1990.  
Protein kinase C during differentiation of human promyelocytic leukemia cell line, HL-60.  
*FEBS Lett.* **263**:31-34.

**Haussler, M. R., C. A. Donaldson, M. A. Kelly, D. J. Mangelsdorf, G. T. Bowden, W. J. Meinke, F. L. Meyskens, and N. Sidell.** 1984.  
Identification and quantitation of intracellular retinol and retinoic acid binding proteins in cultured cells.  
*Biochim. Biophys. Acta* **803**:54-62.

**Hemmi, H. and T. R. Breitman.** 1982.  
Induction by retinoic acid of NAD<sup>+</sup>-glycohydrolase activity of myelomonocytic cell lines HL-60, THP-1 and U-937, and fresh human acute promyelocytic leukemia cells in primary culture.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **109**:669-674.

**Heyman, R. A., D. J. Mangelsdorf, J. A. Dyck, R. B. Stein, G. Eichele, R. M. Evans, and C. Thaller.** 1992.  
9-Cis Retinoic Acid Is a High Affinity Ligand for the Retinoid-X Receptor.  
*Cell* **68**:397-406.

- Hidaka, H., M. Inagaki, S. Kawamoto, and Y. Sasaki.** 1984.  
Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* **23**:5036-5041.
- Hofmann, C et Eichele, G.** 1994  
Retinoids in development  
The RETINOIDS: Biology, Chemistry and Medecine.  
2nd edition. Edited by M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman. Raven Press, Ltd., New York.
- Hogan, B. and C. Wright.** 1992.  
Developmental biology. The making of the ear [news, comment]. *Nature* **355**:494-495.
- Honda, A., A. Raz, and P. Needleman.** 1990.  
Induction of cyclo-oxygenase synthesis in human promyelocytic leukaemia (HL-60) cells during monocytic or granulocytic differentiation. *Biochem. J.* **272**:259-262.
- Hope, I. A., S. Mahadevan, and K. Struhl.** 1988.  
Structural and functional characterization of the short acidic transcriptional activation region of yeast GCN4 protein. *Nature* **333**:635-640.
- Horlein, A. J., A. M. Naar, T. Heinzl, J. Torchia, B. Gloss, R. Kurokawa, A. Ryan, Y. Kamel, M. Soderstrom, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld.** 1995.  
Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**:397-404.
- Hornbruch, A. and L. Wolpert.** 1986.  
Positional signalling by Hensen's node when grafted to the chick limb bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **94**:257-265.
- House, C. and B. E. Kemp.** 1990.  
Protein kinase C pseudosubstrate prototope: structure-function relationships. *Cell Signal.* **2**:187-190.
- Housley, P. R. and W. B. Pratt.** 1983.  
Direct demonstration of glucocorticoid receptor phosphorylation in intact L-cells. *J. Biol. Chem.* **258**:4630-4636.
- Hsieh, J. C., P. W. Jurutka, M. A. Galligan, C. M. Terpening, C. A. Haussler, D. S. Samuels, Y. Shimizu, N. Shimizu, and M. R. Haussler.** 1991.  
Human vitamin D receptor is selectively phosphorylated by protein kinase C on serine 51, a residue crucial to its trans-activation function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:9315-9319.
- Hsieh, J. C., P. W. Jurutka, S. Nakajima, M. A. Galligan, C. A. Haussler, Y. Shimizu, N. Shimizu, G. K. Whitfield, and M. R. Haussler.** 1993.  
Phosphorylation of the human Vitamin-D receptor by protein Kinase-C - biochemical and functional evaluation of the serine-51 recognition site. *J. Biol. Chem.* **268**:15118-15126.
- Huang, K. P., F. L. Huang, H. Nakabayashi, and Y. Yoshida.** 1988.  
Biochemical characterization of rat brain protein kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **263**:14839-14845.
- Huang, K. P., H. Nakabayashi, and F. L. Huang.** 1986.  
Isozymic forms of rat brain Ca<sup>2+</sup>-activated and phospholipid-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:8535-8539.
- Hubbard, S. R., W. R. Bishop, P. Kirschmeier, S. J. George, S. P. Cramer, and W. A. Hendrickson.** 1991.  
Identification and characterization of zinc binding sites in protein kinase C. *Science* **254**:1776-1779.
- Huggenvik, J. L., M. W. Collard, Y. W. Kim, and R. P. Sharma.** 1993.  
Modification of the retinoic acid signaling pathway by the catalytic subunit of protein Kinase-A. *Mol. Endocrinol.* **7**:543-550.
- Imaoka, T., M. Imazu, H. Usui, N. Kinohara, and M. Takeda.** 1980.  
Isolation of an inactive component from pig heart phosphoprotein phosphatase and its reassociation with an active component. *Biochim. Biophys. Acta* **612**:73-84.
- Imaoka, T., M. Imazu, H. Usui, N. Kinohara, and M. Takeda.** 1983.  
Resolution and reassociation of three distinct components from pig heart phosphoprotein phosphatase. *J. Biol. Chem.* **258**:1526-1535.
- Ito, M., F. Tanabe, A. Sato, E. Ishida, Y. Takami, and S. Shigeta.** 1989.  
Possible involvement of microfilaments in protein kinase C translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**:1344-1349.
- Izpisua-belmonte, J. C., Tickle, C., Dollé, P., Wolpert, L., and Duboule, D.** 1991  
Expression of homeobox genes and the specification of position in chick wing development. *Nature* **350**: 585-589.
- Izpisua-belmonte, J. C., Brown, J. M., Crawley, A., Duboule, D., and Tickle, C.** 1992



Hox-4 gene expression in mouse/chicken heterospecific grafts of signalling regions to limb buds reveals similarities in patterning mechanisms.

Development **115** : 553-560.

**Izpisua-belmonte, J.C. and Duboule, D.** 1992  
Homeobox genes and pattern formation in the vertebrate limb.  
Dev. Biol. **152** : 26-36.

**Jaken, S., K. Leach, and T. Klauck.** 1989.  
Association of type 3 protein kinase C with focal contacts in rat embryo fibroblasts.  
J. Cell Biol. **109**:697-704.

**Jakes, S., R. L. Mellgren, and K. K. Schlender.** 1986.  
Isolation and characterization of an inhibitor-sensitive and a polycation-stimulated protein phosphatase from rat liver nuclei.  
Biochim. Biophys. Acta **888**:135-142.

**Jetten, A. M., K. Anderson, M. A. Deas, H. Kagechika, R. Lotan, J. I. Rearick, and K. Shudo.** 1987.  
New benzoic acid derivatives with retinoid activity: lack of direct correlation between biological activity and binding to cellular retinoic acid binding protein.  
Cancer Res. **47**:3523-3527.

**Jetten, A. M., M. A. George, and J. I. Rearick.** 1990.  
Down-regulation of squamous cell-specific markers by retinoids: transglutaminase type I and cholesterol sulfotransferase.  
Meth. in Enzymol. **190**:42-49.

**Jurgensen, S., E. Shacter, C. Y. Huang, P. B. Chock, S. D. Yang, J. R. Vandenheede, and W. Merlevede.** 1984.  
On the mechanism of activation of the ATP X Mg(II)-dependent phosphoprotein phosphatase by kinase FA.  
J. Biol. Chem. **259**:5864-5870.

**Kaibuchi, K., Y. Fukumoto, N. Oku, Y. Takai, K. Arai, and M. Muramatsu.** 1989.  
Molecular genetic analysis of the regulatory and catalytic domains of protein kinase C.  
J. Biol. Chem. **264**:13489-13496.

