

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse

Présentée pour l'obtention du grade de
Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

par

Christophe RACHEZ

**DETERMINANTS STRUCTURAUX DU RECEPTEUR HUMAIN
ALPHA DE L'ACIDE RETINOÏQUE (RAR) IMPLIQUES
DANS LA DIMERISATION ET LA LIAISON A L'ADN**

soutenue le 27 février 1996 devant la Commission d'examen

N° d'ordre :

JURY :

Président : Pr A. VERBERT
Rapporteurs : Pr P. LUSTENBERGER
Dr J.-M. RENOIR
Examineurs : Pr J.-P. HENICHART
Pr P. SAUTIERE
Pr P. FORMSTECHE



à Nelly,
à nos parents.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Biochimie Structurale de la faculté de Médecine de Lille. Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements :

au Professeur Pierre FORMSTECHEER pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, et pour l'intérêt qu'il a porté à l'avancement de mes travaux.

au Professeur André VERBERT pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

au Docteur Jack-Michel RENOIR et au Professeur Patrick LUSTENBERGER pour avoir accepté de juger ce travail et de siéger à ce jury.

au Professeur Pierre SAUTIERE pour avoir accepté d'examiner cette thèse. Vos conseils ont été de précieux atouts dans notre choix de techniques d'étude du récepteur.

au Professeur Jean-Pierre HENICHART pour avoir accepté d'examiner cette thèse. C'est au sein de votre équipe que j'ai pu débiter ma thèse. J'ai toujours, depuis, pu apprécier votre présence, scientifiquement et humainement.

au Docteur Philippe LEFEBVRE pour avoir spontanément pris la direction scientifique de ce travail. Merci pour toutes tes idées judicieuses et tes encouragements.

à tous les membres du laboratoire pour leur sympathie et leurs conseils.

aux stagiaires Christophe et Jean-Marc pour leur précieuse contribution technique.

Ce travail a donné lieu aux communications suivantes :

Publications :

On the differential contribution of amino-acid side chains to the DNA binding and dimerization properties of the human retinoic acid receptor alpha.

C. Rachez, P. Sautiere, P. Formstecher, P. Lefebvre, soumis.

Structural determinants of the ligand binding domain of the human retinoic acid receptor alpha.

B. Lefebvre, C. Rachez, P. Formstecher, P. Lefebvre (1995) *Biochemistry* 34, 5477-5485.

Communications par affiche :

Regulation of the function of the nuclear receptors.

P. Lefebvre, P. Dao Phan, B. Lefebvre, C. Rachez, A. Tahayato, P. Formstecher (1995) EMBO Workshop, Ponto Conte, Italy, 27-30 avril.

On the differential contribution of amino-acid side chains to the DNA binding and dimerization properties of the human retinoic acid receptor alpha.

C. Rachez, P. Formstecher, P. Lefebvre (1995) European Retinoid Research Group Conference, Nice, France, 8-11 octobre.

Purification d'un récepteur de l'acide rétinoïque et étude du rôle de plusieurs types d'acides-amino dans sa liaison à l'ADN.

C. Rachez, P. Lefebvre, P. Formstecher (1994) XXI^o Forum des Jeunes Chercheurs, Reims, France.

Mise en évidence de thiols essentiels à l'interaction spécifique des récepteurs de l'acide rétinoïque avec l'ADN.

C. Rachez, P.M. Danzé, P. Formstecher, M. Dautrevaux (1993) VII^o Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, France.

Publication hors du cadre de ce travail :

Coordinate regulation of glycogen metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Induction of glycogen branching enzyme.

V.J. Thon, C. Vigneron-Lesens, T. Marianne-Pépin, J. Montreuil, A. Decq, C. Rachez, S.G. Ball, J.F. Cannon (1992) *Journal of Biological Chemistry* 267, 15224-15228.

Table des matières

	pages
Abréviations	1
Résumé	2
Généralités	3
Introduction	4
I. Les dérivés de la vitamine A et leurs activités biologiques	4
1. Biosynthèse et source de l'acide rétinoïque	4
2. Métabolisme et dérivés biologiquement actifs	6
3. Rétinoïdes de synthèse	6
4. Activités biologiques	8
4.1. Activités spécifiques	8
4.2. Rétinoïdes, embryogénèse et morphogénèse	8
4.3. Rétinoïdes et contrôle de la prolifération cellulaire	11
4.4. Rétinoïdes et pathologies	11
II. Les récepteurs de l'acide rétinoïque	13
1. Les protéines de transport intracellulaires	13
2. Une superfamille	15
3. Les RAR	15
4. Les RXR	16
5. Un nouveau ligand parmi les rétinoïdes	16
6. Acide rétinoïque et régulation de la transcription	17
7. Expression différentielle des récepteurs, disruptions géniques	18
III. Structure et fonctions des récepteurs nucléaires	18
1. Domaines fonctionnels	18
2. Liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires	20
2.1. Trois groupes de récepteurs	20
2.2. Les éléments de réponse (HRE)	21
3. Structure du domaine de liaison à l'ADN	24
3.1. Des doigts de zinc aux boîtes fonctionnelles.	24
3.2. Les molécules d'eau et la spécificité	28
3.3. D'autres boîtes fonctionnelles du domaine de liaison à l'ADN	30
4. La dimérisation des récepteurs nucléaires	32
4.1. Motifs de dimérisation du domaine de liaison à l'ADN: les boîtes D et DR	32
4.2. Données structurales sur le complexe RXR-TR-TRE	35
5. Dimérisation et HBD	35
5.1. Structure et dimérisation dans le domaine E	35
5.2. Ligand et dimérisation	39

5.3. Stratégies d'analyse structurale des LBD	40
6. La transactivation	44
6.1. Structure des motifs de transactivation	44
6.2. Ligand, dimérisation et voies de transactivation	46
6.3. Modulation de la transactivation	48
Résultats & Discussion	50
1. Stratégie	51
2. Purification du RAR par affinité	54
2.1 Principe	54
2.2. Clonage du (His) ₆ -hRAR α	56
2.3. Surexpression et purification du (His) ₆ -hRAR α	56
3. Caractérisation fonctionnelle du (His) ₆ -hRAR α purifié	58
3.1. Tests de fonctionnalité du RAR par retard sur gel	58
3.2. Test de liaison du RXR	58
4. Modifications chimiques du RAR et propriétés de liaison à l'ADN et dimérisation :	
Effet de l'alkylation des cystéines par la N-éthylmaléimide	60
4.1. Principe et mise en oeuvre des modifications chimiques du RAR	60
4.2. Effets de modifications chimiques des cystéines par la N-éthylmaléimide	62
5. Mise en évidence d'une contribution distincte des résidus Arg, Lys, Tyr, His et Trp aux fonctions de liaison à l'ADN et dimérisation du RAR	65
5.1. Modification chimique des lysines	65
5.2. Modification chimique des arginines	65
5.3. Modification chimique des tyrosines	66
5.4. Modification chimique des histidines	66
5.5. Modification chimique du tryptophane	68
6. Localisation des résidus lysine essentiels à la fonctionnalité du RAR α	68
6.1. Marquage radioactif des lysines exposées du RAR α	68
6.2. Localisation par HPLC des résidus lysine radiomarqués	71
6.3. Un motif de dimérisation du RAR α	71
6.4. Effets de la mutagenèse dirigée	74
Conclusion & Perspectives	75
Appendice technique	78
Références bibliographiques	103

Abréviations

CRABP :	"cellular retinoic acid binding protein" ou protéine cellulaire de liaison du t-RA
CRBP :	"cellular retinol binding protein" ou protéine cellulaire de liaison du rétinol
ER :	récepteur des oestrogènes
ERE :	élément de réponse des oestrogènes
GR :	récepteur des glucocorticoïdes
GRE :	élément de réponse des glucocorticoïdes
HRE :	"hormone response element" ou élément de réponse hormonal
LBD :	"ligand binding domain" ou domaine de liaison au ligand
PPAR :	"peroxisome proliferator activated protein"
PR :	récepteur de la progestérone
RA :	acide rétinoïque
t-RA :	acide rétinoïque tout trans
9-cis RA :	acide 9-cis rétinoïque
RAR :	récepteur de l'acide rétinoïque tout trans
RARE :	élément de réponse de l'acide rétinoïque tout trans
RXR :	récepteur de l'acide 9-cis rétinoïque
RXRE :	élément de réponse de l'acide 9-cis rétinoïque
TR :	récepteur des hormones thyroïdiennes
TRE :	élément de réponse des hormones thyroïdiennes
VDR :	récepteur de la 1,25-dihydroxy-vitamine D3
VDRE :	élément de réponse de la 1,25-dihydroxy-vitamine D3
ZPA :	"zone of polarizing activity" ou zone d'activité polarisante

Résumé

L'acide rétinoïque, un dérivé de la vitamine A, est un élément clef du contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Son mécanisme d'action met en jeu l'activation de gènes cibles, notamment via deux récepteurs nucléaires. Dans cette étape, les récepteurs de l'acide rétinoïque tout-trans (RAR) et de son dérivé 9-cis (RXR) se lient sous forme d'hétérodimères à des éléments de réponse appelés RARE. Le positionnement précis des deux récepteurs sur l'ADN cible est déterminé par plusieurs motifs structuraux qui forment des interfaces de dimérisation des récepteurs et d'interaction avec l'ADN.

Nous avons mis au point une stratégie basée sur des modifications chimiques spécifiques d'acides aminés afin d'examiner le rôle des lysines, arginines, cystéines, histidines, tyrosines et tryptophane du RAR dans ses fonctions de liaison à l'ADN, d'homodimérisation et d'hétérodimérisation en présence et en absence d'ADN. Nous avons observé une implication différentielle de ces acides aminés dans les différentes fonctions testées. Les acides aminés basiques, lysines et arginines, apparaissent impliqués dans toutes les activités étudiées. Les cystéines et tyrosines sont impliquées essentiellement dans les fonctions de dimérisation en présence d'ADN. Les histidines semblent essentielles à la seule formation d'homodimères sur le RARE, alors que l'unique tryptophane n'est requis pour aucune fonction testée.

Dans un deuxième temps, le radiomarquage des lysines accessibles du RAR natif a permis de localiser ces résidus dans la 8^e "heptad repeat" au sein du domaine de liaison au ligand. Ces résultats fournissent une mise en évidence directe de l'implication différentielle de résidus à groupement basique, thiol ou aromatique dans les propriétés de liaison à l'ADN, homodimérisation et hétérodimérisation du RAR, et illustrent la mise en jeu de plusieurs interfaces de dimérisation.

GENERALITES

Introduction

La vitamine A (et ses dérivés) est depuis longtemps reconnue comme étant l'un des composants essentiels de l'alimentation, car ses effets sont observés dans les mécanismes de la croissance, la reproduction, la vision, l'embryogénèse. Une carence alimentaire en vitamine A - phénomène encore d'actualité dans de nombreux pays en voie de développement - est d'ailleurs à l'origine du syndrome "VAD" (pour "dietary Vitamin A Deprivation") caractérisé par un retard de croissance, la cécité, la stérilité et parfois même la mort.

Les effets de la vitamine A (ou rétinol) sont médiés par certains de ses dérivés, tels que l'acide rétinoïque tout-trans et son isomère 9-cis. Leur mécanisme d'action (figure 1) passe par la liaison à deux types de récepteurs nucléaires RAR et RXR, eux-mêmes impliqués dans la régulation de l'expression de certains gènes. C'est par ces voies de régulation que la vitamine A est un élément clef du contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaires.

I. Les dérivés de la vitamine A et leurs activités biologiques

1. Biosynthèse et source de l'acide rétinoïque

L'acide rétinoïque est l'un des nombreux dérivés de la vitamine A (ou rétinol). Il est présent dans la circulation plasmatique à des taux de 4 à 14 nmol/l chez l'homme (De Leenheer et al., 1982). Son précurseur de biosynthèse, le rétinol, ne peut pas être synthétisé de-novo chez les animaux, d'où son nom de vitamine, mais il peut être formé à partir des caroténoïdes végétaux (essentiellement le beta-carotène) apportés par l'alimentation. Le rétinol est absorbé dans l'intestin selon la voie des lipides puis est stocké notamment dans le foie.

Le processus exact de biosynthèse enzymatique endogène de l'acide rétinoïque à partir du rétinol n'est toujours pas clairement établi (pour revue: Blaner et Olson, 1994). L'alcool déshydrogénase du foie (ADH) pourrait oxyder le rétinol en rétinal, à son tour oxydé en acide rétinoïque par l'aldéhyde oxydase (figure 1). Or, par leur caractère hydrophobe, les rétinoïdes dans le plasma se trouvent associés à des protéines de transport spécifiques. Ce sont donc des complexes ligand-transporteur qui peuvent servir de substrat à des enzymes spécifiques. Une rétinol deshydrogénase (RoDH) a en effet été clonée (Chai et al., 1995). Elle est issue des microsomes hépatiques et elle est active sur le complexe rétinol-CRBP (Cellular Retinol Binding Protein). Ainsi de multiples activités enzymatiques sont probablement impliquées dans la formation de l'acide rétinoïque.

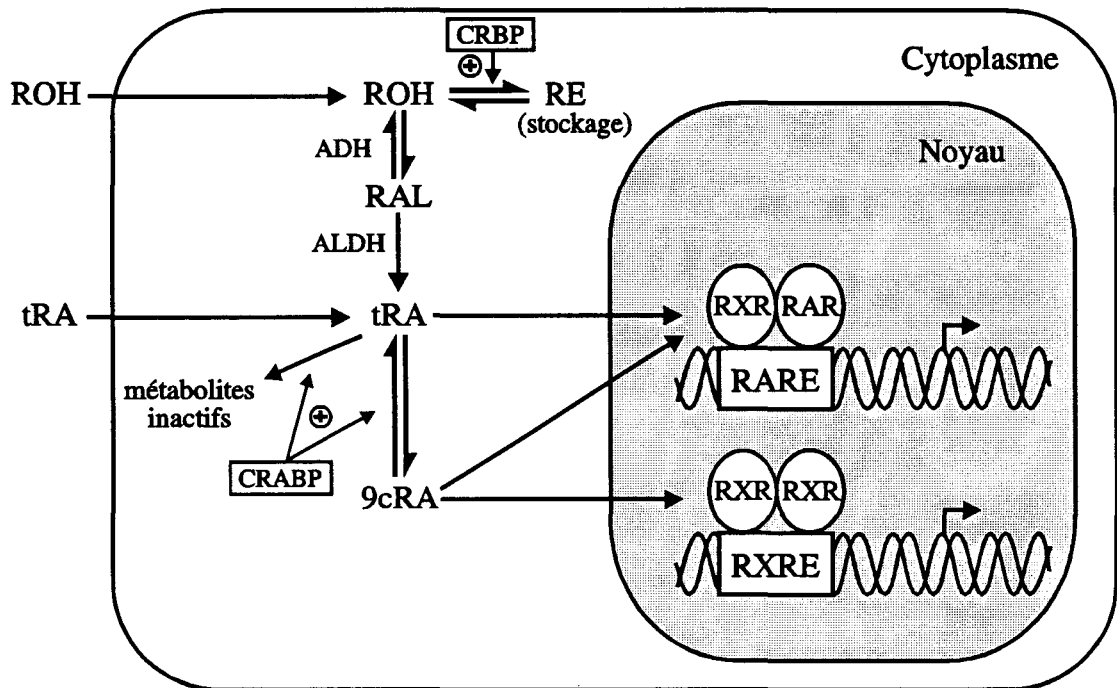


Figure 1: Mécanisme d'action des rétinoïdes dans la cellule (d'après Mangelsdorf et al., 1994)

ROH : rétinol
 RAL : rétinol
 t-RA : acide rétinoïque tout-trans
 9-cis RA : acide rétinoïque 9-cis
 RE : rétinyl ester
 ADH : alcool deshydrogénase
 ALDH : aldéhyde deshydrogénase

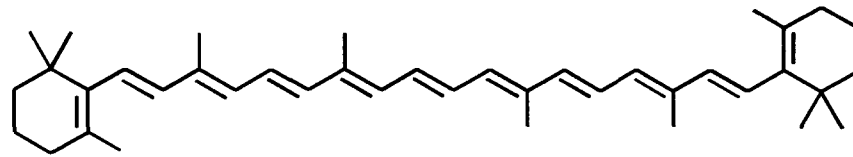
CRABP : cellular RA binding protein
 CRBP : cellular ROH binding protein
 RAR : retinoic acid receptor
 RXR : retinoid-X receptor

2. Métabolisme et dérivés biologiquement actifs

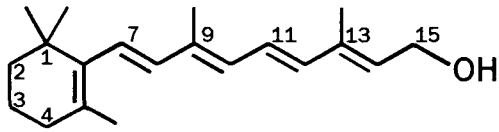
Il existe un grand nombre de métabolites dérivés directement de l'acide rétinoïque ou plus largement issus du rétinol (pour revue : Blaner et Olson, 1994). Cette diversité est due à une multitude de voies métaboliques pour ces molécules : l'acide rétinoïque tout-trans peut être modifié par isomérisation de sa chaîne aromatique en divers dérivés en cis (9-, 11-, 13-cis RA), ou modifié en différents dérivés oxo-, époxy-, didéhydro-RA, ou encore éliminé sous forme de dérivés glucuronides... Parmi toutes ces molécules naturelles, certaines sont de simples produits du catabolisme, mais d'autres sont pourvues d'une activité biologique propre. En effet, hormis l'acide rétinoïque tout-trans lui-même (figure 2), qui est le ligand spécifique du RAR, son isomère 9-cis est également impliqué dans des messages hormonaux puisqu'il a été identifié comme étant le ligand du RXR (Levin et al., 1992; Heyman et al., 1992) et il lie aussi le RAR. L'isomère 13-cis RA est utilisé en thérapeutique (sous le nom d'isotrétinoïne). D'autre part dans l'étude de la morphogénèse du membre de poulet, des effets biologiques ont été montrés pour le dérivé 3,4-didéshydro-RA (Thaller et Eichele, 1990), et plus récemment un effet morphogénétique chez l'embryon pour l'acide 4-oxo-rétinoïque (Pijnappel et al., 1993); ces dérivés sont tous deux capables d'activer le RAR. Dans certains types cellulaires, le dérivé 14-hydroxy-4,14-rétro-rétinol peut promouvoir des messages intracellulaires indispensables à la croissance (Buck et al., 1991). Cette diversité des métabolites actifs contribue à la diversité des messages qui sont issus de la vitamine A.

3. Rétinoïdes de synthèse

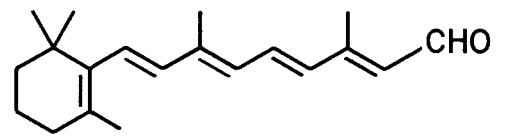
Les effets des dérivés de la vitamine A en font des agents thérapeutiques prometteurs, mais leur utilisation est restée limitée aux formes les plus sévères des pathologies du fait de leur toxicité qui est la source d'effets secondaires importants. C'est l'une des raisons du développement de la recherche de rétinoïdes synthétiques moins toxiques mais aussi efficaces que les molécules naturelles. Différentes générations de rétinoïdes de synthèse sont apparues suivant le type de modification apportée aux molécules de base t-RA et 9-cis RA. La plupart des rétinoïdes synthétiques sont des molécules plus rigides que les ligands naturels car ils sont basés sur des structures polycycliques aromatiques. Dans ce domaine, il existe des ligands sélectifs de divers sous-types de RAR : RAR α , RAR β ou RAR γ (Delescluse et al., 1991; Martin et al., 1992), ou bien des ligands spécifiques du RXR (Lehmann et al., 1993) alors que le 9-cis RA est ligand de RAR et RXR. Il existe encore des ligands synthétiques à activité antagoniste des récepteurs RAR α (Apfel et al., 1992) ou RAR α et β (Eyrolles et al., 1994). Ces ligands spécifiques



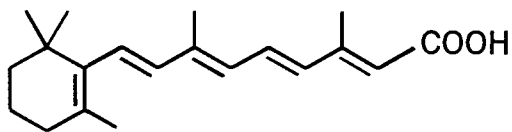
beta-carotène



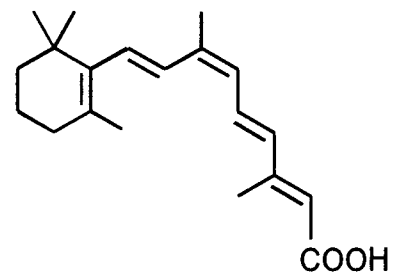
Rétinol
Vitamine A



Rétinal



Acide tout-trans Rétinoïque
(t-RA)



Acide 9-cis Rétinoïque
(9-cis RA)

Figure 2 : Précurseur et dérivés de la vitamine A

constituent des outils d'étude des récepteurs qui permettent de disséquer les différents effets induits par les rétinoïdes in vivo.

4. Activités biologiques

4.1. Activités spécifiques

Le rôle de la vitamine A dans la vision est l'un des premiers effets dont le mécanisme d'action a été élucidé. C'est un phénomène qui met en jeu l'interaction d'un dérivé 11-cis rétinol avec l'opsine, une protéine des cellules en bâtonnet de la rétine, pour former la rhodopsine, un pigment photosensible à la base de l'influx nerveux (pour revue : Wald, 1968). Mais ce mécanisme, qui ne met pas en jeu de récepteurs nucléaires, est spécifique de la rétine.

Les dérivés de la vitamine A seraient également impliqués dans la spermatogénèse des mammifères selon un mécanisme de différenciation cellulaire (van Pelt and de Rooij, 1991).

Les rétinoïdes pourraient également être impliqués dans la régulation du système immunitaire (pour revue : Ross et Hammerling, 1994). D'ailleurs l'acide rétinoïque contrôle un certain nombre de gènes de l'immunité : certaines interleukines et leurs récepteurs (IL-1, IL-2, IL-8, récepteur d'IL-6) mais aussi des interférons (IFN) (pour revue: Gudas et al., 1994).

Des études ont également montré les effets des rétinoïdes sur l'apoptose. Les régulations de ce phénomène, encore appelé mort cellulaire programmée, sont étudiées au sein du laboratoire, notamment sur des lignées cellulaires myélomateuses humaines. Les rétinoïdes ont un rôle sur l'induction des caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose dans ces cellules (mesures de prolifération, fragmentation cellulaire, induction de la transglutaminase tissulaire,...). Ces mécanismes sont complexes car un grand nombre de facteurs s'imbriquent dans l'induction de ce phénomène.

4.2. Rétinoïdes, embryogénèse et morphogénèse

L'acide rétinoïque possède un rôle majeur dans les mécanismes du développement embryonnaire. Il a été longuement étudié dans le cas de certains modèles biologiques comme le développement embryonnaire du membre de poulet. Les membres de mammifères se développent à partir de régions appelées "bourgeons" qui émergent de chaque flanc de l'embryon. La croissance de ces bourgeons donne naissance progressivement à l'ensemble des structures organisées du membre adulte (os, cartilages, muscles, peau, doigts ou orteils). Une expérience de Saunders et Gasseling (1968) a permis

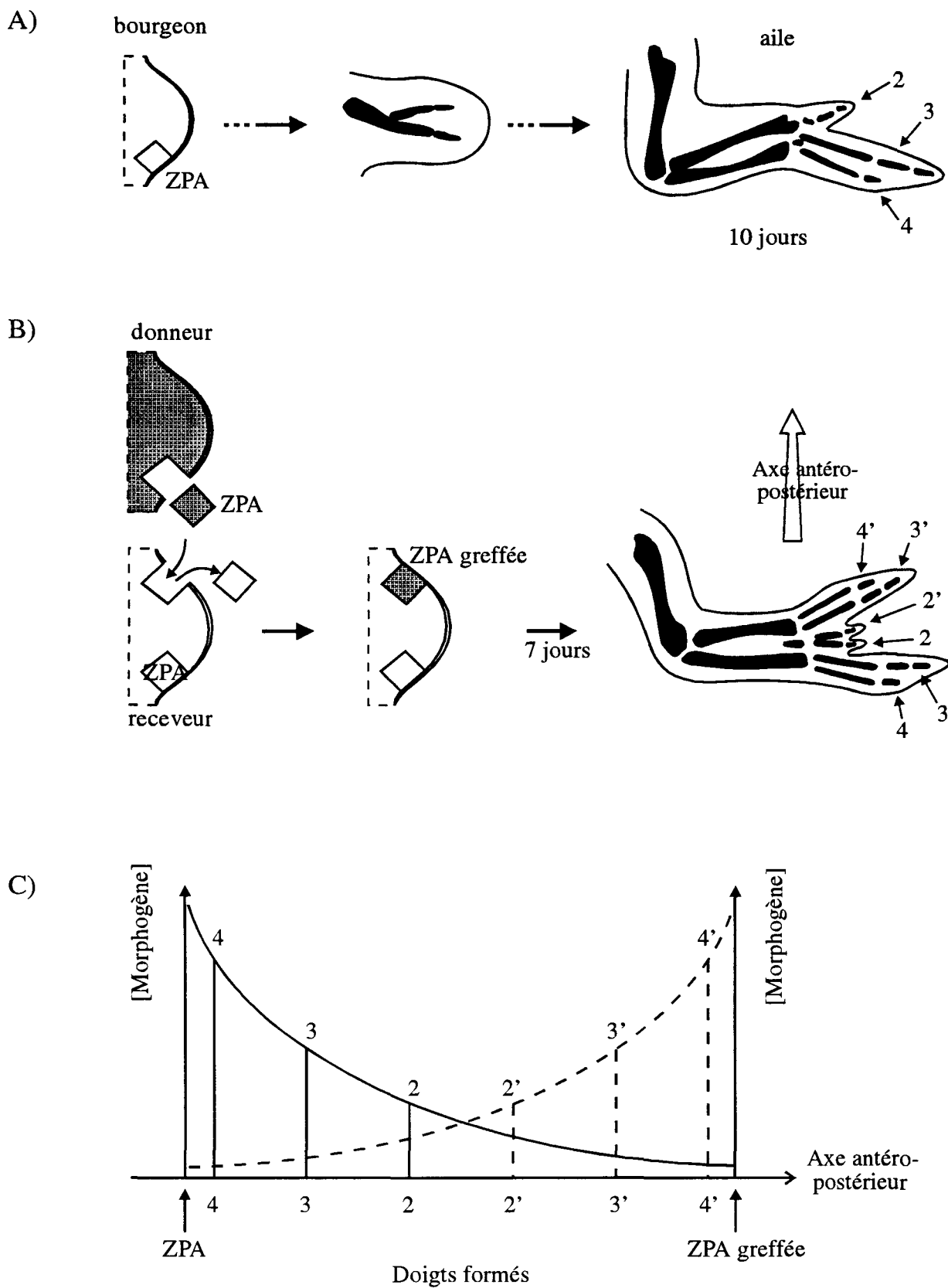


Figure 3 : Duplication du membre de poulet par greffe de ZPA

A) Morphogénèse normale de l'aile

B) Induction de doigts surnuméraires par greffe de ZPA

C) Modèle de duplication par agent morphogène

de définir une zone précise du bourgeon d'aile du poulet responsable du développement correct des doigts. Cette zone de cellules à propriété inductrice est appelée ZPA ("Zone of Polarizing Activity"). En effet la greffe de cette zone (donneur) dans la partie antérieure d'un autre bourgeon de membre (receveur) induit une duplication des structures du membre receveur comme une image en miroir (figure 3, A et B). Or ces structures induites sont des tissus provenant non pas de la greffe mais du receveur.

La relation entre cette expérience et l'acide rétinoïque réside dans le fait que la greffe de ZPA peut être remplacée par l'implant d'une bille de gel imprégnée de t-RA qui produit exactement les mêmes effets de duplication (Tickle et al., 1982). Cet effet du t-RA a suscité un grand intérêt car l'expérience initiale de greffe de ZPA avait donné naissance à un modèle de mécanisme basé sur l'existence d'une substance inconnue définie comme agent morphogène. Un morphogène est ici une substance synthétisée dans la ZPA et capable de diffuser dans les tissus environnants. C'est le gradient formé par cet agent qui explique la formation successive des doigts 4, 3, 2, le doigt 4 étant formé dans la zone de concentration la plus élevée (figure 3C). Le t-RA apparaissait alors comme la substance morphogène (Maden, 1982). Mais une étude fine de l'expression des protéines induites par greffe de ZPA ou par le t-RA a révélé des différences d'effets entre les deux (Noji et al., 1991). De plus cette expression en réponse au t-RA exogène n'apparaît qu'après un certain délai (10 heures) en accord avec un effet indirect. Il en résulte que le t-RA ne serait pas LE morphogène mais qu'il déclenche une cascade d'inductions à l'origine de la morphogénèse dans le membre de poulet, mais aussi plus généralement dans tous les mécanismes d'embryogénèse des mammifères.

En fait, le t-RA semble réguler l'expression de certains gènes impliqués dans des mécanismes de morphogénèse, comme la famille des gènes Hox chez l'homme ou la souris (pour revue: Gudas, 1994). Chaque sous-famille comporte plusieurs gènes physiquement voisins sur un même chromosome. Au sein d'une même sous-famille, les gènes sont d'autant plus sensibles à l'activation par le t-RA qu'ils sont situés en aval de la suite des gènes Hox. Un élément de réponse au t-RA a même été identifié dans le cas d'un gène Hox a-1 (Langston and Gudas, 1992).

Chez la drosophile, des mutants affectant le développement normal de la larve ont permis d'isoler des gènes essentiels à ce processus. Les homologues de ces gènes chez les mammifères définissent de nouveaux acteurs impliqués dans le développement. C'est le cas du gène Sonic-Hedgehog, l'homologue murin du gène Hedgehog. Ce gène est impliqué dans l'organisation spatiale du système nerveux central. Mais surtout, on a montré que, dans le bourgeon de membre, l'addition de t-RA qui induit une duplication des doigts provoque aussi l'activation du gène Sonic-Hedgehog (Riddle et al., 1993). Ce gène pourrait définir un nouvel agent morphogène ou une nouvelle étape dans la cascade d'inductions initiée par le t-RA. C'est cette cascade qui permettrait d'établir les signaux de

positionnement spatial dans les différents tissus sous forme d'interactions cellulaires. Le modèle d'étude qu'est l'embryogénèse peut fournir des bases à une compréhension du rôle des rétinoïdes dans les communications cellulaires et dans la différenciation.

4.3. Rétinoïdes et contrôle de la prolifération cellulaire

Les rétinoïdes ont un effet de régulation de la prolifération cellulaire, mais leur rôle majeur réside dans une activité de différenciation cellulaire et tissulaire. Ces effets des rétinoïdes peuvent être disséqués par l'étude de nombreuses lignées cellulaires en culture, telles que les cellules promyélocytaires humaines HL-60 (Breitman et al., 1980) qui se développent en granulocytes matures sous l'effet du t-RA. La différenciation cellulaire (pour revue : Gudas et al., 1994) peut se caractériser par différents phénomènes : une prolifération cellulaire réduite, un accroissement de la capacité d'adhésion des cellules, une baisse des propriétés invasives, l'expression de marqueurs génétiques spécifiques d'un type cellulaire... En fait, ces phénomènes sont le résultat d'une altération de l'expression d'une grande variété de gènes. En effet, le t-RA affecte les taux d'expression de nombreux éléments de la machinerie cellulaire, comme par exemple (Gudas et al., 1994) :

- des hormones peptidiques (hormone de croissance, oxytocine...)
- des facteurs de croissance et leurs récepteurs (Epidermal Growth Factor, Transforming growth Factor, des interleukines et interférons...),
- certaines enzymes (ornithine décarboxylase, alcool deshydrogénase...)
- des facteurs de transcription comme les homéoprotéines impliquées dans la morphogénèse
- des protéines de structure (protéines de la matrice extracellulaire, stromélysine, collagénase, protéines de gap-junctions...)

Tous ces éléments peuvent être impliqués dans le processus qui conduit à l'état différencié d'un type cellulaire.

4.4. Rétinoïdes et pathologies

Les effets différenciateurs des rétinoïdes ont jusqu'à présent deux champs d'applications médicales : les affections de la peau et les cancers.

Les rétinoïdes ont un effet sur le maintien des épithéliums. Ils réduisent notamment les phénomènes de kératinisation de la peau. Cet effet est mis à profit dans le traitement de diverses pathologies de la peau telles le psoriasis, les formes sévères d'acné et diverses hyperkératoses. Deux dérivés de synthèse de la vitamine A sont principalement utilisés en dermatologie : l'isotrétinoïne (acide 13-cis rétinoïque) et l'étrétinate (un analogue

aromatique du t-RA). Mais de nombreux rétinoïdes synthétiques sont actuellement développés au niveau de la recherche médicale.

L'application majeure des rétinoïdes, qui pourrait justifier à elle seule l'intérêt porté à ces molécules, est leur effet dans le traitement et la chimioprévention de certains cancers. Les rétinoïdes sont capables d'inhiber la prolifération de certain types de cellules tumorales humaines : (pour références : Pfahl et al., 1994)

- leucémies aiguës myéloïdes (AML) et à promyélocytes (APL)
- carcinomes mammaire et à cellules squameuses
- certains cancers du poumon
- chondrosarcome, ostéosarcome
- mélanome, neuroblastome, cancer de la prostate

Les études des effets antinéoplasiques des rétinoïdes ont été menées chez l'homme (études épidémiologiques), chez les animaux en laboratoire (études de cancérogénèse chimique induite) et sur des lignées cellulaires tumorales en culture.

* La leucémie aiguë à promyélocytes (APL)

L'effet du t-RA sur la leucémie aiguë à promyélocytes (APL) est le premier exemple de thérapie anticancéreuse par différenciation cellulaire (pour revue : Degos, 1993). Le traitement de cette leucémie par le t-RA conduit à la différenciation des cellules malignes et une rémission complète est observée chez 90 % des patients en quelques semaines (Huang et al., 1988). Mais des rechutes peuvent apparaître en quelques mois car l'apport massif de t-RA induit son propre métabolisme. Actuellement, ce type de traitement est couplé à la chimiothérapie. Cette leucémie dite APL est une pathologie peu fréquente associée à une translocation entre les chromosomes 15 et 17 t(15:17), qui fusionne le gène du récepteur alpha du t-RA (RAR α) avec un gène du chromosome 15 appelé PML ("promyelocytic leukemia"). La protéine PML est spécifiquement associée à une structure fonctionnelle du noyau appelée corps nucléaire dont le rôle pourrait être lié à la prolifération cellulaire. La protéine de fusion PML-RAR α semble agir en bloquant la différenciation des cellules promyélocytaires mais le mécanisme impliqué dans ce phénomène est encore inconnu. Certains auteurs suggèrent que PML-RAR α conduit à une délocalisation du RAR α et de PML, phénomène réversible par un traitement au t-RA (Dyck et al., 1994). Il apparaît donc que RAR α peut être impliqué dans le processus normal de différenciation des promyélocytes, et l'expression aberrante de ce récepteur serait une source de leucémogénèse.

* Un type de cancer du poumon

L'importance des récepteurs de l'acide rétinoïque et de leurs anomalies de structure ou d'expression est de plus en plus documentée dans les cancers du poumon et des voies aérodigestives supérieures. Notamment, un défaut d'expression de RAR β est déjà observé dans les lésions ORL précancéreuses (Lotan et al., 1995). Ce phénomène est fréquemment associé à la délétion d'une partie du chromosome 3, région qui est le site du gène RAR β . Cette même délétion et ce défaut d'expression sont également observés dans un type de cancer du poumon (carcinome pulmonaire épidermoïde). Or le gène RAR β ré-introduit par transfection dans ces cellules cancéreuses en culture provoque une baisse de leur prolifération en présence du t-RA et on observe surtout une diminution de leur pouvoir tumorigène dans des souris "nude" (Houle et Bradley, 1993). Ces faits permettent de suggérer que le gène RAR β pourrait avoir un rôle suppresseur de tumeur dans les poumons.

II. Les récepteurs de l'acide rétinoïque

1. Les protéines de transport intracellulaires

L'existence d'un récepteur nucléaire permettant de médier les effets transcriptionnels de la vitamine A a été supposée dès les années 70, par similitude avec les mécanismes d'action des hormones stéroïdes et de la vitamine D qui passent tous par un récepteur. Les recherches d'un récepteur nucléaire liant l'acide rétinoïque tout-trans (t-RA) ont d'abord mené à la découverte d'une petite protéine cytoplasmique (15 kD) liant le t-RA : la CRABP (Cellular Retinoic Acid Binding Protein) par Ong et Chytil (1978).

