

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE

Année 1997

N° d'ordre

**THESE**

présentée à Lille I pour l'obtention du grade de

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

Option :

**Biochimie, Biologie cellulaire et moléculaire**

par

**Bruno LEFEBVRE**

**DETERMINANTS STRUCTURAUX DU RECEPTEUR HUMAIN  $\alpha$  DE  
L'ACIDE RETINOIQUE IMPLIQUES DANS LA LIAISON AU LIGAND  
ET LA MODULATION DE SON ACTIVITE BIOLOGIQUE**

**Soutenue le 17 septembre 1997 devant la Commission d'Examen :**

<b>Président</b>	:	Professeur S. BALL
<b>Rapporteurs</b>	:	Docteur U. REICHERT Docteur J. C. NICOLAS
<b>Examineurs</b>	:	Professeur P. FORMSTECHE Professeur J. P. HENICHART

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

Je remercie les Docteurs Uwe Reichert et Jean-Claude Nicolas d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie le Professeur Jean-Pierre Hénichart d'avoir accepté spontanément d'examiner ce travail.

Ce mémoire est pour moi aussi l'occasion de remercier les personnes qui ont participé de près ou de loin à son élaboration :

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur Pierre Formstecher pour m'avoir accueilli dans son laboratoire

Je tiens à remercier particulièrement le Docteur Philippe Lefebvre pour m'avoir encadré et soutenu tout au long de ce travail. Saches que j'ai énormément apprécié ta disponibilité, tes idées judicieuses et l'ambiance que tu crées au sein de ton équipe. Merci pour avoir supporté le bruit de mon vortex et les "dans quinze jours ..... si je trouve la solution".

Un frère, pour moi, toujours tu seras !!!!!!!

Je voudrais également remercier mes compagnons de route passés (Ali et Chris) et présents (nono transfactor, ben, mad, la Marie et Olga) avec qui il fut bon de travailler et de rigoler...

Enfin, je remercie les autres membres du laboratoire pour leur sympathie ( Un petit mot pour Nardette, je sais que ça lui fait plaisir)

<b>RESUME</b> .....	4
<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b> .....	6
<b>ABREVIATIONS</b> .....	7
<b>PARTIE GENERALE</b> .....	9
<b>INTRODUCTION</b> .....	10
<b>A. LES PRINCIPAUX PROTAGONISTES</b> .....	10
<b>I. LES RETINOIDES</b> .....	10
1. Les rétinoïdes naturels .....	10
2. Activités biologiques .....	14
2.a Rétinoïdes et développement .....	14
2.b Rétinoïdes et contrôle de la prolifération cellulaire .....	17
2.c Rétinoïdes et apoptose .....	18
2.d Rétinoïdes et pathologies .....	18
3. Les rétinoïdes synthétiques .....	18
<b>II. RAR, RXR : DEUX FAMILLES DE RECEPTEURS AUX RETINOIDES</b> .....	21
1. RAR, RXR : découverte et structure. ....	21
2. RARs et RXRs : distribution tissulaire et invalidation génique. . .	23
<b>B. DONNEES STRUCTURALES SUR LES RECEPTEURS</b> .....	24
<b>I. GENERALITES</b> .....	24
<b>II. RECEPTEURS AUX RETINOIDES ET LIAISON A L'ADN.</b> ....	26
1. Polymorphisme des HREs .....	26
2. Spécificité de la liaison aux HREs .....	29
2.a. interactions avec l'ADN .....	29
2.b interactions protéines/protéines .....	32
<b>III. LE DOMAINE DE LIAISON AU LIGAND</b> .....	32
1. Apo-RXR/Holo-RAR : le ligand induit un changement de conformation .....	34
2. le site de liaison au ligand .....	36
3. Interface de dimérisation .....	41
<b>C. REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES PAR LES RECEPTEURS AUX RETINOIDES.</b> .....	43

<b>I. AF1, AF2 : DEUX REGIONS IMPLIQUEES DANS LA TRANSACTIVATION.</b>	44
1. L'AF1.	44
2. L'AF2.	45
<b>II. DIMERISATION, LIAISON AU LIGAND ET TRANSACTIVATION</b>	46
<b>III. LES MODULATEURS DE L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE.</b>	48
1. Les coactivateurs.	48
2. Les corépresseurs	52
<b>IV. MODULATION DE LA TRANSACTIVATION</b>	55
<b>V. RECEPTEURS AUX RETINOIDES ET CHROMATINE</b>	56
<b>RESULTATS</b>	58
<b>A. DOMAINE MINIMUM DE LIAISON AUX RETINOIDES DU hRAR<math>\alpha</math> :</b>	
<b>Importance des extrémités N et C-terminales et variations selon la nature     du ligand.</b>	59
<b>I. APPROCHE EXPERIMENTALE.</b>	59
<b>II. RESULTATS : ARTICLE</b>	60
<b>III. CONCLUSION</b>	70
<b>B. ETUDE DE LA CONTRIBUTION DES REGIONS 186/198 ET 403/410 DANS L'INTERACTION LIGAND/RECEPTEUR</b>	70
<b>I. REGION 186/198</b>	71
1. Mutagenèse dirigée	71
2. Résultats	71
<b>II. REGION 403/410</b>	73
1. Mutagenèse dirigée	73
2. Résultats	78
2. a. $\Delta$ N186/462, $\Delta$ C186/418 et $\Delta$ C186/410 : implication du domaine F dans l'interaction avec l'antagoniste Ro41- 5253	78
2. b. Effets des mutations ponctuelles sur les récepteurs $\Delta$ C186/410.	81
2. c. Effets des mutations ponctuelles sur les récepteurs $\Delta$ C186/418	84

<b>C. INFLUENCE DE LA REGION 403/410 DANS LE MECANISME D’ACTION DU RECEPTEUR</b> .....	86
<b>I. PROTEOLYSE LIMITEE : IMPLICATION DE LA REGION 403/410 DANS LE CHANGEMENT DE CONFORMATION</b> .....	86
1. Etudes réalisées sur les mutants de délétion (sauvage, $\Delta C1/418$ , $\Delta C1/410$ , $\Delta C1/403$ ) .....	88
2. Etudes réalisées sur les mutants ponctuels $\Delta C1/418$ . .....	90
<b>II. EFFETS DES MUTATIONS PONCTUELLES SUR L’ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DU RECEPTEUR</b> .....	90
1. Effets différentiels des mutations sur deux agonistes : l’ATRA et le CD367 .....	91
2. Effets des mutations ponctuelles sur l’antagoniste Ro41-5253 ...	91
<b>CONCLUSION</b> .....	95
<b>MATERIELS &amp; METHODES</b> .....	98
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	103

## RESUME

L'acide rétinoïque, un dérivé de la vitamine A, est un élément clef dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Son mécanisme d'action passe par l'activation de gènes cibles via deux récepteurs nucléaires, les RARs et les RXRs, facteurs de transcription ligand dépendant. Par homologie avec les autres membres de la super famille, ces récepteurs peuvent être divisés en six domaines distincts nommés de A à F. Le domaine C (DNA binding domain) est composé de deux doigts de zinc et assure la reconnaissance spécifique de séquences d'ADN localisées dans le promoteur des gènes cibles. Le domaine E (LBD : ligand binding domain) confère au récepteur les propriétés de liaison au ligand, de dimérisation et de transactivation ligand dépendante. Ces deux récepteurs se fixent sous forme d'hétérodimères aux éléments de réponse. La fixation du ligand entraîne un changement de conformation au niveau du LBD qui permet l'activation transcriptionnelle.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de l'interaction ligand/récepteur (hRAR $\alpha$ ). Utilisant la technique de mutagenèse par délétion, nous avons pu identifier deux régions fonctionnellement importantes. La partie C-terminale du domaine D (aa 186 à 198) concourt à la stabilité du site de liaison tandis que la partie C-terminale du domaine E (aa 403 à 410) est impliquée directement dans la liaison au ligand. Une exception est à noter sur l'ensemble des ligands testés, l'antagoniste Ro 41-5253, qui requiert la présence du domaine F pour une liaison de haute affinité. Cette étude s'est prolongée par l'introduction de mutations ponctuelles non conservatives au niveau de cette région. Nous avons pu ainsi évaluer la contribution de chaque résidu dans l'interaction avec le ligand naturel, l'ATRA, mais également pour d'autres rétinoïdes naturels ou synthétiques. L'importance des différents acides aminés s'est avérée variable en fonction du ligand étudié suggérant une certaine flexibilité de la région. Cette dernière est toutefois fortement influencée en présence de l'AF2, région responsable de la transactivation ligand dépendante du récepteur, qui introduit des contraintes stériques sur la région 403/410. Finalement, nous avons montré par transfection transitoire l'implication de deux résidus dans la transactivation induite par l'ATRA, la glycine 404 et la serine 405, et qui a pu être corrélée à une perturbation du changement de conformation induit par le ligand. L'impact des mutations s'est révélé différent pour un autre agoniste, le CD367. Certaines se sont montrées essentielles pour la pharmacologie du ligand avec en particulier la glycine 404 et la leucine 409

qui transforment le CD367 en un agoniste inverse. Par le même type d'expérience, nous avons montré que le domaine F n'est pas nécessaire pour l'effet antagoniste du Ro41-5253 malgré des variations très importantes dans l'amplitude de la répression observée.

L'ensemble de ces résultats identifie la région 403/410 du hRAR $\alpha$  comme essentielle pour l'activité biologique du récepteur par son implication dans la liaison et l'interprétation de la pharmacologie des ligands.

## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### PUBLICATIONS

Structural determinants of the ligand binding site of the human retinoic acid receptor  $\alpha$ .  
**Bruno Lefebvre**, Christophe Rachez, Pierre Formstecher and Philippe Lefebvre.  
*Biochemistry* 1995, 34, 5477-5485.

Improvement of the gene Splicing overlap (SOE) method.  
**Bruno Lefebvre**, Pierre Formstecher and Philippe Lefebvre.  
*Biotechniques*, Vol. 18, No 6 (1995).