**Kaibuchi, K., Y. Takai, M. Sawamura, M. Hoshijima, T. Fujikura, and Y. Nishizuka.** 1983.  
Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation.  
J. Biol. Chem. **258**:6701-6704.

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

**Kastner, P., J. M. Grondona, M. Mark, A. Gansmuller, M. LeMeur, D. Decimo, J. L. Vonesch, P. Dolle, and P. Chambon.** 1994.

Genetic analysis of RXR alpha, developmental function: Convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis.  
Cell **78**:987-1003.

**Kastner, P., A. Krust, C. Mendelsohn, J. M. Garnier, A. Zelent, P. Leroy, A. Staub, and P. Chambon.** 1990.  
Murine isoforms of retinoic acid receptor gamma with specific patterns of expression.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**:2700-2704.

**Katahira, M., R. Knegt, J. Schilthuis, R. Boelens, D. Eib, P. van der Saag, and R. Kaptein.** 1992.  
The structure of the human retinoic acid receptor-beta DNA-binding domain determined by NMR.  
Nucleic. Acids. Symp. Ser. **65**-66.

**Katz, D., T. J. Berrodin, and M. A. Lazar.** 1992.  
The Unique C-Termini of the Thyroid Hormone Receptor Variant, C-erbAalpha2, and Thyroid Hormone Receptor alpha Mediate Different DNA-Binding and Heterodimerization Properties.  
Mol. Endocrinol. **6**:805-814.

**Keidel, S., P. LeMotte, and C. Apfel.** 1994.  
Different Agonist-Induced and Antagonist-Induced Conformational Changes in Retinoic Acid Receptors Analyzed by Protease Mapping.  
Mol. Cell. Biol. **14**:287-298.

**Keller, H., C. Dreyer, J. Medin, A. Mahfoudi, K. Ozato, and W. Wahli.** 1993.  
Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome Proliferator-Activated receptor-retinoid x receptor heterodimers.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **90**:2160-2164.

**Kemppainen, J. A., M. V. Lane, M. Sar, and E. M. Wilson.** 1992.  
Androgen Receptor Phosphorylation, Turnover, Nuclear Transport, and Transcriptional Activation - Specificity for Steroids and Antihormones.  
J. Biol. Chem. **267**:968-974.

**Knegt, R.M.A., Katahira, M., Schilthuis, J.G., Bonvin, A., Boelens, R., Eib, D., Vandersaag, P.T., and Kaptein, R.** 1993  
The solution structure of the human retinoic acid receptor  $\beta$  DNA binding domain.  
J. Bio. Mol. NMR, **3** : 1-17.

**Khalil, R.A., and Morgan, K.G.** 1992.  
News. Physiol. Sci. **7** : 10-15.

**Kiley, S., D. Schaap, P. Parker, L. L. Hsieh, and S. Jaken.** 1990.  
Protein kinase C heterogeneity in GH4C1 rat pituitary cells. Characterization of a Ca<sup>2+</sup>(+)-independent phospholipid receptor.  
J. Biol. Chem. **265**:15704-15712.

- Kishimoto, A., N. Kajikawa, M. Shiota, and Y. Nishizuka.** 1983.  
Proteolytic activation of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease.  
*J. Biol. Chem.* **258**:1156-1164.
- Kishimoto, A., Y. Takai, T. Mori, U. Kikkawa, and Y. Nishizuka.** 1980.  
Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover.  
*J. Biol. Chem.* **255**:2273-2276.
- Klee, C. B.** 1988.  
Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid- (and membrane-) binding proteins.  
*Biochemistry* **27**:6645-6653.
- Klee, C. B., T. H. Crouch, and M. H. Krinks.** 1979.  
Subunit structure and catalytic properties of bovine brain Ca<sup>2+</sup>-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase.  
*Biochemistry* **18**:722-729.
- Klee, C. B. and M. H. Krinks.** 1978.  
Purification of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein by affinity chromatography on activator protein coupled to Sepharose.  
*Biochemistry* **17**:120-126.
- Klein-Hitpass, L., M. Schorpp, U. Wagner, and G. U. Ryffel.** 1986.  
An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells.  
*Cell* **46**:1053-1061.
- Kliwer, S. A., K. Umesono, D. J. Mangelsdorf, and R. M. Evans.** 1992.  
Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin-D<sub>3</sub> signalling.  
*Nature* **355**:446-449.
- Ko, H. S., P. Fast, W. McBride, and L. M. Staudt.** 1988.  
A human protein specific for the immunoglobulin octamer DNA motif contains a functional homeobox domain.  
*Cell* **55**:135-144.
- Koeffler, H. P., D. Heitjan, R. Mertelsmann, J. E. Kolitz, P. Schulman, L. Itri, P. Gunter, and E. Besa.** 1988.  
Randomized study of 13-cis retinoic acid v placebo in the myelodysplastic disorders.  
*Blood* **71**:703-708.
- Koelle, M. R., W. A. Segraves, and D. S. Hogness.** 1992.  
DHR3 - A *Drosophila* Steroid Receptor Homolog.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:6167-6171.
- Kruyt, F. A. E., G. E. Folkers, A. J. M. Walhout, B. M. Vanderleede, and P. T. Vandersaag.** 1993.  
E1A functions as a coactivator of retinoic acid-dependent retinoic acid receptor-beta-2 promoter activation.  
*Mol. Endocrinol.* **7**:604-615.
- Kuiper, G. G. J. M., P. E. Deruiter, J. Trapman, W. J. A. Boersma, J. A. Grootegeed, and A. O. Brinkmann.** 1993.  
Localization and hormonal stimulation of phosphorylation sites in the LNCaP-Cell androgen receptor.  
*Biochem. J.* **291**:95-101.
- Kumar, V., S. Green, G. Stack, M. Berry, J. R. Jin, and P. Chambon.** 1987.  
Functional domains of the human estrogen receptor.  
*Cell* **51**:941-951.
- Kuret, J., H. Bell, and P. Cohen.** 1986.  
Identification of high levels of protein phosphatase-1 in rat liver nuclei.  
*FEBS Lett.* **203**:197-202.
- Kurokawa, R., J. Drenzo, M. Boehm, J. Sugarman, B. Gloss, M. G. Rosenfeld, R. A. Heyman, and C. K. Glass.** 1994.  
Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding.  
*Nature* **371**:528-531.
- Kurokawa, R., M. Soderstrom, A. Horlein, S. Halachmi, M. Brown, M. G. Rosenfeld, and C. K. Glass.** 1995.  
Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor.  
*Nature* **377**:451-454.
- Kurokawa, R., V. C. Yu, A. Naar, S. Kyakumoto, Z. H. Han, S. Silverman, M. G. Rosenfeld, and C. K. Glass.** 1993.  
Differential orientations of the DNA-Binding domain and Carboxy-Terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers.  
*Genes & Develop.* **7**:1423-1435.
- Lacal, J. C., P. de la Pena, J. Moscat, P. Garcia Barreno, P. S. Anderson, and S. A. Aaronson.** 1987.  
Rapid stimulation of diacylglycerol production in *Xenopus* oocytes by microinjection of H-ras p21.  
*Science* **238**:533-536.
- Larosa, G. J. and L. J. Gudas.** 1988.  
Early retinoic acid-induced F9 teratocarcinoma stem cell gene ERA-1: alternate splicing creates transcripts for a homeobox-containing protein and one lacking the homeobox.  
*Mol. Cell Biol.* **8**:3906-3917.
- Laudet, V., Hänni, C., Coll, J., Catzeflis, F., and Stehelin, D.** 1992.  
Evolution of the nuclear receptor gene superfamily  
*EMBO J.* **11** : 1003-1013.