Deux types de CRABP (types I et II) ont été caractérisés jusqu'à présent. Ces protéines pourraient agir comme des transporteurs de t-RA dans les cellules, mais leurs fonctions ne sont pas clairement définies car il apparaît qu'elles ne sont pas forcément indispensables à l'action du t-RA dans la cellule. En effet ces protéines sont essentiellement exprimées lors de l'embryogénèse, mais leur expression chez l'adulte est restreinte notamment à la peau (pour revue: Ong et al., 1994) alors que les effets du t-RA sont beaucoup plus diversifiés. L'inactivation des gènes des CRABP-I et -II par recombinaison homologe chez la souris montre que ces protéines ne sont pas indispensables au développement, la fertilité, et la vie adulte de la souris (Lampron et al., 1995). De plus, un certain nombre de rétinoïdes de synthèse très actifs ne se lient pas aux CRABPs. Celles-ci ont cependant un effet non négligeable de séquestration d'une fraction du t-RA présent dans la cellule, et pourraient également régir le métabolisme des molécules qui leur sont liées, en orientant l'accessibilité des ligands vers certains types d'enzymes plus spécifiques de complexes CRABP-ligand. Ainsi les conversions de t-RA vers des métabolites plus polaires

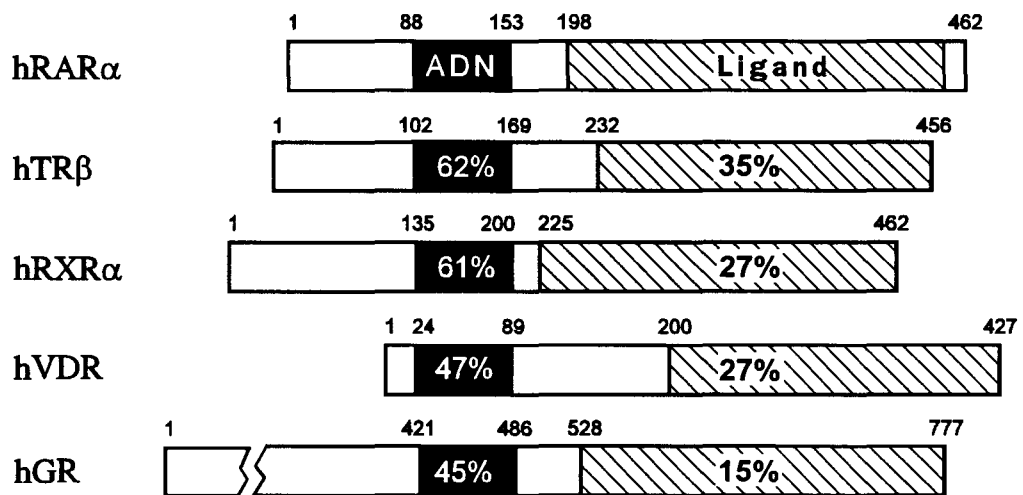


Figure 4 : Homologies de séquence entre RAR et divers récepteurs nucléaires (d'après Mangelsdorf, 1994).

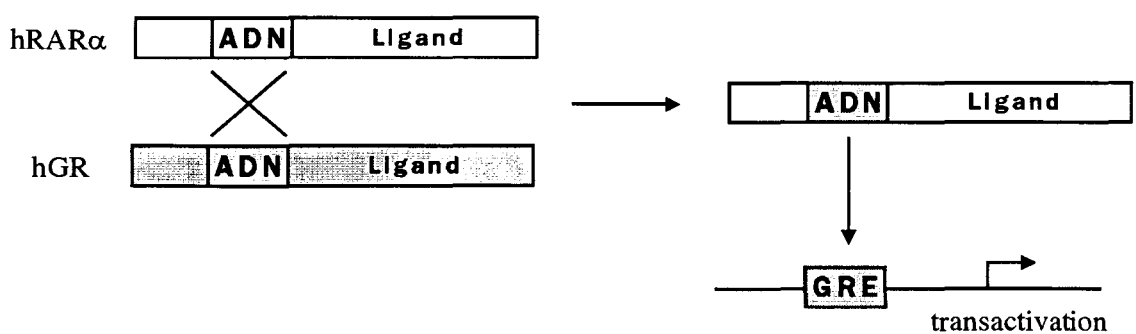


Figure 5 : Identification de l'activité transcriptionnelle du RAR en réponse au t-RA par création d'une chimère avec le domaine de liaison à l'ADN du GR. (Giguere et al., 1987).

ont été observées plus rapides et plus spécifiques lorsque le ligand est complexé à son transporteur (Fiorella and Napoli, 1991).

2. La superfamille des récepteurs nucléaires

Le premier récepteur nucléaire cloné a été le récepteur des glucocorticoïdes (GR) en 1985 (Hollenberg et al., 1985). Il était déjà auparavant isolé et étudié par des techniques biochimiques, mais son clonage en a fourni la première séquence complète. Puis les clonages d'autres récepteurs nucléaires comme ceux des oestrogènes (ER), de la progestérone (PR), de la vitamine D (VDR)... ont mis en évidence les fortes homologies de séquence entre toutes ces protéines (figure 4). Ces récepteurs, par leurs structures apparentées, sont regroupés en une superfamille des récepteurs nucléaires.

Cette notion de superfamille confirme la notion de caractère commun du mécanisme d'action des hormones stéroïdes mais aussi des vitamines liposolubles (vitamines A et D).

Outre les récepteurs des hormones stéroïdes, thyroïdes, des rétinoïdes et de la vitamine D, la superfamille des récepteurs nucléaires comprend de nombreux récepteurs dits orphelins, car on ne leur connaît aucun ligand, mais ils sont de structure apparentée aux précédents. Ceci signifie qu'aucune hormone ou vitamine susceptible de les activer n'a encore été identifiée. Cependant, d'autres types de signaux tels des nutriments ou des intermédiaires du métabolisme pourraient logiquement activer ces orphelins. On peut par exemple le supposer dans le cas de NGFI-B essentiellement exprimé dans le foie et l'intestin. Par ailleurs, des récepteurs orphelins peuvent être activés par de multiples voies différentes de la liaison d'un ligand (pour revue: O'Malley and Conneely, 1992). Parmi celles-ci, les mécanismes de phosphorylation n'en sont qu'un exemple qui s'applique aux récepteurs orphelins, mais aussi à l'ensemble des récepteurs nucléaires.

3. Les RAR

C'est en 1987 que deux groupes distincts (Giguere et al., 1987; Petkovitch et al., 1987) ont simultanément isolé l'ADN complémentaire d'un nouveau membre de la superfamille des récepteurs nucléaires humains. Le récepteur surexprimé dans les cellules humaines s'avérait posséder une forte affinité pour l'acide rétinoïque tout-trans. On ne connaissait alors aucun promoteur directement activé par le t-RA. Ainsi, la capacité du récepteur à fonctionner par transactivation en réponse au t-RA a été parallèlement démontrée en remplaçant son domaine de liaison à l'ADN (figure 5) par celui du récepteur des glucocorticoïdes (Giguere et al., 1987) ou du récepteur des oestrogènes (Petkovitch et al., 1987). Le récepteur chimère obtenu a donc permis de tester l'activation

transcriptionnelle du RAR sur des éléments de réponse du GR ou ER en réponse au t-RA (dans des concentrations nanomolaires ou même inférieures), avec une affinité non négligeable du récepteur pour le rétinol et le rétinol. C'était donc le récepteur nucléaire du t-RA : le RAR ("Retinoic Acid Receptor").

Ultérieurement deux autres isoformes du RAR (RAR β et RAR γ) ont été identifiées, et leurs séquences ont une forte homologie avec RAR α . Le RAR β a été cloné à partir de cellules humaines d'hépatocarcinome (de The et al., 1987). Son identité de récepteur du t-RA a été testée de la même manière que pour RAR α (Brand et al., 1988; Benbrook et al., 1988). La troisième isoforme RAR γ a été isolée d'une banque d'ADNc d'embryon de souris (Zelent et al., 1989) avant d'être clonée chez l'homme (Krust et al., 1989). Parmi chacune de ces trois isoformes, divers sous-types ont été identifiés; ils diffèrent essentiellement par leurs régions N-terminales par épissage alternatif de leurs ARN messagers. Chez l'homme, on compte essentiellement 2 RAR α , 4 RAR β et 2 RAR γ (pour revue : Leid et al., 1992a).

4. Les RXR

Un deuxième type de récepteur des rétinoïdes, le RXR, a été initialement identifié par sa capacité à être activé par le t-RA (Mangelsdorf et al., 1990), propriété paradoxale sachant que le RXR ne lie pas ce ligand, mais qui s'explique par les fortes concentrations de t-RA utilisées. Le RXR se distingue des RARs déjà clonés par une séquence relativement différente qui l'empêche de l'assimiler à une nouvelle isoforme de RAR (seulement 27 % d'homologies entre les domaines de liaison au ligand de RAR α et RXR α). En fait le RAR s'avère plus proche du TR que du RXR du point de vue des homologies de séquence. D'autres isoformes du RXR ont par la suite été identifiées, elle sont actuellement au nombre de trois chez les mammifères (RXR α , β et γ).

5. Un nouveau ligand parmi les rétinoïdes

Les auteurs qui ont découvert le RXR ont également montré par des tests in-vitro que ce récepteur n'est pourtant pas capable de lier une molécule de t-RA tritié (Mangelsdorf et al., 1990). Un autre ligand a donc été recherché pour le RXR, notamment parmi d'éventuels métabolites actifs du t-RA formés lors des tests d'activation in-vivo du RXR par le ligand. C'est pourquoi il a été donné au récepteur le nom de "retinoid-X receptor" ou RXR.

Des techniques de fractionnement par HPLC ont permis à deux groupes distincts d'identifier simultanément le ligand du RXR. Le premier groupe (Heyman et al., 1992) a testé l'activation du RXR par des fractions d'extraits cellulaires provenant de cellules traitées à l'acide rétinoïque tout-trans, chaque fraction active sur le récepteur était

ultérieurement purifiée. La stratégie développée par le deuxième groupe (Levin et al., 1992) consistait à isoler tout dérivé radiomarqué issu du t-RA tritié qui était retrouvé lié in-vivo à un RXR surexprimé. Ces deux techniques ont permis d'isoler l'acide 9-cis rétinolique (9-cis RA), un stéréoisomère du t-RA qui possède une affinité pour le RXR (10nM) proche de celle du t-RA pour le RAR (1-5 nM). Nous savons maintenant que le 9-cis RA est aussi capable de lier et transactiver le RAR. Ainsi avec le 9-cis RA est apparue une deuxième voie de transduction des rétinoïdes.

6 Acide rétinolique et régulation de la transcription

* Régulation directe

La rapidité de modification de l'expression des gènes - moins de 24 h ou plus de 48 h - témoigne de différents niveaux de régulation génique par le t-RA. Une réponse rapide aux rétinoïdes correspond à une régulation transcriptionnelle directe sur des gènes qui possèdent dans leur promoteur un élément de réponse à l'acide rétinolique appelé RARE, c'est à dire une séquence cible des récepteurs des rétinoïdes. Les RAREs sont présents dans différents types de gènes, notamment ceux qui sont impliqués dans la différenciation. D'autre part, les mécanismes d'autorégulation de la voie de transduction par les rétinoïdes se font également de manière directe : des RAREs sont en effet présents dans de nombreux gènes des récepteurs et transporteurs du t-RA (hRAR β 2, hRAR α 2, hRAR γ 2, mCRBPI, mCRABPII).

* Régulation indirecte

Une réponse plus lente aux rétinoïdes correspond à d'autres types de régulation comme un changement de stabilité d'ARN messagers, ou des modifications post-traductionnelles. Il peut s'agir d'autre part d'une régulation transcriptionnelle indirecte comme dans le cas d'interactions des récepteurs avec le complexe AP1 formé par les dimères des facteurs Fos et Jun. Certains auteurs démontrent que des régulations peuvent se produire par dimérisation de RAR ou RXR, non pas entre eux, mais avec l'un des partenaires du complexe AP1. En effet, le t-RA peut inhiber le promoteur de la collagénase via une séquence de liaison du complexe AP1, alors que ni RAR ni RXR ne sont capables de lier une telle séquence (Schule et al., 1991). Cette régulation croisée est actuellement exploitée par la synthèse de nouveaux rétinoïdes qui restent inhibiteurs du complexe AP1 alors qu'ils sont incapables d'activer RAR et RXR (Fanjul et al., 1994; Chen et al., 1995). Ces ligand possèderaient donc des effets antiprolifératifs sans les effets secondaires des rétinoïdes.

7. Expression différentielle des récepteurs, disruptions géniques

L'expression des ARNm des RARs et RXRs dans les tissus embryonnaires et adultes a été étudiée par hybridation in-situ et par "Northern blot". Les récepteurs RAR et RXR sont exprimés largement dans l'embryon et dans un grand nombre de tissus chez l'adulte. RAR γ est par contre exprimé de manière prépondérante dans la peau et les cartilages (Krust et al., 1989; Zelent et al., 1989). RXR est également exprimé largement dans l'embryon et l'adulte et plus précisément dans le foie, l'intestin, les reins et le coeur (Mangelsdorf et al., 1992).

Afin de mieux comprendre le rôle physiologique de chacun des types et isoformes de RAR et RXR, plusieurs laboratoires ont inactivé leurs gènes par recombinaison homologue ("gene knock-out") chez la souris. Des mutants inactifs ont été créés pour toutes les isoformes de RAR α ou de RAR γ , ou spécifiquement pour les isoformes RAR α 1, RAR β 2, RAR γ 2 (Lohnes et al., 1993; Lufkin et al., 1993; Li et al., 1993; Mendelsohn et al., 1994). Ces mutants ne présentent pas de défaut détectable ou bien possèdent un nombre limité de malformations correspondant à un syndrome de déficience en vitamine A (VAD) qui confirme le rôle majeur du RAR dans la transduction des messages de la vitamine A. Mais le peu d'effets observés suite à la délétion de types ou d'isoformes des RAR suggère une redondance d'activité des différents récepteurs. Des souris mutantes délétées du RXR α ont également été obtenues (Sucof et al., 1994), ainsi que des doubles mutantes RXR α /RAR α et RXR α /RAR γ (Kastner et al., 1994); elles montrent d'une part un rôle du RXR dans la morphogénèse du coeur et de l'oeil, et confirment d'autre part une convergence des voies de transduction par RAR et RXR par la formation d'hétérodimères.

Plus récemment, la réexpression de RAR γ ou la surexpression de RAR α ou RAR β dans des cellules en culture délétées du RAR γ nous montrent une certaine redondance d'activité entre RAR γ et RAR α et une redondance moins marquée entre RAR γ et RAR β dans ces cellules (Taneja et al., 1995).

III. Structure et fonctions des récepteurs nucléaires

1. Domaines fonctionnels

Les RARs et RXRs, ainsi que tous les autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, sont des récepteurs vis-à-vis de leur ligand mais ce sont aussi des facteurs de transcription se liant à l'ADN. Ils portent donc dans leur séquence protéique tous les motifs structuraux responsables de cette dualité de fonctions.

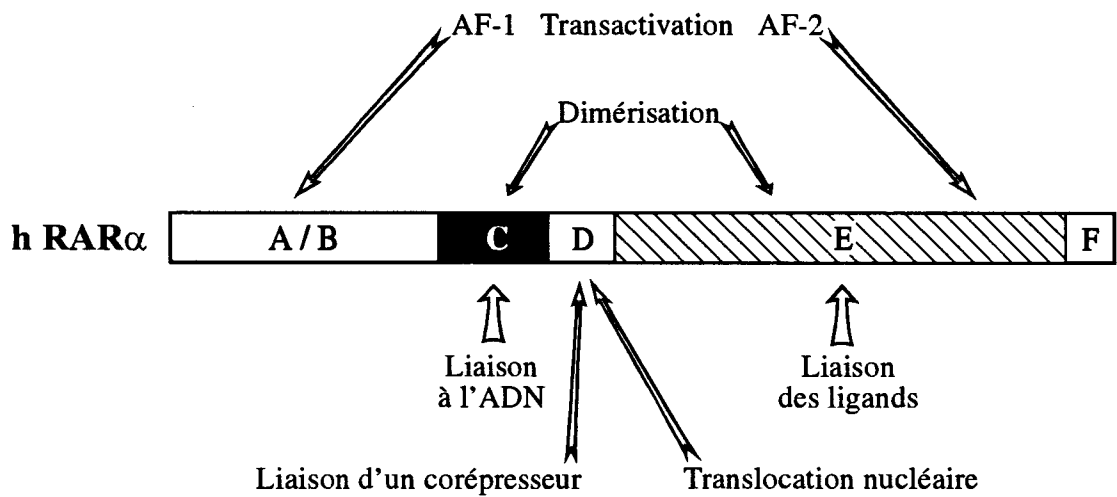
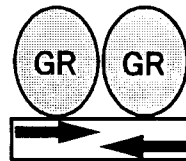


Figure 6 : Domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires

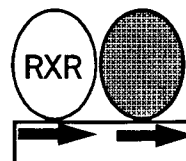
Type I
Récepteurs Stéroïdiens



Récepteurs
Homodimères

HRE Palindrome

Type II
Récepteurs des Rétinoïdes,
de la Vitamine D, et
des Hormones Thyroïdiennes,
NGFI-B, PPAR,...



Récepteurs
Hétérodimères

HRE Répétition Directe

Type III
Récepteurs Orphelins
NGFI-B, ROR,...



Récepteurs
Monomères

HRE Demi-Site

Figure 7 : Trois groupes de récepteurs suivant leur configuration sur l'ADN
(Types I et II définis d'après Stunnenberg, 1993)

Les récepteurs se composent de six domaines (figure 6) appelés de A à F (pour revue : Evans, 1988; Green and Chambon, 1988). Deux domaines, C et E, sont essentiels à leur fonction : le domaine C ou DBD ("DNA binding domain") est le domaine de liaison à l'ADN; le domaine E ou LBD ("ligand binding domain") est le domaine de liaison au ligand. Ces deux domaines forment deux structures qui restent fonctionnelles lorsqu'elles sont isolées du reste du récepteur. Ces domaines C et E sont reliés entre-eux par le domaine D qui apparaît contribuer à la fois à la liaison à l'ADN et à celle du ligand, mais produirait également une certaine flexibilité entre les deux domaines. D'autres fonctions mettent en jeu plusieurs domaines à la fois; c'est le cas de la dimérisation portée par les deux domaines C et E. Il est identifié au moins deux motifs de transactivation (AF-1 et 2). L'un, localisé dans le domaine A/B, est dit constitutif; le second est ligand-dépendent et localisé dans le domaine E. Une séquence de transfert nucléaire a été identifiée dans le domaine C. Le domaine F ne semble pas porter de fonction connue, il n'est d'ailleurs pas présent parmi tous les récepteurs. Dans le cas du récepteur aux oestrogènes, ce domaine F serait impliqué dans la liaison d'un ligand antagoniste (Montano et al., 1995).

2. Liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires

2.1. Trois groupes de récepteurs

La liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires est une étape cruciale du processus de transactivation du message hormonal. Comme la plupart des facteurs de transcription, les récepteurs nucléaires se lient sous forme de dimère à des séquences d'ADN appelées élément de réponse ou HRE ("hormone response element"). Ces HRE sont présents dans la région promotrice des gènes cibles de la régulation hormonale. Les récepteurs nucléaires stéroïdiens se lient sous forme d'homodimère sur des HRE qui se composent de deux séquences nucléotidiques de reconnaissance orientées en palindrome (figures 7 et 8). D'autres récepteurs ont comme partenaire le RXR avec lequel ils forment des hétérodimères et se lient à des éléments de réponse en répétition directe. Cette nouvelle configuration définit un deuxième groupe : les récepteurs de type II (Stunnenberg, 1993). C'est le cas des RAR, TR, VDR, PPAR,.... D'autre part certains récepteurs orphelins se lient sous forme de monomère à des demi-sites de HRE, comme par exemple NGFI-B (Wilson et al., 1992) ou ROR (Tini et al., 1995). C'est par ces différents modes de liaison à l'ADN que les récepteurs se distinguent en trois groupes, caractérisés également par la structure de leurs éléments de réponse.

2.2. Les éléments de réponse (HRE)

* Morphologie des HREs (figure 8)

La mise en évidence de la fixation du GR sur un site précis d'ADN dans la région promotrice du virus MMTV (Scheidereit et al., 1983) a permis de définir l'existence d'un élément de réponse aux glucocorticoïdes ou GRE ("Glucocorticoid response element"). D'autres GRE identifiés près de divers gènes ont permis de définir une séquence consensus de type palindromique avec trois nucléotides espaceurs :

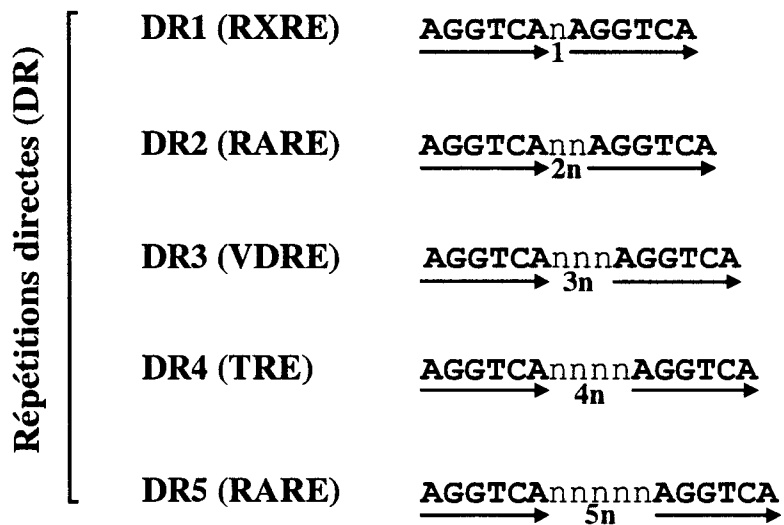
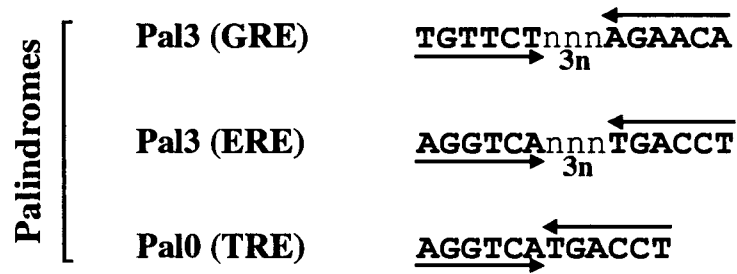


Curieusement, cette séquence est aussi un HRE pour d'autres récepteurs stéroïdiens tels MR, AR, PR. Par contre l'ERE, élément de réponse du récepteur des oestrogènes est un palindrome parfait de deux séquences du type "(A/G)GGTCA" espacées encore de trois nucléotides.

Par analogie avec les HRE précédents, des éléments de réponse des récepteurs de type II ont été supposés être de structure palindromique. Ainsi un TRE a été identifié dans le gène de l'hormone de croissance sous forme d'un palindrome de séquences (A/G)GGTCA directement accolées (Glass et al., 1987). Mais des éléments de réponse aux récepteurs RAR, TR, VDR étaient aussi découverts sous forme de séquences en répétition directe ou DR ("Direct Repeat") séparées par un certain nombre de nucléotides. C'est la découverte du fait que le RXR est un partenaire commun à tous les récepteurs de type II (Yu et al., 1991; Kliewer et al., 1992b; Zhang et al., 1992a; Leid et al., 1992b) qui a éclairci la situation : les répétitions directes sont alors apparues comme des HRE beaucoup plus efficaces que les palindromes pour les hétérodimères de RAR, TR ou VDR avec RXR.

L'étude systématique des éléments de réponse en répétition directe a montré qu'ils ont tous la même séquence consensus de type (A/G)GGTCA et a également suggéré que l'espacement entre les deux séquences est un élément déterminant de spécificité de réponse. En effet des espacements de 3, 4 et 5 nucléotides spécifient des éléments de réponse (DR3, DR4, DR5) à la vitamine D, l'hormone thyroïdienne, et le t-RA respectivement (Umesono et al., 1993) donc des VDRE, TRE, et RARE respectivement. Cette règle des "3-4-5" pour la liaison des récepteurs à l'ADN a même été étendue à "1-2-3-4-5" avec la découverte de HRE de type DR1. Le premier exemple d'un DR1 a été observé dans la zone de régulation du gène de la CRBP-II ("Cellular Retinol Binding Protein type II"). C'est un élément de réponse aux homodimères de RXR qui peuvent être formés en présence de leur ligand 9-cis RA (Mangelsdorf et al., 1991). Les DR1 sont donc des RXRE (figure 9). La règle "3-4-5" de Umesono et al. (1993) s'est étendue aux éléments de réponse de type DR2 lorsque cette configuration a aussi été observée pour des hétérodimères RXR-RAR.

A)



B)

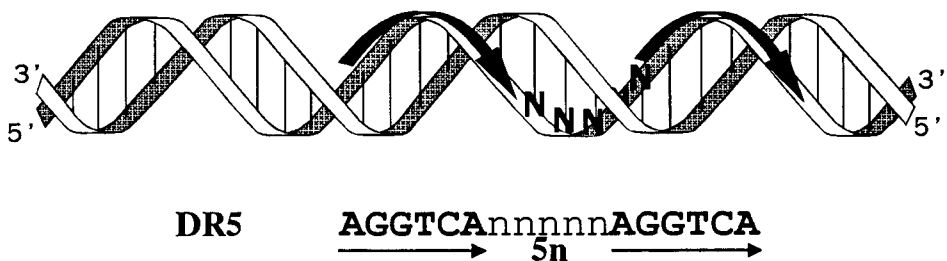


Figure 8 : séquences consensus des HRE de différents récepteurs nucléaires (A) et configuration d'un DR5 sur la double hélice d'ADN (B)

Répétitions directes (DR)

RARE (DR5)	$\overrightarrow{\text{AGGTCAnnnnnnAGGTC}}_{5n}$
hRAR β 2	AGGGTTCACCGAAAGTTCACT
mCP-H	GCAGGTCACTGACAGGGCATA
hADH3	AGGGGTCAATTCAGAGTTCAGT
mHox-1.6	CAGGTTACCGAAAGTTC AAG
RARE (DR2)	$\overrightarrow{\text{AGGTCAnAGGTC}}_{2n}$
mCRBPI	GTAGGTCAAAAGGTCAGA
mCRABPII	CCAGTTCACCAGGTCAGG
RXRE (DR1)	$\overrightarrow{\text{AGGTCAnAGGTC}}_1$
rCRBPII	ACAGGTCACAGGTCACAGGTCACAGTTCATT
hApoAI	GCAGGGCAAGGGTCAAG
cOVAL	TGGTGTCAAAGGTC AAA

Palindromes

TRE pal	$\overleftarrow{\text{TCAGGTCATGACCTGA}}$
xVitA2	$\overleftarrow{\text{TCAGGTCACAGTGACCTGA}}$

Palindromes inversés

RARE (ER8)	$\overleftarrow{\text{TGACCTnnnnnnnnnAGGTC}}_{8n}$
γ F-Crystalline	$\overleftarrow{\text{AGTGACCCCTTTTAAACCAGGTCAGTGA}}$

HREs Complexes

hMCAD	$\overleftarrow{\text{ATTGACCTTTCTCTCCGGGTAAAGGTGAAG}}$
rGH	$\overrightarrow{\text{AAAGGTAAGATCAGGGACGTGACCGCA}}$
mLamB1	$\overrightarrow{\text{GAGGTGAGTCAGGTTAA}} \dots (13n) \dots \overrightarrow{\text{GGGTCAAC}}$

Figure 9 : Exemples d'éléments de réponse parmi les différents types de RARE et RXRE.
(pour références : Mangelsdorf et al., 1994)

CP-H : complement factor H, ADH3 : alcool déshydrogénase 3, ApoAI : Apolipoprotéine AI,
OVAL : ovalbumine, Vit A2 : vitellogénine A2, MCAD : medium chain acyl-CoA
deshydrogénase, GH : growth hormone, LamB1 : laminine B1.
m : souris, h : homme, c : poulet, x : xénope, r : rat

* Exceptions aux règles établies

Bien que les configurations en répétition directe soient les plus favorables aux récepteurs de type II, de nombreuses exceptions à cette règle ont été décrites pour divers gènes (figure 9). Par exemple, les RARE existent également sous forme de palindrome car le TRE palindromique est aussi un élément de réponse pour le RAR. Un RARE en palindrome inversé a été découvert pour le gène de la γ F-crystalline (Tini et al., 1993). Mais ces divers types de HRE apparaissent moins spécifiques d'un type unique de récepteur (Naar et al., 1991). De plus certains RARE ont été identifiés dans des configurations dites complexes telles que celle du promoteur du gène de la chaîne moyenne de l'acyl-Coenzyme A deshydrogénase qui comprend deux demi-sites en palindrome inversé séparés de huit paires de bases, et d'un troisième demi-site en répétition directe avec le second motif (Carter et al., 1994). RXR-RAR peut se lier sur le palindrome inversé. Deux récepteurs orphelins peuvent également se lier à ce promoteur. Un dimère d'HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4) se lie à la répétition directe et un homodimère du facteur COUP (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor) peut lier les premier et troisième demi-sites qui forment un palindrome inversé espacé de 14 nucléotides ! A l'inverse, la spécificité d'un hétérodimère pour l'ADN peut être plus large qu'il n'y paraît schématiquement (voir plus loin, le rôle des molécules d'eau dans les interactions). Par exemple, il a été observé (Mader et al., 1993) une certaine promiscuité in-vitro des complexes RXR-RAR pour les HRE en répétition directe, puisque l'éventail d'éléments de réponse liés efficacement dans ce cas va du DR1 au DR5.

Un autre type d'exception à la règle de Umesono et al. (1991) apparaît dans les multiples spécificités de liaison des DR1 identifiés à l'origine comme des RXRE, cibles des homodimères RXR. En effet, les DR1 sont aussi les cibles des hétérodimères de RXR avec PPAR ("Peroxisome Proliferator Activated Receptor"), et des homodimères du récepteur orphelin COUP. Les hétérodimères RXR-RAR sont aussi capables de se lier à un élément de réponse de type DR1, mais ils y adoptent une configuration particulière, car c'est le RXR qui est situé sur le demi-site en aval (Kurokawa et al., 1994). Cependant ces complexes sont inactifs.

3. Structure du domaine de liaison à l'ADN

3.1. Des doigts de zinc aux boîtes fonctionnelles.

La structure du domaine de liaison à l'ADN (domaine C) des récepteurs nucléaires a été initialement étudiée dans le cas du récepteur des glucocorticoïdes. Ce sont les données structurales obtenues pour ce récepteur qui ont servi de base à l'étude ultérieure des autres

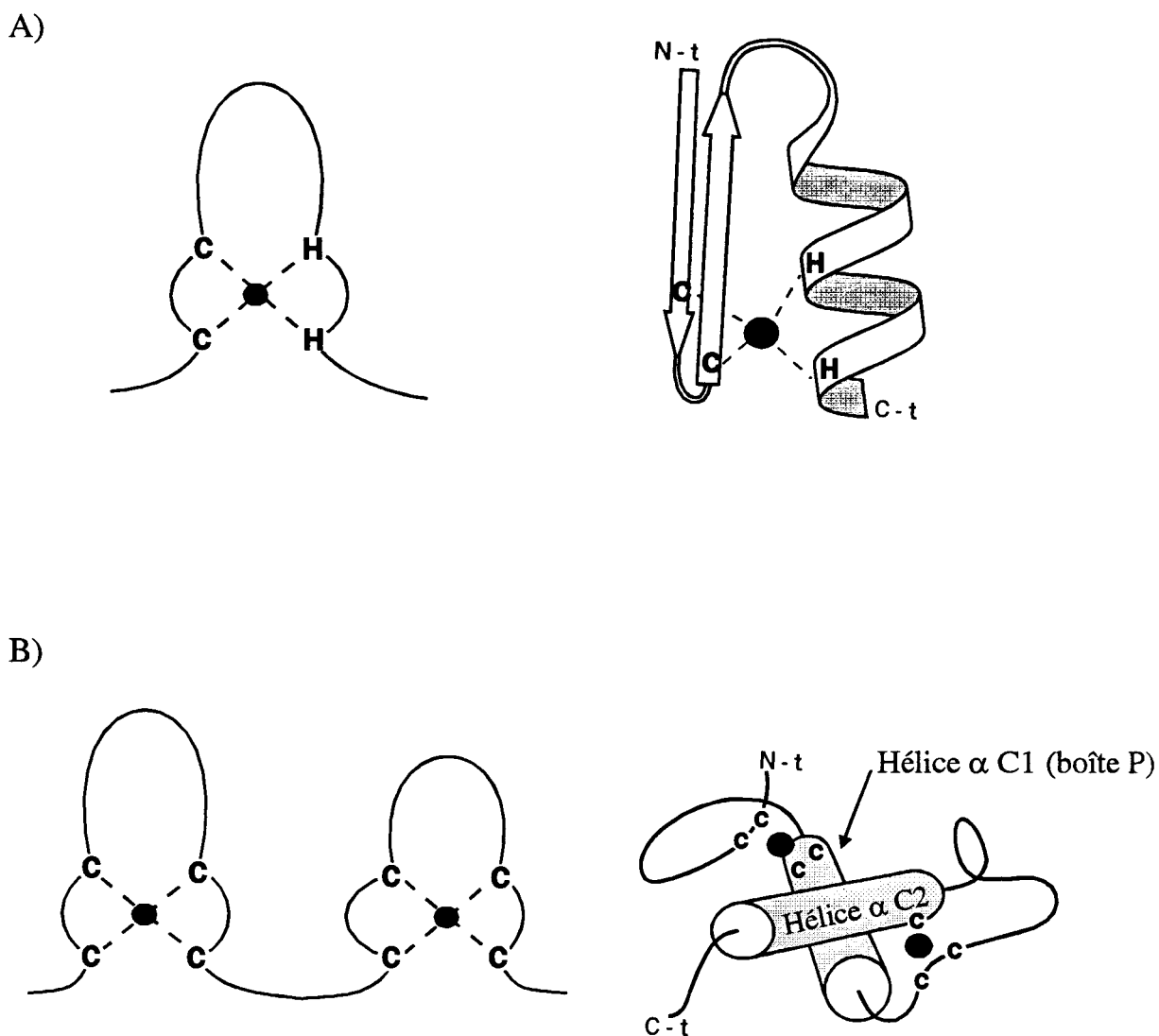


Figure 10 : Structure des motifs en doigt de zinc

(A) doigt de zinc de type C2H2 du TFIIIA (d'après Green, 1988)

(B) doigt de zinc de type C4 des récepteurs nucléaires (d'après Luisi et al., 1990)

Les ronds noirs schématisent les atomes de zinc. C : cystéine; H : histidine.

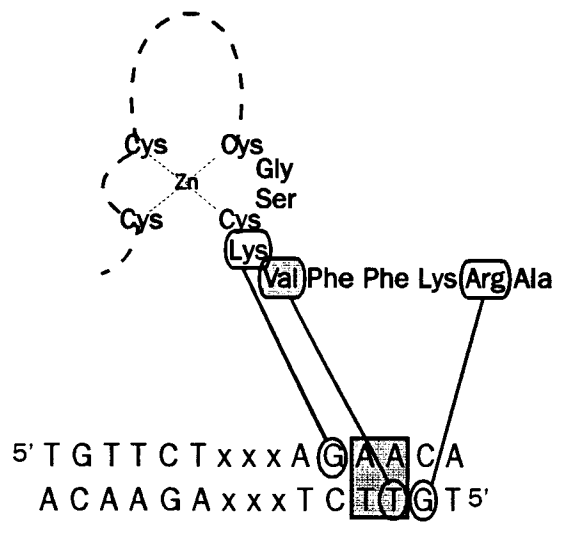
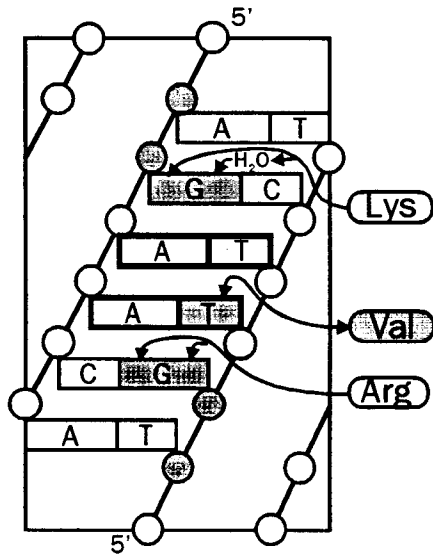
membres de la superfamille. Ces analogies sont possibles par les fortes homologies observées entre les différents récepteurs nucléaires au niveau du domaine C. En particulier, neuf cystéines sont parfaitement conservées parmi tous les membres. Les huit cystéines N-terminales sont impliquées dans une liaison de coordination tétraédrique avec deux atomes de zinc (Severne et al., 1988). Ce métal s'est avéré indispensable à la capacité de liaison à l'ADN du domaine C (Freedman et al., 1988).

En fait, la liaison des atomes de zinc par les cystéines induit un repliement de structure dit en doigt de zinc (doigt de zinc de type C4) par similitude avec un motif initialement observé dans le facteur de transcription TFIID de xénope (Miller et al., 1985). En effet, l'étude de la structure du domaine de liaison à l'ADN du TFIID par spectrométrie par absorption de rayons X a mis en évidence la coordination d'un atome de zinc par deux cystéines et deux histidines (doigt de zinc de type C2-H2) sous forme d'un complexe tétraédrique (Diakun et al., 1986). La conformation de ce motif en doigt de zinc a été étudiée par Berg et al. (Berg, 1988). C'est une hélice alpha sur laquelle se superpose un feuillet beta, la structure globale étant maintenue par le zinc. L'hélice interagit avec l'ADN au niveau du grand sillon de la double hélice (figure 10).