Limited proteolysis as a tool for assaying ligand binding affinities of nuclear receptors  
Madjid Benkoussa, Benjamin Nominé, Arnaud Mouchon, **Bruno Lefebvre**, Pierre  
Formstecher and Philippe Lefebvre  
soumis

### COMMUNICATIONS :

Déterminants structuraux intervenant dans la liaison de l'acide rétinoïque avec son  
récepteur (hRAR $\alpha$ ).  
**Bruno Lefebvre**, Philippe Lefebvre and Pierre Formstecher.  
XXI<sup>e</sup> Forum Des Jeunes Chercheurs  
Université de Reims Champagne-Ardenne, 5-8 Juillet 1994.

Structural determinants of the ligand binding site of the human retinoic acid receptor  $\alpha$ .  
Philippe Lefebvre, **Bruno Lefebvre**, Christophe Rachez and Pierre Formstecher.  
Communication to EMBO Workshop, Ponto Conte, Italy, April 27-30, 1995.

Structural determinants of the ligand binding site of the human retinoic acid receptor  $\alpha$   
**Bruno Lefebvre**, Pierre Formstecher and Philippe Lefebvre  
conference retinoids' 95, October 8-11, 1995, Sophia-Antipolis, France

## ABREVIATIONS

AF-1	:activation fonction 1
AF-2	:activation fonction 2
ADN	:acide désoxyribonucléique
ADNc	: ADN complémentaire
AP-1	: activator protein 1
AR	: récepteurs aux androgènes
ATRA	: acide rétinoïque tout-trans
CBP	: CREB-binding protein
CRABP	: cellular retinoic acid binding protein
CRBP	: cellular retinol binding protein
DBD	: DNA binding domain
DR	: direct repeat
ER	: récepteur aux oestrogènes
ERE	: élément de réponse aux oestrogènes
GR	: récepteur aux glucocorticoïdes
GRE	: élément de réponse aux glucocorticoïdes
HRE	: hormone responsive element
HBD	: hormone binding domain
Kd	: constante de dissociation
Ki	: constante d'inhibition
LBD	: ligand binding domain
N-CoR	: nuclear receptor corepressor
PPAR	: peroxisome proliferator activated protein
PR	: récepteur de la progestérone
RAR	: récepteur à l'acide rétinoïque
RARE	: éléments de réponse à l'acide rétinoïque tout-trans
RXR	: récepteur à l'acide 9-cis rétinoïque
RXRE	: élément de réponse à l'acide 9-cis rétinoïque
SMRT	: silencing mediator for retinoic and thyroid receptors

TPA : 12-O tétradecanolphorbol 13-acétate  
TR : récepteur aux hormones thyroïdiennes  
TRE : élément de réponse aux hormones thyroïdiennes  
VDR : récepteur de la vitamine D  
VDRE : éléments de réponse de la vitamine D

# **PARTIE GENERALE**

## **INTRODUCTION**

L'importance de la vitamine A dans l'alimentation est reconnue depuis longtemps par ses effets sur la vision, la croissance, l'embryogénèse et la reproduction. Cependant, c'est actuellement les effets de son dérivé principal, l'acide rétinoïque sous ses formes isomères tout trans (ATRA) et 9-cis (9-cis RA) dans les processus de développement, de différenciation et d'homéostasie cellulaire qui suscitent le plus d'intérêt tant sur le plan fondamental que clinique. La compréhension de leur mécanisme d'action s'est considérablement accrue à partir de 1987, par le clonage de récepteurs spécifiques (Giguere et al., 1987; Petkovich et al., 1987). Ils appartiennent à l'une des plus grandes familles de facteurs de transcription connue à ce jour, à savoir la super famille des récepteurs nucléaires. Elle comprend également les récepteurs aux hormones stéroïdiennes (glucocorticoïdes, oestrogènes, minéralocorticoïdes, androgène, progestérone), aux hormones thyroïdiennes, à la vitamine D et de nombreux récepteurs orphelins dont le ligand n'a pas encore été identifié.

La régulation de l'expression des gènes par l'acide rétinoïque s'effectue selon le schéma décrit sur la figure 1. Après avoir présenté les différents protagonistes, les données structurales connues sur ces récepteurs seront développées pour enfin arriver à leur mécanisme d'action.

## **A. LES PRINCIPAUX PROTAGONISTES**

### **I. LES RETINOIDES**

#### **1. Les rétinoïdes naturels**

La diversité dans le contrôle de l'expression des gènes par l'ATRA est due à l'intervention de plusieurs paramètres dans la voie de signalisation. Le premier est la présence de plusieurs métabolites secondaires de cette molécule pouvant être potentiellement des ligands des récepteurs à l'acide rétinoïque.

La vitamine A (rétinol) est considérée comme la source principale des rétinoïdes naturels. Elle provient essentiellement de l'adsorption intestinale des caroténoïdes végétaux et

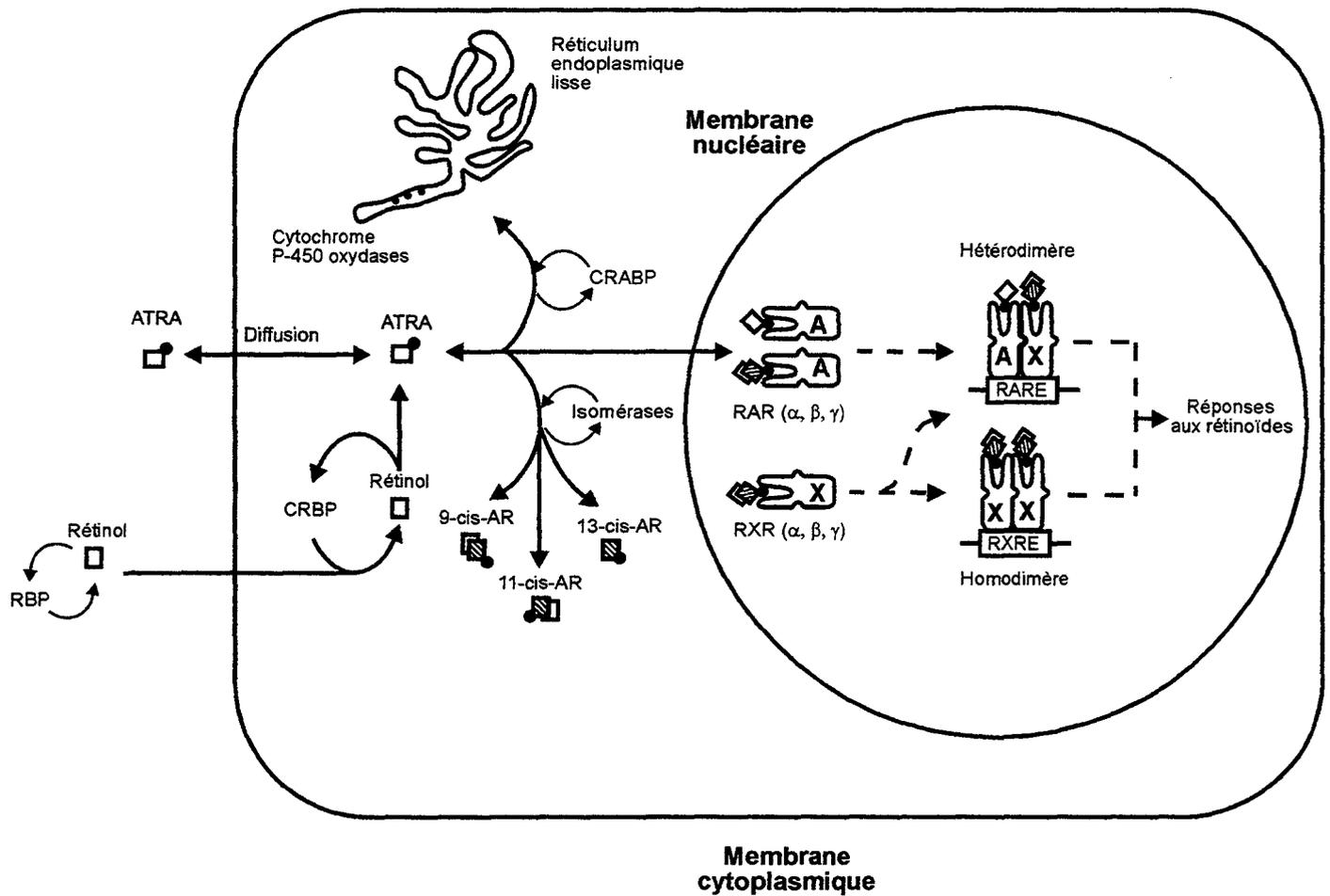


Figure 1 : Mode d'action des rétinoïdes  
(D'après Warrell et al., 1993)

des esters de rétinol des tissus animaux. Chez les mammifères, 50 à 80 % de la vitamine A est stockée dans le foie sous forme d'esters de rétinol assurant une concentration sanguine de  $2\mu\text{M}$  indépendamment des fluctuations alimentaires, sauf, bien sur, en cas de carence prolongée. Bien qu'une faible concentration soit présente dans le sang, la majorité de l'ATRA provient de l'oxydation du rétinol dans les tissus. Le processus exact de biosynthèse n'est pas encore clairement défini mais semble impliquer plusieurs systèmes enzymatiques (Blaner and Olson, 1994; Blomhoff et al., 1990). L'oxydation du rétinol en rétinol pourrait être catalysée par une alcool déshydrogénase (ADH) qui pourrait être à son tour oxydé en ATRA par une aldéhyde déshydrogénase (ALDH). Une rétinol déshydrogénase (RoDH) a été en effet clonée. Elle provient des microsomes hépatiques et est capable de catalyser cette réaction (Chai et al., 1995).