- Leach, K. L., V. A. Ruff, T. M. Wright, M. S. Pessin, and D. M. Raben.** 1991.  
Dissociation of protein kinase C activation and sn-1,2-diacylglycerol formation. Comparison of phosphatidylinositol- and phosphatidylcholine-derived diglycerides in alpha-thrombin-stimulated fibroblasts.  
*J. Biol. Chem.* **266**:3215-3221.
- Leblanc, B. P. and H. G. Stunnenberg.** 1995.  
9-Cis retinoic acid signaling: Changing partners causes some excitement.  
*Gene Develop.* **9**:1811-1816.
- Ledouarin, B., C. Zechel, J. M. Garnier, Y. Lutz, L. Tora, B. Pierrat, D. Heery, H. Gronemeyer, P. Chambon, and R. Losson.** 1995.  
The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18.  
*EMBO J.* **14**:2020-2033.
- Lee, J. W., T. Gulick, and D. D. Moore.** 1992.  
Thyroid Hormone Receptor Dimerization Function Maps to a Conserved Subregion of the Ligand Binding Domain.  
*Mol. Endocrinol.* **6**:1867-1873.
- Lee, M. S., S. A. Kliewer, J. Provencal, P. E. Wright, and R. M. Evans.** 1993.  
Structure of the retinoid-X receptor-alpha DNA binding domain - a helix required for homodimeric DNA binding.  
*Science* **260**:
- Lefebvre, B., C. Rachez, P. Formstecher, and P. Lefebvre.** 1995.  
Structural determinants of the ligand-binding site of the human retinoic acid receptor alpha.  
*Biochemistry* **34**:5477-5485.
- Legoff, P., M. R. Montano, D. J. Schodin, and B. S. Katzenellenbogen.** 1994.  
Phosphorylation of the human estrogen receptor - identification of Hormone-Regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity.  
*J. Biol. Chem.* **269**:4458-4466.
- Lehmann, J. M., L. Jong, A. Fanjul, J. F. Cameron, X. P. Lu, P. Haefner, M. I. Dawson, and M. Pfahl.** 1992.  
Retinoids selective for retinoid X receptor response pathways.  
*Science* **258**:1944-1946.
- Leroy, P., A. Krust, A. Zelent, C. Mendelsohn, J. M. Garnier, P. Kastner, A. Dierich, and P. Chambon.** 1991.  
Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor Alpha are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid.  
*EMBO J.* **10**:59-69.
- Leuther, K. K., J. M. Salmeron, and S. A. Johnston.** 1993.  
Genetic evidence that an activation domain of GAL4 does not require acidity and may form a beta sheet [see comments].  
*Cell* **72**:575-585.
- Levin, A. A., L. J. Sturzenbecker, S. Kazmer, T. Bosakowski, C. Huselton, G. Allenby, J. Speck, C. Kratzeisen, M. Rosenberger, A. Lovey, and J. F. Grippo.** 1992.  
9-Cis Retinoic Acid Stereoisomer Binds and Activates the Nuclear Receptor RXRalpha.  
*Nature* **355**:359-361.
- Li, L., G. James, R. Hellerharrison, M. P. Czech, and E. N. Olson.** 1992.  
FGF inactivates myogenic Helix-Loop-Helix proteins through phosphorylation of a conserved protein Kinase-C site in their DNA-Binding domains.  
*Cell* **71**:1181-1194.
- Lin, K. H., K. Ashizawa, and S. Y. Cheng.** 1992.  
Phosphorylation Stimulates the Transcriptional Activity of the Human beta 1 Thyroid Hormone Nuclear Receptor.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:7737-7741.
- Liscovitch, M., and Cantley, L.C.** 1994  
Lipid second messengers.  
*Cell* **77** : 329-334.
- Lohnes, D., P. Kastner, A. Dierich, M. Mark, M. LeMeur, and P. Chambon.** 1993.  
Function of retinoic acid receptor-gamma in the mouse.  
*Cell* **73**:
- Lotan, R.** 1980.  
Effect of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells.  
*Biochem. Biophys. Acta* **43** : 3040-3043.
- Lucas, P. C., R. M. O'Brien, J. A. Mitchell, C. M. Davis, E. Imai, B. M. Forman, H. H. Samuels, and D. K. Granner.** 1991.  
A retinoic acid response element is part of a pleiotropic domain in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:2184-2188.
- Lufkin, T., D. Lohnes, M. Mark, A. Dierich, P. Gorry, M.-P. Gaub, M. LeMeur, and P. Chambon.** 1993.  
High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:7225-7229.
- Luisi, B.F., Xu, W.X., Twinowski, Z.O., Freedman, L.P., Yamamoto, K.R., and Sigler, P.B.** 1991  
*Nature*, **352** : 497-505
- Luo, J. H. and I. B. Weinstein.** 1993.  
Calcium-dependent activation of protein kinase C. The role of the C2 domain in divalent cation selectivity.  
*J. Biol. Chem.* **268**:23580-23584.

- Macgregor, T. M., N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and V. Giguere.** 1992.  
The Murine Gene for Cellular Retinoic Acid-Binding Protein Type-II - Genomic Organization, Chromosomal Localization, and Post-Transcriptional Regulation by Retinoic Acid.  
*J. Biol. Chem.* **267**:7777-7783.
- Maden, M., D. E. Ong, D. Summerbell, and F. Chytil.** 1988.  
Spatial distribution of cellular protein binding to retinoic acid in the chick limb bud.  
*Nature* **335**:733-735.
- Mader, S., V. Kumar, H. de Verneuil, and P. Chambon.** 1989.  
Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element.  
*Nature* **338**:271-274.
- Mader, S., P. Leroy, J. Y. Chen, and P. Chambon.** 1993.  
Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements - selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and Retinoid-X receptors.  
*J. Biol. Chem.* **268**:591-600.
- Makowske, M., R. Ballester, Y. Cayre, and O. M. Rosen.** 1988.  
Immunochemical evidence that three protein kinase C isozymes increase in abundance during HL-60 differentiation induced by dimethyl sulfoxide and retinoic acid.  
*J. Biol. Chem.* **263**:3402-3410.
- Makowske, M. and O. M. Rosen.** 1989.  
Complete activation of protein kinase C by an antipeptide antibody directed against the pseudosubstrate prototope.  
*J. Biol. Chem.* **264**:16155-16159.
- Mangelsdorf, D. J., E. S. Ong, J. A. Dyck, and R. M. Evans.** 1990.  
Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway.  
*Nature* **345**:224-229.
- Mangelsdorf, D. J., K. Umesono, and R. M. Evans.** 1994.  
The retinoid receptors.  
*Retinoids: Biology, chemistry* 319-349.
- Mangelsdorf, D. J., K. Umesono, S. A. Kliewer, U. Borgmeyer, E. S. Ong, and R. M. Evans.** 1991.  
A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II confers differential regulation by RXR and RAR.  
*Cell* **66**:555-561.
- Marais, R. M. and P. J. Parker.** 1989.  
Purification and characterisation of bovine brain protein kinase C isotypes alpha, beta and gamma.  
*Eur. J. Biochem.* **182**:129-137.
- Martell, R. E., R. U. Simpson, and J. M. Taylor.** 1987.  
1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> regulation of phospholipid receptors in HL-60 leukemia cells.  
*J. Biol. Chem.* **262**:5570-5575.
- Masmoudi, A., G. Labourdette, M. Mersel, F. L. Huang, K. P. Huang, G. Vincendon, and A. N. Malviya.** 1989.  
Protein kinase C located in rat liver nuclei. Partial purification and biochemical and immunochemical characterization.  
*J. Biol. Chem.* **264**:1172-1179.
- Mason, S. A. and P. R. Housley.** 1993.  
Site-Directed mutagenesis of the phosphorylation sites in the mouse glucocorticoid receptor.  
*J. Biol. Chem.* **268**:21501-21504.
- Matkovits, T. and S. Christakos.** 1995.  
Ligand occupancy is not required for vitamin D receptor and retinoid receptor-mediated transcriptional activation.  
*Mol. Endocrinol.* **9**:232-242.
- McDonnell, D. P., R. A. Scott, S. A. Kerner, B. W. O'Malley, and J. W. Pike.** 1989.  
Functional domains of the human vitamin D<sub>3</sub> receptor regulate osteocalcin gene expression.  
*Mol. Endocrinol.* **3**:635-644.
- McGinnis, W., R. L. Garber, J. Wirz, A. Kuroiwa, and W. J. Gehring.** 1984.  
A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans.  
*Cell* **37**:403-408.
- McGinnis, W. and R. Krumlauf.** 1992.  
Homeobox genes and axial patterning.  
*Cell* **68**:283-302.
- McGinnis, W., M. S. Levine, E. Hafen, A. Kuroiwa, and W. J. Gehring.** 1984.  
A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes.  
*Nature* **308**:428-433.
- Mendelsohn, C., E. Ruberte, and P. Chambon.** 1992.  
Retinoid Receptors in Vertebrate Limb Development.  
*Dev. Biol.* **152**:50-61.
- Mermod, N., E. A. O'Neill, T. J. Kelly, and R. Tjian.** 1989.  
The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-1 is distinct from the replication and DNA binding domain.  
*Cell* **58**:741-753.
- Missiaen, L., F. Wuytack, L. Raeymaekers, H. De Smedt, G. Droogmans, I. Declerck, and R. Casteels.** 1991.  
Ca<sup>2+</sup> extrusion across plasma membrane and Ca<sup>2+</sup> uptake by intracellular stores.  
*Pharmacol. Ther.* **50**:191-232.