Dans le cas du GR, les données structurales sur ce domaine ont été fournies par la RMN (Hard et al., 1990) ainsi que par la cristallographie du domaine complexé à un élément de réponse (Luisi et al., 1991). Chaque doigt de zinc de ce domaine forme une hélice alpha. Les deux hélices sont superposées perpendiculairement. L'ensemble constitue en fait un domaine globulaire où l'hélice N-terminale (doigt de zinc C1) se loge dans le grand sillon de l'ADN, alors que l'hélice C-terminale (doigt de zinc C2) qui est plus éloignée de l'ADN s'oriente dans l'axe de la double hélice (figure 10).

Du fait de leurs positions respectives, les doigts de zinc C1 et C2 ont chacun leur fonction propre : le motif C1 est impliqué dans la spécificité d'interaction avec l'ADN alors que le motif C2 apparaît contribuer à l'affinité de la liaison. En effet, des expériences de substitution du motif C1 du récepteur des oestrogènes (ER) par le même motif C1 issu du GR crée un ER qui se lie spécifiquement à l'élément de réponse du GR (Green et al., 1988). Des études plus précises ciblant le doigt de zinc C1 ont montré l'importance de trois amino-acides dans la spécificité d'interaction des récepteurs à leur élément de réponse (Mader et al., 1989; Umesono and Evans, 1989; Danielsen et al., 1989) : le remplacement des trois amino-acides dans le récepteur des oestrogènes (acide glutamique, glycine, alanine) par les amino-acides correspondants du GR (glycine, serine, valine respectivement) suffit à faire perdre au ER sa spécificité propre au profit de l'apparition d'une spécificité pour le GRE, l'élément de réponse du GR. Ces trois amino-acides constituent ce qu'on appelle la "boîte P" (boîte du doigt proximal). L'importance de ces amino-acides est explicitée par les données structurales du domaine C (Hard et al., 1990; Luisi et al., 1991)

GR-DBD/GRE Demi-site



ER-DBD/ERE Demi-site

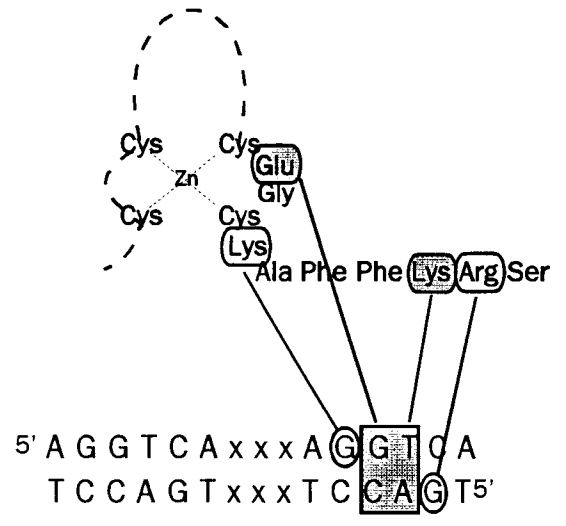
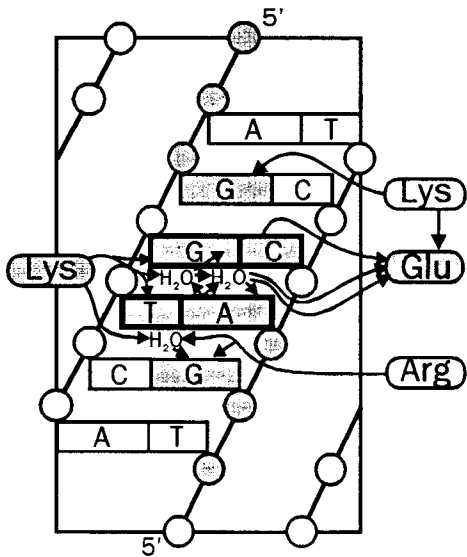


Figure 11 : Interactions du GR (Luisi et al., 1990) et du ER (Schwabe et al., 1991) avec l'ADN. Les contacts entre amino-acides de la boîte P et un demi-site sont schématisés d'après les données cristallographiques.

qui permettent de situer ces résidus au sein de l'hélice du doigt C1 directement face aux paires de bases de l'ADN dans son grand sillon.

Dans le cas du GR la séquence de la boîte P est : Gly-Ser-Cys-Lys-Val. Ainsi, la valine est séparée des deux autres amino-acides discriminants par un tour d'hélice alpha, mais tous trois se retrouvent face à l'ADN.

Cette boîte P est présente chez tous les récepteurs nucléaires. Ils peuvent être regroupés en différentes classes suivant leurs homologies dans ce motif :

Cys- <u>Gly-Ser-Cys-Lys-Val</u>	GR, MR, AR, PR
Cys- <u>Gln-Gly-Cys-Lys-Ala</u>	ER
Cys- <u>Gln-Gly-Cys-Lys-Gly</u>	TR, VDR, RAR, RXR

3.2. Les molécules d'eau et la spécificité

Mais le mode d'interaction du GR à l'ADN (et des récepteurs nucléaires en général) est loin d'être une simple liaison de chaque amino-acide de la boîte P avec des paires de bases de l'ADN. En effet les interactions décrites selon les données de la cristallographie des complexes GR-GRE (Hard et al., 1990) et ER-ERE (Schwabe et al., 1993) sont un schéma complexe de liaisons d'amino-acides avec les paires de bases de l'ADN mais aussi entre-eux et avec les groupements phosphate du squelette de la double hélice. Toutes ces interactions peuvent être directes ou bien passer par l'intermédiaire de molécules d'eau (figure 11). Les données cristallographiques ont d'ailleurs mis en évidence le rôle important de l'eau dans la spécificité d'interaction récepteur/ADN. Ce rôle est illustré dans le cas d'une chimère du GR possédant la boîte P du ER, dans une récente analyse de son mode d'interaction avec un GRE (Gewirth and Sigler, 1995). Dans le complexe GR-GRE, la valine de la boîte P interagit directement avec une thymine du GRE. Dans la chimère, la valine est remplacée par une alanine, plus petite, qui pourtant peut interagir avec la thymine du GRE malgré une distance plus grande. En fait, l'interaction récepteur-ADN est moins spécifique. La cristallographie nous montre un ajustement moins étroit entre les molécules, qui sont donc plus accessibles à la solvataion par des molécules d'eau. Cette distance plus grande est donc comblée par une molécule d'eau qui crée un pontage non-covalent entre les deux interfaces et autorise une interaction. Globalement, l'étroitesse d'interaction rend compte de la spécificité des deux interfaces, mais pour deux motifs moins spécifiques un ajustement plus lâche peut être compensé par les molécules d'eau. (Arbuckle and Luisi, 1995). Ce phénomène peut aussi expliquer l'existence de divers types d'éléments de réponse d'affinité différente pour un même récepteur.

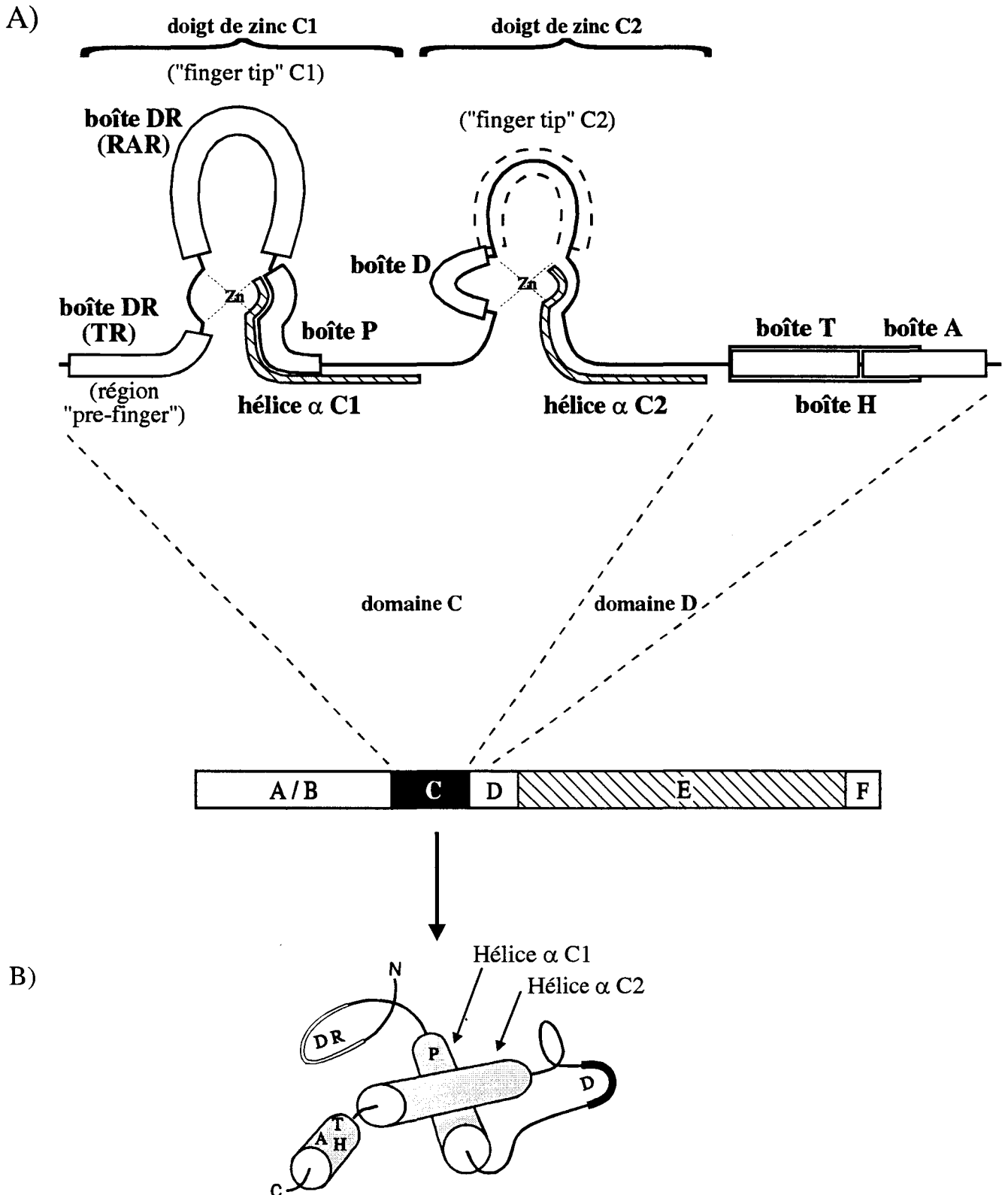


Figure 12 : Structure du domaine de liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires

A) Structure secondaire :

- Boîtes fonctionnelles**
- (sub-régions des doigts de zinc)
- Hélices α**

B) Position des boîtes fonctionnelles décrites dans le texte (P, D, DR, A, T, H) au sein de la structure tertiaire du DBD.

3.3. D'autres boîtes fonctionnelles du domaine de liaison à l'ADN

Nous allons voir que le domaine de liaison à l'ADN des récepteurs est subdivisé en une suite de boîtes (figure 12) chacune étant appelée par une lettre : P (déjà décrite), T, A, H, D et DR. Elles définissent, au sein du domaine C, tous les motifs protéiques déterminant une fonction précise comme l'interaction avec l'ADN (pour les boîtes P, T, A, H) ou la dimérisation (pour les boîtes D et DR).

* Boîte T

Les structures des domaines de liaison à l'ADN du RAR β et du RXR α ont été obtenues par RMN (Katahira et al., 1992; Lee et al., 1993). Elles confirment la forte homologie de structure avec les récepteurs des hormones stéroïdes GR et ER. Cependant, dans le cas du RXR, une troisième hélice alpha a été révélée en partie C-terminale du doigt de zinc C2 dans le domaine D - domaine initialement décrit comme charnière. Cette troisième hélice porte une séquence appelée boîte T (figure 12) qui est impliquée dans la formation d'homodimères de RXR α (Lee et al., 1993) et de RXR β (Wilson et al., 1992). Lee et al. suggèrent aussi que cette boîte est plus généralement nécessaire à une interaction correcte du RXR avec l'ADN.

* Boîte A

Une autre boîte fonctionnelle appelée boîte A (figure 12) a été identifiée près de la boîte T, du côté C-terminal dans la séquence d'un récepteur orphelin NGFI-B (Wilson et al., 1992). Ce récepteur peut se lier sous forme d'hétérodimère avec RXR (voir figure 7), mais il se lie aussi sous forme de monomère à un élément de réponse formé d'un seul demi-site précédé de deux adénines : 5'-AA-AGGTCA-3'. Dans ce dernier cas, la boîte A interagit spécifiquement avec les deux adénines en 5' du demi-site. La séquence de cette boîte A est indispensable à la liaison de NGFI-B sur son demi-site. Jusqu'à présent, on ne sait pas s'il existe une boîte A dans la région correspondante chez tous les récepteurs. En effet, cette même région des récepteurs stéroïdiens GR et ER n'a pas de conformation définie et n'interagit pas avec l'ADN (Hard et al., 1990; Schwabe et al., 1993). Mais dans le cas du TR, cette boîte A est indispensable à la formation d'homodimères TR-TR et joue un rôle dans celle des dimères RXR-TR (Kurokawa et al., 1993). De plus, la séquence spécifique de reconnaissance du TR sur l'ADN s'étend de deux nucléotides en amont de chaque demi-site (Katz and Koenig, 1993). En effet, le TR possède une meilleure affinité pour un site AGGTCA précédé de deux nucléotides TA, ce qui suggère l'existence d'interactions en amont de chaque demi-site. L'importance de cette boîte A pour le TR a été mise en évidence par les récentes données cristallographiques des domaines de liaison à l'ADN du complexe RXR-TR avec le TRE (Rastinejad et al., 1995). Cette boîte A se situe

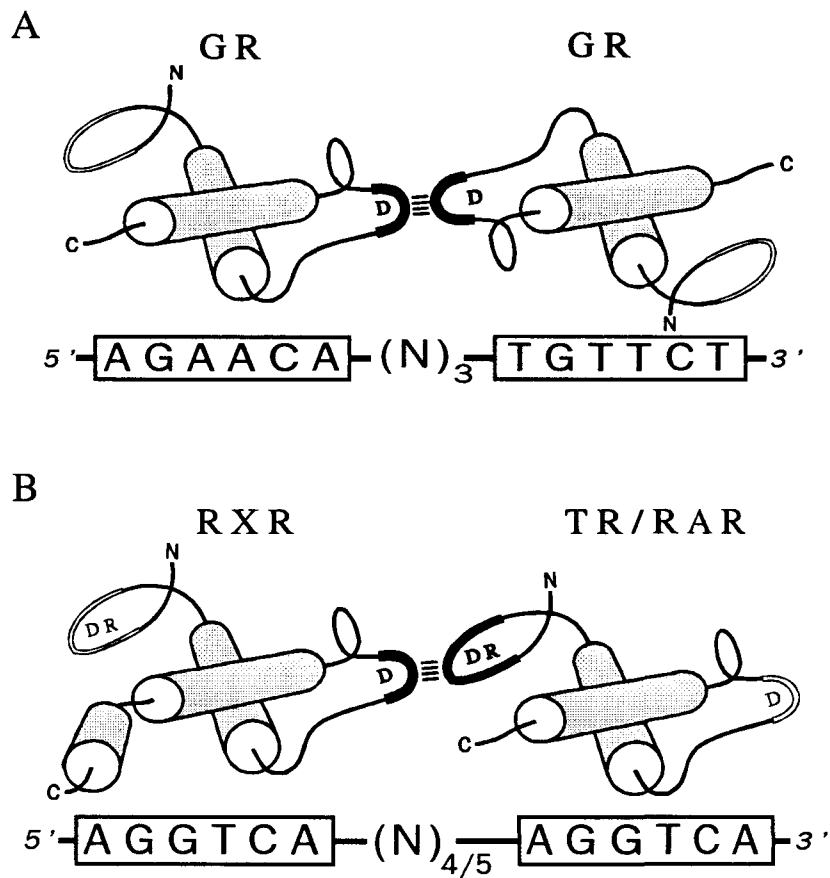


Figure 13 : Modèle de dimérisation des récepteurs nucléaires (d'après Perlmann et al., 1993)
 A. Homodimérisation du GR sur un palindrome par interactions entre les boîtes D.
 B. Hétérodimérisation du RXR sur un DR5 / DR4 avec RAR / TR par interactions entre la boîte D du RXR et la boîte DR du RAR / TR.

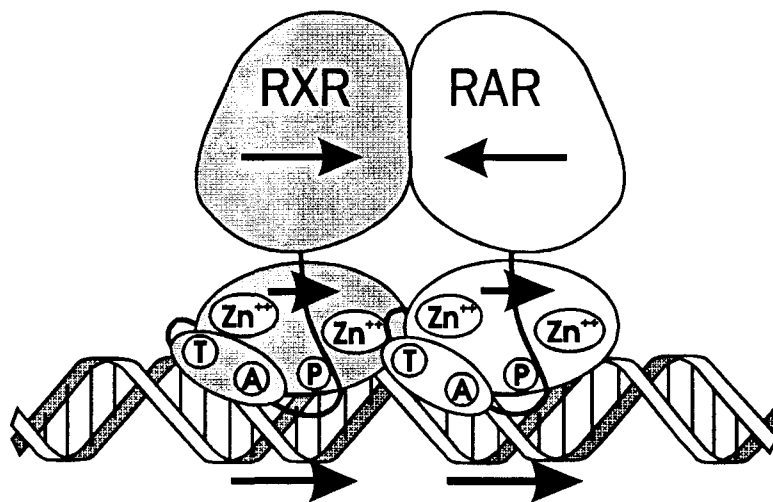


Figure 14 : Dimérisation du complexe RXR-RAR sur un DR5 (d'après Kurokawa et al., 1993)

dans une troisième hélice du DBD du TR et interagit du côté du petit sillon de l'ADN par des résidus basiques (Arg, Lys) avec essentiellement des groupements phosphates. Cette zone de contacts accroît substantiellement la surface d'interaction TR/ADN. Mais cette troisième hélice, du fait de son encombrement stérique dans le petit sillon, a également un rôle discriminant dans la longueur de l'espacement du TRE (4 nucléotides; DR4). En effet, par modélisation les auteurs ont montré qu'un espacement de 1, 2, ou 3 nucléotides crée simplement un chevauchement entre le RXR et la boîte A du TR sur l'ADN qui empêche toute liaison des partenaires.

* Boîte H

Pour le RAR, une boîte H qui se superpose à la boîte T et une partie de la boîte A est définie comme déterminant critique d'une haute affinité de liaison à l'ADN du récepteur (Predki et al., 1994) probablement encore par des interactions avec le petit sillon de l'ADN.

4. La dimérisation des récepteurs nucléaires

Il apparaît clairement que le processus de reconnaissance de l'ADN met en jeu la liaison spécifique aux nucléotides du HRE, mais implique aussi la fonction de dimérisation des récepteurs, et ces deux fonctions semblent indissociables.

4.1. Motifs de dimérisation du domaine de liaison à l'ADN : les boîtes D et DR

* Boîte D

Des amino-acides qui constituent une interface de dimérisation optimale pour GR ou ER sur leur élément de réponse ont été localisés entre les deux premières cystéines du doigt de zinc C2 de leur domaine de liaison à l'ADN (figure 12), par des études de mutagenèse dirigée (Umesono and Evans, 1989; Dahlman-Wright et al., 1991). Ces amino-acides constituent la boîte D, qui signifie boîte de "dimérisation", ou bien boîte "distale" relativement à la boîte P (qui est la boîte "proximale" dans la séquence primaire des récepteurs). Les données structurales obtenues ensuite par cristallographie (Hard et al., 1990; Schwabe et al., 1993) nous montrent des contacts étroits entre les boîtes D de chaque monomère pour former l'interface de dimérisation sur le palindrome (figure 13 A). Ainsi, les amino-acides de la boîte P déchiffrent les séquences nucléotidiques des demi-sites, alors que la boîte D est un discriminant de l'espacement entre ces demi-sites.

* Boîte DR

La symétrie des éléments de réponse palindromiques permet aux boîtes D des récepteurs stéroïdiens d'interagir entre-elles. Mais les éléments de réponse des récepteurs de

type II étant en répétition directe, les récepteurs ne peuvent pas adopter la même configuration. Ceci suggère l'existence d'une ou plusieurs interfaces de dimérisation distinctes de la boîte D pour les RAR, TR, VDR, RXR, ... Une autre différence essentielle entre les types de récepteurs réside dans les partenaires de dimérisation. En effet, le RXR s'est révélé être le partenaire de tous les récepteurs de type II dans la formation d'hétérodimères (Yu et al., 1991; Kliwer et al., 1992b; Zhang et al., 1992a; Leid et al., 1992b). Et la présence du RXR dans les hétérodimères confère une forte coopérativité de liaison à l'ADN sur des répétitions directes; du moins elle est nettement plus forte que celle des dimères de RAR et/ou TR sur le TRE palindromique. En fait, une seconde interface de dimérisation a été définie pour les récepteurs de type II par les modèles de Perlmann et al. (Perlmann et al., 1993) et de Kurokawa et al. (Kurokawa et al., 1993) (figures 13 et 14). Ces auteurs ont étudié par deux techniques différentes la position du RXR dans les dimères RXR-RAR, RXR-TR et RXR-VDR sur leur élément de réponse. Ils ont montré que dans chaque cas le RXR se lie sur le demi-site en 5' (en amont) des HRE alors que ses partenaires sont en position 3'. Dans ces dimères, la boîte D du RXR interagit avec des amino-acides situés dans la boucle du doigt de zinc C1 du RAR, TR ou VDR cette région est appelée boîte DR. Cette interaction permet le positionnement asymétrique des récepteurs sur des répétitions directes.

Le rôle et la position exacte de la boîte DR ont été étudiés ultérieurement par la création de chimères de RXR, RAR et TR (Zechel et al., 1994a; Zechel et al., 1994b). La boîte DR du RAR est située dans la boucle du doigt de zinc C1 ("finger tip"), tandis que dans le TR elle se trouve en partie N-terminale du doigt de zinc C1 (région "pre-finger") à la limite entre le domaine A/B et le domaine C (figures 12 et 15). Les auteurs montrent également l'influence prépondérante de cette boîte dans l'espacement préférentiel des demi-sites du HRE pour la liaison de chaque récepteur. Cependant, l'interaction de RXR-RAR sur un RARE de type DR2 met en jeu des interfaces de dimérisation assez différentes : les contacts se font ici entre la boucle du doigt de zinc C2 (sauf la boîte D) du RXR et la zone C-terminale du DBD du RAR définie comme boîte T (Zechel et al., 1994a; Zechel et al., 1994b) ou boîte H (Predki et al., 1994). Ces changements drastiques d'interfaces de dimérisation peuvent s'expliquer si l'on considère que le DR2, comparé au DR5, a non seulement un espace plus étroit des demi-sites mais aussi voit s'opérer une rotation d'un demi-site par rapport à l'axe de la double hélice : la suppression de trois paires de bases suppose une rotation d'un demi-site d'environ 110° , pour un ADN de type B qui a 10 paires de bases par tour.

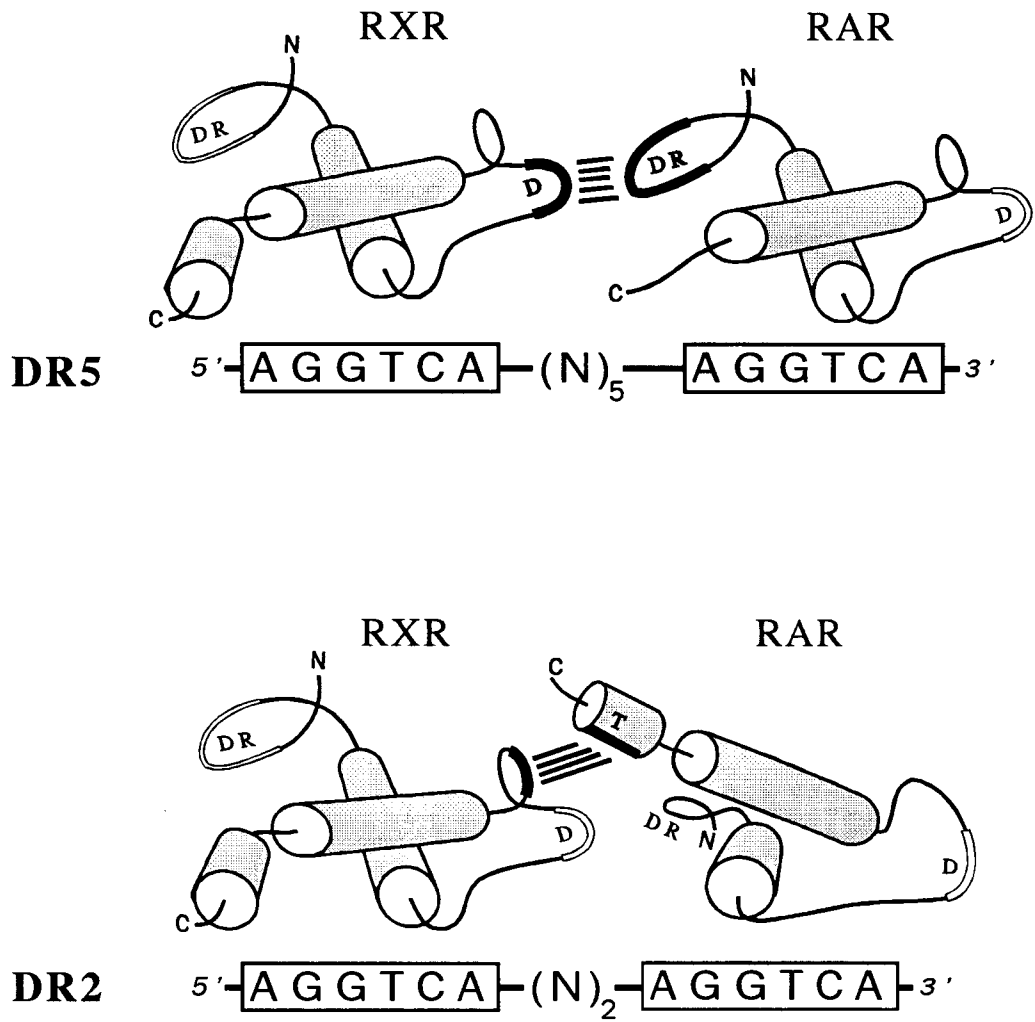


Figure 15 : Interfaces de dimérisation des complexes RXR-RAR sur les éléments de réponse de type DR5 et DR2. (d'après Zechel et al., 1994)

4.2. Données structurales sur le complexe RXR-TR-TRE

La structure du complexe des DBD de RXR-TR sur un DR4 a été élucidée récemment par cristallographie (Rastinejad et al., 1995). Elle précise les configurations mises en jeu. Les interactions RXR/TR se font entre trois arginines du doigt de zinc C2 du RXR ("finger tip" et boîte D) et différentes régions du TR correspondant à la boîte T et la boîte DR. Ceci confirme l'existence des interfaces de dimérisation asymétriques portées par les domaines de liaison à l'ADN des récepteurs de type II. De plus les données de la cristallographie nous apportent une explication du mécanisme de coopérativité des récepteurs sur les répétitions directes. En effet l'une des trois arginines du RXR impliquées dans l'interface de dimérisation (doigt de zinc C2) est entourée par une arginine, une asparagine et une glutamine en position -2, -1 et +2 de cette arginine. Or ces résidus contactent directement les phosphates de l'ADN. Ainsi les interactions récepteurs-ADN et récepteur-récepteur se renforcent mutuellement, créant un effet de coopérativité. Ces interactions fournissent une base structurale physique à la règle de spécificité de liaison des récepteurs aux répétitions directes, règle "3-4-5" (Umesono et al., 1993).

5. Dimérisation et LBD

Il existe une autre interface de dimérisation des récepteurs qui se situe dans leur domaine de liaison au ligand. Elle permet des interactions entre les récepteurs pour la formation de dimères aussi bien sur l'ADN que directement en solution. Mais elle ne semble pas imposer de restriction à la spécificité de liaison à l'ADN des récepteurs de type II qui serait plutôt définie par l'interface de dimérisation présente dans leur DBD. En effet le répertoire des éléments de réponse des récepteurs de type II et leur configuration sont les mêmes si l'on étudie l'activité de liaison à l'ADN des récepteurs entiers ou de leur DBD seul. (par exemple : Zechel et al., 1994a et 1994b) L'étude des DBD isolés est possible *in vitro*, bien que nécessitant des conditions de plus faible stringence.

5.1. Structure et dimérisation dans le domaine E

Sur le plan structural, plusieurs régions fonctionnelles ont été identifiées dans le domaine E par Forman et Samuels (1990). Deux d'entre elles semblent impliquées dans la dimérisation. Une région Ti (pour "Transcriptional inhibition") a été initialement décrite par les auteurs comme étant impliquée dans l'inhibition de la transcription par les récepteurs en absence de ligand. Mais en réalité, la région Ti serait impliquée dans les mécanismes de dimérisation des récepteurs (O'Donnell et al., 1991; Lee et al., 1992; Rosen et al., 1993). En effet la délétion de la région Ti du TR inhibe sa capacité d'hétérodimérisation avec RXR

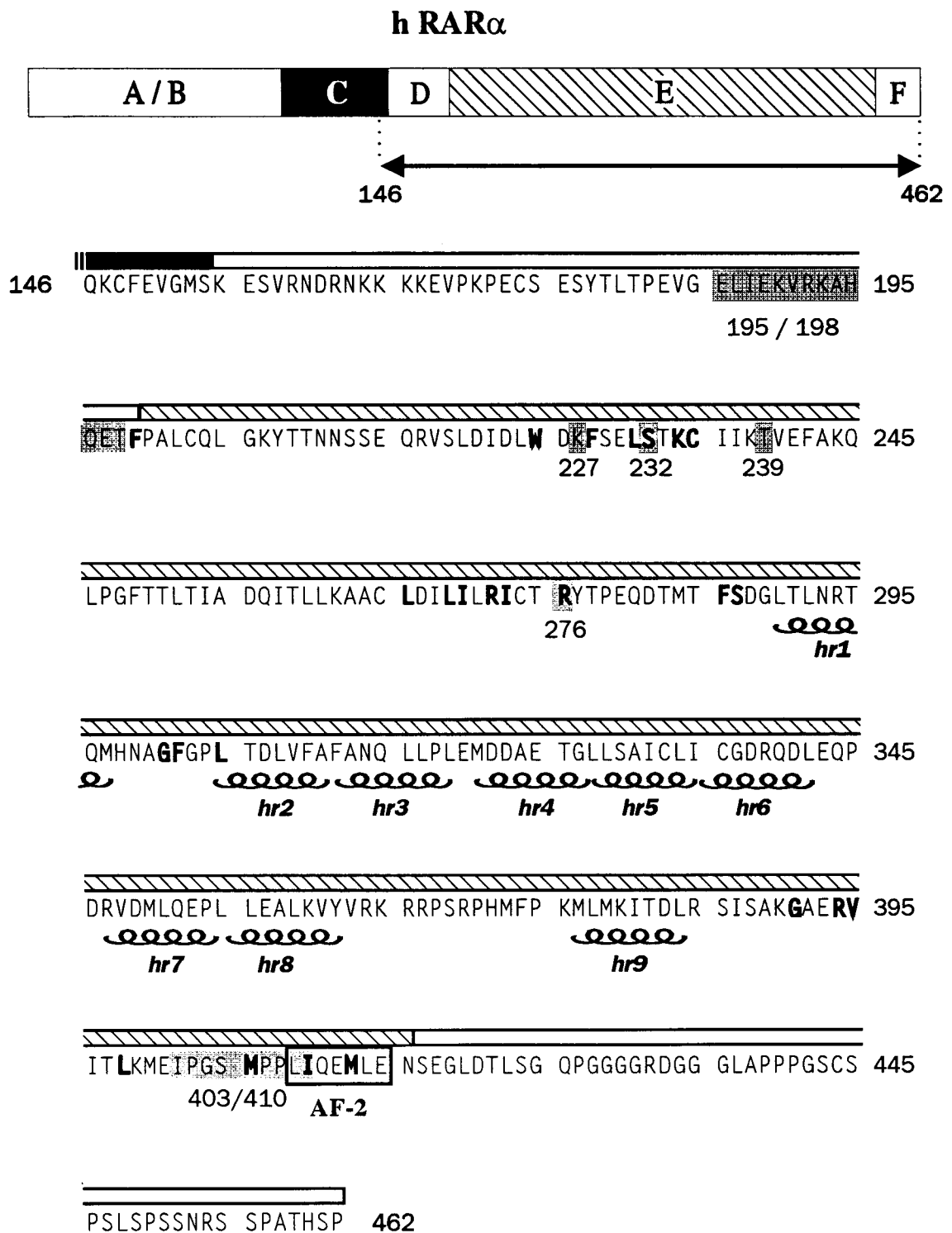


Figure 16 : Organisation fonctionnelle du domaine de liaison du ligand du hRAR α .

hr1 à *hr9* sont les heptad repeat définies par Forman et Samuels(1990).

AF-2 est le motif de transactivation ligand dépendant.

Les amino-acides en grisé sont impliqués dans la liaison du ligand d'après les données précédant la cristallographie du RAR γ (voir texte).

Les amino-acides en gras établissent des liaisons avec le t-RA dans le LBD du RAR γ d'après les données cristallographiques (Renaud et al., 1995).

Les domaines C à F sont figurés au dessus de chaque ligne de la séquence.

sans affecter sa capacité à lier l'hormone. Mais la même délétion dans le RXR est quasiment sans effet sur sa capacité d'hétérodimérisation (Rosen et al., 1993). Nous avons vu que le domaine de liaison à l'ADN comporte des interfaces de dimérisation asymétriques permettant la liaison de répétitions directes. Ainsi, par similitude avec le DBD et d'après les données ci-dessus, on peut supposer l'existence de plusieurs motifs de dimérisation au sein du domaine E.

Forman et Samuels (1990) ont également suggéré qu'une grande partie du domaine E est organisée en neuf structures hélicoïdales appelées "heptad repeat". Ces hélices contiennent des résidus hydrophobes (leucine, méthionine) en position 1 et 8, ainsi que des résidus hydrophobes ou chargés avec chaîne hydrophobe (arginine, glutamine) en position 5. Ces amino-acides en position 1, 5 et 8 formeraient une interface hydrophobe au sein de chaque hélice en heptad repeat. Cette répétition d'acides aminés est de plus conservée parmi de nombreux récepteurs nucléaires excepté le GR. Les auteurs considèrent que ces motifs constituent une interface de dimérisation de type crémaillère à leucines ("leucine zipper") comme on peut l'observer dans le cas d'autres facteurs de transcription tels fos et jun (Glover and Harrison, 1995). Le rôle fonctionnel de ces heptad repeat a en effet été étudié par des récepteurs TR mutés par la délétion de leur domaine de liaison à l'ADN (Forman et al., 1989). Ces mutants inhibent l'activité transcriptionnelle d'un TR de type sauvage, et ceci de façon dominante (effet dominant négatif). Parallèlement, l'étude des interactions coopératives entre TR et RAR a révélé une séquence de 35 amino-acides en partie C-terminale des récepteurs qui s'avère indispensable à leur dimérisation (Glass et al., 1989), et qui correspond à la 9^e heptad repeat identifiée par Forman et al. (1989).

Par la suite, les études ont essentiellement porté sur la 9^e heptad repeat, et le rôle des huit autres motifs dans la dimérisation est encore imprécis. Des mutations ponctuelles de résidus hydrophobes dans la 9^e heptad repeat du TR ou du RAR empêchent préférentiellement la formation d'hétérodimères avec RXR mais n'influent pas sur la formation d'homodimères. Ceci est observé sans ligand, mais de façon surprenante, l'addition du ligand sur ces mêmes mutants in-vitro permet la formation d'hétérodimères (Aufliegner et al., 1993). Ces résultats laissent suggérer que des régions différentes forment l'interface de dimérisation au sein du domaine E en présence et en absence de ligand. D'autre part, sur le RXR, des études par délétion et par mutagenèse ponctuelle ont également mis en évidence deux régions distinctes de dimérisation : l'une impliquée dans la formation d'hétérodimères et l'autre dans celle d'homodimères, localisées respectivement dans la 9^e heptad repeat et dans un segment de 10 amino-acides en position C-terminale de cette heptad repeat (figure 16).