Une concentration inadéquate en ATRA peut causer de sérieux dommages pour certains types cellulaires. De plus, un manque ou un excès de cette molécule à un moment non approprié du développement peut aboutir à des malformations sévères. Un contrôle précis doit donc s'effectuer de façon spatio-temporelle au cours du développement et dans l'organisme adulte (Maden, 1994) (voir figure 2). Deux types de protéines cytoplasmiques jouent un rôle dans le contrôle du métabolisme de l'ATRA, la CRBP (Cellular Retinol Binding Protein) et les CRABP I et II (Cellular Retinoic Acid Binding Protein) (voir figure 2). Elles possèdent toutes deux un profil d'expression spécifique et sont conservées chez les vertébrés (Giguere, 1994). La CRBP semble avoir plusieurs fonctions. Elle stimule l'adsorption cellulaire du rétinol vers le cytoplasme. Des expériences de transfection d'un vecteur d'expression codant pour la CRBP dans des cellules intestinales humaines (Caco-2) ont montré une augmentation de l'absorption cellulaire (Napoli, 1996). Une fois formé, le complexe rétinol-CRBP sert de substrat pour la rétinol acyl transférase (LRAT) qui oriente le métabolisme vers le stockage sous forme d'esters de rétinol ou pour la RoDH vers la biosynthèse de l'ATRA. Le taux existant entre le complexe rétinol-CRBP/CRBP libre influence fortement l'orientation des réactions métabolites en stimulant la rétinyl ester hydrolase (REH) et en inhibant la LRAT. Le rôle des CRABP est moins clairement établi. En effet, l'inactivation des CRABP I et II par recombinaison homologue chez la souris montre que ces protéines ne sont pas indispensables au développement, à la fertilité et à la vie adulte de la souris. Cependant, elles ont un effet non négligeable de séquestration d'une fraction de l'ATRA présent dans la cellule. Elles pourraient régir le métabolisme des molécules qui leur sont liées, en orientant l'accessibilité des ligands vers certains types d'enzymes plus

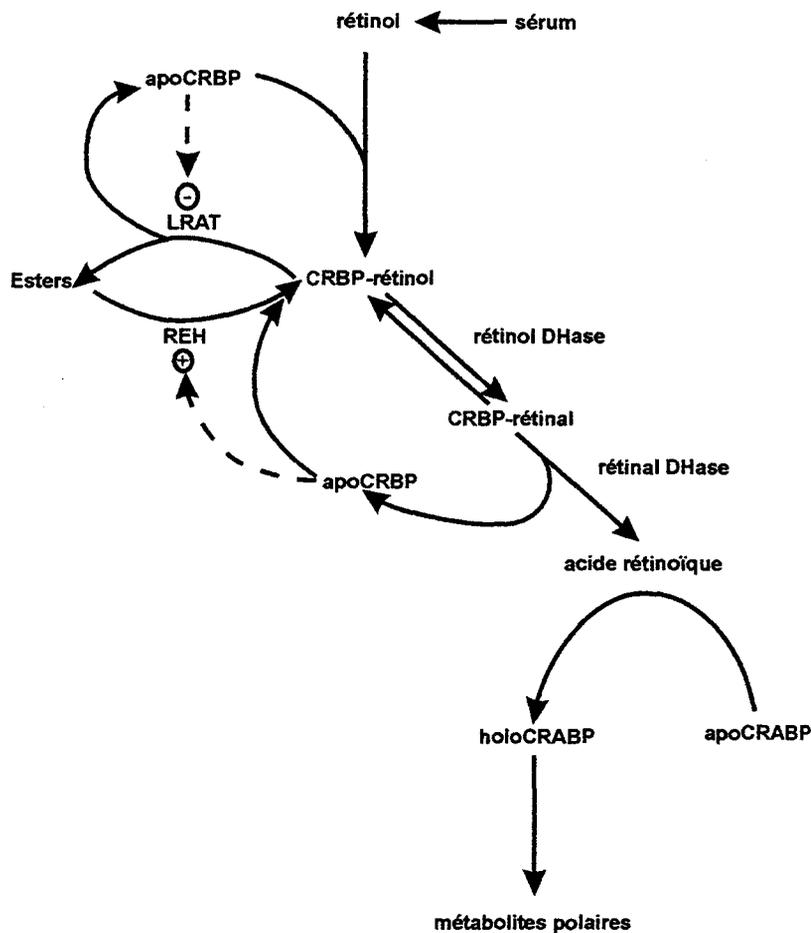


Figure 2 : Modèle de la synthèse et du catabolisme de l'acide rétinoïque.

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

spécifiques des complexes CRABP-ligand. Ainsi, des conversions de l'ATRA vers des métabolites plus polaires ont été montrées plus rapides et plus spécifiques lorsque le ligand est complexé à son transporteur (Napoli, 1996).

Plusieurs métabolites de l'ATRA ont été identifiés (Blaner and Olson, 1994). Ils résultent soit d'une modification de la structure tel que l'isomérisation de la chaîne polyénique (9-, 11-, 13-cis RA) ou modifié en certains dérivés oxo, didéhydro, epoxy ou encore glucuronique (voir figure 3). Parmi ces molécules, certaines vont présenter une activité biologique tel que l'ATRA, ligand spécifique des RARs et le 9-cis RA liant les RARs et les RXRs (Levin et al., 1992; Heyman et al., 1992). On trouve également le 3,4 didehydro RA, l'acide 4 oxo rétinol et plus récemment le 4 oxo rétinol qui ont été identifiés comme ligand des RARs (Pijnappel et al., 1993; Thaller and Eichele, 1990; Blumberg et al., 1996).

## **2. Activités biologiques**

L'ATRA et ses dérivés métaboliques possèdent de nombreux effets biologiques. Les principaux concernent le développement, l'inhibition de la prolifération cellulaire et la stimulation de la différenciation cellulaire. La complexité de ces phénomènes rend extrêmement difficile l'élucidation du rôle précis des rétinoïdes dans leur contrôle qui met en jeu un nombre considérable de facteurs.

### **2.a Rétinoïdes et développement**

L'importance des rétinoïdes dans le développement a été mise en évidence principalement dans l'étude de la morphogénèse des membres de poulet. Chez les vertébrés, ils se développent à partir d'un bourgeon qui se forme sur les flancs de l'embryon. Par des expériences de greffe, Saunders et Gasseling ont défini une région située sur la partie postérieure du bourgeon comme essentielle à ce processus (Saunders and Gasseling, 1968). Cette région, appelée ZPA (Zone of Polarizing Activity), transplantée sur la partie antérieure du bourgeon est capable d'induire une duplication en miroir des membres (voir figure 4).

L'implication des rétinoïdes dans ce processus a été montrée par le groupe de Tickle

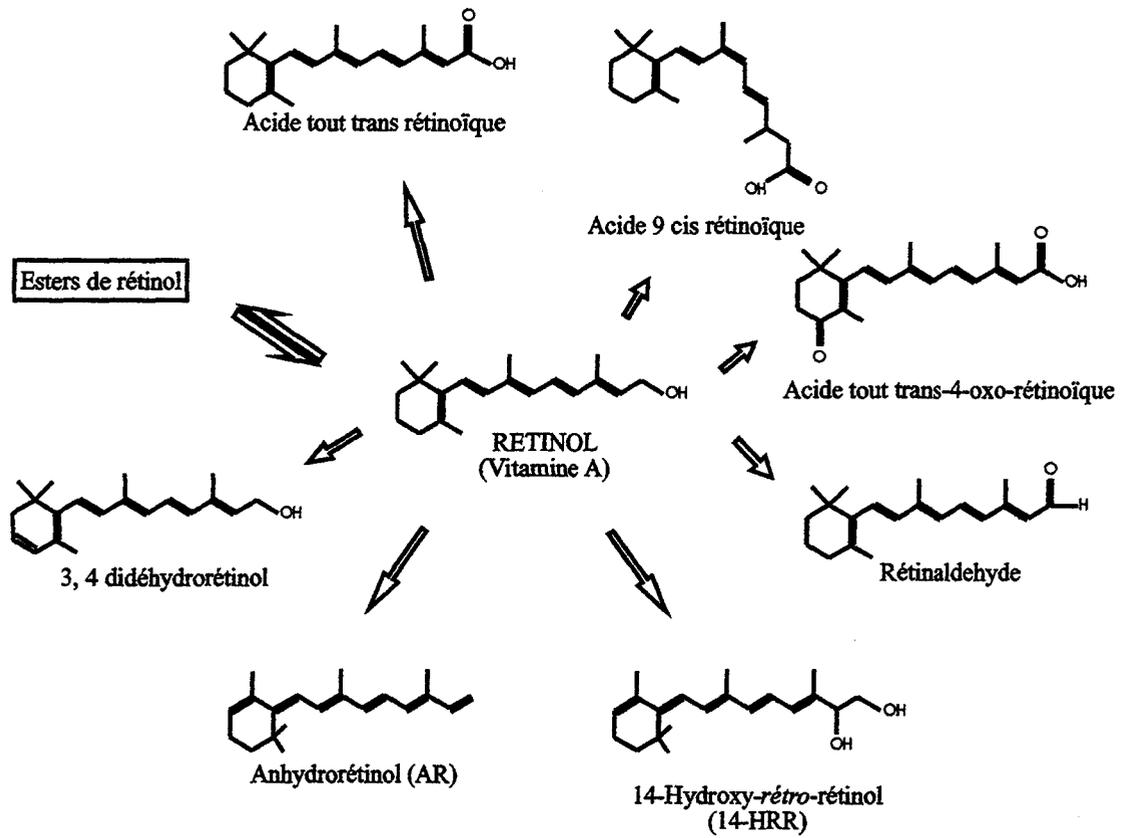


Figure 3 : Structure des principaux rétinolides naturels  
(Gudas , 1994)