- Mochly Rosen, D., C. J. Henrich, L. Cheever, H. Khaner, and P. C. Simpson.** 1990.  
A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation.  
*Cell Regul.* **1**:693-706.
- Mochly Rosen, D., H. Khaner, and J. Lopez.** 1991.  
Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:3997-4000.
- Mochly Rosen, D., H. Khaner, J. Lopez, and B. L. Smith.** 1991.  
Intracellular receptors for activated protein kinase C. Identification of a binding site for the enzyme.  
*J. Biol. Chem.* **266**:14866-14868.
- Mochly Rosen, D. and D. E. Koshland, Jr.** 1987.  
Domain structure and phosphorylation of protein kinase C.  
*J. Biol. Chem.* **262**:2291-2297.
- Mochly Rosen, D., K. G. Miller, R. H. Scheller, H. Khaner, J. Lopez, and B. L. Smith.** 1992.  
p65 fragments, homologous to the C2 region of protein kinase C, bind to the intracellular receptors for protein kinase C.  
*Biochemistry* **31**:8120-8124.
- Morgan, B. A., J. C. Izpisua Belmonte, D. Duboule, and C. J. Tabin.** 1992.  
Targeted misexpression of Hox-4.6 in the avian limb bud causes apparent homeotic transformations [see comments].  
*Nature* **358**:236-239.
- Moyer, M. L., K. C. Borrer, B. J. Bona, D. B. DeFranco, and S. K. Nordeen.** 1993.  
Modulation of cell signaling pathways can enhance or impair Glucocorticoid-Induced gene expression without altering the state of receptor phosphorylation.  
*J. Biol. Chem.* **268**:22933-22940.
- Nagpal, S., S. Friant, H. Nakshatri, and P. Chambon.** 1993.  
RARs and RXRs - evidence for 2 autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization *in vivo*.  
*EMBO J.* **12**:2349-2360.
- Nagpal, S., M. Saunders, P. Kastner, B. Durand, H. Nakshatri, and P. Chambon.** 1992.  
Promoter Context-Dependent and Response Element-Dependent Specificity of the Transcriptional Activation and Modulating Functions of Retinoic Acid Receptors.  
*Cell* **70**:1007-1019.
- Nagpal, S., A. Zelent, and P. Chambon.** 1992.  
RAR-beta4, a Retinoic Acid Receptor Isoform Is Generated from RAR-beta2 by Alternative Splicing and Usage of a CUG Initiator Codon.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:2718-2722.
- Nagy, L., V. A. Thomazy, G. L. Shipley, L. Fesus, W. Lamph, R. A. Heyman, R. A. Chandraratna, and P. J. Davies.** 1995.  
Activation of retinoid X receptors induces apoptosis in HL-60 cell lines.  
*Mol. Cell Biol.* **15**:3540-3551.
- Nicholson, R. C., S. Mader, S. Nagpal, M. Leid, C. Rochette Egly, and P. Chambon.** 1990.  
Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoic acid is mediated by an AP1 binding site.  
*EMBO J.* **9**:4443-4454.
- Niedel, J. E., L. J. Kuhn, and G. R. Vandenberg.** 1983.  
Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**:36-40.
- Nishizuka, Y.** 1986.  
Studies and perspectives of protein kinase C.  
*Science* **233**:305-312.
- Nishizuka, Y.** 1988.  
The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation.  
*Nature* **334**:661-665.
- Nishizuka, Y.** 1992.  
Studies and perspectives of protein kinase C.  
*Science* **258**:607-614.
- Nishizuka, Y.** 1995.  
Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses.  
*FASEB J.* **9**:484-496.
- Noji, S., T. Nohno, E. Koyama, K. Muto, K. Ohshima, Y. Aoki, K. Tamura, K. Ohsugi, H. Ide, S. Taniguchi, and T. Saito.** 1991.  
Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud.  
*Nature* **350**:83-86.
- Noji, S., T. Yamaai, E. Koyama, T. Nohno, and S. Taniguchi.** 1989.  
Spatial and temporal expression pattern of retinoic acid receptor genes during mouse bone development.  
*FEBS Lett.* **257**:93-96.
- Norman, C., M. Runswick, R. Pollock, and R. Treisman.** 1988.  
Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element.  
*Cell* **55**:989-1003.
- Noy, N. and W. S. Blazer.** 1991.  
Interactions of retinol with binding proteins: studies with rat cellular retinol-binding protein and with rat retinol-binding protein.