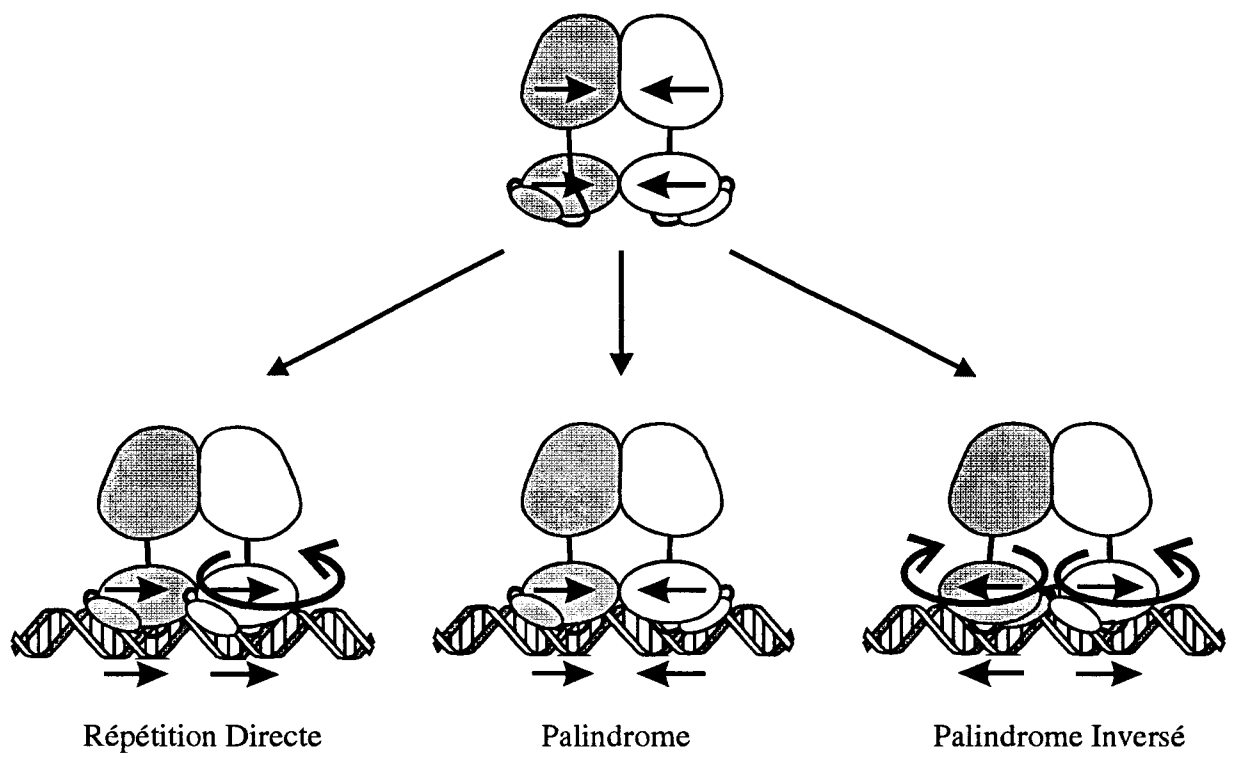


Figure 17 : Dimérisation des récepteurs sur l'ADN selon Glass (1994)
 Le DBD sur l'ADN effectue une rotation par rapport au LBD pour s'orienter dans le sens de son demi-site.

Par ailleurs, certains auteurs suggèrent que, de manière globale, c'est une seule configuration de dimérisation dans les domaines E, due à une seule interface localisée dans la 9^e heptad repeat, qui permet différents modes de liaison des récepteurs à l'ADN : palindrome, répétition directe, palindrome inversé,... Or la liaison de ces différents types d'éléments de réponse nécessite différentes orientations des DBD entre-eux. Pour cela les auteurs proposent qu'une rotation de 180° est possible entre LBD et DBD au niveau d'une région supposée flexible comme le domaine D (Kurokawa et al., 1993; Glass, 1994). Cette rotation permettrait d'accomoder un changement d'orientation du DBD tout en conservant la même orientation des LBD dans le dimère (figure 17).

5.2. Ligand et dimérisation

Une certaine colocalisation des fonctions de dimérisation et de liaison du ligand au sein du domaine E suggère un effet régulateur du ligand sur la dimérisation. Cet effet est connu dans le cas des récepteurs stéroïdiens tels GR et ER (Kumar and Chambon, 1988). Ils existent à l'état inactif dans la cellule sous forme d'un complexe avec des protéines de choc thermique (HSP 90, HSP 70, HSP 56). Sous l'effet de la liaison d'une hormone stéroïde, les récepteurs sont libérés de leur complexe multiprotéique et deviennent capable de former des dimères et de lier l'ADN; de plus ils acquièrent une localisation nucléaire (Pour revue : Pratt, 1993). Mais contrairement aux récepteurs stéroïdiens, les récepteurs de type II (RAR, TR,...) ne forment pas de complexe de stockage avec des protéines de type HSP (Dalman et al., 1990).

Pour ce deuxième type de récepteurs, le ligand paraît réguler l'équilibre entre la formation d'hétérodimères et celle d'homodimères. Par exemple, la formation d'homodimères de RXR sur un DR1 est fortement stimulée par l'addition de son ligand le 9-cis RA (Zhang et al., 1992b). Mais on ne sait pas si le phénomène se produit grâce au motif de dimérisation du LBD ou s'il requière la liaison à l'ADN. Dans le cas du VDR, des études montrent que la formation d'hétérodimères de VDR avec RXR est nettement stimulée par la présence du ligand dérivé de la vitamine D3 (Liao et al., 1990; Cheskis and Freedman, 1994). D'autre part l'hormone thyroïdienne T3 inhibe la liaison d'homodimères TR-TR (Ribeiro et al., 1992; Miyamoto et al., 1993), mais elle semble cependant avoir très peu d'effets sur la formation d'hétérodimères avec RXR.

Les études citées dans ce chapitre nous montrent, au sein des motifs de dimérisation du domaine E, un rôle différent des amino-acides dans l'hétéro- et l'homodimérisation, en présence et en absence de ligand. Une meilleure compréhension des mécanismes de dimérisation du LBD passe par la détermination de sa structure tridimensionnelle chez les RAR, TR, VDR, RXR,... ce qui commence seulement à être connu.

5.3. Stratégies d'analyse structurale des LBD

Avant que ne soit disponible la résolution des structures cristallines ou en solution pour chaque hétérodimère de récepteur de type II, des approches par mutagenèse, des études biochimiques, physicochimiques et de modélisation effectuées sur certains récepteurs ont permis de préciser la structure tridimensionnelle des domaines E. Ces travaux ont été réalisés essentiellement dans le but d'identifier la conformation du site de liaison du ligand.

* Marquage d'affinité et modifications chimiques spécifiques.

La technique de marquage d'affinité des récepteurs emploie des ligands de synthèse couplés à un groupement chimique très réactif ou photoactivable. Ces groupements permettent d'obtenir des pontages covalents avec des amino-acides proches du ligand. Dans le cas du GR de rat, différents résidus du site de liaison de l'hormone stéroïde ont pu être identifiés : la cystéine 656, la méthionine 622 et la cystéine 754 (Carlstedt-Duke et al., 1988). Dans l'étude du RAR α un rétinoïde photoactivable (ADAM-3) a permis de marquer un fragment peptidique du récepteur incluant l'arginine 385 (Sasaki et al., 1995).

L'identification de résidus fonctionnels des récepteurs a également été menée par des techniques de modification chimique des protéines à l'aide de réactifs spécifiques de certains types d'amino-acides. Notamment pour le GR, le rôle des cystéines dans la fonction de liaison à l'hormone et dans le processus d'activation du récepteur a été étudié par des réactifs spécifiques des groupements thiols (pour revue : Simons, 1994). Au sein du laboratoire, ce type de stratégie a été employé pour l'étude du GR (par exemple : Blicq et al., 1988; Burollaud et al., 1993), et du RAR (Dallery et al., 1993). Nous développerons ultérieurement ce type d'approche au chapitre "Stratégie".

* Mutagenèse du domaine de liaison au ligand

Les stratégies de mutagenèse ont souvent consisté en des délétions successives des parties N- et C-terminales du LBD des récepteurs afin d'en délimiter les régions fonctionnelles. Par cette technique, la partie C-terminale du domaine D du TR s'est révélée d'une importance critique pour la liaison du ligand T3 (Lin et al., 1991). Des délétions du domaine F du RAR β ne changent pas l'affinité du récepteur pour le t-RA par rapport au type sauvage (Shen et al., 1993). De même le RAR α tronqué des amino-acides C-terminaux jusqu'à la glycine 404 conserve une affinité inchangée pour le t-RA et les ligands synthétiques (Tate et al., 1994).

Cette stratégie a été employée au sein du laboratoire sur le hRAR α et elle a permis de délimiter deux régions du domaine E impliquées dans la liaison du ligand (Lefebvre et al., 1995). D'une part la partie C-terminale du domaine D est nécessaire à la liaison du t-RA et de différents ligands synthétiques. D'autre part le récepteur tronqué en partie C-terminale jusqu'à l'acide-amino 410 conserve la même affinité pour les ligands; mais une délétion supplémentaire jusqu'au résidu 403 provoque une faible perte d'affinité sauf pour deux ligands synthétiques spécifiques du RAR α (Am80 et Am580) qui perdent toute affinité. Ainsi la région comprise entre les acides-amino 403 et 410 délimite une zone porteuse de déterminants structuraux impliqués dans la spécificité de reconnaissance de ligands du hRAR α .

Des mutants ponctuels des récepteurs mettent en évidence le rôle individuel de certains acides-amino dans leur fonctionnalité. La substitution simultanée des lysine 220 et arginine 269 du hRAR β (correspondant aux résidus 227 et 276 du hRAR α) provoque une diminution très importante de l'activité de liaison du t-RA, alors que la mutation d'un seul résidu n'a qu'une faible incidence (Tairis et al., 1994). La substitution de régions du hRAR α par celles du hRAR β a permis d'identifier une région de 70 acides-amino de la partie N-terminale du domaine E qui est déterminante dans le profil de réponse à des ligands spécifiques d'un type de récepteur α ou β . Et au sein de cette région deux résidus sérine 232 et thréonine 239 du hRAR α (et leurs équivalents dans le hRAR β) sont essentiels dans cet effet (Ostrowski et al., 1995). Ces auteurs, par modélisation, localisent ces deux résidus sur la face hydrophobe d'une hélice α amphiphile. Cette hélice pourrait être similaire à l'hélice H3 du RXR dont les données cristallographiques suggèrent un rôle dans la liaison du ligand [voir le chapitre suivant (Bourguet et al., 1995)].

* Modélisation, cristallographie

Particulièrement dans le cas du TR (dont la structure primaire est assez proche du RAR), différents modèles d'organisation structurale du LBD ont été créés. L'étude des mutants ponctuels du TR chez des patients souffrant d'un syndrome de résistance aux hormones thyroïdiennes ont donné lieu à un modèle de structure à alternance d'hélices α et de feuillets β (Cheng et al., 1994; Mcphie et al., 1993). Ce modèle rapproche le LBD du TR des protéines à structure en "tonneau α/β ".

Une autre stratégie d'étude met en oeuvre des algorithmes de prédiction de structure à partir des homologies de séquence entre le domaine E des récepteurs nucléaires et des enzymes de structure tertiaire connue. En l'occurrence le GR est comparé à la famille des protéases du type de la subtilisine (Goldstein et al., 1993). Les résultats obtenus sont appliqués aux autres récepteurs nucléaires. Mais ces études restent basées sur des modélisations de structure. Les résultats obtenus ne sont pas très éloignés de la structure

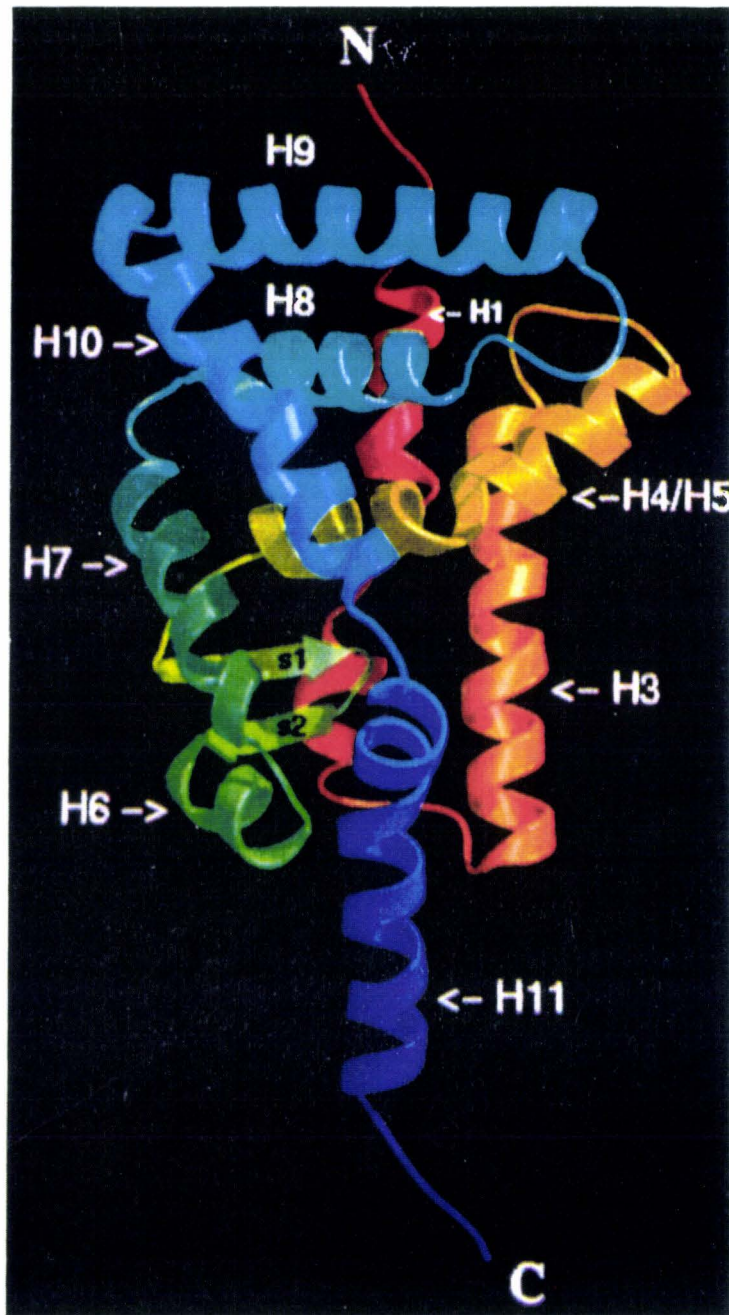


Figure 18 : Modèle de conformation du domaine de liaison au ligand du RXR basé sur les données de la cristallographie (Bourguet et al., 1995).

cristallographique des protéines de transport des rétinoïdes telles la E-RABP (protéine de liaison du t-RA dans l'épididyme) qui possède une structure en forme de tonneau dite "beta-barrel".

Un bond en avant a été réalisé dans ce domaine avec la cristallographie du domaine de liaison au ligand du RXR sous forme d'homodimère sans ligand (Bourguet et al., 1995). Ce domaine se révèle organisé en douze hélices α et deux petits feuillets β qui s'associent en trois couches en "sandwich" formées respectivement par les hélices H1 à H3, H4 à H8, et H9 à H11/12. L'ensemble forme un domaine globulaire (figure 18) dans lequel deux hélices H9 et H10 correspondent aux 8^e et 9^e heptad repeat définies par Forman et Samuels (1990). Elles apparaissent comme deux composants essentiels de l'interface de dimérisation du domaine E du RXR. Les interactions majeures entre chaque monomère de RXR sont faites par contacts entre résidus acides et basiques du motif de dimérisation : Asp739 (boucle H8-H9) interagit avec Arg421 (H10), Glu390 (H9) avec Lys417 (H10). Les hélices H9 de chaque RXR se font face de façon antiparallèle dans l'homodimère, ainsi Glu401 et Lys405 qui sont à chaque extrémité de H9 interagissent d'un partenaire à l'autre.

Les hélices H10 de chaque partenaire interagissent entre elles par des paires de leucines (Leu419 et Leu430) comme selon le modèle d'interaction à "leucine zipper" (Forman and Samuels, 1990). Mais la structure cristallographique du RXR nous révèle de manière surprenante que ce sont les deux seules leucines qui interagissent de cette façon. Les résidus hydrophobes des huit autres heptad repeat sont en fait orientés vers l'intérieur du domaine globulaire.

D'autre part les auteurs déduisent de la structure du RXR deux sites possibles de liaison au ligand, sous la forme de poches hydrophobes entre les hélices H1, H3, H5 et H11 et la boucle formée par les deux feuillets β .

Mais l'influence du ligand sur la conformation du LBD s'est nettement clarifiée avec les récentes structures cristallographiques des domaines de liaison au ligand du RAR γ (Renaud et al., 1995) et du TR α (Wagner et al., 1995) complexés avec leur ligand respectif. En effet, la structure de ce domaine chez le RAR et le TR avec leur ligand est très similaire à celle du RXR sans ligand. On y retrouve les mêmes structures hélicoïdales (H1 à H12) que chez le RXR, notamment les hélices H9 et H10 de l'interface de dimérisation sont conformées de manière identique au moins entre RAR et RXR. Des différences apparaissent essentiellement dans la partie C-terminale du RAR et du TR où l'hélice H12 n'émerge plus de la protéine mais au contraire elle est repliée vers le LBD et obstrue le site d'entrée de la poche hydrophobe. Cette différence de structure pourrait être le résultat d'une transconformation induite par la présence du ligand dans cette poche. D'ailleurs, la structure plus compacte du LBD des RAR et TR pourrait être aussi le résultat d'une telle transconformation induite par le ligand.

Les données cristallographiques du LBD du RAR (Renaud et al., 1995) mettent en évidence l'interaction du t-RA avec un certain nombre de résidus présents dans les hélices H1, H3, H5, H11, H12, le coude β et les boucles entre H6 et H7 et entre H11 et H12. Ces éléments de structure forment une cavité dont les charges électrostatiques favorisent l'entrée du ligand du côté de son groupement carbonyle. L'hélice H12 comporte aussi des résidus qui forment le motif de transactivation AF-2. Or le repliement de l'hélice H12 contre le LBD est stabilisé par une interaction électrostatique entre l'un des résidus glutamate de H12 et une lysine de l'hélice H4. Cette interaction est essentielle puisqu'une mutation de la lysine abolit toute activité de transactivation alors que le ligand est encore capable de se fixer dans le LBD. Les auteurs suggèrent donc un rôle majeur du ligand dans l'établissement d'une conformation fonctionnelle requise pour la transactivation des récepteurs.

6. La transactivation

6.1. Structure des motifs de transactivation

La régulation transcriptionnelle des gènes représente l'ultime fonction mise en jeu par les récepteurs nucléaires dans le processus de transactivation du message hormonal. Cette fonction est portée par deux régions appelées AF-1 et AF-2 qui sont présentes dans la plupart des récepteurs nucléaires, dont RAR et RXR (Nagpal et al., 1993; Folkers et al., 1993). Leur activité est dépendante du type de promoteur mais aussi du type cellulaire, car ces motifs structuraux forment le lien (figure 19) entre les récepteurs et les composants de la machinerie transcriptionnelle (la RNA polymérase II et ses facteurs associés TFIIA, B, C, D, E, F, G, H,...) (pour revue : Zawel et al., 1995).

- Le motif AF-1 est localisé dans le domaine A/B et ne requière pas la présence de ligand sur le récepteur pour son activité.

- Le motif AF-2 est localisé dans la partie C-terminale du domaine E (figure 16). C'est un motif fonctionnel dépendant du ligand. Ce segment serait conformé en une hélice α amphiphile (Zenke et al., 1990). Son caractère hélicoïdal a été observé chez le RXR par la cristallographie (Bourguet et al., 1995).

L'AF-2 est présent dans la grande majorité des récepteurs nucléaires, et sa séquence y est bien conservée (Durand et al., 1994). En fait le RAR ou le TR peuvent fonctionner avec un AF-2 provenant d'autres récepteurs sans modification majeure de leur activité (Barettino et al., 1994). Le caractère interchangeable de ce motif provient de la haute conservation de certains de ses résidus : notamment des résidus hydrophobes, mais surtout un acide glutamique (Glu412 chez le RAR α) est hautement conservé, un autre (Glu415 chez le RAR α) est fréquemment rencontré au sein de la famille. Ces deux résidus semblent

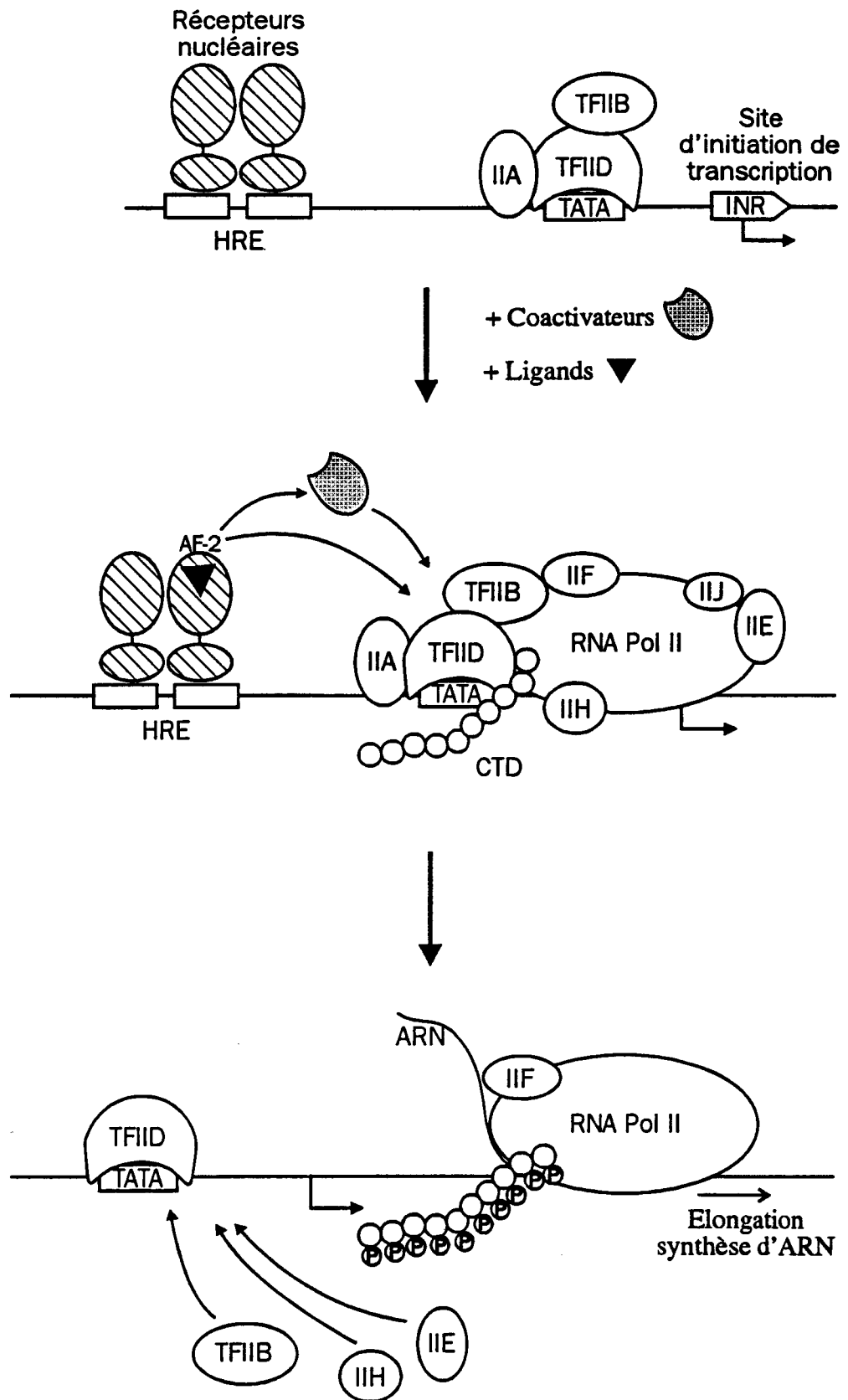


Figure 19 : Modèle d'activation du complexe de transcription par les récepteurs nucléaires (adapté d'après Zawel et al., 1995)

essentiels à l'activité de transactivation des récepteurs, car la mutation de Glu412 et Glu415 en glutamine abroge cette fonction (Durand et al., 1994). Cet AF-2 est probablement un motif spécifique d'interaction avec un facteur protéique qui connecte les récepteurs avec la machinerie de transcription.

6.2. Ligand, dimérisation et voies de transactivation

*RXR, partenaire silencieux

Nous avons vu que le RXR est un partenaire commun à de nombreux récepteurs (RAR, TR, VDR, des récepteurs orphelins,... et RXR) dans le processus de dimérisation. Mais chaque récepteur associé au RXR régule l'activité transcriptionnelle des gènes en réponse à son propre ligand. Ainsi on peut supposer que RXR serait dans ce cas un simple partenaire de dimérisation silencieux, indépendant de son ligand. Dans le cas contraire la voie de transactivation par le 9-cis RA serait ubiquitaire et superposée à toute autre voie, notamment celles du t-RA, de l'hormone thyroïde T3 et de la vitamine D. Certaines études permettent de répondre à ce problème. En effet, les complexes RXR-RAR peuvent se lier à l'ADN sur un DR5 mais aussi un DR1 (Kurokawa et al., 1994). Mais sur ce DR1 la position des complexes est inversée : RAR en amont, RXR en aval. Cependant sur les deux types d'élément de réponse seul RAR est capable de lier un ligand; cette propriété est démontrée par l'emploi in-vitro de ligands spécifiques de RXR et de RAR (Kurokawa et al., 1994). Ceci restreint RXR à un rôle de facteur auxiliaire du RAR dans ces deux cas. Mais la réponse n'est pas si claire dans les complexes RXR-RAR formés sur un HRE de type DR2 où l'on observe que RAR et aussi RXR ont une activité transcriptionnelle additive (Durand et al., 1992).

* Voies dépendantes du 9-cis RA

La récente découverte de nouveaux partenaires de dimérisation du RXR parmi des récepteurs orphelins éclaire l'existence de voies de transactivation dépendantes du 9-cis RA ligand du RXR. NGFI-B était initialement classé parmi les récepteurs se liant à l'ADN sous la forme de monomères (Wilson et al., 1992). Mais Perlmann et Jansson (1995) ont récemment montré que NGFI-B est en réalité capable de former des hétérodimères avec RXR, et ce complexe se lie à l'ADN sur un DR5. NGFI-B est situé sur le demi-site en aval du HRE, comme le RAR dans les complexes RXR-RAR. Mais dans ce cas l'activité transcriptionnelle du complexe est conduite par la liaison du 9-cis RA sur le RXR. Un autre récepteur orphelin, LXR, forme des complexes avec RXR, cette fois sur un élément de réponse de type DR4 (Willy et al., 1995). Ici encore l'activité du complexe est médiée par

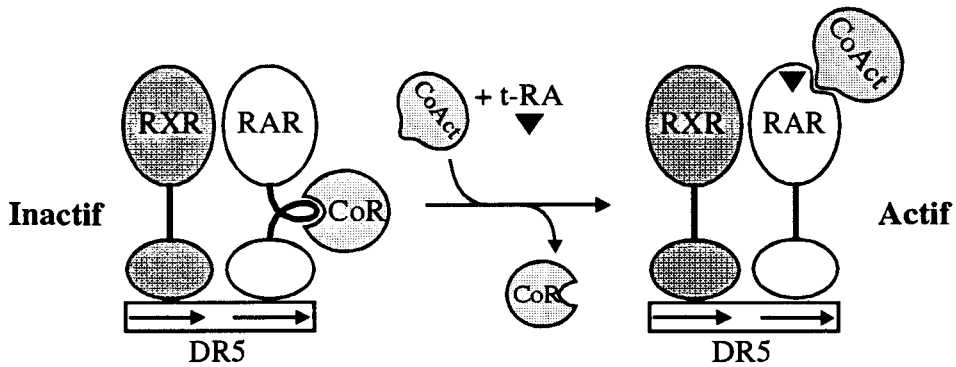


Figure 20 : Régulation de l'activité de transcription de RXR-RAR sur un DR5 par interaction avec un corépresseur (CoR) et un coactivateur (CoAct) en présence du ligand. D'après Perlmann et Vennstrom (1995)

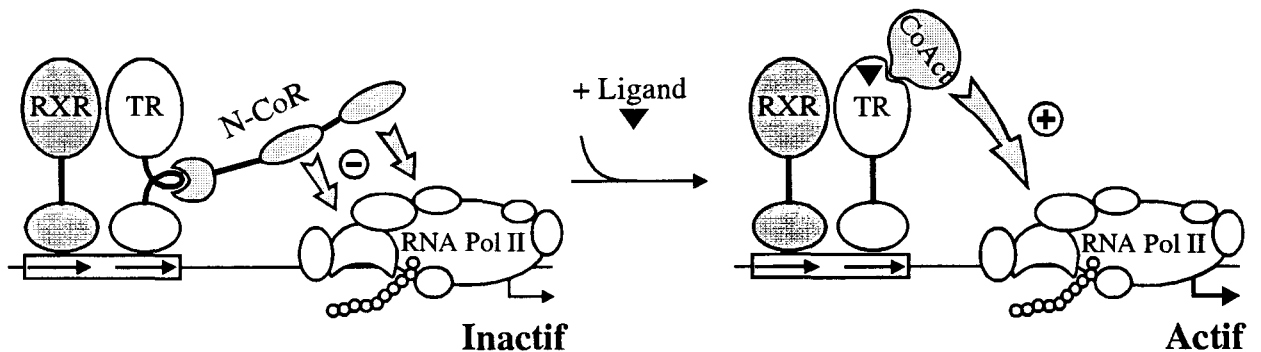


Figure 21 : Interaction des corégulateurs avec la machinerie transcriptionnelle. Le répresseur N-CoR se lie au domaine D du TR, il possède deux domaines répresseurs requis pour une inhibition de la transcription ligand dépendante. (d'après Horlein et al., 1995)

un ligand spécifique du RXR. Ces complexes laissent supposer l'existence d'un mécanisme spécifique de transactivation par lequel le ligand du RXR se lie à son récepteur, mais l'activité transactivatrice est médiée par l'AF-2 de son partenaire LXR (Willy et al., 1995).

On ne connaît aucun ligand pour ces récepteurs orphelins. Par contre PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) peut être activé par des médicaments comme le clofibrate utilisé dans le contrôle du métabolisme des lipides, mais également par certains dérivés des prostaglandines. Or ce récepteur dimérise avec RXR et chacun des partenaires est ici actif; la stimulation des deux récepteurs est synergique (Keller et al., 1993; Kliewer et al., 1993). D'autre part, FXR (farnesoid-X-activated receptor) hétérodimérise avec RXR et peut être activé par des métabolites du farnésol. L'addition de l'hormone juvénile III (hormone de mue chez l'insecte) et d'un ligand spécifique du RXR crée une forte synergie transcriptionnelle par le complexe RXR-FXR (Forman et al., 1995).

Ainsi il existe à présent deux voies majeures de transduction par les rétinoïdes. La première est régulée par le t-RA sur le RAR dans les complexes RXR-RAR. Une seconde voie est régulée par le 9-cis RA sur le RXR impliqué dans la formation de dimères avec des récepteurs orphelins. L'activité transcriptionnelle dépendante du RXR est donc fonction du type de partenaire. Le RXR pourrait être activé ou inhibé suivant le type d'interaction formée dans le domaine E. Il en résulterait une modification de conformation qui masquerait ou mettrait en évidence le motif AF-2 pour des interactions avec des éléments de la machinerie de transcription.

6.3. Modulation de la transactivation

Les différentes voies impliquant le RXR se régulent entre elles par compétition pour l'accessibilité du RXR aux différents récepteurs (Davis and Lazar, 1992; Baretino et al., 1993; Damm et al., 1993). C'est la quantité de RXR disponible qui peut restreindre la réponse à un ligand au profit d'un autre par compétition au niveau de la formation d'hétérodimères. Une compétition au niveau des sites de liaison des récepteurs sur l'ADN peut aussi orienter les voies de transduction des messages hormonaux. Par exemple l'hétérodimère PPAR-RXR peut lier certains éléments de réponse naturels de type ERE, mais il y est inactif (Keller et al., 1995). Il inhibe donc la transactivation par ER via une compétition pour l'ERE. Une autre étude montre que le récepteur orphelin COUP peut se lier sous forme d'homodimère à un DR5 qui est aussi l'élément de réponse du complexe RXR-RAR (Kliewer et al., 1992a; Cooney et al., 1993). C'est ce qui explique l'absence d'activité promotrice d'éléments de réponse de type DR5 stimulés par des rétinoïdes in-vivo dans certains gènes et pour certains types cellulaires.

Un autre mécanisme de régulation de transcription a récemment été mis en évidence avec la découverte de facteurs protéiques qui interagissent avec des récepteurs de type II (figure 20). Un facteur N-CoR interagit avec le TR au niveau de la partie C-terminale du domaine D, dans une région conservée entre TR, RAR et VDR (Horlein et al., 1995). Un autre facteur appelé SMRT peut interagir avec RAR ou TR (Chen and Evans, 1995). Dans les deux cas, leur liaison est rompue par l'apparition du ligand, mais en absence de ce ligand ils inhibent toute activité transcriptionnelle des récepteurs (figure 21). Ils peuvent interagir avec les récepteurs en solution aussi bien qu'avec des hétérodimères liés à l'ADN.

Enfin, la possibilité d'interconnexions entre toutes les voies de transactivation est due à la grande diversité des configurations de dimérisation. Mais elle se restreint au moins par l'accessibilité des ligands aux récepteurs, mais aussi par l'existence de facteurs répresseurs qui contrôlent spécifiquement l'activation des récepteurs.

RESULTATS & DISCUSSION

1. Stratégie

Le but de notre recherche est l'identification et la localisation de tous les amino-acides du hRAR α essentiels à ses fonctions de dimérisation et de liaison à l'ADN.

De nombreuses études visant à définir des régions fonctionnelles des récepteurs nucléaires ont été menées par des techniques de mutagenèse dirigée ou par délétions. Ce type de technique procède souvent par délétions successives de régions N- ou C-terminales ou internes à la séquence de la protéine étudiée, afin de délimiter une ou des régions essentielles. Au sein de ces régions, des données plus précises peuvent être extraites: il est possible, sur un nombre restreint d' amino-acides, d'identifier le rôle spécifique de chacun par la mutagenèse dirigée qui permet le remplacement d'un amino-acide supposé fonctionnel par un autre. Mais cette technique est difficilement envisageable pour une identification de résidus fonctionnels au sein de la totalité de la séquence protéique des récepteurs nucléaires. Dans notre étude, nous ne pouvions donc pas employer la mutagenèse habituellement utilisée.

Nous avons mis au point une stratégie de modifications chimiques spécifiques des amino-acides du récepteur. Pour cela, nous avons choisi des réactifs chimiques dirigés spécifiquement contre la chaîne latérale de certains amino-acides, afin de modifier les résidus accessibles du RAR natif.

Les techniques de modifications chimiques spécifiques d' amino-acides ont été mises au point et utilisées depuis un certain nombre d'années, notamment dans l'étude fonctionnelle de nombreuses enzymes (pour revue : Glazer et al., 1985). Il existe actuellement une multitude de réactifs chimiques dirigés contre des groupes fonctionnels des amino-acides (NH₂, COOH, SH, OH,...), mais beaucoup d'entre-eux possèdent de multiples spécificités ou bien sont réactifs dans des conditions non physiologiques, donc peu compatibles avec le maintien d'une conformation native des protéines (par exemple : réactivité dans 50% d'acide acétique, réaction 24h à 40°C...)