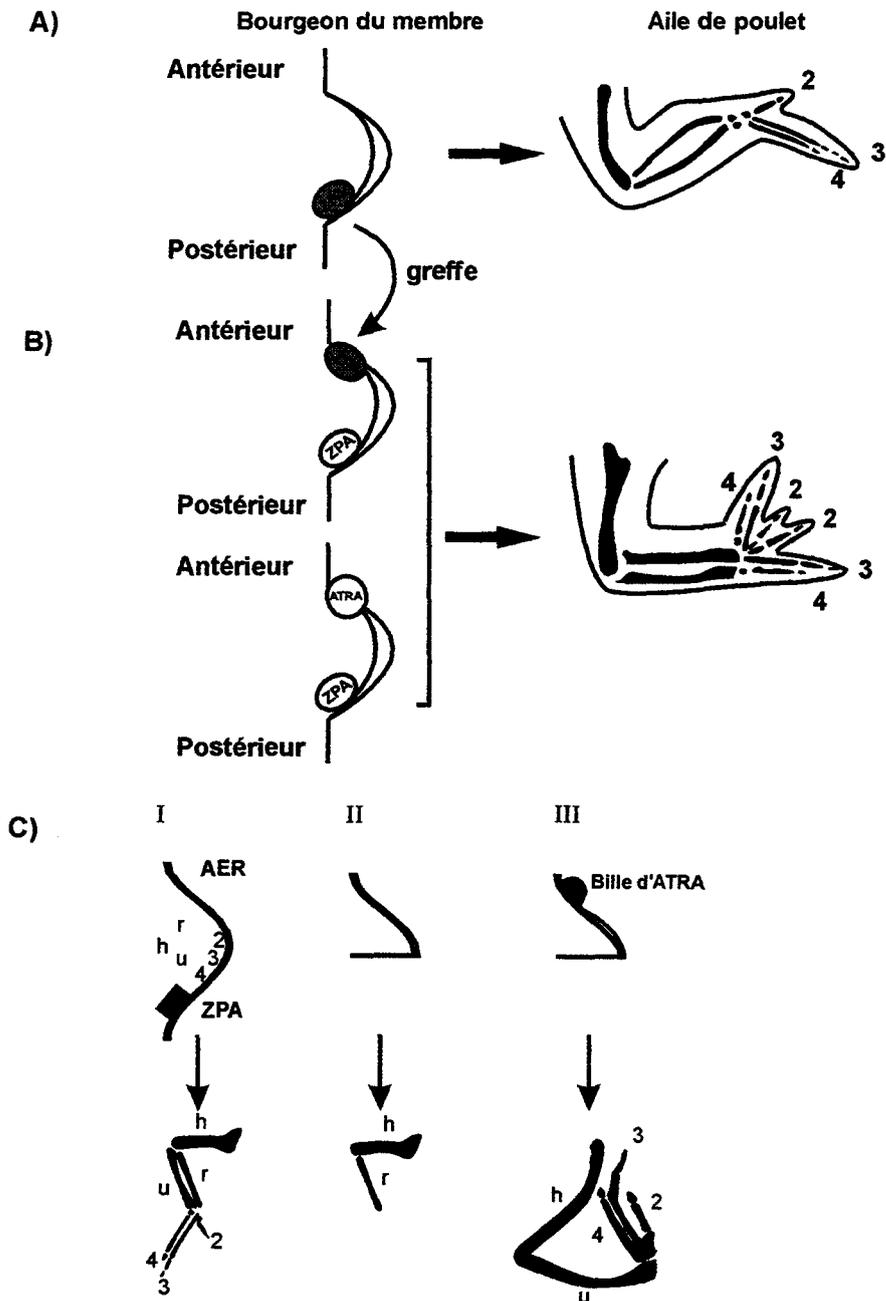


Figure 4 : L'ATRA est capable de mimer l'action de la ZPA dans le développement de l'aile de poulet (Tabin, 1991).

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

(Tickle et al., 1982). L'expérience a consisté à remplacer la greffe de ZPA sur la partie postérieure du bourgeon par une bille imprégnée d'ATRA. Le résultat obtenu a été identique à celui de la greffe indiquant que cette molécule pouvait avoir un effet morphogène direct. De plus, l'ATRA est présent naturellement dans ces structures sous forme de gradient et pouvant expliquer la formation successive des doigts. Toutefois, des études plus fines de ce phénomène ont montré que cette molécule n'était pas le morphogène direct mais induisait une cascade d'induction de gènes aboutissant à la formation des membres. En effet, l'exposition de la partie antérieure du bourgeon à de l'ATRA avant transplantation est capable d'induire également la duplication sans apport d'ATRA exogène (Wanek et al., 1991; Noji et al., 1991).

Parmi les gènes régulés par l'ATRA dans ce processus, on trouve en particulier les gènes Hox ainsi que le gène sonic hedgehog (Gudas, 1994). Leur expression est fortement augmentée après exposition à de l'ATRA et ils pourraient être les intermédiaires entre cette molécule et la formation des membres.

## 2.b Rétinoïdes et contrôle de la prolifération cellulaire

Les rétinoïdes ont un effet sur la régulation de la prolifération cellulaire mais leur rôle majeur réside dans une activité de différenciation cellulaire et tissulaire. L'effet des rétinoïdes a été étudié sur de nombreuses lignées cellulaires et plus particulièrement sur la lignée promyélocitaire humaine HL-60 qui se différencie en granulocytes après exposition à de l'ATRA (Breitman et al., 1980). Ce traitement affecte le taux d'expression de nombreux gènes de la machinerie cellulaire comme les hormones peptidiques (hormone de croissance, ocytocine...), les facteurs de croissance et leurs récepteurs (EGF, TGF, des interleukines et interférons...), des facteurs de transcription comme les homéoprotéines impliquées dans la morphogénèse, certaines enzymes (ornithine décarboxylase, alcool déshydrogénase...), des protéines de structure (constituants de la matrice extra cellulaire, stromélysine, collagénase, protéines de gap-junctions...). Tous ces éléments peuvent être impliqués dans les processus aboutissant à l'état différencié d'un type cellulaire (Gudas et al., 1994).

## 2.c Rétinoïdes et apoptose

L'apoptose (ou mort cellulaire programmée) est essentielle pour l'homéostasie cellulaire d'un organisme pluricellulaire. Ce processus très complexe aboutissant à l'élimination discrète d'un grand nombre de cellules est régulé par un nombre important de gènes dont la liste s'allonge chaque jour (Bousquet and Sarthou, 1995). Le rôle des rétinoïdes dans ce processus est encore mal compris et dépend du type cellulaire étudié mais les travaux de plus en plus nombreux montrent clairement leur implication.

## 2.d Rétinoïdes et pathologies

Par leur effet sur l'apoptose et la différenciation cellulaire, les rétinoïdes ont bénéficié de nombreux essais cliniques. Ces effets ont d'abord été mis à profit d'abord pour le traitement de maladies cutanées (acné sévère, psoriasis) avec un succès considérable puis testés dans le traitement de certains cancers. L'une des grandes réussites de la thérapie par les rétinoïdes est le traitement de la leucémie promyélocytaire aiguë (Degos, 1993). Depuis, ces molécules ont été testées sur d'autres tumeurs comme la leucémie chronique juvénile, les syndromes myélodysplasiques ou de Sézary où ils montrent des effets plus modestes (Koeffler et al., 1988; Wieselthier et al., 1990). Par contre, de bons résultats ont été obtenus dans le cas des carcinomes des cellules squameuses de la tête et du cou (Jetten et al., 1990). Les rétinoïdes montrent également des effets antiprolifératifs sur de nombreuses lignées cellulaires en culture justifiant la continuité des recherches (Pfahl et al., 1994). Ils ont donné également des résultats encourageants dans les traitements chimiopréventifs en augmentant sensiblement le taux de rémission ou l'arrêt de la progression des tumeurs malignes des voies orales.

## 3. Les rétinoïdes synthétiques

Les effets biologiques de l'ATRA et d'autres dérivés en ont fait des agents thérapeutiques prometteurs mais leur utilisation reste limitée principalement en raison de leur forte toxicité. De nouvelles molécules ont donc été développées dans l'espoir d'obtenir des dérivés plus actifs et

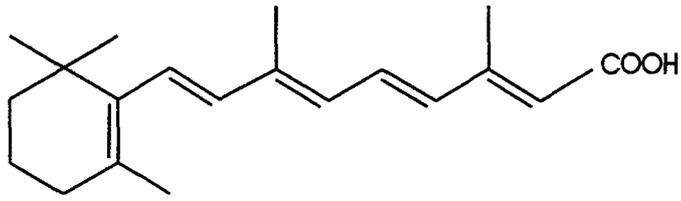
moins toxiques (Shudo and Kagechika, 1993). La molécule d'ATRA peut être divisée en trois parties : l'extrémité cyclique hydrophobe, la chaîne polyénique et le groupement polaire terminal. La modification systématique de chacune de ces parties a abouti à différentes classes de rétinoïdes (voir figure 5).

\* *Les rétinoïdes de première génération* proviennent de la modification de l'extrémité de la chaîne polaire latérale. Ces rétinoïdes se distinguent par la nature du groupement substituant (esters, amides, acides, aldéhydes, alcools ou éthers), par la longueur de la chaîne latérale et par le nombre et la position des doubles liaisons et des substituants méthyles. On trouve en particulier dans ce groupe l'acide 13-cis RA (isotrétinoïne) utilisé dans le traitement de l'acné.

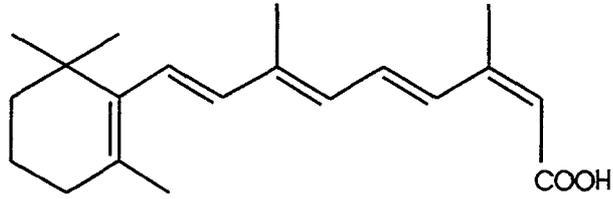
\* *Les rétinoïdes de seconde génération* sont obtenus par la substitution de l'extrémité cyclique par divers cycles ou hétérocycles substitués ou non. A ce groupe appartient l'étrétinate utilisé dans le traitement du psoriasis et des dermatoses kératinisantes.

\* *Les rétinoïdes de troisième génération* sont toujours en cours de développement. Ils regroupent les dérivés présentant différentes formes de cyclisation englobant l'ensemble ou une partie de la chaîne polyénique.

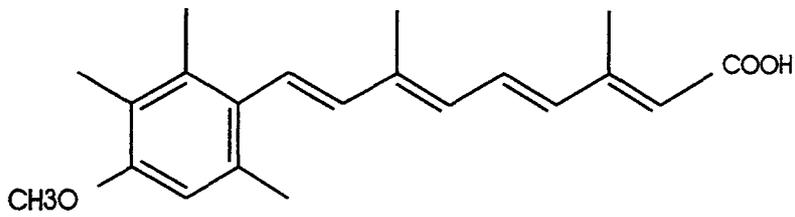
En plus des molécules présentant des effets thérapeutiques, le développement de ces divers rétinoïdes a abouti à la synthèse d'agonistes ou d'antagonistes spécifiques des différentes sous-classes de récepteurs  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  des RARs et RXRs (Delescluse et al., 1991; Martin et al., 1992; Lehmann et al., 1993; Apfel et al., 1992; Eyrolles et al., 1994). Ils constituent des outils essentiels pour la compréhension du mécanisme moléculaire d'action des récepteurs.