- Biochemistry **30**:6380-6386.
- Noy, N. and Z. J. Xu.** 1990.  
The thermodynamic parameters of the binding of retinol to binding proteins and to membranes.  
Biochemistry **29**:3888-3892.
- Noy, N. and Z. J. Xu.** 1990.  
Interactions of retinol with binding proteins: implications for the mechanism of uptake by cells.  
Biochemistry **29**:3878-3883.
- O'Donnell, A. L., E. D. Rosen, D. S. Darling, and R. J. Koenig.** 1991.  
Thyroid hormone receptor mutations that interfere with transcriptional activation also interfere with receptor interaction with a nuclear protein.  
Mol. Endocrinol. **5**:94-99.
- Obeid, L. M., T. Okazaki, L. A. Karolak, and Y. A. Hannun.** 1990.  
Transcriptional regulation of protein kinase C by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in HL-60 cells.  
J. Biol. Chem. **265**:2370-2374.
- Olsson, I. L. and T. R. Breitman.** 1982.  
Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by retinoic acid and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-inducing agents.  
Cancer Res. **42**:3924-3927.
- Ong, D. E.** 1987.  
Cellular retinoid-binding proteins.  
Arch. Dermatol. **123**:1693-1695a.
- Ong, D. E. and F. Chytil.** 1978.  
Cellular retinoic acid-binding protein from rat testis. Purification and characterization.  
J. Biol. Chem. **253**:4551-4554.
- Ono, Y., T. Fujii, K. Ogita, U. Kikkawa, K. Igarashi, and Y. Nishizuka.** 1988.  
The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family.  
J. Biol. Chem. **263**:6927-6932.
- Oro, A. E., M. McKeown, and R. M. Evans.** 1990.  
Relationship between the product of the *Drosophila* ultraspiracle locus and the vertebrate retinoid X receptor.  
Nature **347**:298-301.
- Oro, A. E., M. McKeown, and R. M. Evans.** 1992.  
The *Drosophila* Retinoid-X Receptor Homolog Ultraspiracle Functions in Both Female Reproduction and Eye Morphogenesis.  
Development **115**:449-462.
- Orr, J. W. and A. C. Newton.** 1994.  
Intra-peptide regulation of protein kinase C.  
J. Biol. Chem. **269**:8383-8387.
- Orti, E., J. Bodwell, and A. Munck.** 1992.  
Phosphorylation of steroid hormone receptor.  
Endocrine Rev. **13**:105-128.
- Orti, E., L. M. Hu, and A. Munck.** 1993.  
Kinetics of glucocorticoid receptor phosphorylation in intact cells - evidence for Hormone-Induced hyperphosphorylation after activation and recycling of hyperphosphorylated receptors.  
J. Biol. Chem. **268**:7779-7784.
- Orti, E., D. B. Mendel, and A. Munck.** 1989.  
Phosphorylation of glucocorticoid receptor-associated and free forms of the approximately 90-kDa heat shock protein before and after receptor activation.  
J. Biol. Chem. **264**:231-237.
- Osada, S., Y. Hashimoto, S. Nomura, Y. Kohno, K. Chida, O. Tajima, K. Kubo, K. Akimoto, H. Koizumi, Y. Kitamura, and et al.** 1993.  
Predominant expression of nPKC  $\epsilon$ , a Ca(2+)-independent isoform of protein kinase C in epithelial tissues, in association with epithelial differentiation.  
Cell Growth Differ. **4**:167-175.
- Ostrowski, J., L. Hammer, T. Roalsvig, K. Pokornowski, and P. R. Reczek.** 1995.  
The N-terminal portion of domain E of retinoic acid receptors  $\alpha$  and  $\beta$  is essential for the recognition of retinoic acid and various analogs.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**:1812-1816.
- Osumi-Yamashita, N., S. Noji, T. Nohno, E. Koyama, H. Doi, K. Eto, and S. Taniguchi.** 1990.  
Expression of retinoic acid receptor genes in neural crest-derived cells during mouse facial development.  
FEBS Lett. **264**:71-74.
- Owensgrillo, J. K., K. Hoffmann, K. A. Hutchison, A. W. Yem, M. R. Deibel, R. E. Handschumacher, and W. B. Pratt.** 1995.  
The cyclosporin A-binding immunophilin CyP-40 and the FK506-binding immunophilin hsp56 bind to a common site on hsp90 and exist in independent cytosolic heterocomplexes with the untransformed glucocorticoid receptor.  
J. Biol. Chem. **270**:20479-20484.
- Papadopoulos, V. and P. F. Hall.** 1989.  
Isolation and characterization of protein kinase C from Y-1 adrenal cell cytoskeleton.  
J. Cell Biol. **108**:553-567.
- Parker, P. J., L. Coussens, N. Totty, L. Rhee, S. Young, E. Chen, S. Stabel, M. D. Waterfield, and A. Ullrich.** 1986.  
The complete primary structure of protein kinase C--the major phorbol ester receptor.  
Science **233**:853-859.
- Pears, C., S. Stabel, S. Cazaubon, and P. J. Parker.** 1992.  
Studies on the Phosphorylation of Protein Kinase-C- $\alpha$ .

Biochem. J. **283**:515-518.

**Perez-Castro, A. V., L. E. Toth-Rogler, L. N. Wei, and M. C. Nguyen-Huu.** 1989.

Spatial and temporal pattern of expression of the cellular retinoic acid-binding protein and the cellular retinol-binding protein during mouse embryogenesis [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1990 Feb;87(4):1626-7].  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **86**:8813-8817.

**Perlmann, T., P. N. Rangarajan, K. Umesono, and R. M. Evans.** 1993.

Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs.  
Genes & Develop. **7**:1411-1422.

**Perlmann, T., and Vennström B.** 1995

The sound of silence  
Nature **377** : 387-388

**Petkovitch, M., N. J. Brand, A. Krust, and P. Chambon.** 1987.

A human retinoic receptor which belongs to the family of nuclear receptors.  
Nature **330**:444-450.

**Pfahl, M., Apfel, R., Bendik, L., Fanjul, A., Graupner, G., Lee, M., La-vista, N., Lu, X., Piedrafita, J., Ortíz, M., Salbert, G., and Zhang, X.** 1994

Nuclear retinoid receptors and their mechanism of action  
Vitamins and hormones, vol. 49. 327-382  
Academic Press, Inc

**Ponzoni, M., E. Lucarelli, M. V. Corrias, and P. Cornagliaferraris.** 1993.

Protein Kinase-C isoenzymes in human neuroblasts - involvement of PKC epsilon in cell differentiation.  
FEBS Lett. **322**:120-124.

**Posch, K. C., M. H. Boerman, R. D. Burns, and J. L. Napoli.** 1991.

Holocellular retinol binding protein as a substrate for microsomal retinal synthesis.  
Biochemistry **30**:6224-6230.

**Power, R. F., S. K. Mani, J. Codina, O. M. Conneely, and B. W. O'Malley.** 1991.

Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors.  
Science **254**:1636-1639.

**Predki, P. F., D. Zamble, B. Sarkar, and V. Giguere.** 1994.

Ordered binding of retinoic acid and Retinoid-X receptors to asymmetric response elements involves determinants adjacent to the DNA-Binding domain.  
Mol. Endocrinol. **8**:31-39.

**Price, B. D., J. D. Morris, C. J. Marshall, and A. Hall.** 1989.

Stimulation of phosphatidylcholine hydrolysis, diacylglycerol release, and arachidonic acid production by oncogenic ras is a consequence of protein kinase C activation.

J. Biol. Chem. **264**:16638-16643.

**Qi, J. S., V. Desaiyajnik, M. E. Greene, B. M. Raaka, and H. H. Samuels.** 1995.

The ligand-binding domains of the thyroid hormone/retinoid receptor gene subfamily function in vivo to mediate heterodimerization, gene silencing, and transactivation.  
Mol. Cell Biol. **15**:1817-1825.

**Quest, A. F., E. S. Bardes, and R. M. Bell.** 1994.

A phorbol ester binding domain of protein kinase C gamma. Deletion analysis of the Cys2 domain defines a minimal 43-amino acid peptide.  
J. Biol. Chem. **269**:2961-2970.

**Quest, A. F. and R. M. Bell.** 1994.

The regulatory region of protein kinase C gamma. Studies of phorbol ester binding to individual and combined functional segments expressed as glutathione S-transferase fusion proteins indicate a complex mechanism of regulation by phospholipids, phorbol esters, and divalent cations.  
J. Biol. Chem. **269**:20000-20012.

**Quest, A. F., J. Bloomenthal, E. S. Bardes, and R. M. Bell.** 1992.

The regulatory domain of protein kinase C coordinates four atoms of zinc.  
J. Biol. Chem. **267**:10193-10197.