Dans le domaine des récepteurs nucléaires, de nombreux travaux basés sur les modifications chimiques d' amino-acides ont porté sur l'étude des cystéines. Le rôle de ces résidus a particulièrement été étudié dans le cas des fonctions de liaison à l'ADN et au ligand des récepteurs stéroïdiens (GR, ER,...). La réactivité importante des groupements thiols a permis le développement de divers réactifs covalents. Certains sont réversibles comme le MMTS (méthylméthane-thiosulfonate) ou le DTNB (dithiobisnitrobenzoate) qui permettent d'inhiber toute liaison du GR à l'ADN et à l'hormone (Tienrungraj et al., 1987). Leur effet est réversible en présence de fortes concentrations en agent réducteur

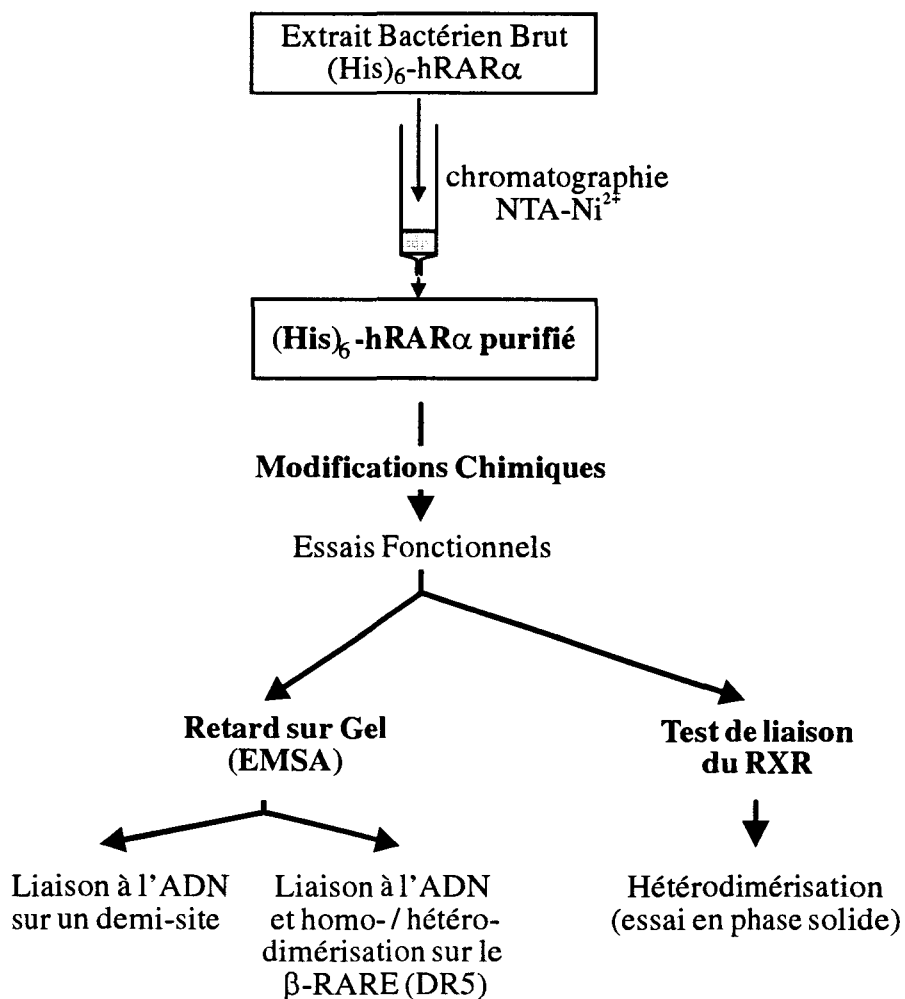


Figure 22 : Schéma global de la stratégie employée.

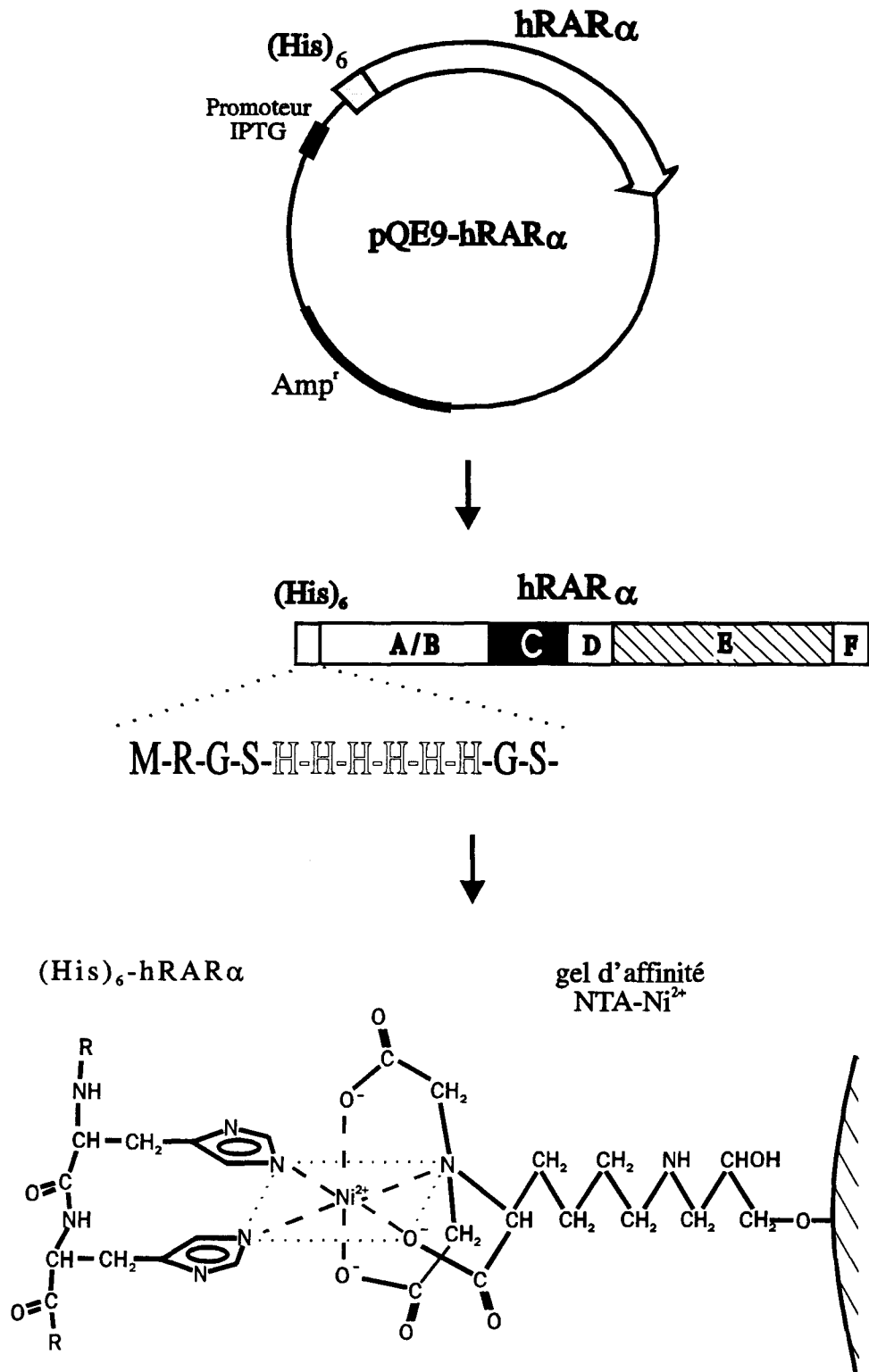


Figure 23 : Expression du RAR sous forme d'une protéine de fusion avec 6 histidines. Interaction du (His)₆-hRAR α avec le nickel du gel d'affinité.

(dithiothréitol, β -mercaptoéthanol). Les effets obtenus par ces réactifs illustrent la spécificité du mode d'action des agents dirigés contre les amino-acides de manière générale. En effet, la possibilité de retrouver l'activité initiale du récepteur par réversion de la modification chimique écarte toute possibilité d'action par dénaturation non spécifique de la structure spatiale fonctionnelle de la protéine cible.

Il existe également des molécules réagissant de manière irréversible avec les thiols tels l'iodoacétamide ou la N-éthylmaléimide. Au sein du laboratoire, des maléimides N-substitués par des chaînes alkyles ou aromatiques de différentes longueurs ont montré différents effets inhibiteurs sur l'activité de liaison du GR. Ces résultats ont permis de supposer que des thiols impliqués dans la liaison du ligand se trouvent dans un environnement hydrophobe voire même dans le site de liaison du GR qui pourrait donc être une poche hydrophobe.

D'autres agents comme l'arsenite et ses dérivés réagissent avec les thiols vicinaux. Ils permettent de déceler la présence de thiols impliqués dans la formation de ponts disulfures au sein des récepteurs.

Ces divers réactifs des thiols permettent non seulement de déceler l'existence de cystéines impliquées dans les fonctions testées au sein des récepteurs, mais aussi de préciser finement le type d'environnement de ces groupements fonctionnels (hydrophobicité, thiols vicinaux...).

Dans notre étude, nous avons cherché à identifier les résidus fonctionnels du RAR sans plus approfondir le mode de fonctionnalité de ces résidus comme cela a déjà été réalisé pour les cystéines du GR. Nous avons employé des réactifs spécifiques d'amino-acides afin de cibler les résidus fonctionnels du récepteur. Nous avons ainsi testé l'effet de modifications chimiques des cystéines, lysines, arginines, tyrosines, histidines et tryptophane du hRAR α sur sa fonctionnalité dans différentes configurations de dimérisation et liaison à l'ADN. Pour cela, le RAR, surexprimé dans les bactéries (figure 22), a été purifié par affinité à l'aide de colonnes à nickel immobilisé, afin d'isoler le récepteur de toute autre protéine avant modification. Ensuite, l'importance des résidus modifiés dans l'activité du RAR a été testée par différentes études fonctionnelles.

2. Purification du RAR par affinité

2.1. Principe (figure 23)

Le RAR est purifié en une étape par chromatographie d'affinité au nickel (greffé sur des billes d'agarose via un groupement chimique nitrilo-triacétate NTA). Cette technique est

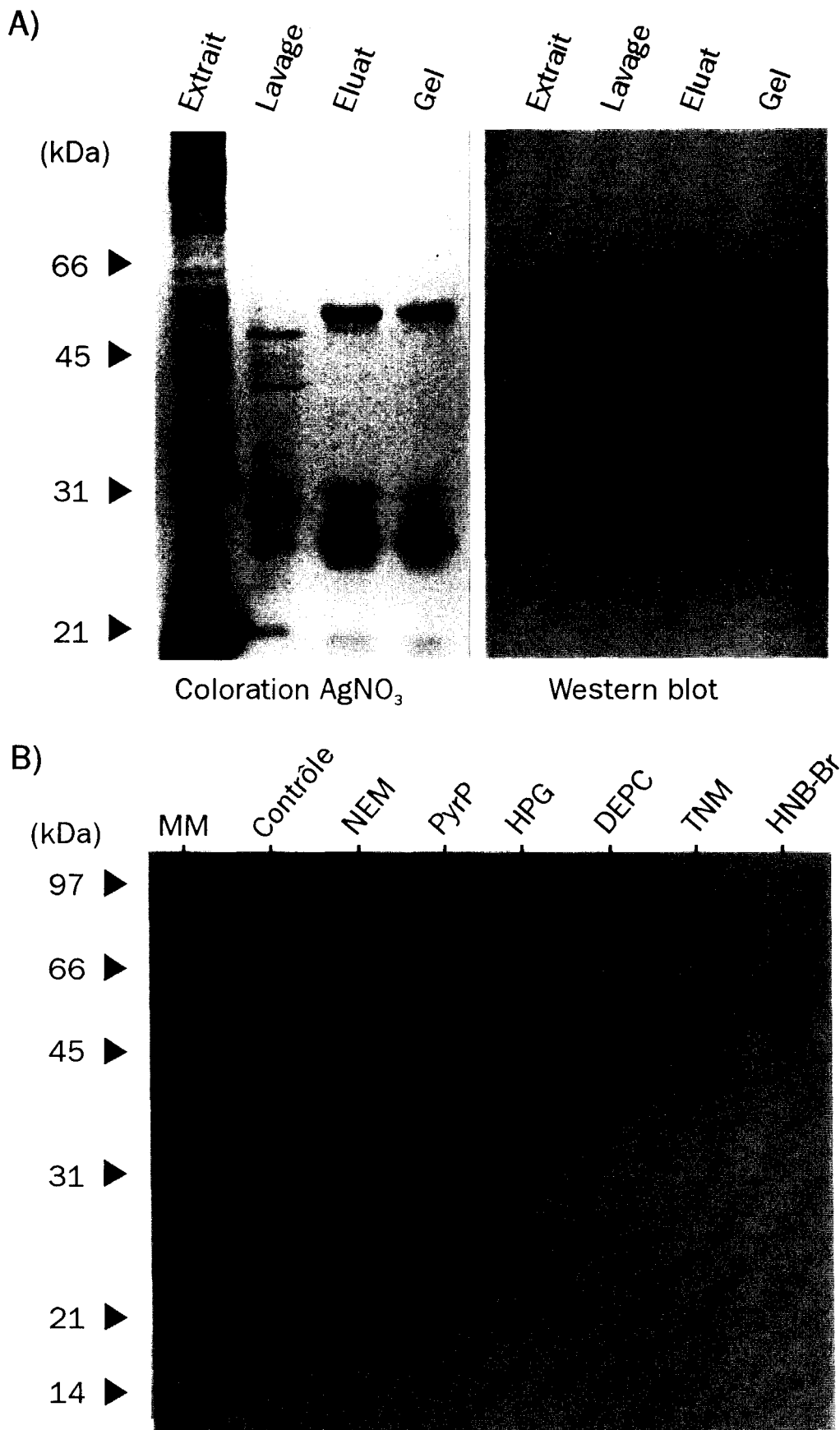


Figure 24 : A) Purification du $(\text{His})_6\text{-hRAR}\alpha$ par chromatographie d'affinité au nickel. Les protéines sont colorées au nitrate d'argent (gauche) et révélées par anticorps anti-RAR α (droite).
 B) Electrophorèse du RAR après modification chimique spécifique de ses amino-acides et électroélution.

basée sur la capacité du nickel de former des liaisons de chélation avec essentiellement les chaînes latérales des histidines présentes dans les protéines. Dans ce but, un segment de six histidines a été greffé en partie N-terminale du RAR qui est alors surexprimé dans les bactéries sous forme d'une protéine de fusion. Ce segment d'histidines accolé au domaine A/B n'a apparemment aucune influence sur chacune des fonctions du hRAR que nous avons testé (Lefebvre et al., 1995; voir aussi § caractérisation). Nous avons donc jugé inutile de cliver ce segment après purification du RAR.

2.2. Clonage du (His)₆-hRAR α

Pour surexprimer le RAR sous forme d'une protéine de fusion, nous avons ajouté à chaque extrémité de son ADN complémentaire des sites d'enzymes de restriction (BamHI et HindIII) par amplification par PCR. Le fragment d'ADN ainsi obtenu a été inséré sous forme d'un segment BamHI/HindIII dans le vecteur d'expression pQE9 en respectant la phase de lecture du RAR pour son expression ultérieure. Le vecteur pQE9 possède la séquence codant un segment de six histidines. L'insertion de l'ADN du RAR en aval de cette séquence donne lieu à l'expression de la protéine de fusion.

2.3. Surexpression et purification du (His)₆-hRAR α

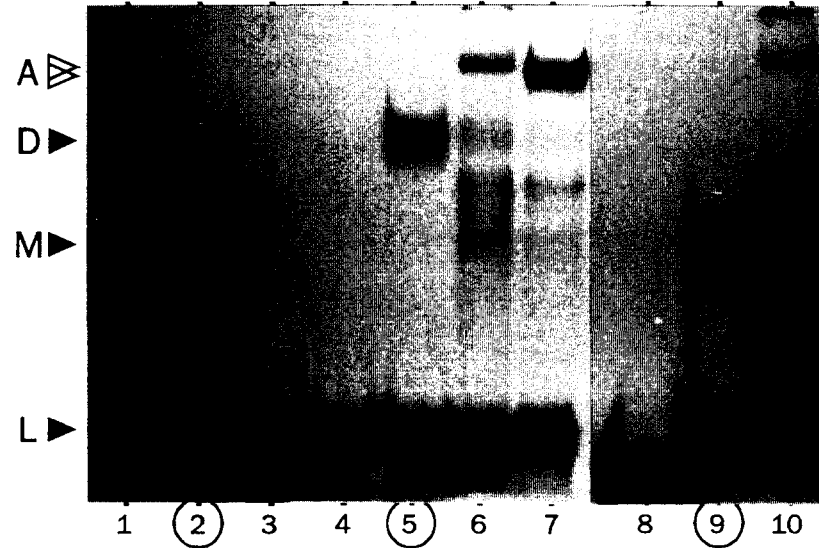
La surexpression du (His)₆-hRAR α par la bactérie est déclenchée par addition d'IPTG (qui agit par dérégulation du promoteur du vecteur pQE9). Le récepteur contenu dans l'extrait bactérien est alors purifié en conditions non dénaturantes sur colonne d'affinité au nickel (figure 24A). Les protéines adsorbées de façon non spécifique sur la colonne sont lavées par de faibles concentrations en imidazole (30mM). Le RAR est élué par compétition avec de plus fortes concentrations en imidazole (200mM). Une fraction des protéines reste liée au gel d'affinité après l'étape d'éluion (figure 24A ligne "gel").

Les préparations de récepteur purifié par cette technique sont obtenues avec un taux de pureté de l'ordre de 50% en routine. Le contaminant majeur d'un poids moléculaire de 28kD représente environ 60% de l'ensemble des contaminants (analyse par densitométrie). Ce contaminant majeur a été analysé par microséquençage (P. Lefebvre). Sa séquence N-terminale est : MYVASDLVMSNAYQXRT. Elle n'est pas apparentée au (His)₆-hRAR α mais possède une homologie de 70% avec une protéine bactérienne riche en résidus histidine qui est la FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomérase SLYD d'après les banques de protéines (Genbank).

La protéine majoritaire d'un poids moléculaire de 52kD correspond au RAR. Son identité est confirmée par un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine F (C-terminal) du hRAR α . L'anticorps anti-RAR met aussi en évidence (figure 24A) la présence d'un

A)

Anticorps	-	-	-	-	-	RAR-Ab	RXR-Ab	-	-	RAR-Ab
RAR (pmol)	-	9	3	-	3	3	3	-	12	12
RXR	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
	βRARE					demi-site				



B)

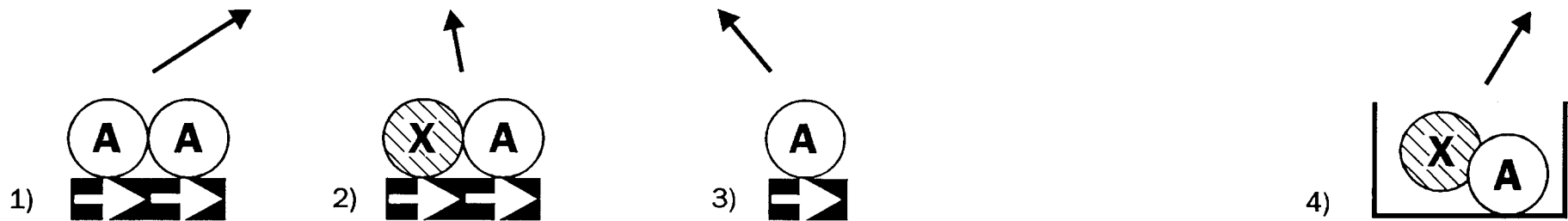
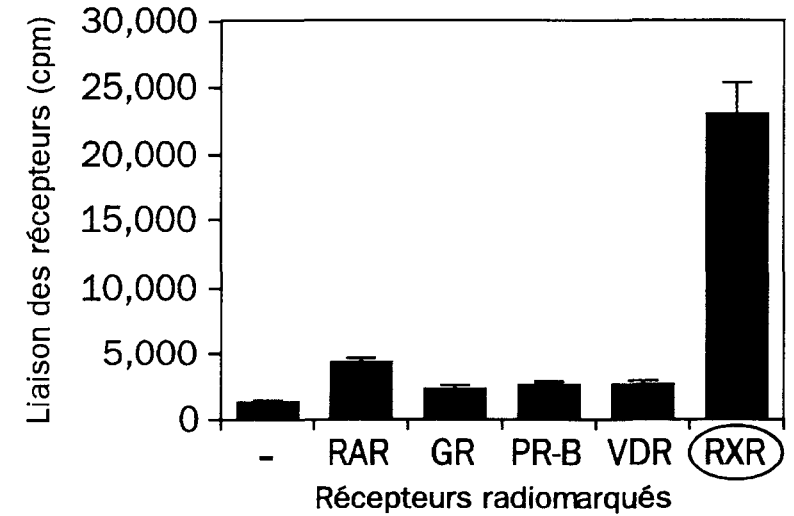


Figure 25 : Caractérisation des activités de dimérisation et de liaison à l'ADN du (His)₆-hRAR α par retard sur gel (A) et par un test de liaison des récepteurs en phase hétérogène (B). Les quatre configurations du RAR étudiées sont figurées au bas des tests (1 à 4). L: ADN libre; D: Dimères; M: Monomères; A: Complexes avec anticorps

produit de protéolyse du récepteur, d'un poids moléculaire de 48-50kD. Il apparaît probablement par dégradation au niveau de la séquence N-terminale du RAR puisqu'il est essentiellement non retenu sur le gel d'affinité et donc ne contiendrait plus le segment à six histidines.

3. Caractérisation fonctionnelle du (His)₆-hRAR α purifié

3.1. Tests de fonctionnalité du RAR par retard sur gel

La purification par affinité en conditions non dénaturantes fournit un récepteur fonctionnel. Nous avons testé par retard sur gel les capacités de liaison à l'ADN et de dimérisation du RAR après purification (figure 25A).

Le RAR est capable de former des hétérodimères avec RXR sur un β RARE, élément de réponse de type DR5 présent dans le promoteur du gène du h-RAR β (de The et al., 1987). Le complexe formé RAR-RXR- β RARE (complexe D, ligne 5) est retardé par rapport à l'ADN libre (ligne 1). La présence de RAR et de RXR dans ce complexe est révélée par des anticorps spécifiques anti-RAR et anti-RXR dont la liaison au complexe RAR-RXR- β RARE le retarde plus encore (complexes A, lignes 6 et 7).

Le RAR est également capable de lier l'ADN sous la forme d'homodimères. Les concentrations de RAR utilisées (3pmol) pour former des hétérodimères avec RXR ne sont pas suffisantes pour former des homodimères de RAR (ligne 3) du fait des phénomènes de coopérativité de liaison des récepteurs entre eux. Mais des concentrations en RAR plus élevées (9pmol) permettent d'observer la formation d'homodimères sur le β RARE (ligne 2).

Il est possible d'observer la liaison du RAR à l'ADN en absence de toute activité de dimérisation. en effet, le RAR en concentrations élevées (12pmol) peut se lier à un élément de réponse formé d'un seul demi-site sous la forme d'un monomère (complexe M, ligne 9). La présence de RAR dans ce complexe est caractérisée par l'anticorps anti-RAR (ligne 10) et sa spécificité de liaison est démontrée par compétition avec des oligonucléotides non-marqués spécifique (demi-site) et non-spécifique (GRE).

3.2. Test de liaison du RXR

La capacité de dimérisation du RAR avec RXR en absence de toute liaison à l'ADN a été caractérisée en phase hétérogène sur microplaque à 96 puits traitée pour la culture cellulaire. Cette technique consiste à adsorber le RAR purifié dans chaque puit de la plaque puis, après blocage des sites non-spécifiques, différents récepteurs traduits in-vitro en présence de ³⁵S sont incubés sur cette matrice. Nous observons que seul le RXR est capable, en absence d'ADN, de s'associer avec le RAR adsorbé sur la microplaque (figure

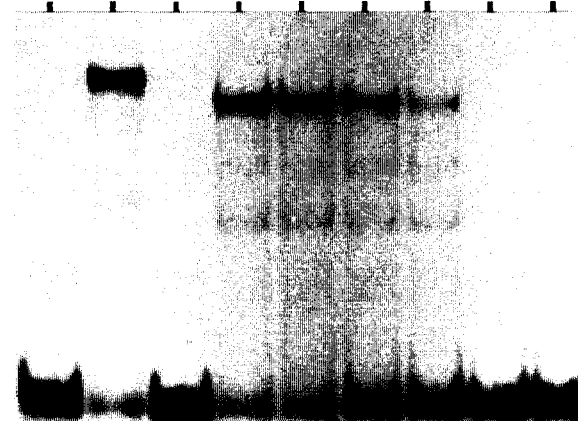
1) Hétérodimères sur β RARE

Agent	-	-	-	-	C	2	4	20	40
Récepteur	-	A	X	AX	AX	AX	AX	AX	AX



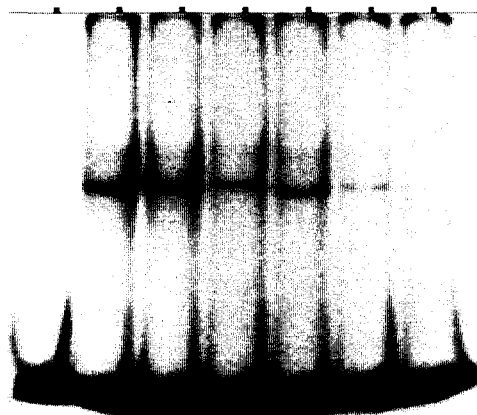
2) Homodimères sur β RARE

Agent	-	-	-	-	C	2	4	20	40
Récepteur	-	AX	-	A	A	A	A	A	A



3) Monomères sur demi-site

Agent	-	-	C	2	4	20	40
Récepteur	-	A	A	A	A	A	A



4) Test de liaison du RXR

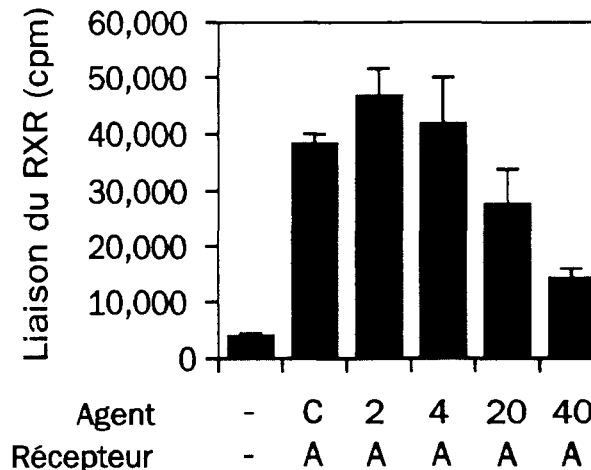


Figure 26 : Les effets de la modification chimique des thiols du RAR par la NEM sont testés dans quatre configurations. Le RAR est traité par des concentrations croissantes de NEM (ratios de 2 à 40) ou par le solvant seul (C). Les lettres A et X indiquent la présence respective de RAR ou de RXR. 3, 9 et 12 pmol de RAR sont présentes par colonne dans les tests 1, 2 et 3 respectivement.

25 B). Cependant de faibles proportions de RAR radiomarqué sont aussi capables de se lier au RAR de la matrice. Ceci montre que la stabilité des hétérodimères RAR-RXR est bien supérieure à celle des homodimères RAR en absence d'ADN. Cette interaction est spécifique du fait qu'aucun autre récepteur nucléaire testé GR, PR, VDR n'est capable de lier la matrice de RAR dans ces conditions.

Par ces deux techniques de retard sur gel et de liaison en phase hétérogène, nous pouvons observer différentes configurations fonctionnelles du RAR :

- 1) hétérodimérisation avec RXR sur un DR5
- 2) homodimérisation sur un DR5
- 3) liaison à l'ADN en monomère sur un demi-site
- 4) hétérodimérisation avec RXR en absence d'ADN

Ces configurations permettent notamment de disséquer et analyser individuellement les fonctions de liaison à l'ADN et d'hétérodimérisation qui sont normalement imbriquées dans le processus de liaison à l'ADN du complexe RXR-RAR.

4. Modifications chimiques du RAR et propriétés de liaison à l'ADN et dimérisation : Effet de l'alkylation des cystéines par la N-éthylmaléimide

4.1. Principe et mise en oeuvre des modifications chimiques du RAR

Nous avons utilisé les quatre configurations du RAR décrites ci-dessus pour tester la fonctionnalité du récepteur après modification chimique de certains de ses amino-acides. Le RAR purifié a été traité par la N-éthylmaléimide (NEM), réactif spécifique des cystéines. Elle a été utilisée en concentrations croissantes calculées par rapport au nombre d'acides aminés cibles présents dans le (His)₆-hRAR α (voir aussi l'appendice technique). Ainsi les quantités de NEM mises en jeu sont exprimées sous forme du rapport molaire NEM / Cys. Les rapports molaires employés sont de 2, 4, 20, 40, ce qui correspond à des concentrations en NEM de l'ordre de 0,2 à 4 mM. Les calculs effectués pour la NEM sont faits de la même manière pour tous les autres réactifs que nous avons utilisés.

Dans chacune des configurations du RAR, l'alkylation des thiols par la NEM a un effet inhibiteur sur ses fonctions testées. Cet effet est directement dépendant de la concentration en réactif (figure 26). Expérimentalement, pour les tests de retard sur gel, les complexes récepteurs/ADN obtenus en présence des différentes concentrations en NEM ont été découpés et comptés en scintillation liquide afin d'en quantifier la radioactivité. D'autre part, la dimérisation du RAR avec RXR en absence d'ADN est également inhibée par l'alkylation des thiols accessibles du RAR. C'est ce que nous révèle le test de liaison du RXR en phase hétérogène sur microplaque (figure 26, panneau 4). Cet effet ne résulte pas

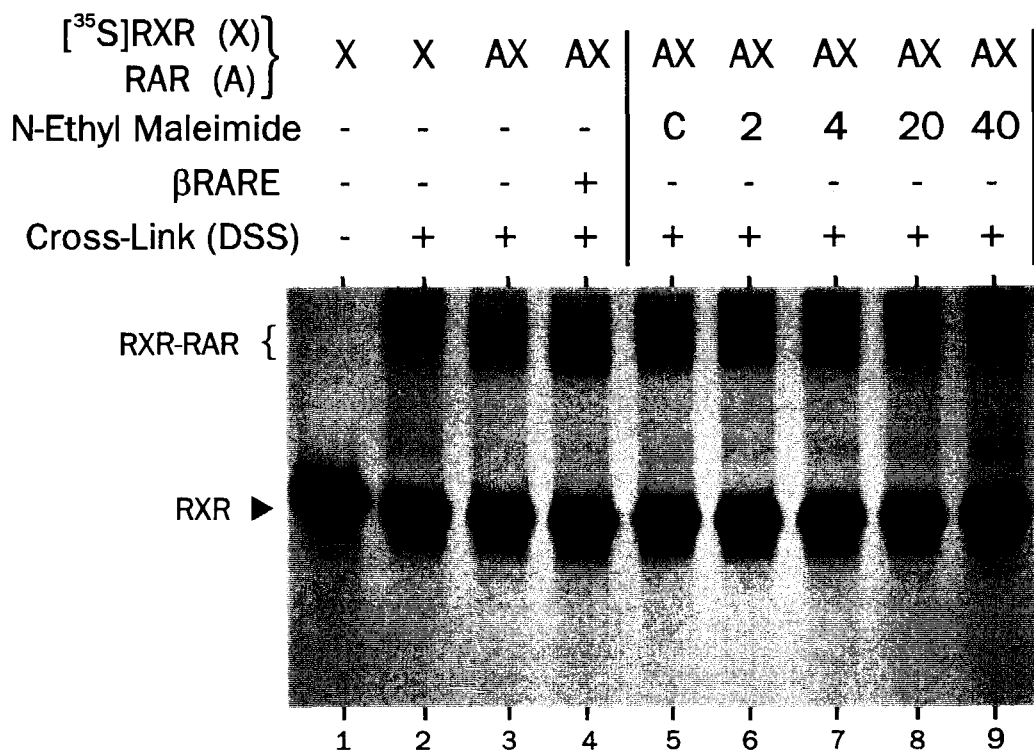


Figure 27 : Mise en évidence par pontage chimique des complexes RXR-RAR formés en solution après traitement ou non du RAR par la NEM. Les abréviations sont identiques à celles de la figure 26. Les pontages chimiques sont effectués par le disuccinimidyl-subérate (DSS; voir appendice technique, protocole de pontages chimiques). Les monomères de $[^{35}\text{S}]\text{-RXR}$ sont identifiés par la pointe de flèche noire.

d'une baisse de l'adhésivité du RAR alkylé sur la surface des puits de la microplaque, car une expérience de pontage chimique ou "cross-link" du complexe RAR-RXR où le RAR est alkylé (figure 27) donne lieu aux mêmes résultats que ceux obtenus en phase hétérogène, or cette expérience est réalisée exclusivement en solution.

La quantification des complexes formés a permis d'exprimer les données issues des retards sur gel et du test de liaison du RXR sous forme graphique (figure 28). Les courbes obtenues représentent l'activité de liaison résiduelle du RAR après modification par la NEM mais aussi par tous les autres réactifs spécifiques d'acides aminés que nous avons employés. Au sein de chaque courbe, la concentration en réactif nécessaire pour inhiber de 50% l'activité de liaison initiale du RAR a été mesurée expérimentalement; elle est exprimée sous la forme d'un R_{50} (rapport molaire à 50% d'activité résiduelle) représenté dans le tableau, figure 29.

4.2. Effets de modifications chimiques des cystéines du RAR par la N-éthylmaléimide

Différents effets sont observés par la modification chimique des cystéines (figures 28 et 29). La NEM a un effet inhibiteur très important sur l'hétérodimérisation et l'homodimérisation du RAR lié à un DR5 ($R_{50}=2,5$). La capacité intrinsèque du RAR à lier l'ADN est testée en retard sur gel par liaison à un demi-site. Elle est également sensible au traitement du récepteur par la NEM mais dans une moindre mesure ($R_{50}=16$). L'effet de la NEM sur la formation d'hétérodimères RAR-RXR en absence d'ADN est par contre beaucoup moins marqué ($R_{50}=30$). Ainsi, il apparaît que l'alkylation des cystéines produit un effet différentiel sur les activités testées.

Cet effet met en évidence une implication préférentielle des groupements thiols accessibles du RAR dans la stabilisation des dimères liés à l'ADN, et dans une moindre mesure dans la formation d'hétérodimères en solution. Les résultats observés suggèrent que la NEM est sans effet sur les cystéines impliquées dans la coordination du zinc qui maintient la conformation active du domaine de liaison à l'ADN. Mais l'effet marqué de la NEM sur la fonctionnalité du RAR suggère le rôle majeur de certaines cystéines dans ses activités de dimérisation. Quelques résidus peuvent correspondre à ce profil comme les cystéines 148 et 174 du DBD très proches de la boîte H impliquée dans la spécificité et la coopérativité de liaison du RAR sur les éléments de réponse de type DR5 et DR2 (Predki et al., 1994).

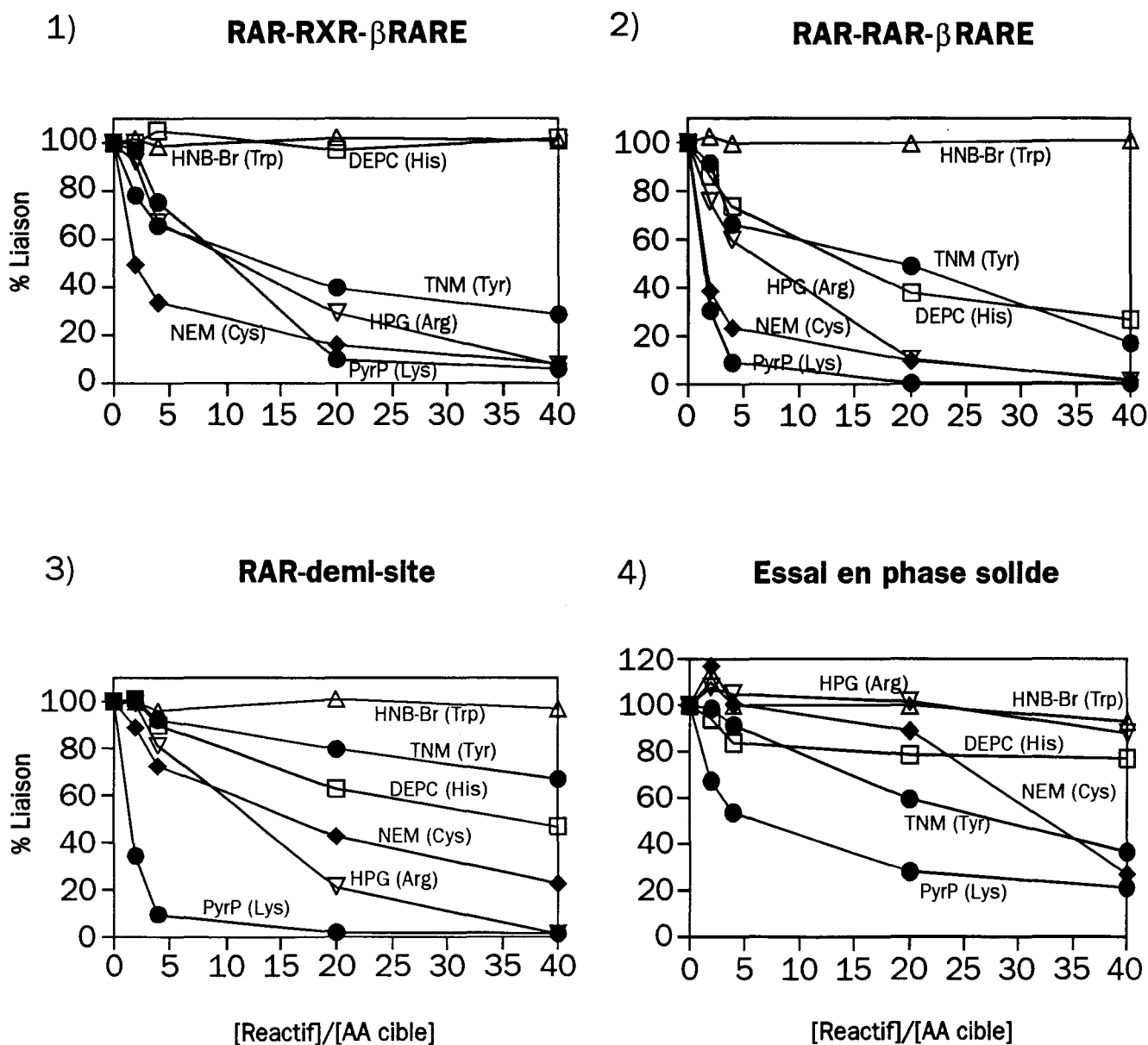


Figure 28 : Représentation graphique des effets des modifications chimiques du RAR dans les quatre configurations présentées figure 26, cette fois en présence de tous les agents chimiques utilisés. Les écarts types ne sont pas figurés mais sont de 2 à 20 % des valeurs obtenues sur 3 à 4 expériences.