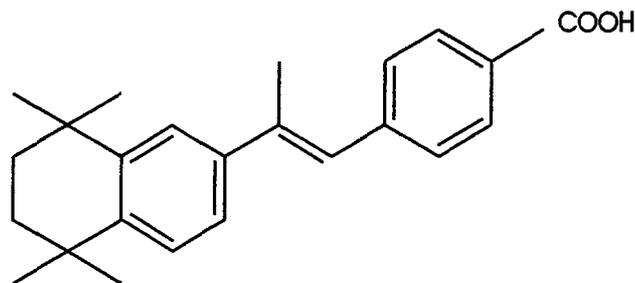
all-trans-RA



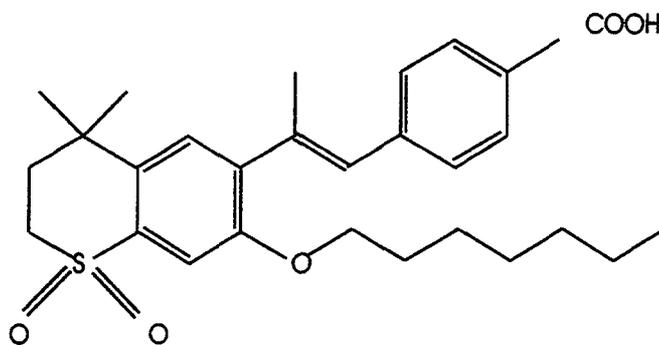
13 cis-RA



(ETRETINATE)  
TMMP



(AROTINOIDE)  
TNPB



Ro 41-5253  
(antagoniste)

Figure 5 : Structure de l'ATRA et de quelques rétinoïdes synthétiques

## II. RAR, RXR : DEUX FAMILLES DE RECEPTEURS AUX RETINOIDES.

### 1. RAR, RXR : découverte et structure.

Utilisant une technique de screening basée sur l'homologie de certaines régions dans la famille des récepteurs nucléaires, Giguère et al. et Petkovich et al. ont isolé simultanément un ADNc qui s'est avéré être un récepteur (hRAR $\alpha$ ) activable par l'ATRA à des concentrations physiologiques (de l'ordre de la nanomole/litre) (Giguère et al., 1987; Petkovich et al., 1987). Depuis, deux autres isoformes,  $\beta$  et  $\gamma$ , ont été caractérisées chez les mammifères, les oiseaux et les amphibiens. Cette diversité due à l'existence de trois isoformes est accrue par la présence de deux promoteurs pour chaque gène pouvant donner naissance à deux transcrits. Ils peuvent présenter eux-mêmes une certaine variabilité par épissage alternatif (Leid et al., 1992a) (voir figure 6).

En 1990, un deuxième type de récepteur activable par les rétinoïdes fut isolé. Ce récepteur différait suffisamment de la famille des RARs pour ne pas y être assimilé et fût dénommé RXR (Mangelsdorf et al., 1990). Comme précédemment, trois isoformes ont été caractérisées chez les mammifères, oiseaux et amphibiens. Ce récepteur a été initialement identifié par sa capacité à être activé par l'ATRA, propriété paradoxale, puisque ce récepteur ne lie pas cette molécule. Ce phénomène peut être toutefois expliqué par les fortes concentrations en ligand utilisées et les conversions métaboliques ATRA/9-cisRA existantes in vivo. Par des techniques de fractionnement en HPLC, le ligand des RXRs a été identifié comme étant le 9-cis RA (Heyman et al., 1992; Mangelsdorf et al., 1994).

Ces récepteurs, comme les autres membres de la famille des récepteurs nucléaires se composent de 6 domaines notés de A à F (Evans, 1988; Green and Chambon, 1988). Deux de ces domaines, C et E, sont essentiels pour leur fonction : le domaine C (DNA binding domain ou DBD) qui est le domaine de liaison à l'ADN et le domaine E (ligand binding domain ou LBD) qui est le domaine de fixation à l'hormone (voir figure 7). Ces deux 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 au ligand. Il intervient également dans la fixation de protéines nucléaires dénommées corépresseurs qui régulent l'activité transcriptionnelle des récepteurs. D'autres fonctions mettent en jeu plusieurs domaines à la fois comme la dimérisation impliquant les domaines C et E. La transactivation

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

Figure 6 : Les gènes des récepteurs aux rétinoïdes : Clonage et localisation chromosomique  
(Adapté à partir de Mangelsdorf et al., 1994 in THE RETINOIDS: Biology, Chemistry, and Medecine)

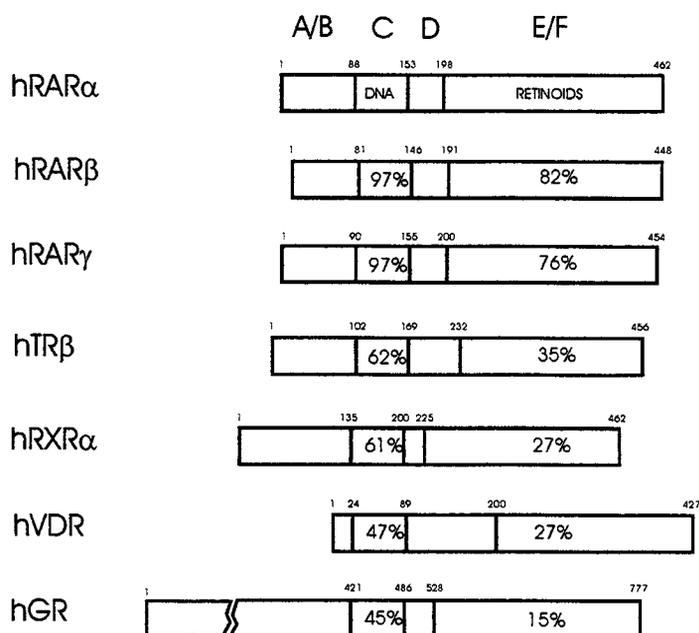


Figure 7 : Homologie de séquence des différents domaines de hRAR $\alpha$  avec ceux des autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires  
(Adapté à partir de Mangelsdorf et al., 1994 in THE RETINOIDS: Biology, Chemistry, and Medecine)

implique deux motifs, AF-1 et AF-2. L'un est localisé dans le domaine A/B; son activité est constitutive. L'activité du second, localisé dans le domaine E, est ligand dépendante. Le domaine F ne semble pas avoir de fonctions, il n'est d'ailleurs pas présent parmi tous les récepteurs, sauf dans le cas des récepteurs aux oestrogènes où il serait impliqué dans l'activité de liaison d'un ligand antagoniste (Montano et al., 1995).

## **2. RARs et RXRs : distribution tissulaire et invalidation génique.**

Les effets pléiotropiques des rétinoïdes peuvent être expliqués en partie par les profils d'expression des deux types de récepteurs aux rétinoïdes, RAR et RXR. Cette étude effectuée par des techniques d'hybridation in situ suggère un rôle précis pour chacune des isoformes.

Les différentes isoformes des RARs présentent un profil d'expression spécifique durant l'embryogénèse et la formation des membres. Ce dernier peut être exclusif ou chevauchant avec celui des RXRs, CRABP et CRBP. Dans le cas de l'embryon de souris, le RAR $\alpha$  est exprimé de façon ubiquitaire tandis que les RAR $\beta$  et  $\gamma$  montrent un profil d'expression plus restreint temporellement et spatialement. Ces deux isoformes ne montrent pas de profil chevauchant suggérant un rôle spécifique pour chacun d'eux. Chez l'adulte et l'embryon, le RAR $\gamma$  est exprimé de façon plus prépondérante dans la peau et les cartilages (Mangelsdorf et al., 1994).

Les études d'expression des différents RXRs ne révèlent pas de corrélation entre les isoformes des deux types de récepteurs. Cependant, alors que RXR $\beta$  et RAR $\alpha$  sont trouvés dans la plupart des tissus, RXR $\alpha$  et  $\gamma$  et RAR  $\beta$  et  $\gamma$  montrent un profil plus restreint. RXR $\alpha$  est présent majoritairement dans le foie, la rate, l'intestin et autres tissus viscéraux (Mangelsdorf et al., 1994).

Afin de mieux comprendre le rôle biologique des deux types de récepteurs et de chacune des isoformes, plusieurs laboratoires ont entrepris d'inactiver leur gène par recombinaison homologue. Plusieurs lignées de souris dépourvues des gènes codant pour toutes les isoformes du RAR $\alpha$  et  $\beta$  ont été créées. Contrairement aux résultats attendus, elles ne présentent pas ou peu de malformations et correspondent à un syndrome de déficience en vitamine A. Ces observations suggèrent un phénomène de redondance entre les différentes isoformes de récepteurs rendant difficile, par cette technique, l'identification précise de leur rôle. De la même manière, les isoformes du RXR $\alpha$  ont été inactivées. Les souris présentent des malformations au niveau de

l'oeil et du coeur qui deviennent plus graves pour les doubles mutants RAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  (Kastner et al., 1995).

L'identification des fonctions des isoformes a été également investie à l'aide de rétinoïdes spécifiques. Tajena et al. ont montré clairement que la différenciation des lignées cellulaires P19EC et F9 est induite par des isoformes différentes des RARs (Taneja et al., 1996). Ces expériences ouvrent un nouveau champ d'investigation pour la détermination du rôle des RARs.

## **B. DONNEES STRUCTURALES SUR LES RECEPTEURS**

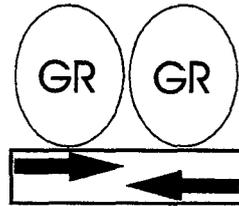
### **I. GENERALITES**

La régulation de l'expression des gènes par les récepteurs nucléaires nécessite plusieurs étapes dont la liaison au ligand et la fixation à l'ADN. Cette dernière s'effectue sur des séquences précises ( HRE : hormone responsive element) localisées dans la région promotrice des gènes cibles. La spécificité d'interaction récepteur/ADN est déterminée par deux domaines. Le DBD assure la reconnaissance spécifique des HREs mais la fixation nécessite également des interactions protéine/protéine impliquant le DBD et le HBD. Suivant la nature de l'HRE et du mode de dimérisation, on distingue plusieurs types de récepteurs (figure 8).