**Raisher, B. D., T. Gulick, Z. F. Zhang, A. W. Strauss, D. D. Moore, and D. P. Kelly.** 1992.

Identification of a Novel Retinoid-Responsive Element in the Promoter Region of the Medium Chain Acyl-Coenzyme-A Dehydrogenase Gene.  
J. Biol. Chem. **267**:20264-20269.

**Renaud, J.P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D.** 1995.

Crystal structure of the RAR- $\gamma$  ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid.  
Nature **378** : 681-689.

**Richard, S. and H. H. Zingg.** 1991.

Identification of a retinoic acid response element in the human oxytocin promoter.  
J. Biol. Chem. **266**:21428-21433.

**Riddle, R. D., R. L. Johnson, E. Laufer, and C. Tabin.** 1993.

Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA.  
Cell **75**:1401-1416.

**Robertson, K. A., B. Emami, and S. J. Collins.** 1992.  
Retinoic Acid-Resistant HL-60R Cells Harbor a Point Mutation in the Retinoic Acid Receptor Ligand-Binding Domain That Confers Dominant Negative Activity.

Blood 80:1885-1889.

**Rochette-Egly, C., M. P. Gaub, Y. Lutz, S. Ali, I. Scheuer, and P. Chambon.** 1992.

Retinoic Acid Receptor-beta - Immunodetection and Phosphorylation on Tyrosine Residues.  
Mol. Endocrinol. 6:2197-2209.

**Rochette-Egly, C., Y. Lutz, M. Saunders, I. Scheuer, M. P. Gaub, and P. Chambon.** 1991.

Retinoic acid receptor  $\tau$ : specific immunodetection and phosphorylation.  
J. Cell. Biol. 115:535-545

**Rochetteegly, C., M. Ouladabdelghani, A. Staub, V. Pfister, I. Scheuer, P. Chambon, and M. P. Gaub.** 1995.

Phosphorylation of the retinoic acid receptor-alpha by protein kinase A.  
Mol. Endocrinol. 9:860-871.

**Ron, D. and D. Mochly Rosen.** 1995.

An autoregulatory region in protein kinase C: the pseudoanchoring site.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92:492-496.

**Rosen, E. D., E. G. Beninghof, and R. J. Koenig.** 1993.

Dimerization interfaces of thyroid hormone, retinoic acid, vitamin-D, and retinoid-X receptors.  
J. Biol. Chem. 268:11534-11541.

**Rosoff, P. M., N. Savage, and C. A. Dinarello.** 1988.

Interleukin-1 stimulates diacylglycerol production in T lymphocytes by a novel mechanism.  
Cell 54:73-81.

**Ruberte, E., P. Dollé, A. Krust, A. Zelent, G. Morriss-Kay, and P. Chambon.** 1990.

Specific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis.  
Development 108:213-222.

**Saatcioglu, F., T. L. Deng, and M. Karin.** 1993.

A Novel Cis Element Mediating Ligand-Independent Activation by c-ErbA - Implications for Hormonal Regulation.  
Cell 75:1095-1105.

**Sadowski, L., J. Ma, S. Triezenberg, and M. Ptashne.** 1988.

GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator.  
Nature 335:563-564.

**Saito, N., A. Kose, A. Ito, K. Hosoda, M. Mori, M. Hirata, K. Ogita, U. Kikkawa, Y. Ono, K. Igarashi, and et al.** 1989.

Immunocytochemical localization of beta II subspecies of protein kinase C in rat brain.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86:3409-3413.

**Sano, K., Y. Takai, J. Yamanishi, and Y. Nishizuka.** 1983.

A role of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase in human platelet activation. Comparison of thrombin and collagen actions.

J. Biol. Chem. 258:2010-2013.

**Saunders, J. W. and M. T. Gasseling.** 1968.

Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry.  
Epithelial-mesenchymal interactions 78-97.

**Saunders, J. W., Jr.** 1948.

The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm.  
J. Exp. Zool. 108:363-403.

**Schaap, D. and P. J. Parker.** 1990.

Expression, purification, and characterization of protein kinase C-epsilon.  
J. Biol. Chem. 265:7301-7307.

**Schena, M., L. P. Freedman, and K. R. Yamamoto.** 1989.

Genes & Develop. 3:1590-1601.

**Schule, R., P. Rangarajan, N. Yang, S. Kliewer, L. J. Ransone, J. Bolado, I. M. Verma, and R. M. Evans.** 1991.

Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88:6092-6096.

**Schüle, R., K. Umesono, D. J. Mangelsdorf, J. Bolado, J. W. Pike, and R. M. Evans.** 1990.

Jun-Fos receptors for vitamin A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene.  
Cell 61:497-504.

**Schulman, I. G., Chakravarti, D., Juguilon, H., Romo, A., and Evans, R.M.** 1995.

Interactions between the retinoid X receptor and a conserved region of the TAT-binding protein mediate hormone-dependent transactivation  
P.N.A.S. 92 : 8288-8292

**Schwabe, J. W., D. Neuhaus, and D. Rhodes.** 1990.

Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor.  
Nature 348:458-461.

**Scott, M. P.** 1992

Vertebrate homeobox gene nomenclature.  
Cell 71 : 551-553.

**Seibenhener, M. L. and M. W. Wooten.** 1993.

Heterogeneity of protein kinase C isoform expression in chemically induced HL-60 cells.  
Exp. Cell Res. 207:183-188.

**Sekiguchi, K., M. Tsukuda, K. Ase, U. Kikkawa, and Y. Nishizuka.** 1988.

Mode of activation and kinetic properties of three distinct forms of protein kinase C from rat brain.