Activité testée	R ₅₀					
	Polaire NEM (Cys)	Basiques PyrP (Lys)	Basiques HPG (Arg)	Basiques DEPC (His)	Aromatiques TNM (Tyr)	Aromatiques HNB-Br (Trp)
1) Hétérodimérisation sur βRARE (RAR-RXR-βRARE)	2.5	10.0	12.5	NA*	15.0	NA*
2) Homodimérisation sur βRARE (RAR-RAR-βRARE)	2.5	2.0	7.5	15.0	17.0	NA*
3) Liaison à l'ADN sur demi-site (RAR-1/2 site)	16.0	2.0	13.0	34.0	>40.0	NA*
4) Hétérodimérisation (Essai en phase solide)	30.0	4.0	>40.0	>40.0	30.0	NA*

NA : Absence d'inhibition

Figure 29 : Tableau récapitulatif des effets des modifications chimiques du RAR. Les Valeurs représentent les R50 qui sont les concentrations en réactifs nécessaires pour obtenir 50% de l'activité de liaison totale du RAR.

5. Mise en évidence d'une contribution distincte des résidus Arg, Lys, Tyr, His et Trp aux fonctions de liaison à l'ADN et dimérisation du RAR

Le (His)₆-hRAR α a également été traité par un certain nombre de réactifs spécifiques des résidus arginines, lysines, tyrosines, histidines et tryptophane. Ces différents réactifs ont été choisis en raison de leur spécificité d'action dans des conditions d'utilisation suffisamment douces (pH, température,...) pour préserver a priori la conformation native du RAR (voir appendices techniques). La fonctionnalité du RAR, après traitement, a été quantifiée par retard sur gel et test de liaison du RXR de la même manière que dans le cas des cystéines. L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans la figure 28 et le tableau figure 29.

5.1. Modification chimique des lysines

Les résidus lysine du RAR accessibles au solvant ont été spécifiquement modifiés par la vitamine B6 ou phosphate de pyridoxal (noté PyrP). Le traitement de protéines par ce réactif est réversible car il conduit à la formation de bases de Schiff instables qui sont facilement hydrolysées. La réduction de ces bases de Schiff par le borohydrure de sodium (NaBH₄) est donc nécessaire pour obtenir une modification irréversible des groupements amines. La vitamine B6 a un puissant effet inhibiteur sur l'ensemble des fonctions testées du RAR. Cet effet est bien spécifique de la modification des groupement ϵ -NH₂ des lysines par le phosphate de pyridoxal et ne résulte pas de l'activité réductrice du borohydrure, puisque pour chaque traitement du RAR un témoin appelé "Carrier" est soumis à l'action du borohydrure seul et ne présente pas d'effet quantifiable (voir les lignes "C" dans le cas de la NEM, figure 26). Le traitement du RAR par PyrP/NaBH₄ inhibe puissamment l'activité de liaison à l'ADN du RAR sous forme de monomère comme d'homodimère ($R_{50}=2$ pour les deux essais). Cependant, la formation d'hétérodimères avec RXR sur un DR5 est moins sensible au traitement ($R_{50}=10$) que celle des homodimères. De manière plus surprenante, la formation d'hétérodimères en absence d'ADN est plus fortement affectée ($R_{50}=4$) que sur un DR5. Ces résultats nous montrent que la liaison à l'ADN des récepteurs les protège en partie contre les effets du PyrP; d'autre part les différences observées entre les configuration en homodimères et hétérodimères sur l'ADN indiquent l'existence de plusieurs interfaces de dimérisation car des effets différents sont observés dans les deux cas.

5.2. Modification chimique des arginines

Pour la modification chimique des arginines du RAR, nous avons employé le para-hydroxyphénylgyoxal (HPG) qui réagit avec leur groupement guanidyle entre pH7 et pH9

avec une spécificité d'au moins 95% (Yamasaki et al., 1980). Ce traitement affecte de manière équivalente la capacité du RAR à lier l'ADN sous la forme de monomère, d'hétérodimère et d'homodimère (avec une sensibilité plus importante pour cette dernière configuration) comme le montrent les R_{50} de 13, 12,5 et 7,5 respectivement. Il est intéressant de noter que l'hétérodimérisation en absence d'ADN est beaucoup moins affectée par ce traitement ($R_{50}=40-45$).

Ainsi, il apparaît que les résidus arginines sont importants dans les fonctions de liaison à l'ADN et de dimérisation sur l'ADN mais pas en absence d'ADN. Ici, contrairement au cas des lysines, l'hétérodimérisation ne protège pas la liaison à l'ADN du traitement au HPG. Cette diversité des effets du HPG est à mettre en relation avec le nombre important d'arginines et leur grande répartition au long de la séquence primaire du RAR (figure 30). En effet elles se retrouvent près ou dans les boîtes fonctionnelles du DBD (boîtes P, D et H) et dans certaines heptad repeat du LBD (hr1 et 6). Mais la faible activité du HPG sur la dimérisation en absence d'ADN suggère une localisation prédominante des arginines fonctionnelles dans le domaine de liaison à l'ADN du RAR.

5.3. Modification chimique des tyrosines

La nitration des tyrosines par le tétranitrométhane (TNM) est hautement spécifique de ces résidus, bien qu'une légère réactivité des cystéines et des méthionines ait pu être reportée pour certaines protéines (pour références : Glazer et al., 1985). Ce réactif produit peu d'effets sur l'activité de liaison à l'ADN intrinsèque du RAR ($R_{50}=40$), mais il inhibe plus efficacement la formation d'homodimères et d'hétérodimères sur l'ADN ($R_{50}=15$ et 17 respectivement). Le traitement au TNM affecte la formation d'hétérodimères sans ADN avec une efficacité de moitié ($R_{50}=30$) qui montre que les résidus tyrosine contribuent essentiellement à l'activité de dimérisation du RAR en présence d'ADN. La localisation des tyrosines au sein du RAR est en accord avec ces résultats puisqu'elles se situent surtout dans le LBD du récepteur, mais au sein du DBD des tyrosines se situent en position critique pour la dimérisation : dans la boîte DR (Tyr98 et Tyr100) et à côté de la boîte D (Tyr122) du RAR α (figure 30).

5.4. Modification chimique des histidines

Le diéthylpyrocarbonate (DEPC) est souvent utilisé comme inhibiteur de dégradation enzymatique. Son mécanisme d'action met en jeu la carbéthoxylation des résidus histidine localisés dans le site actif des enzymes ciblées.

Les effets inhibiteurs de ce réactif sur le RAR sont très sélectifs de l'homodimérisation ($R_{50}=15$), mais le DEPC est totalement inefficace vis à vis de la

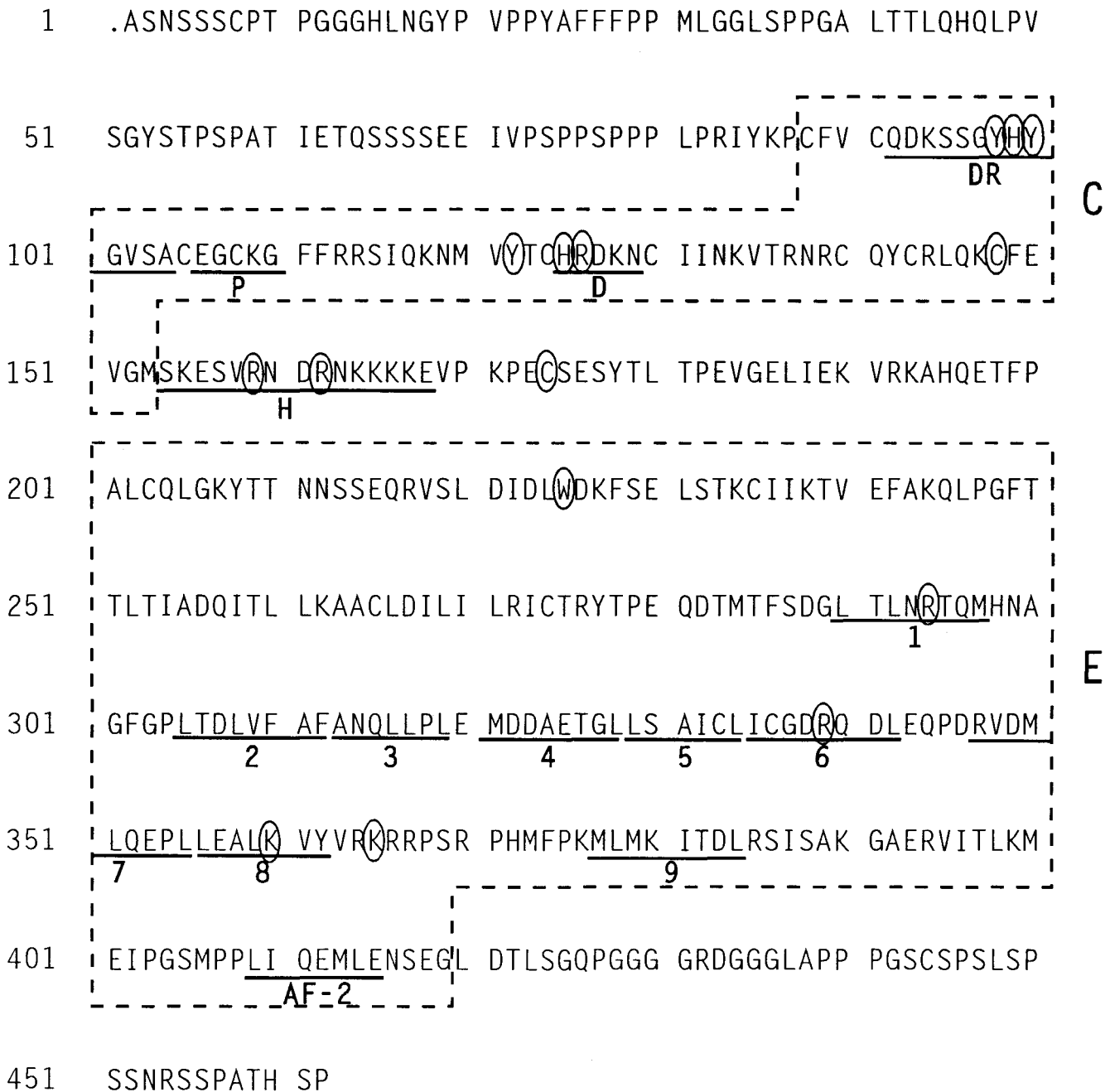


Figure 30 : Schéma récapitulatif des amino-acides mis en évidence par la technique de modifications chimiques du (His)₆-hRAR α .

Les zones fonctionnelles du RAR sont soulignées et définies par des lettres (boîtes P, D, DR, motif AF-2) ou un chiffre (heptad repeat 1 à 9).

Les amino-acides décrits dans le texte sont cerclés. Leur numérotation correspond à la séquence du hRAR α .

formation d'hétérodimères en présence d'ADN, et il montre une légère inhibition de la liaison du RAR sur un demi-site ($R_{50}=34$). L'hétérodimérisation en absence d'ADN est de même très faiblement affectée avec un R_{50} de l'ordre de 40. Ces résultats suggèrent fortement l'implication d'histidines du RAR dans la formation d'homodimères alors qu'elles n'apparaissent pas impliquées dans le processus d'hétérodimérisation. Ce résultat est intéressant si l'on considère la position de ces résidus. En effet, la faible inhibition du DEPC sur l'hétérodimérisation en absence d'ADN suggère la localisation de ces résidus au sein du DBD. Or des histidines sont trouvées dans le RAR au sein des boîtes DR (His99) et D (His125), très voisines des tyrosines 98, 100 et 122 déjà décrites dans ce même type de fonction (figure 30).

5.5. Modification chimique du tryptophane

Le bromure de 2-hydroxy-5-nitrobenzyle (HNB-Br) est un réactif spécifique des tryptophanes, et possède à plus haute concentration une réactivité parasite sur les cystéines. En fait, le (His)₆-hRAR α ne comportant qu'un seul tryptophane, les concentrations en réactif utilisées (0,46mM pour un ratio de 40) sont suffisamment faibles pour éviter des réactions parasites non-spécifiques. Mais elles sont compatibles avec une pleine activité du HNB-Br conformément aux travaux réalisés sur d'autres protéines (Glazer et al., 1985). Cependant, nous n'observons aucun effet de ce réactif sur toutes les activités du RAR que nous avons testé (figures 28 et 29).

L'unique tryptophane du RAR est localisé en position 225 du récepteur, au milieu du domaine E (figure 30). Cette absence d'activité du HNB-Br suggère que ce résidu hydrophobe pourrait être non-exposé au solvant donc inaccessible à toute modification. Ce tryptophane pourrait d'autre part être impliqué dans d'autres fonctions que celles qui sont testées ici, telles que la liaison au ligand. Cette dernière hypothèse est confirmée par la cristallographie du RAR-LBD où le tryptophane contacte le noyau aromatique du t-RA (Renaud et al., 1995).

6. Localisation des résidus lysine essentiels à la fonctionnalité du RAR α

6.1. Marquage radioactif des lysines exposées du RAR α

Les résultats présentés précédemment mettent en évidence un rôle majeur des lysines du RAR dans ses fonctions de dimérisation aussi bien en présence qu'en absence d'ADN. L'effet inhibiteur très puissant du phosphate de pyridoxal sur la fonctionnalité du RAR nous a incité à explorer plus en détail la position de lysines essentielles au sein de la séquence primaire du récepteur. Pour cela nous avons marqué les lysines du RAR à l'aide

MR GSHHHHHHGS

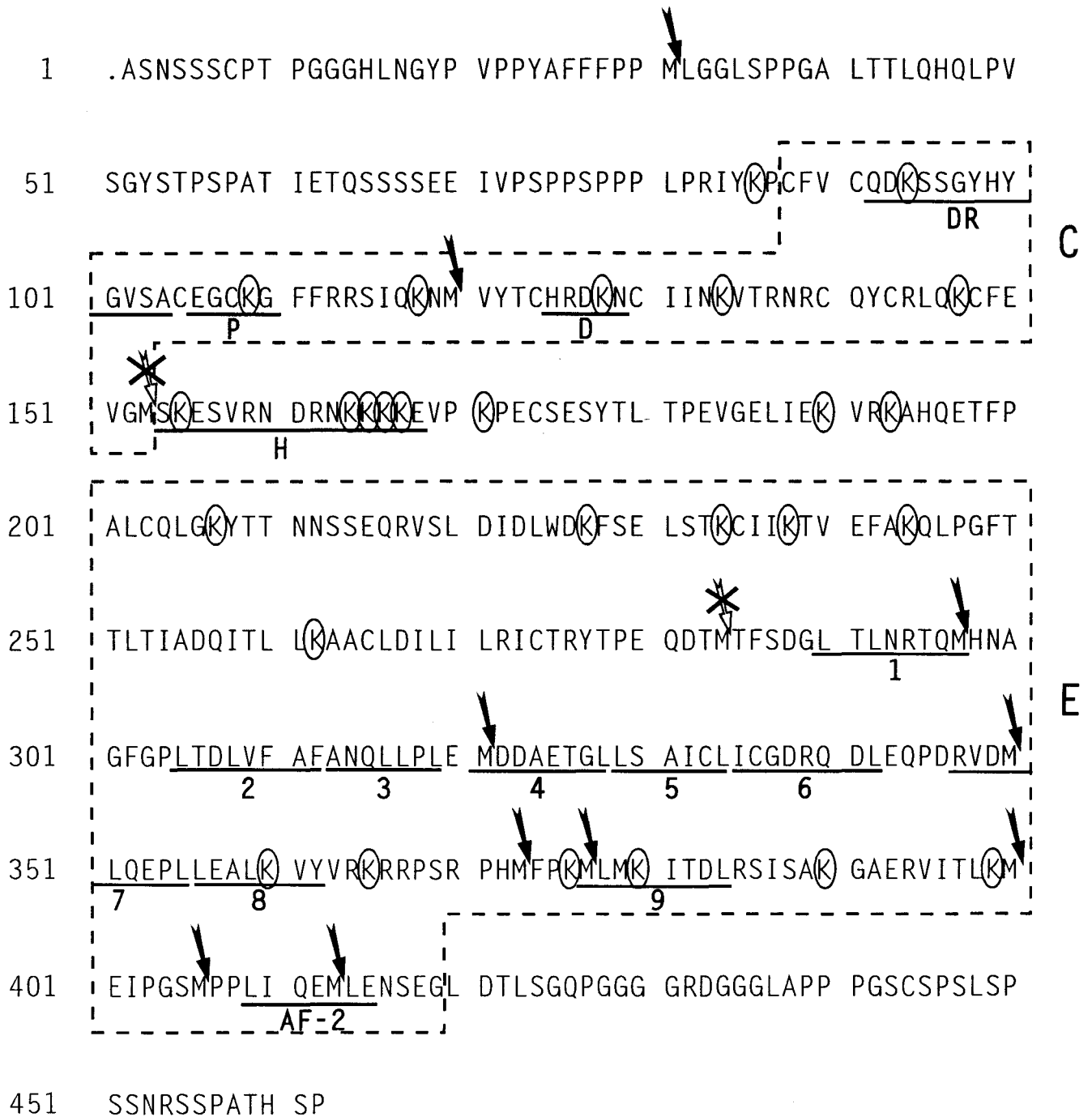
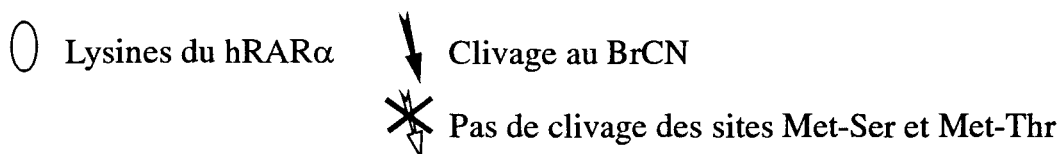


Figure 31 : Position des lysines au sein du hRAR α et sites de clivage par le BrCN



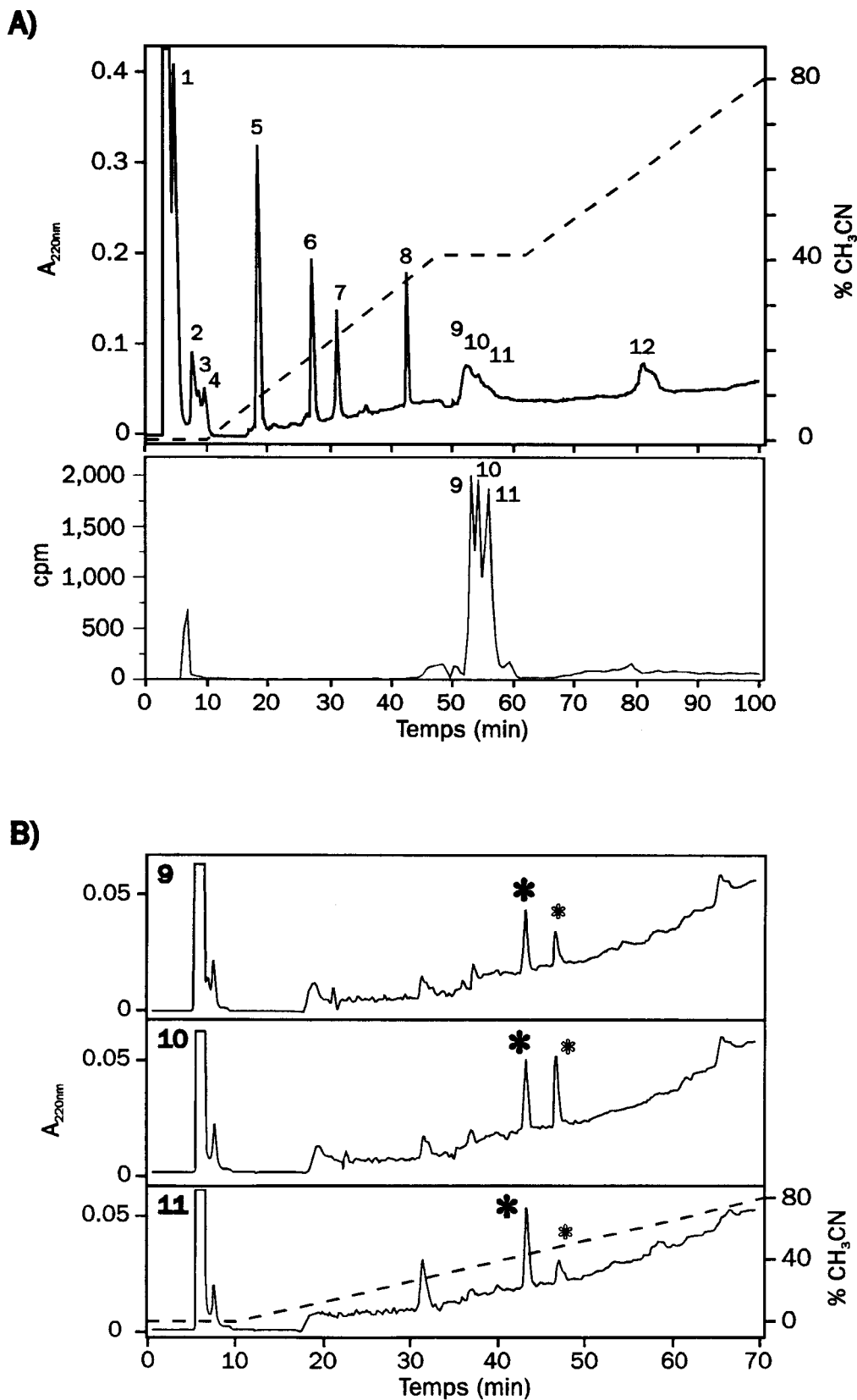


Figure 32 : Localisation par HPLC des résidus lysines radiomarqués.

A) Profils d' élution des peptides du RAR issus du clivage au BrCN, observés en absorbance (A /haut) et par comptage de la radioactivité (A /bas).

B) Profils d' élution des peptides 9, 10 et 11 du RAR issus du clivage au BrCN, après digestion à l'endoprotéinase Arg-C.

d'un réactif radiomarqué spécifique de ces amino-acides. Le phosphate de pyridoxal n'étant pas disponible sous forme radiomarquée nous avons choisi le formaldéhyde tritié. Ce réactif produit les mêmes effets que PyrP sur les propriétés de liaison à l'ADN et dimérisation, bien qu'avec une intensité moindre (R_{50} est 8 à 10 fois plus élevé que pour PyrP). Cette différence est probablement due à la taille beaucoup plus petite du formaldéhyde, qui agit donc beaucoup moins par encombrement stérique de l'environnement des lysines que ne le fait le phosphate de pyridoxal.

6.2. Localisation par HPLC des résidus lysine radiomarqués

Le RAR a été marqué sur ses lysines accessibles au solvant par le formaldéhyde tritié dans les mêmes conditions que pour PyrP. Puis le récepteur et ses contaminants ont été séparés par électrophorèse en SDS-PAGE. Le RAR a été alors purifié à homogénéité par électroélution à partir des bandes d'acrylamide. Par cette technique, le RAR est dénaturé dans le SDS mais il est purifié à homogénéité (figure 24B). Le récepteur a ensuite été clivé au niveau des méthionines par le bromure de cyanogène en milieu acide. Les fragments obtenus après clivage ont été séparés par chromatographie en phase inverse sur colonne C18. Le profil d'élution nous montre la séparation de 12 à 14 pics observés de manière reproductible à 220nm (figure 32 A). Cependant la vaste majorité de la radioactivité détectée co-élue avec les pics qui apparaissent vers 40% d'acétonitrile. Ces pics au nombre de trois (figure 32 A, pics 9, 10 et 11) sont faiblement séparés même par une interruption du gradient dans cette zone d'élution (voir schématisation du gradient figure 32 A). Chacun des trois pics radiomarqués a été à nouveau clivé, cette fois par l'endoprotéinase Arg-C, puis séparé par HPLC. Dans les trois cas, deux pics apparaissent avec des temps de rétention similaires mais des taux de radiomarquages différents (figure 32 B). Ces résultats suggèrent fortement que les trois peptides 9, 10 et 11 seraient identiques, mais différemment radiomarqués. Cette hypothèse est confirmée par analyse par microséquençage qui identifie la séquence N-terminale : Leu-Gln-Glu-Pro-Leu. Cette séquence correspond au fragment du hRAR α comprise entre les amino-acides Leu351 et Met373 qui comprend deux lysines et un site de clivage par l'endoprotéinase Arg-C. La présence de ces deux lysines peut expliquer le marquage différentiel observé.

6.3. Un motif de dimérisation du RAR α

Il est intéressant de constater (figure 31) que les résidus lysine du RAR sont répartis exclusivement dans le domaine de liaison à l'ADN, et dans les régions N- et C-terminales du LBD. Certains d'entre-eux sont conservés parmi les partenaires de RXR (RAR, TR, VDR) d'autres sont particuliers au RAR. Les deux lysines présentes dans le peptide

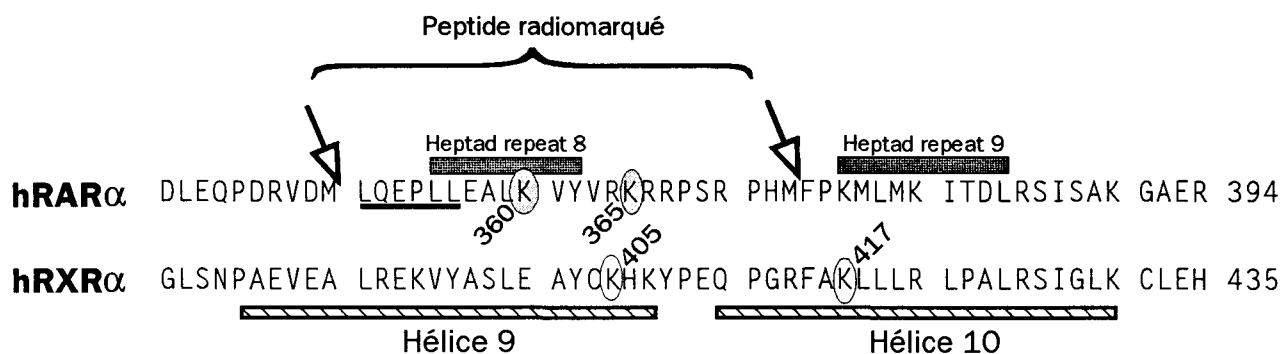


Figure 33 : Séquence de peptide contenant les lysines marquées au formaldéhyde et alignement des séquences du RAR et du RXR.

Les flèches représentent les sites de clivage par le BrCN, la séquence du RAR soulignée a été identifiée par microséquençage.

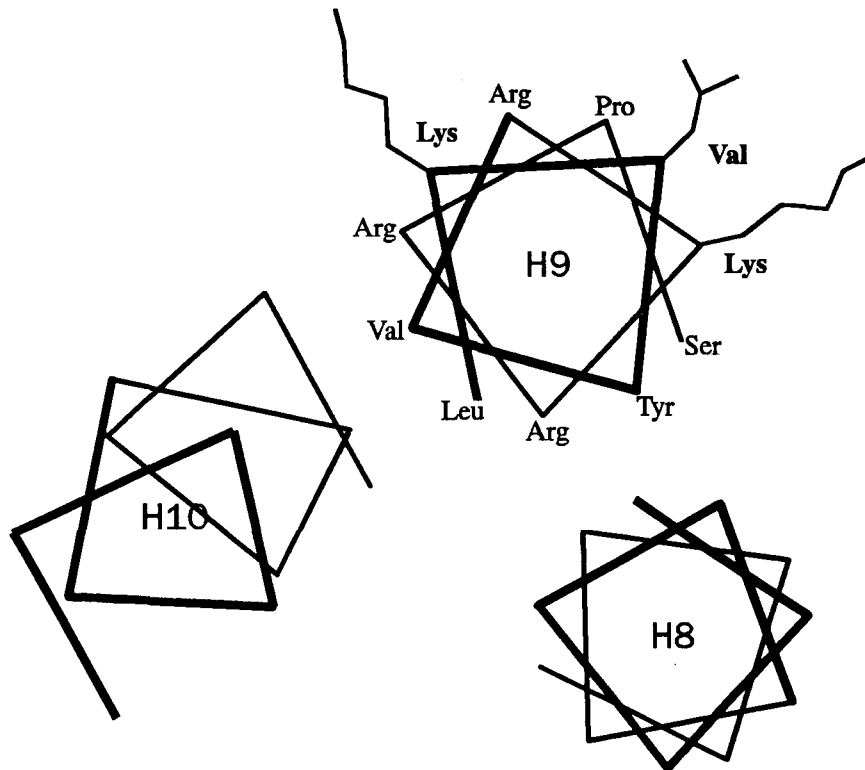


Figure 34 : Modèle de conformation des résidus 360, 361 et 365 d'après les données de la cristallographie du RXR.

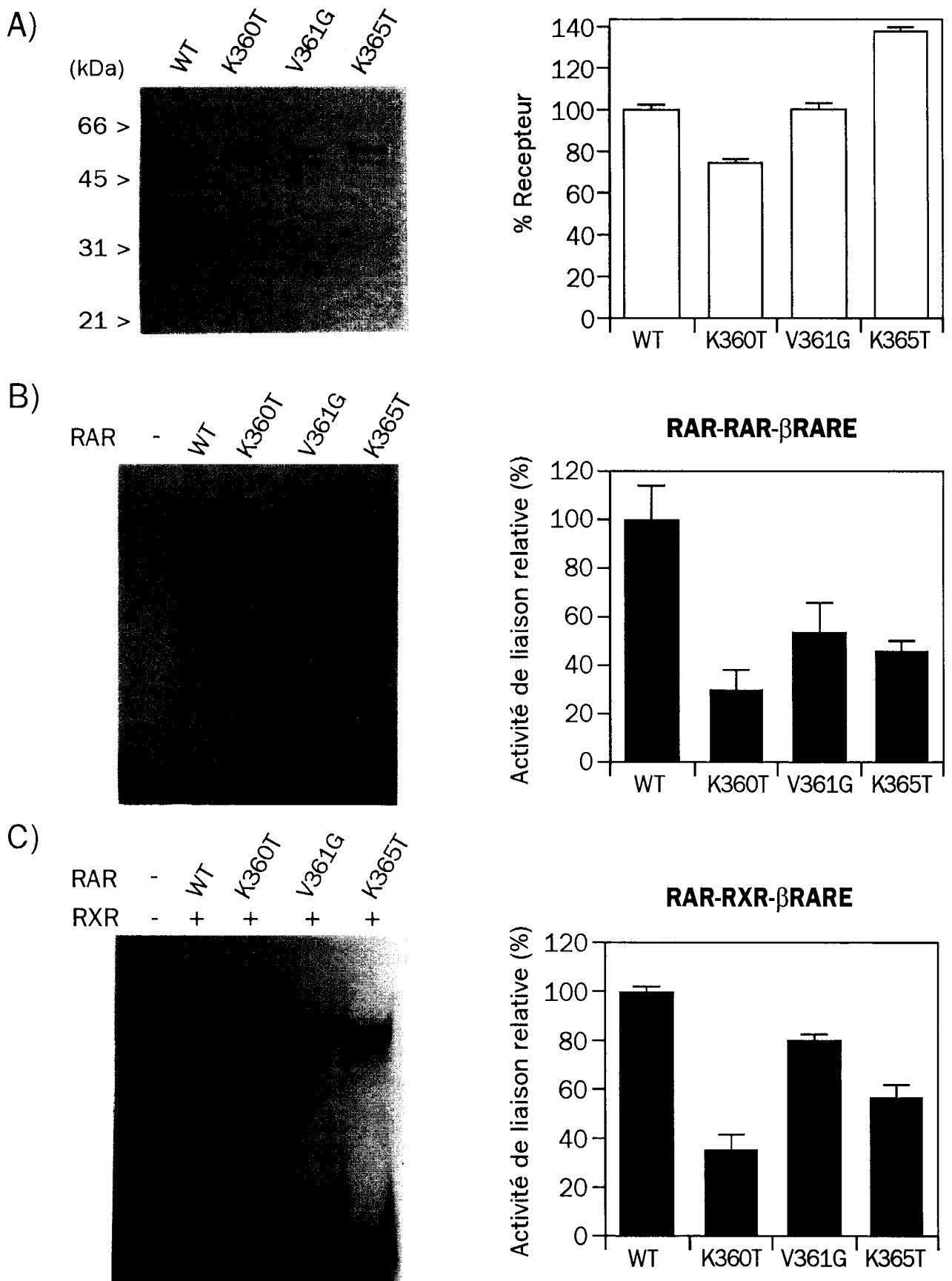


Figure 35 : Effets de la mutation ponctuelle des résidus 360, 361 ou 365 sur l'activité de liaison du RAR sous forme homodimère (B) ou hétérodimère (C). Les activités de liaison schématisées (panneaux de droite) sont ajustées par rapport à une même quantité de récepteur quantifiée par révélation par anticorps (A). WT : RAR non-muté.

radiomarqué localisé par microséquençage font partie des résidus conservés (Lys360 et Lys365). Ils sont localisés dans une région qui inclut la 8^e heptad repeat. Cette heptad repeat correspond dans le RXR à l'hélice H9 qui s'est révélée contribuer de façon importante à la formation d'homodimères de RXR comme l'a montré la structure cristalline des domaines de liaison au ligand des récepteurs (Bourguet et al., 1995; voir figure 18). De plus, ce sont précisément deux lysines du RXR (Lys405 et Lys417) qui sont impliquées dans la formation de liaisons ioniques entre les deux monomères, au sein de cette hélice H9 (figure 33). Enfin, les données cristallographiques sur la structure du LBD du RAR γ , même si elles ne nous renseignent pas sur la position des résidus de l'hélice H9, délimitent de manière identique les hélices H8, H9 et H10 qui sont dans la même conformation entre RAR et RXR. Ainsi, par analogie, un rôle similaire peut être évoqué pour les deux lysines du RAR dans ce mécanisme. Si l'on positionne les amino-acides de la 8^e heptad repeat du RAR selon les données de la cristallographie du RXR (Bourguet et al., 1995) on peut observer que les lysines 360 et 365 sont exposées toutes deux du côté du solvant. De plus, la valine 361 qui jouxte la lysine N-terminale apparaît également clairement exposée et pourrait aussi contribuer à l'interface de dimérisation (figure 34).

6.4. Effets de la mutagenèse dirigée

Dans le but de confirmer l'importance des trois résidus Lys360, Val361 et Lys365 révélés par les modifications chimiques, nous avons créé des récepteurs RAR mutés ponctuellement chacun sur l'un des trois résidus, les lysines étant mutées en thréonines et la valine mutée en glycine. L'activité de liaison des mutants a été testée (figure 35) par la formation d'homo- et hétérodimères sur l'ADN (panneaux B et C). La quantité de RAR de type sauvage (WT) et mutants (K360, V361 et K365) mise en jeu dans chaque essai a été dosée par anticorps anti-RAR α (panneau A, gauche) et quantifiée par densitométrie (A, droite). Elle permet de corriger les activités de liaison par rapport à une même quantité de récepteurs (B et C, panneaux de droite).

Par l'étude préliminaire de ces mutants, il apparaît clairement que ces trois résidus sont essentiels aux configurations testées. Les lysines sont impliquées de façon équivalente entre homo- et hétérodimères sur l'ADN, comme le montrent les activités de liaison des mutants K360 et K365 de 30% et 50% respectivement (panneaux B et C). La valine semble par contre plus impliquée dans la formation d'homodimères, puisque le mutant V361 conserve 50% de liaison en homodimères et 80% de liaison en hétérodimères avec RXR. Ces résultats nous laissent envisager la mise en jeu d'interfaces de dimérisation différentes au sein du LBD : un motif plus basique formerait les hétérodimères, et une interface plus hydrophobe serait mise en jeu dans les homodimères.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Nous avons mis au point une stratégie d'étude fonctionnelle du hRAR α qui permet d'identifier et de localiser des résidus impliqués dans ses activités de liaison à l'ADN et de dimérisation. Nos résultats, confirmés par la mutagenèse dirigée, mettent en évidence un rôle différent des mêmes amino-acides dans les quatre configurations testées, notamment entre l'homodimérisation et l'hétérodimérisation du RAR, ce qui confirme la mise en jeu de différentes interfaces dans ce phénomène.

Il serait intéressant d'étudier par cette même stratégie les résidus du RXR qui sont impliqués dans les mêmes fonctions. D'autre part, nous pouvons étendre cette approche à d'autres types d'éléments de réponse des complexes RXR-RAR, particulièrement à un RARE de type DR1 où les récepteurs ont une polarité inversée par rapport au DR5. Ce DR1 est d'un intérêt particulier puisque, dans les hétérodimères qui s'y lient, le RAR est dans ce cas inactif (Kurokawa et al., 1994). Les autres récepteurs nucléaires, voire les facteurs de transcription en général peuvent être étudiés par cette même approche.