#### *\* les récepteurs de type I*

Ce type de liaison à l'ADN a été pour la première fois décrit pour les récepteurs aux glucocorticoïdes et aux oestrogènes puis a été étendu aux autres récepteurs stéroïdiens. Ces protéines lient l'ADN sous forme d'homodimère sur des HREs composés de deux séquences nucléotidiques palindromiques. Dans la cellule, ils sont associés à des protéines de choc thermique type hsp90 maintenant le HBD dans une configuration apte à lier le ligand. La fixation du stéroïde provoque la dissociation de ce complexe et les récepteurs peuvent alors fixer leur HRE (Gronemeyer, 1992).

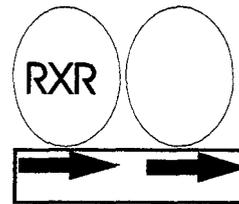
Type I  
Récepteurs Stéroïdiens



Homodimères

Palindromes

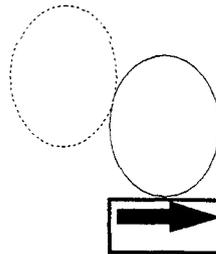
Type II  
Récepteurs des Rétinoïdes,  
de la Vitamine D, et  
des Hormones Thyroïdiennes,  
PPAR, NGFI-B,...



Hétérodimères

Répétitions Directes

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



Monomères

Demi-Sites

Figure 8 : Trois sous familles parmi les récepteurs nucléaires

### *\* les récepteurs de type II*

Plusieurs points diffèrent par rapport aux récepteurs de type I. Premièrement, ces récepteurs sont capables de se fixer sur l'ADN en absence de ligand sur des HREs composées, en général, de deux demi-sites en répétition directe. Deuxièmement, aucune interaction stable avec les protéines de choc thermique n'a été démontrée. Troisièmement, l'utilisation de la technique de gel retard a mis en évidence leur faible activité de liaison à l'ADN en comparaison des récepteurs de type I. Cette dernière peut toutefois être fortement augmentée en présence d'extrait cellulaire suggérant l'existence d'une protéine auxiliaire nécessaire à ce mécanisme. Cette protéine, appelée d'abord TRAP pour TR auxiliary protein, a été identifiée comme étant le RXR (Yu et al., 1991; Kliewer et al., 1992b; Zhang et al., 1992a; Leid et al., 1992b). On trouve en particulier dans cette série les récepteurs aux rétinoïdes, à la vitamine D et aux hormones thyroïdiennes.

### *\*les récepteurs de type III.*

C'est le cas de certains récepteurs orphelins comme Nurr-1 ou NGFI-B. Ces récepteurs se fixent sur des HREs composés d'un demi-site mais le RXR peut également s'hétérodimériser dans certains cas (Perlmann and Jansson, 1995).

## **II. RECEPTEURS AUX RETINOIDES ET LIAISON A L'ADN.**

### **1. Polymorphisme des HREs**

Pour les récepteurs non stéroïdiens, l'étude systématique des différents HREs a permis de définir une séquence consensus, AGG/TTCA, que l'on peut trouver sous la forme de répétitions directes (DR : direct repeat), de palindromes et de palindromes inversés. Ces trois types d'éléments de réponse reflètent les différents modes de liaison à l'ADN qui peuvent s'effectuer sous formes d'hétérodimères, d'homodimères et de monomères suivant les types de récepteurs.

Pour les RAREs et les RXREs, il est clair que les configurations les plus actives *in vivo* sont sous formes de répétitions directes séparées par deux ou cinq nucléotides pour les premiers

et d'un nucléotide pour les derniers (voir figure 9). Elles se sont montrées également les plus actives pour les récepteurs TRs et VDR sous la forme d'un DR4 et DR3 respectivement. Le DR5 est le motif le plus fréquemment retrouvé dans les séquences promotrices des gènes régulés par les rétinoïdes. On le trouve notamment dans les trois codants pour les isoformes des RARs (de Thé et al., 1990; Sucov et al., 1990). Le DR2, moins courant, a été notamment localisé en amont du gène codant pour la CRABP II et son activité semble, tout au moins dans ce cas, requérir la présence d'autres facteurs (Macgregor et al., 1992). Par la suite, d'autres RAREs ne se conformant pas à la structure en répétition directe ont été caractérisés. En général, ces types d'éléments de réponse sont plus permissifs pour les différents récepteurs nucléaires de type II et répondent de manière plus faible que les DRs cités précédemment. L'exemple le plus courant est le TRE palindromique (Glass et al., 1987; Umesono et al., 1988). Un palindrome inversé a été également caractérisé pour le promoteur du gène de la  $\gamma$ F-cristalline (Tini et al., 1993). En plus des DRs et des palindromes, on rencontre également une troisième classe d'HRE répondant aux rétinoïdes. Ils possèdent une configuration complexe, pouvant posséder une séquence très éloignée de la séquence consensus et qui sont apparemment orientés au hasard dans le promoteur. Un exemple est celui du promoteur du gène codant pour la chaîne moyenne de l'acyl coA déshydrogénase. Il comprend deux demi sites en palindrome inversé séparés par huit paires de bases et d'un troisième site en répétition directe avec le second motif (Carter et al., 1994).

Contrairement à l'hétérogénéité des RAREs, les RXREs liant les RXRs sous formes d'homodimères se trouvent exclusivement sous forme de DR1. Ce type d'élément de réponse a été trouvé dans les promoteurs des gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine A, des lipides et des acides gras (Mangelsdorf et al., 1991). Toutefois, les hétérodimères RAR/RXR peuvent lier ce type d'HRE avec une plus forte affinité que les homodimères RXR (Kurokawa et al., 1994). Le DR1 représente un cas unique par le fait qu'il active la réponse transcriptionnelle avec du RXR mais la réprime en présence de RAR (Mangelsdorf et al., 1991).

L'asymétrie présente dans les éléments de réponse de type DR suggère également une liaison asymétrique de l'hétérodimère. Par des expériences utilisant la création de chimères entre différents récepteurs nucléaires, deux groupes ont montré conjointement que, dans le cas d'un DR2 ou DR5, le RXR est en position 5' du demi-site. Dans le cas d'un DR1, le RXR se trouve en position 3' (Kurokawa et al., 1993; Predki et al., 1994; Zechel et al., 1994a; Zechel et al., 1994b). La répression de l'activité transcriptionnelle sur un DR1 par les hétérodimères

## Répétitions directes (DR)

RARE (DR5)	$\overrightarrow{\text{AGGTCAnnnnnnAGGTCA}}$ 5n
hRAR $\beta$ 2	AGGGTTCACCGAAAGTTCACT
mCP-H	GCAGGTCACTGACAGGGCATA
hADH3	AGGGGTCA TTCAGAGTTCA GT
mHox-1.6	CAGGTTACCGAAAGTTCAAG
RARE (DR2)	$\overrightarrow{\text{AGGTCAnnAGGTCA}}$ 2n
mCRBP1	GTAGGTCAAAAGGTCAGA
mCRABP11	CCAGTTCACCAGGTCAGG
RXRE (DR1)	$\overrightarrow{\text{AGGTCAnAGGTCA}}$ 1
rCRBP11	ACAGGTCACAGGTCACAGGTCACAGTTCA TT
hApoA1	GCAGGGCAAGGGTCAAG
cOVAL	TGGTGTCAAAGGTCAAA

## Palindromes

TRE pal	TCAGGTCATGACCTGA $\overleftarrow{\hspace{1.5cm}}$
xVitA2	TCAGGTCACAGT GACCTGA $\overleftarrow{\hspace{1.5cm}}$

## Palindromes inversés

RARE (ER8)	$\overleftarrow{\hspace{1.5cm}}$ 8n $\overrightarrow{\text{TGACCTnnnnnnnnnnAGGTCA}}$
$\gamma$ F-Crystalline	AGT GACCTTTTAAACCAGGTCAGTGA $\overleftarrow{\hspace{1.5cm}}$ $\overrightarrow{\hspace{1.5cm}}$

## HREs Complexes

hMCAD	ATTGACCTTCTCTCCGGGTAAAGGTGAAG $\overleftarrow{\hspace{1.5cm}}$ $\overrightarrow{\hspace{1.5cm}}$
rGH	AAAGGTAA GATCAGGGACGTGACCGCA $\overleftarrow{\hspace{1.5cm}}$ $\overrightarrow{\hspace{1.5cm}}$
mLamb1	GAGGTGAGTCAGGTAA . . (13n) . . GGGTCAAC $\overleftarrow{\hspace{1.5cm}}$ $\overrightarrow{\hspace{1.5cm}}$

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, ApoA1 : Apolipoprotéine A1, 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

RAR/RXR est liée à cette inversion de polarité (Kurokawa et al., 1994).

## 2. Spécificité de la liaison aux HREs

Le DBD seul est responsable de la fixation et de la spécificité d'interaction aux HREs. Ce mécanisme de reconnaissance est en étroite liaison avec la dimérisation. Ce domaine est très conservé, en particulier huit cystéines présentent chez tous les membres de la famille des récepteurs nucléaires et responsable de la conformation particulière de cette région. Elles sont impliquées dans une liaison de coordination tétraédrique avec deux atomes de zinc induisant un repliement dit en doigts de zinc (Hard et al., 1990; Schwabe et al., 1990; Freedman et al., 1988). Les données structurales obtenues par RMN et cristallisation ont permis de montrer que ce domaine possède en fait une structure globulaire, à l'intérieur de laquelle chaque doigt forme une hélice  $\alpha$  disposée perpendiculairement par rapport à l'autre. Le motif C1 du premier doigt de zinc se loge dans le grand sillon de l'ADN alors que le motif C2 est dans l'axe de la double hélice (Luisi et al., 1991). L'étude par mutagenèse dirigée de ce domaine globulaire a permis de définir précisément le rôle de plusieurs régions dans ce processus. Ces dernières, appelées boîtes, sont déterminantes soit pour l'interaction avec l'ADN (boîtes P, T, A, H), soit dans la dimérisation (boîtes D et DR) (voir figure 10).