- J. Biochem. Tokyo. **103**:759-765.
- Shayiq, R. M. and M. Black.** 1994.  
Multiple in vitro site-directed mutagenesis using asymmetric polymerase chain reaction.  
Anal. Biochem. **221**:206-208.
- Shea, M. J., D. L. King, M. J. Conboy, B. D. Mariani, and F. C. Kafatos.** 1990.  
Proteins that bind to *Drosophila* chorion cis-regulatory elements: A new C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger protein and a C<sub>2</sub>C<sub>2</sub> steroid receptor-like component.  
Genes & Develop. **4**:1128-1140.
- Shenolikar, S. and A. C. Nairn.** 1991.  
Protein phosphatases: recent progress.  
Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res. **23**:1-121.
- Shubeita, H. E., J. F. Sambrook, and A. M. McCormick.** 1987.  
Molecular cloning and analysis of function cDNA and genomic clones encoding bovine cellular retinoic acid-binding protein.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**:5645-5649.
- Simeone, A., D. Acampora, L. Arcioni, P. W. Andrews, E. Boncinelli, and F. Mavilio.** 1990.  
Sequential activation of HOX2 homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells.  
Nature **346**:763-766.
- Smith, M. A., P. C. Adamson, F. M. Balis, J. Feusner, L. Aronson, R. F. Murphy, M. E. Horowitz, G. Reaman, G. D. Hammond, R. M. Fenton, and et al.** 1992.  
Phase I and pharmacokinetic evaluation of all-trans-retinoic acid in pediatric patients with cancer [see comments].  
J. Clin. Oncol. **10**:1666-1673.
- Smith, S. M. and G. Eichele.** 1991.  
Temporal and regional differences in the expression pattern of distinct retinoic acid receptor-beta transcripts in the chick embryo.  
Development **111**:245-252.
- Soderling, T. R.** 1990.  
Protein kinases. Regulation by autoinhibitory domains.  
J. Biol. Chem. **265**:1823-1826.
- Somers, J. p. and D. B. DeFranco.** 1992.  
Effects of Okadaic Acid, a Protein Phosphatase Inhibitor, on Glucocorticoid Receptor-Mediated Enhancement.  
Mol. Endocrinol. **6**:26-34.
- Stoner, C. M. and L. J. Gudas.** 1989.  
Mouse cellular retinoic acid binding protein: cloning, complementary DNA sequence, and messenger RNA expression during the retinoic acid-induced differentiation of F9 wild type and RA-3-10 mutant teratocarcinoma cells.  
Cancer Res. **49**:1497-1504.
- Stralfors, P., A. Hiraga, and P. Cohen.** 1985.  
The protein phosphatases involved in cellular regulation. Purification and characterisation of the glycogen-bound form of protein phosphatase-1 from rabbit skeletal muscle.  
Eur. J. Biochem. **149**:295-303.
- Sucov, H. M., K. K. Murakami, and R. M. Evans.** 1990.  
Characterization of an autoregulated response element in the mouse retinoic acid receptor type  $\beta$  gene.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**:5392-5396.
- Sugawara, A., P. M. Yen, J. W. Apriletti, R. C. J. Ribeiro, D. B. Sacks, J. D. Baxter, and W. W. Chin.** 1994.  
Phosphorylation selectively increases triiodothyronine receptor homodimer binding to DNA.  
J. Biol. Chem. **269**:433-437.
- Summerbell, D.** 1974.  
A quantitative analysis of the effect of excision of the AER from the chick limb-bud.  
J. Embryol. Exp. Morphol. **32**:651-660.
- Tabin, C. J.** 1991.  
Retinoids, homeoboxes, and growth factors: toward molecular models for limb development.  
Cell **66**:199-217.
- Tairis, N., J. L. Gabriel, M. Gyda, K. J. Soprano, and D. R. Soprano.** 1994.  
Arg(269) and Lys(220) of retinoic acid receptor-beta are important for the binding of retinoic acid.  
J. Biol. Chem. **269**:19516-19522.
- Takai, Y., A. Kishimoto, M. Inoue, and Y. Nishizuka.** 1977.  
Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum.  
J. Biol. Chem. **252**:7603-7609.
- Takai, Y., A. Kishimoto, Y. Iwasa, Y. Kawahara, T. Mori, and Y. Nishizuka.** 1979.  
Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids.  
J. Biol. Chem. **254**:3692-3695.
- Tamura, K., H. Kagechika, Y. Hashimoto, K. Shudo, K. Ohsugi, and H. Ide.** 1990.  
Synthetic retinoids, retinobenzoic acids, Am80, Am580 and Ch55 regulate morphogenesis in chick limb bud.  
Cell Differ. Dev. **32**:17-26.
- Tamura, S., A. Yasui, and S. Tsuiki.** 1989.  
Expression of rat protein phosphatase 2C (IA) in *Escherichia coli*.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. **163**:131-136.
- Tanaka, Y., K. Yoshihara, M. Tsuyuki, A. Itayahironaka, Y. Inada, and T. Kamiya.** 1992.

- Retinoic Acid Specific Induction of a Protein Kinase-C Isoform During Differentiation of HL-60 Cells.  
J. Biochem. (Tokyo) **111**:265-271.
- Tate, B. F. and J. F. Grippo.** 1995.  
Mutagenesis of the ligand binding domain of the human retinoic acid receptor alpha identifies critical residues for 9-cis-retinoic acid binding.  
J. Biol. Chem. **270**:20258-20263.
- Tawara, L., M. Nishikawa, K. Morita, K. Kobayashi, H. Toyoda, S. B. Omay, H. Shima, M. Nagao, T. Kuno, C. Tanaka, and S. Shirakawa.** 1993.  
Down-Regulation by retinoic acid of the catalytic subunit of protein phosphatase Type-2A during granulocytic differentiation of HL-60 cells.  
FEBS Lett. **321**:224-228.
- Thaller, C. and G. Eichele.** 1990.  
Isolation of 3,4-didehydroretinoic acid, a novel morphogenetic signal in the chick wing bud [see comments].  
Nature **345**:815-819.
- Thomas, H. E., H. G. Stunnenberg, and A. F. Stewart.** 1993.  
Heterodimerization of the drosophila ecdysone receptor with Retinoid-X receptor and ultraspiracle.  
Nature **362**:471-475.
- Thomas, T. P., H. S. Talwar, and W. B. Anderson.** 1988.  
Phorbol ester-mediated association of protein kinase C to the nuclear fraction in NIH 3T3 cells.  
Cancer Res. **48**:1910-1919.
- Tickle, C., B. Alberts, L. Wolpert, and J. Lee.** 1982.  
Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region.  
Nature **296**:564-566.
- Tora, L., J. White, C. Brou, D. Tasset, N. Webster, E. Scheer, and P. Chambon.** 1989.  
The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions.  
Cell **59**:477-487.
- Triezenberg, S. J., R. C. Kingsbury, and S. L. McKnight.** 1988.  
Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression.  
Genes Dev. **2**:718-729.
- Tsien, R. W. and R. Y. Tsien.** 1990.  
Calcium channels, stores, and oscillations.  
Annu. Rev. Cell Biol. **6**:PH
- Tung, H. Y. and P. Cohen.** 1984.  
The protein phosphatases involved in cellular regulation. Comparison of native and reconstituted Mg-ATP-dependent protein phosphatases from rabbit skeletal muscle.  
Eur. J. Biochem. **145**:57-64.
- Umesono, K., V. Giguere, C. K. Glass, M. G. Rosenfeld, and R. M. Evans.** 1988.  
Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element.  
Nature **336**:262-265.
- Valcarcel, R., H. Holz, C. G. Jimenez, D. Baretino, and H. G. Stunnenberg.** 1994.  
Retinoid-dependent in vitro transcription mediated by the RXR/RAR heterodimer.  
Genes & Develop. **8**:3068-3079.
- van Bennekum, A. M., W. S. Blaner, I. Seifert Bock, M. Moukides, A. Brouwer, and H. F. Hendriks.** 1993.  
Retinol uptake from retinol-binding protein (RBP) by liver parenchymal cells in vitro does not specifically depend on its binding to RBP.  
Biochemistry **32**:1727-1733.
- VanHoy, M., K. K. Leuther, T. Kodadek, and S. A. Johnston.** 1993.  
The acidic activation domains of the GCN4 and GAL4 proteins are not alpha helical but form beta sheets [see comments].  
Cell **72**:587-594.
- Van Laar, J. H., C. A. Berrevoets, J. Trapman, N. D. Zegers, and A. O. Brinkmann.** 1991.  
Hormone-dependent androgen receptor phosphorylation is accompanied by receptor transformation in human lymph node carcinoma of the prostate cells.  
J. Biol. Chem. **266**:3734-3738.
- Van Laar, J. H., J. Bolt-de Vries, J. Trapman, and A. O. Brinkmann.** 1990.  
Androgen receptor heterogeneity and phosphorylation in human LNCaP cells.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. **166**:193-200.
- Vanderburg, B., R. Slagter Davidov, B. J. M. Vanderleede, S. W. Delaat, and P. T. Vandersaag.** 1995.  
Differential regulation of AP1 activity by retinoic acid in hormone-dependent and-independent breast cancer cells.  
Mol. Cell Endocrinol. **112**:143-152.
- Vasios, G. W., J. D. Gold, M. Petkovich, P. Chambon, and L. J. Gudas.** 1989.  
A retinoic acid-responsive element is present in the 5' flanking region of the laminin B1 gene.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **86**:9099-9103.
- Wagner, M., C. Thaller, T. Jessell, and G. Eichele.** 1990.  
Polarizing activity and retinoid synthesis in the floor plate of the neural tube [see comments].  
Nature **345**:819-822.
- Wanek, N., D. M. Gardiner, K. Muneoka, and S. V. Bryant.** 1991.