De manière plus immédiate, nous avons mis en oeuvre plusieurs expériences permettant de confirmer les résultats observés par la modification chimique des lysines. Nous avons employé d'autres modes de clivage du RAR de manière à identifier plus finement la localisation des résidus marqués.

Comme nous l'avons vu au long de la séquence primaire du RAR, des résidus lysine sont localisés et conservés dans la partie N-terminale du LBD mais aussi dans le domaine de liaison à l'ADN du RAR, notamment au sein de la boîte H supposée impliquée dans des interactions avec le petit sillon de l'ADN. Or de manière un peu surprenante, ces derniers résidus n'apparaissent pas dans le profil d'élution des fragments radiomarqués du RAR après clivage au BrCN. Ceci peut signifier que ces résidus ne sont pas marqués ou bien qu'ils sont présents dans un fragment de taille trop importante pour être élué de la colonne C18 pendant le gradient (de zéro à 80% d'acétonitrile).

Afin d'analyser plus précisément la présence ou l'absence d'autres lysines radiomarquées dans le RAR, nous avons clivé le récepteur en fragments différents par digestion à l'endoprotéinase Arg-C. Le RAR a été purifié à homogénéité en absence de SDS qui est inhibiteur de l'enzyme aux concentrations utilisées. Pour cela, nous avons isolé le RAR radiomarqué par HPLC sur colonne C4. Les fragments du récepteur obtenus par digestion enzymatique ont alors été séparés sur colonne C18. Ce type de préparation du RAR permet d'utiliser les endoprotéinases à la place du BrCN.

D'autre part, nous avons employé la même stratégie afin de localiser les résidus cystéines mis en évidence par les modifications chimiques. Le RAR a dans ce cas été marqué sur ses cystéines accessibles au solvant par la NEM tritiée. Ces expériences sont actuellement en cours.

Enfin, certains résidus comme les histidines et tyrosines qui se sont révélés essentiels à des configurations précises des récepteurs mériteraient également d'être localisés.

En conclusion, la stratégie que nous avons mis au point nous a permis à présent de localiser des résidus essentiels, dont l'importance a par ailleurs été observée par homologies avec les résultats d'autres techniques telles que la cristallographie du RXR. Notre méthode d'analyse nous permet une approche globale sur la totalité du récepteur et dans les diverses configurations qu'il peut adopter en solution ou sur l'ADN. Par celà, cette approche prend en compte la flexibilité du récepteur, qui n'est pas étudiée dans les structures figées cristallines. De plus, la possibilité que nous avons d'englober l'ensemble de la protéine dans une première approche fournit d'emblée un résultat inaccessible à d'autres techniques telles que la mutagenèse dirigée, mais ces différents approches restent totalement complémentaires.

APPENDICE TECHNIQUE

Milieux et tampons

- Milieu LB 5 x :

Bactotryptone	50 g
Bactoyeast	25 g
NaCl	50 g
NaOH 5 N	5 ml
H ₂ O qsp	1 l

autoclaver 30min à 120°C

- tampon PBS 10 x :

KH ₂ PO ₄ 2 g	15 mM
Na ₂ HPO ₄ 11,5 g	81 mM
KCl 2 g	27 mM
NaCl 80 g	1,37 M
H ₂ O qsp	1 l

- tampon TAE 50 x :

TRIS 242 g	
Na Acétate 136,1 g	2 M TRIS-Acétate
EDTA 37,2 g	50 mM
H ₂ O qsp	1 l

ajuster à pH 7,4 par de l'acide acétique glacial

Plasmides et souches bactériennes

Plasmides :

- pHK1 contient l'ADN complémentaire du hRAR α (fourni par R.M.Evans)
- pQE9 (Diagen) permet d'exprimer toute protéine sous forme fusionnée avec un segment de six histidines.
- pQE9-hRAR α contient l'ADN complémentaire du hRAR α inséré dans le vecteur pQE9.
- pF1-hRXR α (P. Lefebvre) contient l'ADN complémentaire du RXR inséré sous forme d'un fragment HindIII-BglIII dans le vecteur d'expression pF1 (Kodak) qui contient un épitope "Flag".

Souches :

- M15 ou SG13009 (Diagen) souches dérivées d'*Escherichia coli*. Ces souches sont transformées par le plasmide pQE9-hRAR α ; elles sont utilisées pour la surexpression de hRAR α . Elles contiennent le plasmide Rep4 qui est porteur d'un gène de résistance à la kanamycine et qui exprime le répresseur Lac, empêchant toute expression basale de RAR en absence d'inducteur IPTG.

- JM109 (Promega) souche dérivée de *E. coli*. Elle est utilisée pour la surexpression de F1-hRXX α .

Les souches bactériennes sont stockées à -20°C ou -80°C dans une aliquote de milieu LB contenant 30 % de glycérol.

Clonage du RAR dans le vecteur pQE9 par amplification par PCRMatériels et solutions :

- Enzymes : Taq DNA polymérase, T4-DNA ligase, BamHI, HindIII et leur tampon d'incubation

- Oligonucléotides : (sites de restriction en gras)

5'-**GCGGATCCGCCAGCAACAGCA**-3' contient le site BamHI

5'-**GCAAGCTTCCATGTGGCGTGG**-3' contient le site HindIII

Protocole :

L'ADN complémentaire du hRAR α a été amplifié par PCR sous forme d'un fragment BamHI-HindIII en présence du plasmide pHK1 et des deux oligonucléotides contenant les sites de restriction correspondants. L'amplification a été réalisée par 30 cycles de dénaturation 1min à 94°C, hybridation 1min à 58°C, élongation 2min à 72°C.

L'ADN obtenu par PCR, ainsi que le plasmide pQE9 sont digérés par BamHI et HindIII. Les deux fragments sont associés par la T4-DNA ligase à 15°C pendant la nuit. La mixture d'ADN sert à transformer les bactéries JM109. Les colonies positives sont sélectionnées par l'ampicilline sur boîte de Pétri. Les techniques employées sont identiques à celles mises en jeu pour la mutagenèse ponctuelle.

Culture bactérienne et extractionMatériels et solutions :

- Souche bactérienne SG13009 ou M15 (Diagen) transformées par le vecteur pQE9-RAR α

- Milieu LB avec antibiotiques : ampicilline (100 μ g/ml) et kanamycine (25 μ g/ml)

- Isopropyl- β -D-Thio galactoside (IPTG)
- Lysozyme
- DNase I ou homogénéiseur à ultra-sons
- $MgCl_2$ 1 M
- Tampon de lyse PN β :
 - PBS 2 x
 - NaCl 0,4 M
 - β -mercaptoéthanol 5 mM
 - H₂O qsp 50 ml pH 7,3

Culture :

1. Une pré-culture dans 50ml de milieu LB avec antibiotiques est inoculée par 100 μ l de bactéries. Laisser en agitation à 37°C pendant la nuit.
2. Une culture est réalisée dans 2 litres de milieu LB avec antibiotiques en agitation à 37°C, inoculée par la pré-culture. Lorsque sa densité optique à 600 nm atteint 0,7-0,9 la culture est induite (déréprimée) par 1 mM d'IPTG. Laisser en agitation pendant 3-4 heures.
3. La culture est centrifugée à 4000 rpm pendant 30 min. Le culot est repris dans 20 ml de tampon de lyse à 4°C.

Extraction :

4. Le mélange est incubé au moins 30 min à 4°C avec le lysozyme ajouté à 150 μ g/ml. Les cellules sont lysées par un cycle de congélation (-80°C) et décongélation (37°C avec agitation par vortex).
5. Le lysat est soumis à 5 cycles d'ultra-sons de chacun 5 secondes à une amplitude de 10%. Alternativement, le lysat peut être soumis à digestion par la DNase I (100 U/ml) en présence de $MgCl_2$ 10 mM.

Ces deux procédés permettent de supprimer la viscosité des échantillons avant l'étape de purification par affinité.

6. L'homogénat est centrifugé 30 min à 4°C à 15000 rpm ou plus.
7. Le surnageant est immédiatement purifié. Sinon il est ajusté à 20 % de glycérol et stocké à -80°C.

Purification par affinité

Matériels et solutions :

- Gel d'affinité NTA au nickel (Diagen) constitué de billes d'agarose greffées par des molécules d'acide Nitrilo-TriAcétique chélatrices des ions Ni^{2+}
- Corps de colonne à extrémité supérieure ouverte (1 cm x 10 cm)
- Tubes de 500 μl à faible adsorption
- Pompe péristaltique
- Tampons stocks :
 - PNGI-0 : PBS 2 x pH 7,3
NaCl 0,4 M
Glycérol 20 %
 - I-1000 : PBS 2 x pH 7,3
Imidazole 1 M
- Tampon de lavage PNGI-30 (30 mM d'imidazole) = 388 ml PNGI-0 + 12 ml I-1000
- Tampon d'élution PNGI-200 (200 mM d'imidazole) = 8 ml PNGI-0 + 2 ml I-1000

Protocole :

1. Travailler dans une pièce ou armoire réfrigérée à 4°C. 1 ml de gel NTA- Ni^{2+} , préalablement lavé par PNGI-0, est ajouté à 20 ml d'extrait bactérien contenant (His)₆-RAR, et laissé en agitation douce sur roue pendant 30 min.
2. Le mélange est décanté par gravité dans la colonne dont l'extrémité inférieure est connectée à la pompe péristaltique à l'arrêt (de cette façon aucun liquide ne s'écoule).
3. Lorsque le gel est visiblement compacté au bas de la colonne, la pompe est mise en route à basse vitesse (règlage 20-40) jusqu'à écoulement de l'extrait sans sécher le gel. La pompe est alors déconnectée de la colonne et la phase mobile peut s'écouler librement.
4. 10 ml de tampon PNGI-0 est déposé sur le gel.

5. Le gel est lavé par 400 ml de tampon PNGI-30 pendant la nuit. La colonne est alimentée par pompe péristaltique réglée à vitesse moyenne (réglage 150-300) pour compenser exactement son écoulement libre.

6. La colonne est désormais sortie à température ambiante, son extrémité inférieure étant bouchée. L'élution du récepteur est effectuée par fractions de 400 μ l de tampon PNGI-200. Chaque fraction est incubée au moins 2 min dans la colonne qui peut être vortexée régulièrement. Puis la fraction est recueillie par gravité dans les tube à faible absorption. L'élution est réalisée en 6-7 fractions. Chaque fraction est stockée telle quelle à -80°C .

Dosage des protéines

La concentration protéique des fractions purifiées est mesurée par le kit de dosage des protéines (Biorad), dont le principe est basé sur la technique de Bradford (1976).

Protocole :

5 à 10 μ l d'une fraction est dilué dans 800 μ l d'eau auquel sont ajoutés 200 μ l de solution de dosage (bleu de coomassie/méthanol/acide phosphorique). 5 à 30 min après agitation, la densité optique des échantillons est mesurée à 595 nm.

La concentration est mesurée d'après une gamme étalon en ovalbumine.

Electrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide/SDS (SDS-PAGE)

Solutions et matériels :

- plaques de verre 15 x 15 cm; espaceurs 1,5 mm; peigne à 10 dents.
- solution d'acrylamide/bis-acrylamide (29:1) à 40 %
- tampon de dépôt des échantillons (2 x) pH 6,8 :

TRIS	1,52 g
glycérol	20 ml
SDS	2 g
β -mercaptoéthanol	2 ml
bleu de bromophénol	1 mg
H ₂ O	qsp 100 ml

Protocole :

Remarque : Le gel et les plaques doivent être coulé et manipulés avec des gants.

1. Fixer le gel 60 min dans 40 % méthanol/10 % acide acétique, puis fixer pendant 30 min dans 10 % éthanol/5 % acide acétique.
2. Tremper le gel 10 min dans le réactif d'oxydation dilué.
3. Laver le gel dans l'eau distillée jusqu'à ce que toute coloration ait disparu (observer la tranche du gel).
4. Tremper le gel 30 min dans le réactif au nitrate d'argent dilué.
5. Laver le gel 1min dans l'eau distillée.
6. Ajouter la solution de développement, la remplacer à chaque apparition de précipité.
7. Arrêter la révélation par 5 % d'acide acétique.

Coloration au bleu de coomassieMatériels :

- bleu brillant de coomassie R-250 (Sigma)
- Colorant :

Bleu de coomassie	0,5 g
méthanol	90 ml
H ₂ O	90 ml
acide acétique glacial	20 ml
- Solution de décoloration : Colorant sans bleu de coomassie.

Protocole :

1. Tremper le gel 30 min dans le colorant.
2. Tremper le gel dans le décolorant, changé régulièrement jusqu'à décoloration.

Coloration réversible au KCl/DTT

1. Tremper le gel 30min dans 250 mM KCl/1 mM DTT à 4°C.
2. Le gel placé sur une plaque de verre est observé éclairé en lumière rasante sur fond noir.
3. La coloration est réversible dans l'eau.

Western blot

Matériels :

- feuille de nitrocellulose
- papier Whatman 3MM
- Solution de rouge Ponceau : 0,2 % rouge ponceau / 3 % acide acétique
- PBS 1 x
- Lait écrémé en poudre
- H₂O₂ (Sigma)
- Tampon de transfert :

TRIS	14,6 g	
glycine	69,1 g	
méthanol	1,2 l	
H ₂ O	qsp	6 l (devrait être à pH 8,3)
- Tampon de blocage : lait en poudre 1 % / PBS 1 x
- Solution CNM :

4-chloro,1-Naphtol	50 mg	(préparer extemporanément et
méthanol	17 ml	mélanger dans cet ordre)
PBS 1 x	qsp	100 ml
H ₂ O ₂	100 µl	
- anticorps : R α 10 : anticorps monoclonal de souris dirigé contre le domaine F du hRAR α
(Affinity Bioreagent)
IgG anti souris couplé à la peroxydase (HPRO)

Protocole :

1. Les échantillons sont séparés par électrophorèse en SDS-PAGE (voir protocole d'électrophorèse SDS-PAGE). Puis le gel démoulé est placé sur une feuille de papier Whatman imbibée du tampon de transfert.
2. Une feuille de nitrocellulose, préalablement humidifiée dans le tampon de transfert, est placée sur le gel.
3. Une deuxième feuille de papier Whatman humidifiée est placée par dessus la nitrocellulose. Enlever toute bulle d'air entre les couches.
4. Placer l'ensemble dans l'appareil de transfert (Biorad) de telle sorte que la nitrocellulose soit orientée du côté de l'électrode positive.
5. Appliquer 60 volts pendant 3-5 h pour un gel de 1,5 mm d'épaisseur, ou 1 h pour un minigel.

6. Colorer la nitrocellulose au rouge ponceau pendant quelques minutes, décolorer dans l'eau. Cette coloration des protéines révèle l'efficacité de transfert.
7. Incuber la membrane dans le tampon de blocage pendant 2 h à température ambiante.
8. Laver 3 fois 10min dans le PBS 1 x.
9. Incuber 1h avec l'anticorps R α 10 dilué au 1/5000e dans le tampon de blocage.
10. Laver 2 fois 10 min dans le PBS 1 x.
11. Incuber 1 h avec le second anticorps (anti souris couplé à la peroxydase) dilué 1/1000e dans le tampon de blocage.
12. Laver 2 fois 10 min dans le PBS 1 x.
13. Incuber la membrane dans la solution CNM jusqu'à apparition des spots.
- 13bis. La sensibilité de détection peut être accrue par la membrane de détection colorimétrique IBI Enzygraphic Web (Kodak). Pour cela :
 - a. Sècher la membrane de nitrocellulose entre deux feuilles de papier Whatman.
 - b. Appliquer la membrane de détection IBI en évitant la formation de bulles.
14. Prendre une photo sans délai.

Modifications chimiques spécifiques d'acides-amino

Toutes les modifications sont faites sur le même principe : les concentrations en réactifs spécifiques utilisés sont calculées par rapport au nombre de picomoles d'acides-amino cibles présentes dans la fraction de RAR purifié. Ce nombre de picomoles est calculé sachant que le (His)₆-RAR contient 18 Cys, 25 Arg, 27 Lys, 13 His, 10 Tyr et 1 Trp. Les quantités de réactifs spécifiques sont ajustées en excès de 2, 4, 20 et 40 fois par rapport à chaque acide-amino cible. On a ainsi le rapport :

$$(\text{pmol de réactif spécifique})/(\text{pmol d'acide-amino cible}) = 2; 4; 20 \text{ ou } 40$$

Les concentrations en réactifs utilisées sont de l'ordre de 12 μ M à 12 mM.

Pour la modification chimique du RAR par le DEPC, le récepteur est déssalé avant traitement (voir protocole suivant de "déssalage du RAR").

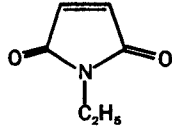
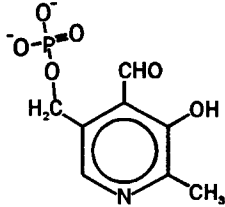
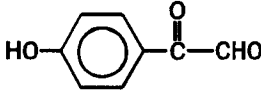
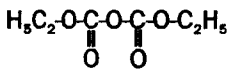
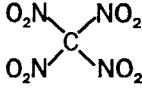
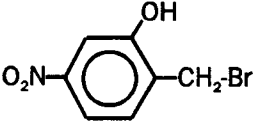
TYPES D'AA's	NOMBRE D'AA's DU (His) ₆ -HRAR α	TYPE DE REACTIF CHIMIQUE SPECIFIQUE	FORMULE
Cys	18	N-éthyl-maléimide NEM	
Lys	27	Pyridoxal-5'-Phosphate Pyr P	
Arg	25	p-hydroxy-phénylgyoxal HPG	
His	13	Diéthylpyrocarbonate DEPC	
Tyr	10	Tétranitrométhane TNM	
Trp	1	Bromure de 2-hydroxy-5-nitrobenzyle HNB-Br	

Figure 36 : Les différents réactifs spécifiques d'amino-acides employés.

Réactifs chimiques :spécificité :

NEM	N-éthyl-maléimide (Pierce)	Cys	
HPG	p-hydroxyphénylglyoxal (Pierce)	Arg	(très sensible à la lumière)
PyrP	phosphate de pyridoxal (Merck)	Lys	(sensible à la lumière)
DEPC	diéthylpyrocarbonate (Sigma)	His	(volatil et allergisant)
TNM	tétranitrométhane (Aldrich)	Tyr	(cancerogène et explosif)
HNB-Br	bromure de 2-hydroxy- 5-nitrobenzyle (Sigma)	Trp	

(voir également figure 36)

Protocole (exemple : modification des cystéines) :

1. La NEM est solubilisée à 2 M dans l'éthanol absolu. La solution est diluée par entraînement dans l'eau puis l'éthanol à 1 % pour obtenir des solutions de réactif 5 x dans les quatre rapports molaires.
2. 150 pmoles (14 μ l à 0,5 mg/ml) de (His)₆-RAR purifié par affinité sont incubées pendant 1 h dans le thermobloc PCR à 12°C, dans 20 mM de TRIS-HCl pH 7,4 en présence de 5 μ l de NEM 5 x dans les quatre rapports de concentration ou en présence d'éthanol 1 % (5 x), dans un volume total de 25 μ l.
3. La réaction est arrêtée par 20 mM de β -mercaptoéthanol.

Modifications par l'ensemble des réactifs :

Cible	Réactif	Solvant	Tampon de réaction	Temps	Arrêt de réaction
Cys	NEM	éthanol	TRIS 20 mM pH 7,4	1 h	β -mercaptoéthanol 20 mM
Arg	HPG	éthanol	TRIS 20 mM pH 8,2	2 h	arginine 20 mM
Lys	PyrP	eau	HEPES 20 mM pH 6,8	50 min	glycine 20 mM et borohydrure 5 mM
His	DEPC	éthanol	Phosphate 50 mM pH6,9	2 h	imidazole 20 mM
Tyr	TNM	éthanol	TRIS 20 mM pH 7,9	2 h	20 mM DTT/TRIS pH 8,5
Trp	HNB-Br	acétone	TRIS 20 mM pH 7,0	2 h	tryptophane 20 mM

Modifications par des réactifs radiomarqués :

- [³H]-formaldéhyde, 51 mCi/mmol 0,3 M (Dupont NEN)
- [³H]-N-éthylmaléimide, 56 Ci/mmol (Dupont NEN)

Le formaldéhyde tritié et la NEM tritiée sont employés dans les mêmes conditions que PyrP et NEM, pour le marquage spécifique des Lysines et cystéines respectivement. Le formaldéhyde tritié est employé à la même concentration que le réactif froid. Le marquage des cystéines est fait par dilution isotopique en ajoutant au réactif froid 10 μ l de NEM tritiée.

Déssalage du RAR purifié avant traitement au DEPC

Le DEPC, réactif spécifique des histidines, est également très actif sur l'imidazole qui est précisément employé pour l'éluion du RAR purifié par affinité. Pour éviter que les modifications chimiques du RAR par le DEPC soient inhibées par de fortes concentrations en imidazole (200 mM), le récepteur est déssalé avant traitement au DEPC.

Matériels et solutions :

- Colonne Chromaspin-10 (Clontech)
- tampon PNGI-0 (utilisé pour la purification du RAR)

Protocole :

1. La colonne est équilibrée dans trois volumes de PNGI-0. Laisser décanter par gravité.
2. 400 μ l de fraction purifiée de RAR (dans le tampon PNGI-200) sont déposés sur la colonne, et décantés.
3. La colonne est lavée par PNGI-0; l'éluat est collecté par fractions de trois gouttes (100 à 150 μ l).
4. Les fractions sont sélectionnées après dosage des protéines et mesure de la présence ou non d'imidazole au spectrophotomètre à 210 nm. En général, les fractions 2 à 4 sont rassemblées afin d'être traitées au DEPC.

Radiomarquage - Sondes oligonucléotidiques

Oligonucléotides (Eurogentec). Les séquences spécifiques de reconnaissance sont indiquées en gras.

Un RARE de type DR-5 issu du promoteur P2 du gène hRAR β 2 (de Thé et al., 1990) :

5'-GATCGGGTAGGGTTCACCGAAAGTTCAAATGC-3'

Un demi-site consensus :

5'-AGCTAGGAGGTCAAATGC-3'

Les oligonucléotides complémentaires simple brin (brin codant représenté) sont hybridés à la concentration de 2 μM dans TRIS 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM pH 8 pendant 10 min à 90°C puis refroidis très lentement.

Radiomarquage

Matériels :

- γ [³²P]-ATP, 3000 Ci/mmol (Dupont-NEN)
- T4-Polynucléotide kinase, 10 U/ μl (Promega), fournie avec son tampon d'incubation 10 x
- colonne Chromaspin-10 (Clontech)

Protocole :

1. Mélanger : 2 μl oligonucléotide double brin (4 pmol)
 - 3 μl γ [³²P]-ATP (6 pmol)
 - 2 μl tampon d'incubation 10 x
 - 11,5 μl eau (qsp 20 μl)
 - 2 μl T4-Polynucléotide kinase (20 U)

Incuber 30 min à 37°C.

2. L'ADN marqué est déssalé à travers la colonne Chromaspin-10 selon les instructions du fabricant :
 - a. La colonne est centrifugée à vide 2 min à 700 g (1800 rpm).
 - b. La solution marquée est ajustée à 40 μl par de l'eau et déposée sur la colonne.
 - c. La colonne est centrifugée 6 min à 700 g.
 - d. Le liquide collecté est ajusté à 150 μl final, il est alors prêt à l'usage.

Retard sur gel

Les complexes de protéines liées à l'ADN sont séparés de l'ADN libre par électrophorèse en gel de polyacrylamide non-dénaturant.

matériels :

- solution d'acrylamide / bis-acrylamide (29:1) à 40 %

- Sonde oligonucléotidique radiomarquée
- RAR purifié par affinité; RXR issu d'extrait brut ou semi-purifié
- Sérum albumine bovine (BSA) 10 mg/ml
- ADN de sperme de saumon 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (ADNss)
- Tampon d'incubation (10 x) :

HEPES	200 mM pH 7,4
NaCl	800 mM
EDTA	10 mM
glycérol	30 %

Protocole :

1. Trois conditions de liaison des récepteurs à l'ADN sont testées après modification chimique spécifique d'acides-amino du RAR :

	RAR-RXR / DR5	RAR-RAR / DR5	RAR / demi-site
RAR (après modification)	1 μl (3 pmol)	3 μl (9 pmol)	4 μl (12 pmol)
RXR	3 μl	-	-
tampon d'incubation 10 x	2 μl	2 μl	2 μl
BSA (10 mg/ml)	-	2,5 μl	2,5 μl
ADNss (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1 μl	1 μl (dilué 1/10e)	-
H ₂ O qsp 18,5 μl	11,5 μl	10 μl	10 μl
20 min à 4°C			
sonde [³² -P]-DR5	1,5 μl	1,5 μl	-
sonde [³² -P]-demi-site	-	-	1,5 μl
15 min à 4°C			

1'. Pour la caractérisation des complexes, ajouter l'un ou l'autre des composés:

- 1 μl sonde froide (2 pmol/ μl) avec la sonde radiomarquée.
- 10 μl d'anticorps anti-RAR (IS47) ou anti-RXR après formation des complexes.

2. Un gel d'acrylamide (A/BA) à 5 % en tampon TAE 0,5 x/0,25 x (voir p.77) est coulé entre deux plaques de verre placées verticalement :

	0,5 x	0,25 x
A/BA 40 %	2,4 ml	2,4 ml
TAE 10 x	1 ml	0,5 ml
H ₂ O qsp	20 ml	20 ml
TEMED	20 μl	20 μl
PSA 10 %	150 μl	150 μl

3. Les complexes sont séparés par électrophorèse à température ambiante à 150 V pendant 2 à 3 heures.

4. Le gel est séché sous vide. Les complexes sont révélés par autoradiographie contre un film Kodak X-Omat à -80°C pendant 2 h, avant développement.

Transcription/traduction des protéines in-vitro

La production de récepteurs radiomarqués est effectuée par le kit "TnT" (Promega) qui permet de coupler transcription et traduction. Le protocole suit les instructions du fabricant.

Matériels :

- Plasmides d'expression des récepteurs : Δ 10Fx pour cPR-B (H. Gronemeyer)
T3.1118 pour rGR (K.R. Yamamoto)
SG5-hRXR α (U. Reichert)
SG5-hVDR (J.W.Pike)
SG5-hRAR α (R.M. Evans)
- Kit "TnT" (Promega)
- [35S]-Méthionine (NEN-Dupont; 800-1000 Ci/mmol)
- H₂O traitée au DEPC

Protocole :

1. mélanger :

	RAR, RXR, PR, VDR	GR
Lysat de Réticulocyte de lapin	12,5 μ l	12,5 μ l
Tampon TnT	1 μ l	1 μ l
T7-ARN polymérase	0,6 μ l	-
SP6-ARN-Polymérase	-	0,5 μ l
Amino-acides sans méthionine	0,5 μ l	0,5 μ l
[35S]-Méthionine	2 μ l	2 μ l
plasmide	(1 μ g)	(1 μ g)
H ₂ O traitée au DEPC	(qsp 25 μ l)	(qsp 25 μ l)

2. Incuber 1 h 30 à 30°C puis éventuellement stocker à -80°C avec 10 % glycérol.

3. L'efficacité de traduction est testée par précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA) :

- a. 1 μl de produit de traduction est mélangé à 50 μl de TCA 12 % à 4°C et laissé 30 min sur la glace.
- b. Le tout est centrifugé à 15000 rpm pendant 15 min.
- c. La radioactivité du culot est comptée par scintillation liquide.

Pontages chimiques des protéines "Cross-linking"

Matériels :

- Tampon d'incubation 10 x (voir protocole de retard sur gel)
- Sonde oligonucléotidique non-radiomarquée type DR5 (0,02 pmol/ μl)
- [35S]-RXR traduit in vitro par le kit TnT
- RAR purifié par affinité
- DSS : Disuccinimidyl-subérate (Pierce). Une solution stock de DSS à 40 mM est faite dans le DMSO.
- "Amplify" (Amersham)

Protocole :

1. Mélanger : 1 μl RAR (0,28 mg/ml après modification chimique d'acides-amino)
 - 2,5 μl [35S]-RXR
 - 4 μl Tampon de liaison 10 x
 - 1,5 μl oligonucléotide non-marqué
 - H₂O qsp 40 μl

Incuber 20 à 30 min à 4°C.

2. Ajouter 1 μl de solution stock de DSS (1 mM final). Incuber 1 h à 4°C.
3. Déposer les échantillons sur un gel SDS-PAGE à 8 %.
4. Après électrophorèse à 35 mA pendant 3 h, le gel est démoulé, traité dans l'Amplify selon les instructions du fabricant :
 - a. tremper pendant 30 min dans le fixateur : isopropanol/H₂O/acide acétique (25:65:10).
 - b. tremper dans l'Amplify pendant 15-30 min.
 - c. sécher le gel et placer en autoradiographie à -80°C pendant une nuit.

Test de liaison du RXR en phase solide

Ce test est utilisé dans le but d'analyser et quantifier les interactions entre protéines en absence de toute liaison à l'ADN. Protocole adapté d'après Kurokawa et al. (1993).

Matériels et solutions :

- Plaque à 96 puits traitée pour la culture de tissus (Corning)
- RAR purifié par affinité
- Récepteurs radiomarqués au ^{35}S traduits in-vitro : RXR, RAR, VDR, PR-B, GR.
- PBS 1 x
- Sérum de veau foetal (Gibco)
- Tampon de liaison :
 - HEPES 20 mM pH 7,8
 - KCl 130 mM
 - EDTA 1 mM
 - β -mercaptoéthanol 1 mM
 - Nonidet-P40 0,05 % (P/V)
 - glycérol 20 %

Protocole :

1. Le RAR est dilué à 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans du PBS 1 x. 25 μl sont déposés par puits sur la plaque à 96 puits, et laissés adsorber pendant 12 à 16 heures à 4°C.
2. Les puits sont lavés 3 fois par 50-100 μl PBS 1 x.
3. La surface des puits est saturée pendant 3 h à 4°C par 80 μl d'une solution à 5 % de sérum de veau foetal dilué dans PBS 1 x.
4. Les puits sont lavés 3 fois par 50-100 μl PBS 1 x.
5. 10⁶ cpm de [^{35}S]-RXR, dans un volume de 30 μl de tampon de liaison, est déposé par puits et incubé 90 min à 4°C. Remarque : Pour comparer les récepteurs entre eux (figure 25B), les quantités de récepteurs mises en jeu doivent être ajustées en tenant compte du nombre de [^{35}S]méthionines par récepteur.
6. Le [^{35}S]-RXR non-lié est soumis à 4 lavages rapides par 50 μl de tampon de liaison.
7. Le récepteur spécifiquement adsorbé est resolubilisé pendant 10 min dans 50 μl de la solution SDS 0,1 %/HCl 0,4 M. La radioactivité est comptée en scintillation liquide.

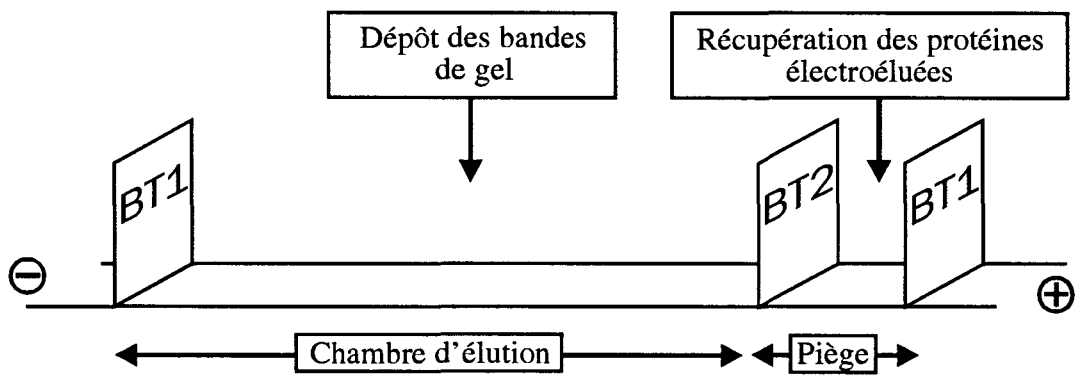


Figure 37 : Représentation schématique de l'appareil à électroélution (Schleicher et Schuell)

Electroélution

Matériels et solutions:

- Appareil à électroélution "Biotrap" (Schleicher & Schuell)
- 2 membranes BT1 (filtre spécifique pour toutes molécules chargées supérieures à 5 kDa)
- 1 membrane BT2 (filtre 0,22 μ)
- tampon : TRIS/glycine/SDS (tampon de SDS-PAGE)

Protocole :

1. Les échantillons sont séparés par SDS-PAGE.
2. Le gel est coloré au mélange KCl/DTT (voir protocole de coloration). La bande de protéine à électroéluer est découpée et placée dans l'appareil dans le compartiment central en amont du piège (voir figure 37).
3. Appliquer un courant de 150 V pendant la nuit ou 200 V pendant 3 à 5 h.
4. Inverser la polarité du courant pendant 20 sec.
5. Récupérer la solution du piège (400-500 μ l).

Séparation des protéines et peptides par HPLC

La séparation des peptides et protéines est effectuée par chromatographie liquide haute pression en phase inverse (RP-HPLC). La technique met en jeu des interactions hydrophobes entre le matériel protéique et les chaînes hydrophobes à 4, 8 ou 18 carbones (C4, C8, C18) greffées sur les billes de silice des colonnes. Avec des concentrations croissantes d'acétonitrile, les espèces les plus polaires sont éluées avant les espèces plus hydrophobes.

Matériels et solutions :

- Appareillage d'HPLC (Waters 625 LC)
- colonnes pour RP-HPLC : Nucleosil C4 5 μ 300 A 250 x 4,6 mm (Interchrom)
Delta-Pak C18 15 μ 300 A 300 x 7,8 mm (Waters)
- Acétonitrile (Scharlau)
- acide trifluoroacétique (TFA), acide formique
- Tampons de gradient d'élution : A=0,1 % TFA
B=80 % CH₃CN / 0,085 % TFA

Le tampon A est filtré sur filtre de porosité 0,45 μm et dégazé sous vide, le tampon B est seulement dégazé sous vide.

Protocole :

1. Les échantillons sont repris dans 50 μl d'acide formique à 60 % et centrifugés à 15000 rpm pendant 10 secondes.
2. Les surnageants sont injectés dans la colonne préalablement équilibrée dans le tampon A, et ils sont séparés par gradient de tampon B, avec un débit de 2ml/min (C18) pendant 90min, ou un débit de 1 ml/min (C4) pendant 70 min.
3. Les produits élués sont collectés par fractions de 30 sec. Les pics sont mesurés à 220 nm avec une sensibilité de 0,250 AUFS (atténuation de 256 et vitesse du papier enregistreur de 0,25 cm/min).
4. La radioactivité présente dans chaque fraction est mesurée par comptage en scintillation liquide.

Clivages chimiques et enzymatiques des protéines

Matériels :

- RAR purifié à homogénéité par électroélution ou par RP-HPLC sur colonne de type C4
- acide formique
- BrCN (Sigma) solution stock à 1 g/ml dans 70 % d'acide formique
- Trypsine "sequencing grade" (Boehringer)
- Endoprotéinase LysC (Boehringer)
- tampons d'incubation : NH_4HCO_3 0,1 M pH 8,4 pour la trypsine
TRIS 25 mM/EDTA 1 mM pH 8,6 pour endoprotéinase LysC

Clivage au BrCN :

1. La fraction de RAR est séchée par centrifugation sous vide sans chauffage et reprise dans 100 μl d'acide formique 70%.
2. Le BrCN est ajouté à la concentration finale de 100 mg/ml. (Attention : très toxique)
3. Le mélange est incubé à température ambiante pendant la nuit.

4. La solution est séchée deux fois par centrifugation sous vide et reprise dans l'eau afin d'évaporer l'acide formique et l'excès de BrCN.

Digestion à la trypsine :

Remarque : Le matériel protéique à cliver est quantifié sur mini-gel en SDS-PAGE par comparaison avec une gamme d'ovalbumine après coloration au bleu de Coomassie.

1. Le RAR séché au speed vac est repris dans 150 μl de tampon NH_4HCO_3 pH 8,4. 7 μl d'acétonitrile permettent d'optimiser la digestion.

2. Une aliquote de trypsine (solution stock à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) est ajoutée pour obtenir un rapport enzyme/récepteur (E/S) de 1/50 ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$), et incubée à 30°C pendant 2 h.

3. Le même volume de trypsine est ajouté (E/S final = 1/25), et incubé à 30°C pendant la nuit.

Digestion à l'endoprotéinase Arg-C :

1. Le RAR séché est repris dans le tampon NH_4HCO_3 pH 7,9.

2. L'endoprotéinase Arg-C (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) est ajoutée deux fois comme pour la trypsine dans des rapports successifs E/S = 1/200 (E/S final = 1/100), sans dépasser 4 heures à 37°C.