### *2.a. interactions avec l'ADN*

**\*boîte P** : Cette boîte, constituée de trois aminoacides localisés dans le doigt C1, est responsable de la spécificité d'interaction avec les HREs (Green et al., 1988). Ainsi, il est possible de convertir un récepteur aux glucocorticoïdes en un récepteur liant les EREs en remplaçant les trois aminoacides du GR par ceux de l'ER. Inversement, les ER peuvent lier les GREs par substitution leur boîte P par celle du GR (Mader et al., 1989).

Les boîtes P des différents récepteurs peuvent être regroupées en différentes classes suivant leurs degrés d'homologie :

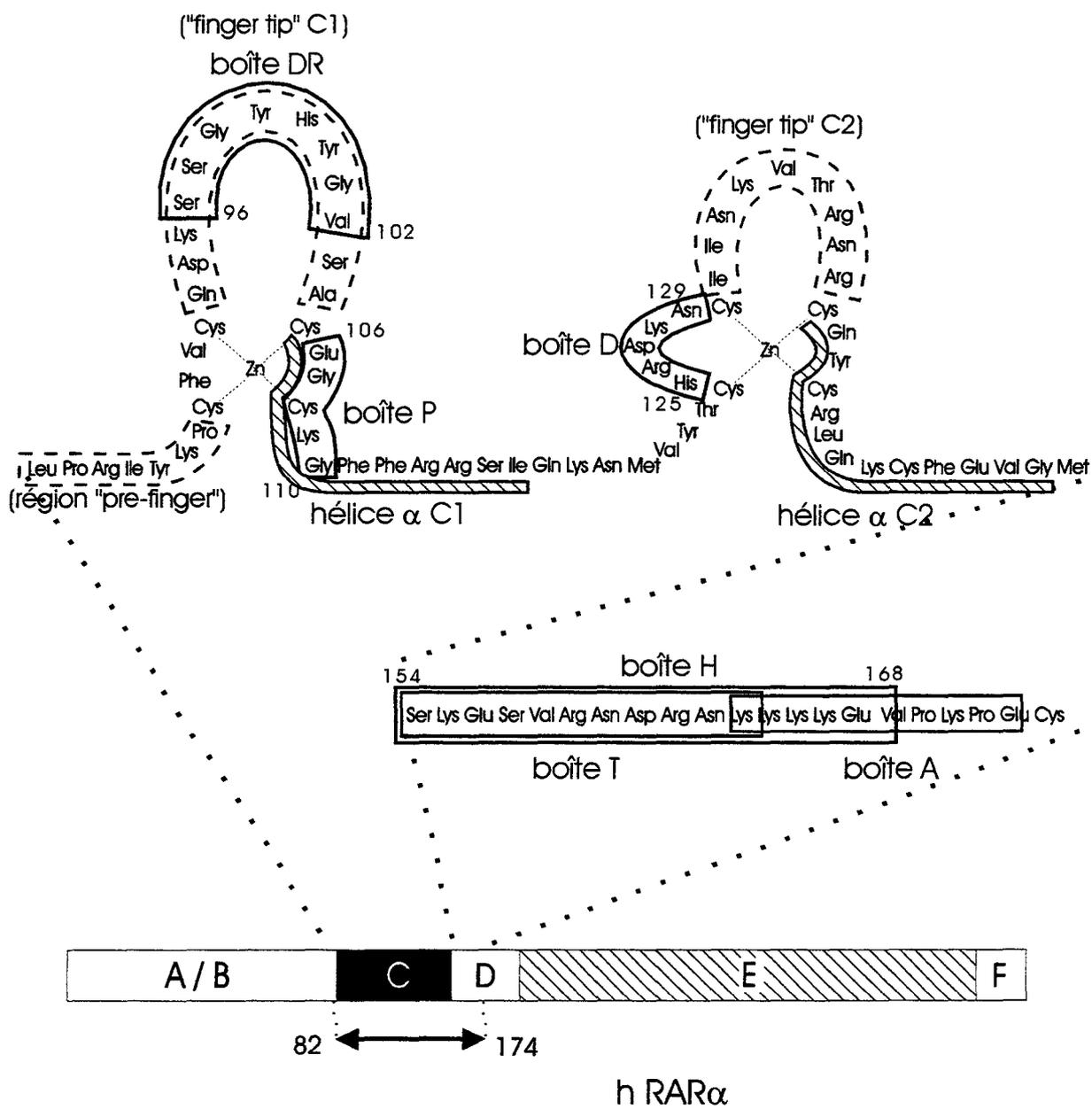


Figure 10 : Structure du domaine de liaison à l'ADN du RAR $\alpha$  humain

cys- <u>gly-ser</u> -cys-lys- <u>val</u>	GR, MR, AR, PR
cys- <u>gln-gly</u> -cys-lys- <u>ala</u>	ER
cys- <u>gln-gly</u> -cys-lys- <u>gly</u>	TR, VDR, RAR, RXR.

**\*boîte T** : L'étude des domaines de liaison à l'ADN des récepteurs RAR $\beta$  et RXR $\alpha$  obtenue par RMN confirme le fort degré d'homologie avec le GR. Cependant, une troisième hélice  $\alpha$  a été mise en évidence dans le cas des RXRs dans la région N-terminale du domaine D (Katahira et al., 1992; Lee et al., 1993). Cette partie est impliquée dans la formation des hétérodimères RXR mais également dans l'interaction de ces récepteurs avec l'ADN (Lee et al., 1993).

**\*La boîte A** : La boîte A a d'abord été identifiée pour le récepteur orphelin NGF1-B au niveau de la partie C-terminale du DBD (Wilson et al., 1992). Elle intervient dans la reconnaissance des bases situées en amont de l'élément de réponse. La présence de cette région n'a pas encore été confirmée et si elle joue un rôle pour tous les membres de la super famille. Dans le cas du GR et de l'ER, elle ne possède pas de structure précise et ne montre pas de rôle dans l'interaction avec l'ADN (Hard et al., 1990; Schwabe et al., 1993). Pour le TR $\beta$  et RXR $\alpha$ , elle intervient dans la reconnaissance des HREs. Ainsi, des mutations ponctuelles dans cette région sont capables d'abolir la liaison d'un homodimère T3R à un DR4 et à un palindrome inversé de type 5. Ces mêmes mutations affectent l'affinité de l'hétérodimère TR/RXR pour un DR4 et de façon moindre pour un TRE<sub>pal</sub> (Kurokawa et al., 1993). Les mutations sur la boîte A du RXR affectent également le comportement de l'hétérodimère TR/RXR (Kurokawa et al., 1993). L'importance de cette région a été confirmée par les données cristallographiques obtenues sur le TR/RXR complexé à un TRE (Rastinejad et al., 1995). Les résidus basiques de cette hélice interagissent avec le petit sillon de l'ADN, en amont du site, et sont impliqués dans la stabilisation de l'interaction et dans le positionnement d'un récepteur dans l'hétérodimère.

**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 et ceci probablement par une interaction avec le petit sillon de l'ADN (Predki et al., 1994).

## *2.b interactions protéines/protéines*

\*La boîte D : Les études par mutagenèse dirigée sur le GR et l'ER ont permis de définir une région localisée entre les deux premières cystéines du doigt de zinc C2 affectant considérablement les propriétés de dimérisation des récepteurs (Umesono and Evans, 1989). Cette région est très conservée parmi les récepteurs nucléaires et les données sur l'ER et le GR ont permis de montrer une interaction entre les boîtes D de chaque récepteurs sur un palindrome.

\*La boîte DR : L'existence d'une liaison coopérative et asymétrique des hétérodimères RAR/RXR sur les DRs à espacement variable suggère la présence d'une interface d'hétérodimérisation multiple. Cette région, appelée boîte DR, a été localisée dans la boucle du doigt C1 du RAR tandis que pour le TR, elle se situe dans la partie N-terminale du domaine A/B. Elle intervient notamment dans le cas des RARs pour la liaison sur un DR5 (Perlmann et al., 1993). Pour un DR2, la dimérisation met en jeu d'autres interfaces en réponse au moindre espacement entre les deux sites. Elle comprend la boucle du doigt C2 (sauf la boîte D) du RXR et la partie C-terminale du DBD du RAR définie comme la boîte T (Zechel et al., 1994a; Zechel et al., 1994b) (voir figure 11).

Ainsi, la combinaison de l'ensemble de ces interactions, soit protéine/protéine, soit protéines/ADN, permettent la liaison coopérative et sélective aux différents éléments de réponse.

## **III.LE DOMAINE DE LIAISON AU LIGAND**

La structure du domaine de liaison au ligand est restée longtemps obscure jusqu'à ce que l'équipe de Dino Moras cristallise le RXR $\alpha$  (sans ligand : apo-RXR) et le RAR $\gamma$  avec le ligand naturel, l'ATRA (avec ligand : holo-RAR)(Bourguet et al., 1995; Renaud et al., 1995). Le TR $\alpha_1$  a été également cristallisé avec son ligand (Wagner et al., 1995). Ce domaine est impliqué dans plusieurs fonctions essentielles qui sont la liaison au ligand, la dimérisation et la transactivation ligand dépendante.