Conversion by retinoic acid of anterior cells into ZPA cells in the chick wing bud.  
*Nature* **350**:81-83.

**Wang, J. H. and R. Desai.** 1977.  
Modulator binding protein.  
*J. Biol. Chem.* **252**:4175-4184.

**Warrell, R. P., Jr., S. R. Frankel, W. H. Miller, Jr., D. A. Scheinberg, L. M. Itri, W. N. Hittelman, R. Vyas, M. Andreeff, A. Tafuri, A. Jakubowski, and et al.** 1991.  
Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid).  
*N. Engl. J. Med.* **324**:1385-1393.

**Warrell, R., de Thé, H., Wang, Z., and Degos, L.** 1993  
Acute promyelocytic leukemia.  
*New Engl. J. Med.* **329** : 177-189

**Watanabe, M., C. Y. Chen, and D. E. Levin.** 1994.  
*Saccharomyces cerevisiae* PKC1 encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC.  
*J. Biol. Chem.* **269**:16829-16836.

**Wei, L. L. L., E. K. W. Hui, J. S. Wei, and B. Y. M. Yung.** 1992.  
Alkaline Phosphatase Activity During Differentiation of the Human Promyelocytic Leukemia Cell Line, HL-60.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**:487-494.

**Wei, L. N., J. R. Mertz, D. S. Goodman, and M. C. Nguyen-Huu.** 1987.  
Cellular retinoic acid- and cellular retinol-binding proteins: complementary deoxyribonucleic acid cloning, chromosomal assignment, and tissue specific expression.  
*Mol. Endocrinol.* **1**:526-534.

**Weigel, N. L., T. H. Carter, W. T. Schrader, and B. W. O'Malley.** 1992.  
Chicken Progesterone Receptor Is Phosphorylated by a DNA-Dependent Protein Kinase During *In Vitro* Transcription Assays.  
*Mol. Endocrinol.* **6**:8-14.

**Westin, E. H., F. Wong-Staal, E. P. Gelmann, R. Dalla-Favera, T. S. Papas, J. A. Lautenberger, A. Eva, E. P. Reddy, S. R. Tronick, S. A. Aaronson, and R. C. Gallo.** 1982.  
Expression of cellular homologues of retroviral onc genes in human hematopoietic cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:2490-2494.

**Wieselthier, J. S., J. Bhawan, and H. K. Koh.** 1990.  
Transformation of Sezary syndrome and the sign of Leser-Trelat: a histopathologic study.  
*J. Am. Acad. Dermatol.* **23**:520-522.

**William, F., F. Wagner, M. Karin, and A. S. Kraft.** 1990.

Multiple doses of diacylglycerol and calcium ionophore are necessary to activate AP-1 enhancer activity and induce markers of macrophage differentiation.  
*J. Biol. Chem.* **265**:18166-18171.

**Williams, T., A. Admon, B. Lüscher, and R. Tjian.** 1988.  
Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements.  
*Genes & Develop.* **2**:1557-1569.

**Wilson, T. E., T. J. Fahrner, and J. Milbrandt.** 1993.  
The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor-1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear Receptor-DNA interaction.  
*Mol. Cell. Biol.* **13**:5794-5804.

**Wilson, T. E., R. E. Paulsen, K. A. Padgett, and J. Milbrandt.** 1992.  
Participation of Non-Zinc Finger Residues in DNA Binding by 2 Nuclear Orphan Receptors.  
*Science* **256**:107-110.

**Woods, N. M., K. S. R. Cuthbertson, and P. H. Cobbold.** 1987.  
*Biochem. J.* **246**:619

**Yang, Y., S. Minucci, K. Ozato, R. A. Heyman, and J. D. Ashwell.** 1995.  
Efficient inhibition of activation-induced Fas ligand up-regulation and T cell apoptosis by retinoids requires occupancy of both retinoid X receptors and retinoic acid receptors.  
*J. Biol. Chem.* **270**:18672-18677.

**Yao, T. P., W. A. Seagraves, A. E. Oro, M. McKeown, and R. M. Evans.** 1992.  
*Drosophila* Ultraspiracle Modulates Ecdysone Receptor Function via Heterodimer Formation.  
*Cell* **71**:63-72.

**Yen, A., S. Chandler, M. E. Forbes, Y. K. Fung, A. T'Ang, and R. Pearson.** 1992.  
Coupled down-regulation of the RB retinoblastoma and c-myc genes antecedes cell differentiation: possible role of RB as a "status quo" gene.  
*Eur. J. Cell Biol.* **57**:210-221.

**Yu, V. C., C. Delsert, B. Andersen, J. M. Holloway, O. V. Devary, A. M. Naar, S. Y. Kim, J. M. Boutin, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld.** 1991.  
RXRbeta - A Coregulator That Enhances Binding of Retinoic Acid, Thyroid Hormone, and Vitamin-D Receptors to Their Cognate Response Elements.  
*Cell* **67**:1251-1266.

**Zalewski, P. D., I. J. Forbes, L. Valente, S. Apostolou, and N. P. Hurst.** 1988.  
Translocation of protein kinase C to a Triton-insoluble sub-cellular compartment induced by the lipophilic gold compound auranofin.

Biochem. Pharmacol. **37**:1415-1417.

**Zechel, C., X. Q. Shen, J. Y. Chen, Z. P. Chen, P. Chambon, and H. Gronemeyer.** 1994.

The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the Full-Length receptors to direct repeats. EMBO J. **13**:1425-1433.

**Zelent, A., C. Mendelsohn, P. Kastner, A. Krust, J. M. Garnier, F. Ruffenach, P. Leroy, and P. Chambon.** 1991.

Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor Beta are generated by usage of two promoters and alternative splicing. EMBO J. **10**:71-81.

**Zenke, M., A. Munoz, J. Sap, B. Vennstrom, and H. Beug.** 1990.

v-erbA oncogene activation entails the loss of hormone-dependent regulator activity of c-erbA. Cell **61**:1035-1049.

**Zhang, G., M. G. Kazanietz, P. M. Blumberg, and J. H. Hurley.** 1995.

Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. Cell **81**:917-924.

**Zhang, J. and S. T. Jacob.** 1990.

Purification and characterization of a novel factor which stimulates rat ribosomal gene transcription in vitro by interacting with enhancer and core promoter elements. Mol. Cell. Biol. **10**:5177-5186.

**Zhang, J., L. Wang, J. Schwartz, R. W. Bond, and W. R. Bishop.** 1994.

Phosphorylation of Thr642 is an early event in the processing of newly synthesized protein kinase C beta 1 and is essential for its activation. J. Biol. Chem. **269**:19578-19584.

**Zhang, L. X., K. J. Mills, M. I. Dawson, S. J. Collins, and A. M. Jetten.** 1995.

Evidence for the involvement of retinoic acid receptor RAR alpha-dependent signaling pathway in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoids. J. Biol. Chem. **270**:6022-6029.

**Zhang, Y. X., C. Beck, A. Poletti, D. P. Edwards, and N. L. Weigel.** 1994.

Identification of phosphorylation sites unique to the B form of human progesterone receptor - In vitro phosphorylation by casein kinase II. J. Biol. Chem. **269**:31034-31040.

**Zhou, Z. X., J. A. Kempainen, and E. M. Wilson.** 1995.

Identification of three proline-directed phosphorylation sites in the human androgen receptor. Mol. Endocrinol. **9**:605-615.