Mutagenèse dirigée

Des récepteurs RAR où les lysines 360 et 365 sont changées en thréonines, et la valine 361 changée en glycine, ont été créés par mutagenèse dirigée. Cette technique procède par amplification par PCR de l'ADN complémentaire du RAR en présence de deux oligonucléotides complémentaires du récepteur. La séquence de l'un des deux possède une base mutée qui remplace un amino-acide par un autre. Un site de restriction (XhoI) est présent dans l'oligonucléotide pour la sélection ultérieure (voir figure 38).

Matériels et solutions :

- kit de mutagenèse dirigée (Stratagène)
- plasmide pQE9-RAR
- oligonucléotides : (bases mutées en gras, les C en 5' permettent de former un site XhoI sans modifier l' amino-acide correspondant)



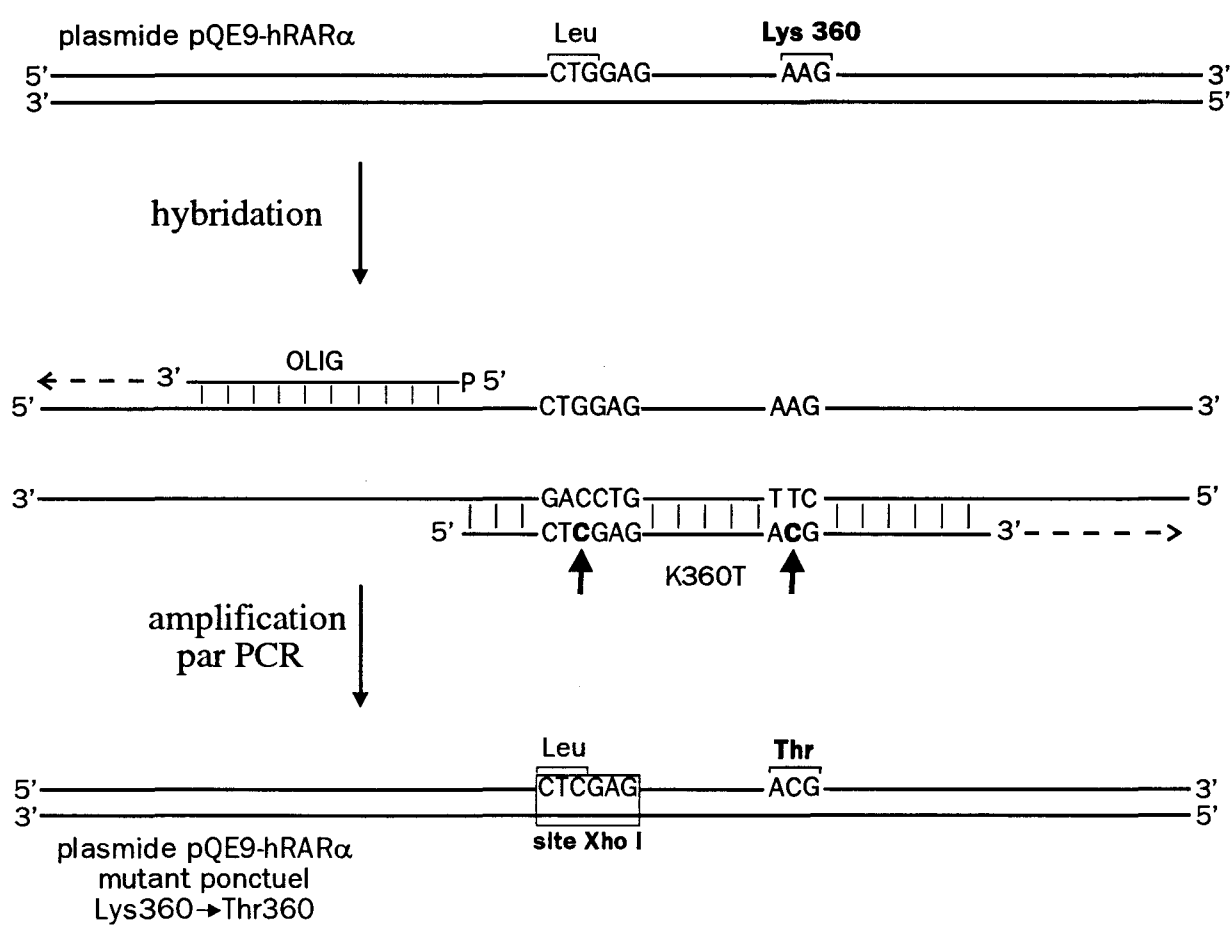


Figure 38 : Principe de la mutagenèse dirigée. Exemple du mutant Lys360/Thr. Les oligonucléotides sont hybridés au plasmide sauf en deux points à l'origine d'une mutation silencieuse Leu/Leu et de la mutation Lys/Thr (flèches).

K360T : 5'-CCGCTGCTCGAGGCGCTAACGGTCTACGTGCG-3'

V361G : 5'-CCGCTGCTCGAGGCGCTAAAGGGCTACGTGCG-3'

K365T : 5'-CCGCTGCTCGAGGCGCTAAAGGTCTACGTGCGGACGCGGAGG-3'

OLIG : 5'-CTCCTGCAGCATGTCCACCCGGTCCGGCTGCTCC-3'

Protocoles : (les étapes du protocole sont effectuées selon les instructions du fabricant)

1) Phosphorylation de OLIG :

20 μg de OLIG sont phosphorylés selon le protocole de marquage des oligonucléotides dans 40 μl de réaction en présence d'ATP froid.

2) PCR :

1. Mélanger : 1 μl pQE9-hRAR α (0,5 pmol)

2,5 μl tampon de mutagenèse 10 x

1 μl dNTPs 25 mM

15 pmol d'oligonucléotide OLIG phosphorylé

15 pmol d'oligonucléotide muté

0,5 μl Taq DNA polymérase 5 U/ μl

0,5 μl Taq extender PCR additive 5 U/ μl

2. Incuber pendant 11 cycles de dénaturation à 94°C, hybridation à 58 ou 62°C, élongation à 72°C, avec des pentes de température de 0,1°C par seconde.

3. Incuber 30 min à 37°C en présence de 0,5 μl DnpI et 0,5 μl Pfu DNA polymérase.

4. Dénaturer les enzymes 30 min à 72°C avant l'étape de ligation.

5. Analyser sur gel d'agarose 1 %/TAE 0,5 x.

3) Ligation :

1. Mélanger : 8 μl de produit de PCR traité DnpI et pfu DNA pol.

1 μl tampon de mutagenèse

0,5 μl rATP 10 mM

1 μl T4-DNA ligase

2. Incuber à 15°C pendant la nuit, ou à 37°C pendant 1 h.

4) Transformation :

1. Mélanger : 8 μl de produit de ligation

80 μl de bactéries XL1-Blue compétentes

laisser dans un tube eppendorf stérile 30 min à 4°C

2. Incuber 45 secondes exactement à 42°C, puis 2 min à 4°C
3. Ajouter 800 μ l de milieu LB et incuber 1 h à 37°C
4. Etaler sur boîtes de Pétri contenant du milieu LB avec ampicilline.

5) Minipréparation d'ADN :

Un kit de préparation d'ADN plasmidique QIAGEN (DIAGEN) est utilisé avec quelques modifications :

1. Chaque colonie est prélevée et cultivée dans 15 ml de milieu LB avec ampicilline pendant une nuit.
2. les cultures sont centrifugées 15 min à 3500 rpm, les culots sont repris dans 200 μ l de tampon TRIS 10 mM/EDTA 1 mM/RNase 100 μ g/ml à 4°C.
3. 200 μ l de tampon NaOH 0,2 N / SDS 1 % sont ajoutés; les bactéries sont lysées dans ce mélange 2 min à température ambiante.
4. 200 μ l de tampon acétate de potassium 1,3 M pH 5,5 est ajouté, mélangé et laissé 15 min à 4°C. Le mélange est ensuite centrifugé 15 min à 15000 rpm.
5. Les 600 μ l de surnageant sont mélangés avec un volume de phénol/chloroforme (1:1) et centrifugés 3 min à 15000 rpm.
6. La phase supérieure est extraite et mélangée avec 2 volumes d'éthanol absolu, puis incubé à -80°C 10 min. L'ensemble est ensuite centrifugé 15 min à 15000 rpm.
7. Le culot est repris dans 500 μ l de TRIS 10 mM/EDTA 1 mM pH 8. 250 μ l de solution de PEG 30 %/NaCl 1,6 M sont ajoutés, et le mélange est incubé 1 h à 4°C. L'ensemble est ensuite centrifugé 15 min à 15000 rpm.
8. Le culot est lavé par 150 μ l d'éthanol absolu, puis séché par centrifugation sous vide et repris dans 20 μ l de TRIS 10 mM/EDTA 1 mM pH 8.
9. L'ADN plasmidique obtenu à partir de chaque colonie est analysé par digestion par l'enzyme de restriction XhoI pendant 1h à 37°C.
10. L'ADN plasmidique correspondant au clone recherché peut être préparé en quantité plus importante à partir de l'aliquote conservée à l'étape 2. Pour cela, le kit de préparation d'ADN plasmidique QIAGEN est utilisé selon les instructions du fabricant (DIAGEN).

Références bibliographiques

- Apfel, C., Bauer, F., Crettaz, M., Forni, L., Kamber, M., Kaufmann, F., LeMotte, P., Pirson, W., and Klaus, M. (1992). A Retinoic Acid Receptor-alpha Antagonist Selectively Counteracts Retinoic Acid Effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *89*, 7129-7133.
- Arbuckle, N.D. and Luisi, B. (1995). A recipe for specificity. *Nature Struct. Biology.* *2*, 341-346.
- Aufliegner, M., Helmer, E., Casanova, J., Raaka, B.M., and Samuels, H.H. (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.
- Barettino, D., Bugge, T.H., Bartunek, P., Ruiz, M.D.M.V., Sonntagbuck, V., Beug, H., Zenke, M., and Stunnenberg, H.G. (1993). Unliganded T3R, but not its oncogenic variant, v-erb A, suppresses RAR-dependent transactivation by titrating out RXR. *EMBO J.* *12*, 1343-1354.
- Barettino, D., Ruiz, M.D.M.V., and Stunnenberg, H.G. (1994). Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. *EMBO J.* *13*, 3039-3049.
- Benbrook, D., Lenhardt, E., and Pfahl, M. (1988). A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma. *Nature* *333*, 669-671.
- Berg, J.M. (1988). Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor IIIA and related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *85*, 99-102.
- Blaner, W.S. and Olson, J.A. (1994). Retinol and retinoic acid metabolism. in : *Retinoids: Biology, chemistry* (Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S., editors) 229-255.
- Blicq, S., Danze, P.M., Dumur, V., Formstecher, P., and Dautrevaux, M. (1988). Inhibition of glucocorticoid receptor transformation, subunit dissociation and temperature-dependent inactivation by various N-substituted alkyl-maleimides. *Biochemistry* *27*, 8436-8442.
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* *375*, 377-382.
- Brand, N., Petkovich, M., Krust, A., Chambon, P., de The, H., Marchio, A., Tiollais, P., and Dejean, A. (1988). Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature* *332*, 850-853.

- Breitman, T.R., Selonick, S.E., and Collins, S.J. (1980). Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 2936-2940.
- Buck, J., Derguini, F., Levi, E., Nakanishi, K., and Hammerling, U. (1991). Intracellular signaling by 14-hydroxy-4, 14-retro-retinol. *Science* 254, 1654-1657.
- Burollaud, T., Danze, P.M., Tbarka, N., Formstecher, P., and Dautrevaux, M. (1993). Binding of RU486 and deacylcortivazol to the glucocorticoid receptor is insensitive to Sulfhydryl- Modifying agents. *J. Ster. Biochem. Molec. Biol.* 44, 217-225.
- Carlstedt-Duke, J., Stromstedt, P.-E., Persson, B., Cederlund, E., Gustafsson, J.A., and Jornvall, H. (1988). Identification of hormone-interacting amino-acid residues within the steroid-binding domain of the glucocorticoid receptor in relation to other steroid hormone receptors. *J. Biol. Chem.* 263, 6842-6846.
- Carter, M.E., Gulick, T., Moore, D.D., and Kelly, D.P. (1994). A pleiotropic element in the medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene promoter mediates transcriptional regulation by multiple nuclear receptor transcription factors and defines novel receptor-DNA binding motifs. *Mol. Cell Biol.* 14, 4360-4372.
- Chai, X., Boerman, M.H., Zhai, Y., and Napoli, J.L. (1995). Cloning of a cDNA for liver microsomal retinol dehydrogenase. A tissue-specific, short-chain alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 270, 3900-3904.
- Chen, J.D. and Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454-457.
- Chen, J.Y., Penco, S., Ostrowski, J., Balaguer, P., Pons, M., Starrett, J.E., Reczek, P., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1995). RAR-specific agonist/antagonists which dissociate transactivation and AP1 transrepression inhibit anchorage-independent cell proliferation. *EMBO J.* 14, 1187-1197.
- Cheng, S.Y., Ransom, S.C., Mcphie, P., Bhat, M.K., Mixson, A.J., and Weintraub, B.D. (1994). Analysis of the binding of 3,3',5-Triiodo-L-thyronine and its analogues to mutant human beta 1 thyroid hormone receptors - a model of the hormone binding site. *Biochemistry* 33, 4319-4326.
- Cheskis, B. and Freedman, L.P. (1994). Ligand modulates the conversion of DNA-Bound vitamin D-3 receptor (VDR) homodimers into VDR-Retinoid X receptor heterodimers. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3329-3338.
- Cooney, A.J., Leng, X.H., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W., and Tsai, M.J. (1993). Multiple Mechanisms of Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor-Dependent Repression of Transactivation by the Vitamin-D, Thyroid Hormone, and Retinoic Acid Receptors. *J. Biol. Chem.* 268, 4152-4160.

- Dahlman-Wright, K., Wright, A., Gustafsson, J.Å., and Carlstedt-Duke, J. (1991). Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J. Biol. Chem.* *266*, 3107-3112.
- Dallery, N., Sablonniere, B., Grillier, I., Formstecher, P., and Dautrevaux, M. (1993). Purification and functional characterization of the Ligand-Binding domain from the retinoic acid receptor alpha - evidence that sulfhydryl groups are involved in Ligand- Receptor interactions. *Biochemistry* *32*, 12428-12436.
- Dalman, F.C., Koenig, R.J., Perdew, G.H., Massa, E., and Pratt, W.B. (1990). In contrast to the glucocorticoid receptor, the thyroid hormone receptor is translated in the DNA binding state and is not associated with hsp90. *J. Biol. Chem.* *265*, 3615-3618.
- Damm, K., Heyman, R.A., Umesono, K., and Evans, R.M. (1993). Functional inhibition of retinoic acid response by dominant negative retinoic acid receptor mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *90*, 2989-2993.
- Danielsen, M., Hinck, L., and Ringold, G.M. (1989). Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor. *Cell* *57*, 1131-1138.
- Davis, K.D. and Lazar, M.A. (1992). Selective Antagonism of Thyroid Hormone Action by Retinoic Acid. *J. Biol. Chem.* *267*, 3185-3189.
- De Leenheer, A.P., Lambert, W.E., and Claeys, I. (1982). All-trans-retinoic acid: measurement of reference values in human serum by high performance liquid chromatography. *J. Lipid Res.* *23*, 1362-1367.
- de The, H., Marchio, A., Tiollais, P., and Dejean, A. (1987). A novel steroid thyroid hormone receptor-related gene inappropriately expressed in human hepatocellular carcinoma. *Nature* *330*, 667-670.
- Degos, L. (1993). All trans retinoic acid as a targeting drug for differentiation therapy in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Treat. Res.* *64*, 1-13.
- Delescluse, C., Cavey, M.T., Martin, B., Bernard, B.A., Reichert, U., Maignan, J., Darmon, M., and Shroot, B. (1991). Selective High Affinity Retinoic Acid Receptor-alpha or Receptor-beta-gamma Ligands. *Mol. Pharmacol.* *40*, 556-562.
- Diakun, G.P., Fairall, L., and Klug, A. (1986). EXAFS study of the zinc-binding sites in the protein transcription factor IIIA. *Nature* *324*, 698-699.
- Durand, B., Saunders, M., Leroy, P., Leid, M., and Chambon, P. (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.

Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R., and Chambon, P. (1994). Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic 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.

Dyck, J.A., Maul, G.G., Miller, W.H., Chen, J.D., Kakizuka, A., and Evans, R.M. (1994). A novel macromolecular structure is a target of the Promyelocyte-Retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* *76*, 333-343.

Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* *240*, 889-895.

Eyrolles, L., Kagechika, H., Kawachi, E., Fukasawa, H., Iijima, T., Matsushima, Y., Hashimoto, Y., and Shudo, K. (1994). Retinobenzoic acids .6. Retinoid antagonists with a heterocyclic ring. *J. Med. Chem.* *37*, 1508-1517.

Fanjul, A., Dawson, M.I., Hobbs, P.D., Jong, L., Cameron, J.F., Harlev, E., Graupner, G., Lu, X.P., and Pfahl, M. (1994). A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature* *372*, 107-111.

Fiorella, P.D. and Napoli, J.L. (1991). Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *266*, 16572-16579.

Folkers, G.E., Vanderleede, B.M., and Vandersaag, P.T. (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.

Forman, B.M., Yang, C.R., Au, M., Casanova, J., Ghysdael, J., and Samuels, H.H. (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.

Forman, B.M., Goode, E., Chen, J., Oro, A.E., Bradley, D.J., Perlmann, T., Noonan, D.J., Burka, L.T., McMorris, T., Lamph, W.W., Evans, R.M., and Weinberger, C. (1995). Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* *81*, 687-693.

Forman, B.M. and Samuels, H.H. (1990). Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: the leucine regulatory zipper model. *Mol. Endocrinol.* *4*, 1293-1301.

Freedman, L.P., Luisi, B.F., Korszun, Z.R., Basavappa, R., Sigler, P.B., and Yamamoto, K.R. (1988). The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* *334*, 543-546.

Gewirth, D.T. and Sigler, P.B. (1995). The basis for half-site specificity explored through a non-cognate steroid receptor-DNA complex. *Nature Struct. Biology.* 2, 386-394.

Giguere, V., Ong, E.S., Segui, P., and Evans, R.M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330, 624-629.

Glass, C.K., Franco, R., Weinberger, C., Albert, V.R., Evans, R.M., and Rosenfeld, M.G. (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., Lipkin, S.M., Devary, O.V., and Rosenfeld, M.G. (1989). Positive and negative regulation of gene transcription by a retinoic acid-thyroid hormone receptor heterodimer. *Cell* 59, 697-708.

Glass, C.K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocrine Rev.* 15, 391-407.

Glazer, A.N., DeLange, R.J., and Sigman, D.S. (1985). Chemical modifications of proteins. Selected methods and analytical procedures. In *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, vol. 4, part I. S.R. Work and E. Work, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 68-119.

Glover, J.N.M. and Harrison, S.C. (1995). Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 373, 257-261.

Goldstein, R.A., Katzenellenbogen, J.A., Lutheyschulten, Z.A., Seielstad, D.A., and Wolynes, P.G. (1993). Three-dimensional model for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 9949-9953.

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

Green, S. and Chambon, P. (1988). Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.* 4, 309-314.

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

Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S., (1994). Cellular biology and biochemistry of the retinoids. in : *Retinoids: Biology, chemistry* (Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S., editors) 443-520.

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

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

Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635-641.

Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamel, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.

Houle, B. and Bradley, W.E.C. (1993). Lung cancer, retinoids and retinoic acid receptor-beta. *M. S-Med. Sci.* 5, 528-533.

Huang, M.E., Ye, Y.C., Chen, S.R., Chai, J.R., Lu, J.X., Zhao, L., Gu, L.J., and Wang, Z.Y. (1988). Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72, 567-572.

Kastner, P., Grondona, J.M., Mark, M., Gansmuller, A., LeMeur, M., Decimo, D., Vonesch, J.L., Dolle, P., and Chambon, P. (1994). Genetic analysis of RXR alpha, developmental function: Convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* 78, 987-1003.

Katahira M., Knegtel R.M.A., Boelens R., Eib D., Schilthuis J.G., Van der Saag P.T. and Kaptein R. (1992) Homo- and heteronuclear NMR studies of the human retinoic acid receptor b DNA-binding domain : sequential assignment and identification of secondary structure elements. *Biochemistry* 31; 6474-6480.

Katz, R.W. and Koenig, R.J. (1993). Nonbiased identification of DNA sequences that bind thyroid hormone receptor alpha-1 with high affinity. *J. Biol. Chem.* 268, 19392-19397.

Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K., and Wahli, W. (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.

Keller, H., Givel, F., Perroud, M., and Wahli, W. (1995). Signaling cross-talk between peroxisome proliferator- activated receptor retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements. *Mol. Endocrinol.* 9, 794-804.

Kliwer, S.A., Umesono, K., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., Dyck, J.A., and Evans, R.M. (1992a). Retinoid X-Receptor COUP-TF Interactions Modulate Retinoic Acid Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 1448-1452.

Kliwer, S.A., Umesono, K., Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1992b). Retinoid X receptor Interacts with Nuclear Receptors in Retinoic Acid, Thyroid Hormone and Vitamin-D3 Signalling. *Nature* 355, 446-449.

Kliwer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heymann, R.A., and Evans, R.M. (1993). Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358, 771-774.

Krust, A., Kastner, P., Petkovich, M., Zelent, A., and Chambon, P. (1989). A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 5310-5314.

Kumar, V. and Chambon, P. (1988). The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 55, 145-156.

Kurokawa, R., Yu, V.C., Naar, A., Kyakumoto, S., Han, Z.H., Silverman, S., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (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.

Kurokawa, R., Drenzo, J., Boehm, M., Sugarman, J., Gloss, B., Rosenfeld, M.G., Heyman, R.A., and Glass, C.K. (1994). Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature* 371, 528-531.

Lampron, C., Rochette-Egly, C., Gorry, P., Dolle, P., Mark, M., Lufkin, T., LeMeur, M., and Chambon, P. (1995). Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* 121, 539-548.

Langston, A.W. and Gudas, L.J. (1992). Identification of a Retinoic Acid Responsive Enhancer 3' of the Murine Homeobox Gene Hox-16. *Mech. Dev.* 38, 217-228.

Lee, J.W., Gulick, T., and Moore, D.D. (1992). Thyroid Hormone Receptor Dimerization Function Maps to a Conserved Subregion of the Ligand Binding Domain. *Mol. Endocrinol.* 6, 1867-1873.

Lee, M.S., Kliwer, S.A., Provencal, J., Wright, P.E., and Evans, R.M. (1993). Structure of the retinoid-X receptor-alpha DNA binding domain -a helix required for homodimeric DNA binding. *Science* 260, 1117-1121.

Lefebvre, B., Rachez, C., Formstecher, P., and Lefebvre, P. (1995). Structural determinants of the ligand-binding site of the human retinoic acid receptor alpha. *Biochemistry* 34, 5477-5485.

Lehmann, J.M., Jong, L., Fanjul, A., Cameron, J.F., Lu, X.P., Haefner, P., Dawson, M.I., and Pfahl, M. (1993). Retinoids selective for the retinoid X receptor response pathways. *Science* 258, 1944-1946.

Leid, M., Kastner, P., and Chambon, P. (1992a). Multiplicity Generates Diversity in the Retinoic Acid Signalling Pathways. *Trends Biochem.Sci.* 17, 427-433.

Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., Chen, J.Y., Staub, A., Garnier, J.M., Mader, S., and Chambon, P. (1992b). 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.

Levin, A.A., Sturzenbecker, L.J., Kazmer, S., Bosakowski, T., Huselton, C., Allenby, G., Speck, J., Kratzeisen, C., Rosenberger, M., Lovey, A., and Grippo, J.F. (1992). 9-Cis Retinoic Acid Stereoisomer Binds and Activates the Nuclear Receptor RXRalpha. *Nature* 355, 359-361.

Li, E., Sucov, H.M., Lee, K.F., Evans, R.M., and Jaenisch, R. (1993). Normal development and growth of mice carrying a targeted disruption of the alpha1 retinoic acid receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 1590-1594.

Liao, J., Ozono, K., Sone, T., McDonnell, D.P., and Pike, J.W. (1990). Vitamin D receptor interaction with specific DNA requires a nuclear protein and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 9751-9755.

Lin, K., Parkison, C., Mcphie, P., and Cheng, S. (1991). An essential role of domain D in the hormone-binding activity of human β 1 thyroid hormone nuclear receptor. *Mol. Endocrinol.* 5, 485-492.

Lohnes, D., Kastner, P., Dierich, A., Mark, M., LeMeur, M., and Chambon, P. (1993). Function of retinoic acid receptor-gamma in the mouse. *Cell* 73, 643-658.

Lotan, R., Xu, X.C., Lippman, S.M., Ro, J.Y., Lee, J.S., Lee, J.J., and Hong, W.K. (1995). Suppression of retinoic acid receptor-beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. *N. Engl. J. Med.* 332, 1405-1410.

Lufkin, T., Lohnes, D., Mark, M., Dierich, A., Gorry, P., Gaub, M.-P., LeMeur, M., and Chambon, P. (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., Otwinowski, Z., Freedman, L.P., Yamamoto, K.R., and Sigler, P.B. (1991). Crystallographic Analysis of the Interaction of the Glucocorticoid Receptor with DNA. *Nature* 352, 497-505.

Maden, M. (1982). Vitamin A and pattern formation in the regenerating limb. *Nature* 295, 672-675.

Mader, S., Kumar, V., de Verneuil, H., and Chambon, P. (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., Leroy, P., Chen, J.Y., and Chambon, P. (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.

Mangelsdorf, D.J., Ong, E.S., Dyck, J.A., and Evans, R.M. (1990). Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345, 224-229.

Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., Kliewer, S.A., Borgmeyer, U., Ong, E.S., and Evans, R.M. (1991). A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* 66, 555-561.

Mangelsdorf, D.J., Borgmeyer, U., Heyman, R.A., Zhou, J.Y., Ong, E.S., Oro, A.E., Kakizuka, A., and Evans, R.M. (1992). Characterization of Three RXR Genes That Mediate the Action of 9-cis Retinoic Acid. *Genes & Develop.* 6, 329-344.

Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., and Evans, R.M. (1994) The retinoid receptors. in : *Retinoids: Biology, chemistry* (Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S., editors) 319-349.

Martin, B., Bernardon, J.M., Cavey, M.T., Bernard, B., Carlavan, I., Charpentier, B., Pilgrim, W.R., Shroot, B., and Reichert, U. (1992). Selective Synthetic Ligands for Human Nuclear Retinoic Acid Receptors. *Skin. Pharmacol.* 5, 57-65.

Mcphie, P., Parkison, C., Lee, B.K., and Cheng, S.Y. (1993). Structure of the hormone binding domain of human beta-1 thyroid hormone nuclear receptor - is it an alpha/beta barrel. *Biochemistry* 32, 7460-7465.

Mendelsohn, C., Mark, M., Dolle, P., Dierich, A., Gaub, M.P., Krust, A., Lampron, C., and Chambon, P. (1994). Retinoic acid receptor beta 2 (RAR beta 2) null mutant mice appear normal. *Dev. Biol.* 166, 246-258.

Miller, J., McLachlan, A.D., and Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 4, 1609-1614.

Miyamoto, T., Suzuki, S., and Degroot, L.J. (1993). High affinity and specificity of dimeric binding of thyroid hormone receptors to DNA and their ligand-dependent dissociation. *Mol. Endocrinol.* 7, 224-231.

- Montano, M.M., Muller, V., Trobaugh, A., and Katzenellenbogen, B.S. (1995). The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: Role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol. Endocrinol.* **9**, 814-825.
- Naar, A.M., Boutin, J.M., Lipkin, S.M., Yu, V.C., Holloway, J.M., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1991). The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* **65**, 1267-1279.
- Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H., and Chambon, P. (1993). RARs and RXRs - evidence for 2 autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization *in vivo*. *EMBO J.* **12**, 2349-2360.
- Noji, S., Nohno, T., Koyama, E., Muto, K., Ohshima, K., Aoki, Y., Tamura, K., Ohsugi, K., Ide, H., Taniguchi, S., and Saito, T. (1991). Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud. *Nature* **350**, 83-86.
- O'Donnell, A.L., Rosen, E.D., Darling, D.S., and Koenig, R.J. (1991). Thyroid hormone receptor mutations that interfere with transcriptional activation also interfere with receptor interaction with a nuclear protein. *Mol. Endocrinol.* **5**, 94-99.
- O'Malley, B.W. and Conneely, O.M. (1992). Orphan receptors: in search of a unifying hypothesis for activation. *Mol. Endocrinol.* **6**, 1359-1361.
- Ong, D.E., Newcomer, M.E., and Chytil, F. (1994). Cellular Retinoid-Binding proteins. in : *Retinoids: Biology, chemistry* (Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S., editors) 283-317.
- Ong, D.E. and Chytil, F. (1978). Cellular retinoic acid-binding protein from rat testis. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **253**, 4551-4554.
- Ostrowski, J., Hammer, L., Roalsvig, T., Pokornowski, K., and Reczek, P.R. (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.
- Perlmann, T., Rangarajan, P.N., Umesono, K., and Evans, R.M. (1993). Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes & Develop.* **7**, 1411-1422.
- Perlmann, T. and Jansson, L. (1995). A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Gene Develop.* **9**, 769-782.

Petkovitch, M., Brand, N.J., Krust, A., and Chambon, P. (1987). A human retinoic receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330, 444-450.

Pfahl, M., Apfel, R., Bendik, I., Fanjul, A., Graupner, G., Lee, M.O., Lavista, N., Lu, X.P., Piedrafita, J., Ortiz, M.A., Salbert, G., and Zhang, X.K. (1994). Nuclear retinoid receptors and their mechanism of action. *Vitamins and Hormones*, 49, 327-382.

Pijnappel, W.W.M., Hendriks, H.F.J., Folkers, G.E., Vandenbrink, C.E., Dekker, E.J., Edelenbosch, C., Vandersaag, P.T., and Durston, A.J. (1993). The retinoid ligand 4-Oxo-Retinoic acid is a highly active modulator of positional specification. *Nature* 366, 340-344.

Pratt, W.B. (1993). The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 21455-21458.

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

Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R.M., and Sigler, P.B. (1995). Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 375, 203-211.

Renaud, J.P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995) *Nature* 378, 681-689.

Ribeiro, R.C., Kushner, P.J., Apriletti, J.W., West, B.L., and Baxter, J.D. (1992). Thyroid Hormone Alters In vitro DNA Binding of Monomers and Dimers of Thyroid Hormone Receptors. *Mol. Endocrinol.* 6, 1142-1152.

Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., and Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75, 1401-1416.

Rosen, E.D., Beninghof, E.G., and Koenig, R.J. (1993). Dimerization interfaces of thyroid hormone, retinoic acid, vitamin-D, and retinoid-X receptors. *J. Biol. Chem.* 268, 11534-11541.

Ross, A.C. and Hammerling, U.G. (1994). Retinoids and the immune system. in : *Retinoids: Biology, chemistry* (Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S., editors) 521-543.

Sasaki, T., Shimazawa, R., Sawada, T., Iijima, T., Fukasawa, H., Shudo, K., Hashimoto, Y., and Iwasaki, S. (1995). Determination of the photoaffinity-labeled site on the ligand-binding domain of retinoic acid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207, 444-451.

Saunders, J.W. and Gasseling, M.T. (1968). Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. *Epithelial-mesenchymal interactions* 78-97.(Abstract)

Scheidereit, C., Geisse, S., Westphal, H.M., and Beato, M. (1983). The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of mouse mammary tumour virus. *Nature* 304(5928), 749-752.

Schule, R., Rangarajan, P., Yang, N., Kliewer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Verma, I.M., and Evans, R.M. (1991). Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 6092-6096.

Schwabe, J.W.R., Chapman, L., Finch, J.T., and Rhodes, D. (1993). The crystal structure of the estrogen receptor DNA-Binding domain bound to DNA - how receptors discriminate between their response elements. *Cell* 75, 567-578.

Severne, Y., Wieland, S., Schaffner, W., and Rusconi, S. (1988). Metal binding 'finger' structures in the glucocorticoid receptor defined by site-directed mutagenesis. *EMBO J.* 7, 2503-2508.

Shen, S., Vandersaag, P.T., and Kruijer, W. (1993). Dominant negative retinoic acid receptor-beta. *Mech. Dev.* 40, 177-189.

Simons, S.S. (1994). Function/activity of specific amino acids in glucocorticoid receptors. *Vitamins. and. Hormones*, 49, 49-130.

Stunnenberg, H.G. (1993). Mechanisms of transactivation by retinoic acid receptors. *Bioessays* 15, 309-315.

Sucov, H.M., Dyson, E., Gumeringer, C.L., Price, J., Chien, K.R., and Evans, R.M. (1994). RXR alpha Mutant Mice Establish a Genetic Basis for Vitamin A Signaling in Heart Morphogenesis. *Genes & Develop.* 8, 1007-1018.

Tairis, N., Gabriel, J.L., Gyda, M., Soprano, K.J., and Soprano, D.R. (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.

Taneja, R., Bouillet, P., Boylan, J.F., Gaub, M.P., Roy, B., Gudas, L.J., and Chambon, P. (1995). Reexpression of retinoic acid receptor (RAR)gamma or overexpression of RAR alpha or RAR beta in RAR gamma-null F9 cells reveals a partial functional redundancy between the three RAR types. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7854-7858.

Tate, B.F., Allenby, G., Janocha, R., Kazmer, S., Speck, J., Sturzenbecker, L.J., Abarzua, P., Levin, A.A., and Grippo, J.F. (1994). Distinct binding determinants for 9-cis retinoic acid are located within AF-2 of retinoic acid receptor-alpha. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2323-2330.

Thaller, C. and Eichele, G. (1990). Isolation of 3,4-didehydroretinoic acid, a novel morphogenetic signal in the chick wing bud. *Nature* 345, 815-819.

Tickle, C., Alberts, B., Wolpert, L., and Lee, J. (1982). Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature* 296, 564-566.

Tienrungroj, W., Meshinski, S., Sanchez, E.R., Pratt, E.S., Grippo, J.F., Hollingevan, A., and Pratt, W.B. (1987). The role of sulfhydryl groups in permitting transformation and DNA binding of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 262, 6992-7000.

Tini, M., Otulakowski, G., Breitman, M.L., Tsui, L.C., and Giguere, V. (1993). An everted repeat mediates retinoic acid induction of the gammaF-Crystallin gene - evidence of a direct role for retinoids in lens development. *Genes & Develop.* 7, 295-307.

Tini, M., Fraser, R.A., and Giguere, V. (1995). Functional interactions between retinoic acid receptor- related orphan nuclear receptor (ROR alpha) and the retinoic acid receptors in the regulation of the gamma F- crystallin promoter. *J. Biol. Chem.* 270, 20156-20161.

Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C., and Evans, R.M. (1993). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid and vitamin D3 receptors. *Cell* 65, 1255-1266.

Umesono, K. and Evans, R.M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57, 1139-1146.

van Pelt, A.M. and de Rooij, D.G. (1991). Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. *Endocrinology* 128, 697-704.

Wagner, R.L., Apriletti, J.W., McGrath, M.E., West, B.L., Baxter, J.D., and Fletterick, R.J. (1995). A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* 378, 690-697.

Wald, G. (1968). Molecular basis of visual excitation. *Science* 162, 230-239.

Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A., and Mangelsdorf, D.J. (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Gene Develop.* 9, 1033-1045.

Wilson, T.E., Paulsen, R.E., Padgett, K.A., and Milbrandt, J. (1992). Participation of Non-Zinc Finger Residues in DNA Binding by 2 Nuclear Orphan Receptors. *Science* 256, 107-110.

Yamasaki, R.B., Vega, A., and Feeney, R.E. (1980). Modification of available arginine residues in proteins by p-hydroxyphenylglyoxal. *Anal. Biochem.* *109*, 32-40.

Yu, V.C., Delsert, C., Andersen, B., Holloway, J.M., Devary, O.V., Naar, A.M., Kim, S.Y., Boutin, J.M., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (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.

Zawel, L., Kumar, K.P., and Reinberg, D. (1995). Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Gene Develop.* *9*, 1479-1490.

Zechel, C., Shen, X.Q., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1994a). Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements. *EMBO J.* *13*, 1414-1424.

Zechel, C., Shen, X.Q., Chen, J.Y., Chen, Z.P., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1994b). 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., Krust, A., Petkovich, M., Kastner, P., and Chambon, P. (1989). Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin. *Nature* *339*, 714-717.

Zenke, M., Munoz, A., Sap, J., Vennstrom, B., and Beug, H. (1990). v-erbA oncogene activation entails the loss of hormone-dependent regulator activity of c-erbA. *Cell* *61*, 1035-1049.

Zhang, X.K., Hoffmann, B., Tran, P.B.V., Graupner, G., and Pfahl, M. (1992a). Retinoid X receptor Is an Auxiliary Protein for Thyroid Hormone and Retinoic Acid Receptors. *Nature* *355*, 441-446.

Zhang, X.K., Lehmann, J., Hoffmann, B., Dawson, M.I., Cameron, J., Graupner, G., Hermann, T., Tran, P., and Pfahl, M. (1992b). Homodimer Formation of Retinoid X-Receptor Induced by 9- cis Retinoic Acid. *Nature* *358*, 587-591.