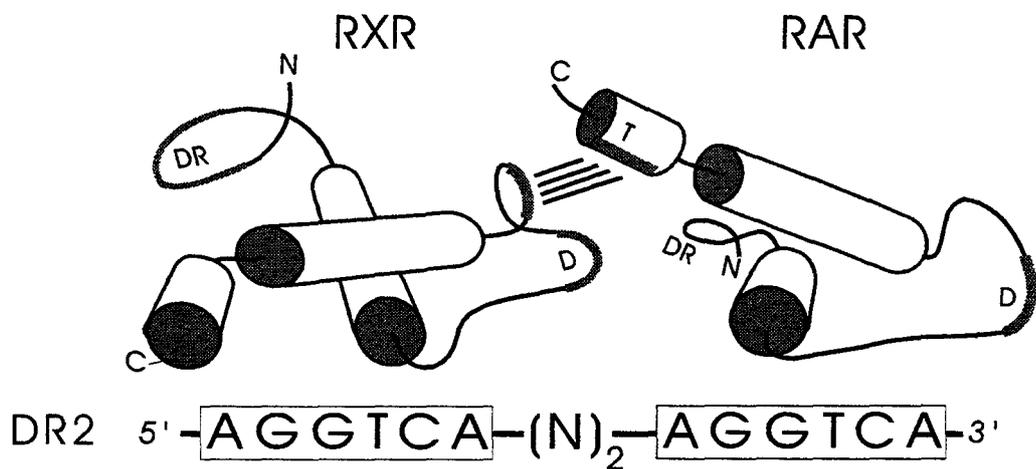
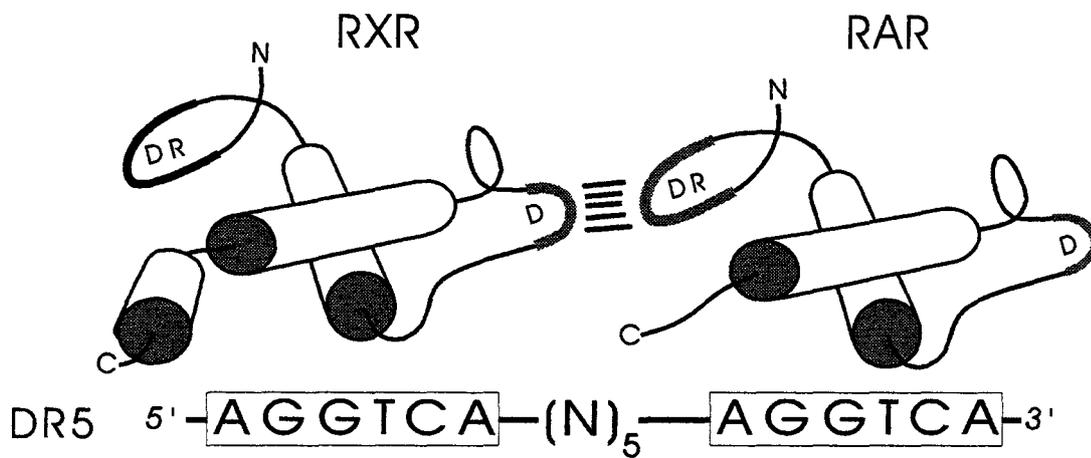


Figure 11 : Interface de dimérisation des complexes RXR/RAR sur les éléments de réponse type DR5 et DR2 (d'après Zechel et al., 1994)

## 1. Apo-RXR/Holo-RAR : le ligand induit un changement de conformation.

Le changement de conformation induit par la liaison au ligand a été mis en évidence pour les récepteurs nucléaires essentiellement par deux techniques : la protéolyse limitée et l'immunoprécipitation. Ces deux techniques sont basées sur le découvrément ou le masquage de certaines parties de la protéine aboutissant soit à une résistance du HBD à la digestion par certaines protéases (la trypsine par exemple) ou la perte des propriétés immunoprécipitantes d'un anticorps donné par masquage de son épitope.

La structure du RXR $\alpha$ , premier récepteur à avoir été cristallisé, est dite en "sandwich d'hélices  $\alpha$  antiparallèles". Elle est organisée en trois couches successives avec les hélices H4, H5 et H8 en position centrale, au premier plan les hélices H1, H2 et H3 et en troisième plan les hélices H7, H10 et H11 (voir figure 12). Cette structure possède également deux feuillets  $\beta$ , S1 et S2, également localisés dans la partie centrale. Neuf régions en structure hélicoïdale et contenant des résidus hydrophobes (leucine et méthionine) appelées "heptad repeat" sont réparties le long de ce domaine et interviennent dans la stabilisation de cette structure (Bourguet et al., 1995).

Malgré une organisation tridimensionnelle voisine, l'holo RAR $\gamma$  présente quelques différences significatives (Renaud et al., 1995). Au niveau de l'aspect général, l'holo-RAR $\gamma$  apparaît beaucoup plus compact, phénomène qui est dû à une réorganisation spatiale de certaines parties du domaine de liaison au ligand :

- \*L'hélice H12, qui porte la région transactivatrice AF2, ne se trouve plus à l'extérieur de la protéine mais vers le corps central du récepteur.

- \*L'hélice H3 se trouve dans ce cas dirigée également vers la partie centrale du récepteur.

- \*La boucle  $\Omega$ , localisé dans le cas de l'holo-RXR vers l'extérieur de la protéine, est maintenant en dessous de l'hélice H6.

- \*Le coude  $\beta$  est maintenant tourné vers la surface de cette structure.

- \*L'hélice H11 est inclinée vers l'extérieur.

Toutefois, les différentes structures cristallines obtenues suggèrent un repliement commun à tous les récepteurs et que les changements conformationnels observés soient dus essentiellement à la fixation du ligand. Cette hypothèse est étayée par les deux techniques citées

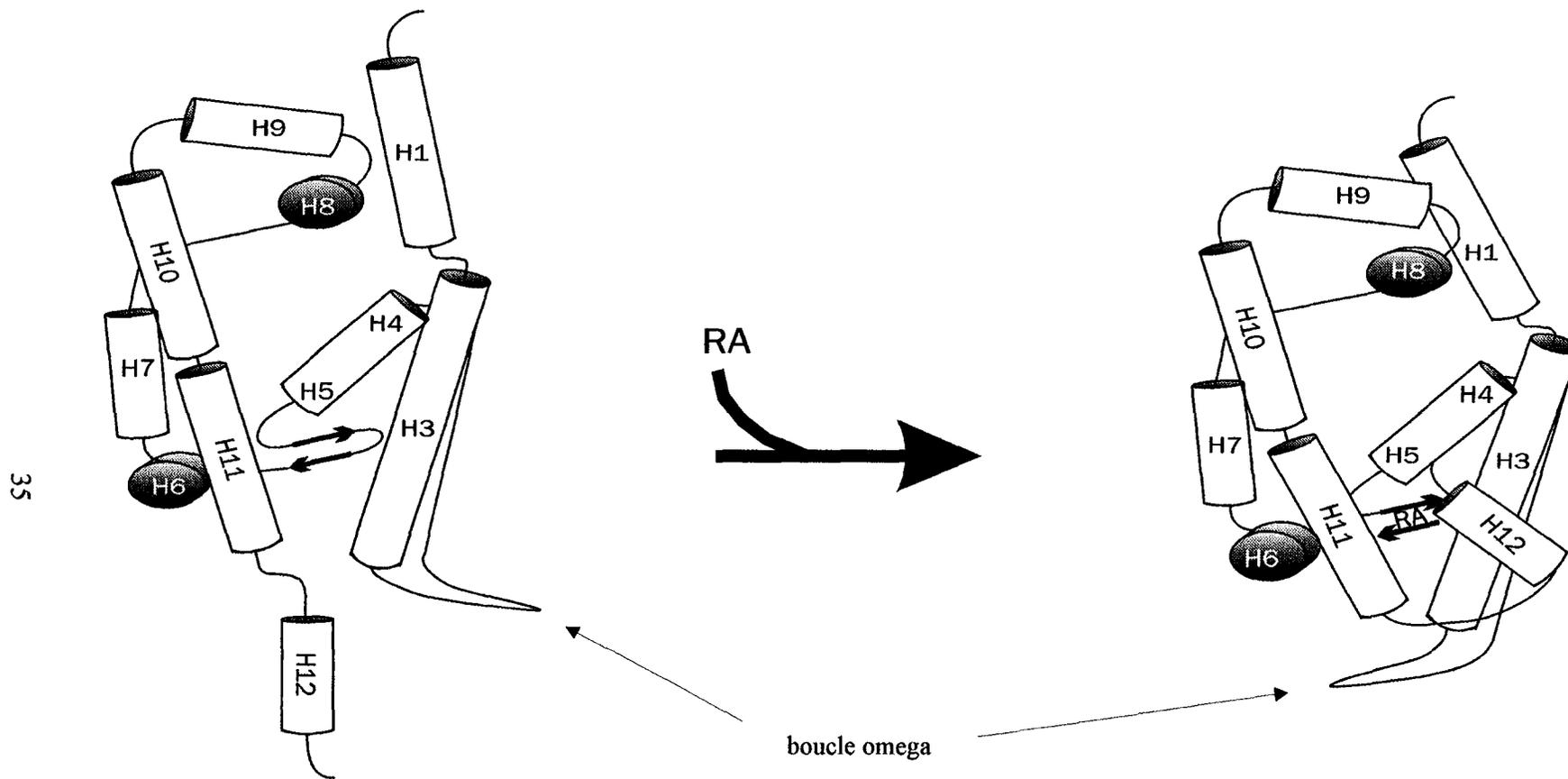


Figure 12 : modèle représentant le changement de conformation induit par l'ATRA au niveau du HBD des RARs

précédemment et notamment par l'utilisation de certains anticorps. En particulier, un anticorps dirigé contre la boucle  $\Omega$  du RAR perd ses propriétés immunoprécipitantes après la fixation du ligand, indiquant une modification dans l'organisation spatiale de cette région (Driscoll et al., 1996). Ce type d'expérience a été également réalisé sur certains récepteurs stéroïdiens avec des anticorps dirigés contre la partie C-terminale du HBD avec le même type de résultat (Weigel et al., 1992).

## 2. le site de liaison au ligand

L'étude cristallographique du RAR $\gamma$  avec son ligand naturel, l'ATRA, a permis également d'identifier son site de liaison. La molécule est logée dans une poche hydrophobe délimitée par les hélices H1, H3, H5, H11 et H12, le coude $\beta$  et les boucles localisées entre les hélices H6/H7 et H11/H12. La partie cyclique de l'ATRA est localisée vers la boucle H11/H12 et l'hélice H12. L'interaction ligand/récepteur est stabilisée essentiellement par des liaisons hydrogènes ou des interactions de Van der Waals (Renaud et al., 1995). Les différents aminoacides pouvant intervenir dans la liaison pour le RAR $\gamma$  sont représentés sur la figure 13.

La contribution des différentes parties du HBD et de certains aminoacides dans l'interaction a été également étudiée par les techniques de mutagenèse, en particulier sur le TR et les RARs. Les études de mutagenèse par délétion ont permis de délimiter plus précisément la partie de la protéine nécessaire à l'interaction et surtout de vérifier la contribution respective des parties N et C-terminale du récepteur incluant respectivement les hélices H1 et H12. Dans le cas du RAR $\alpha$  et du TR $\beta$ , la délétion de l'hélice H1 abolit la liaison au ligand naturel (Lin et al., 1991; Lefebvre et al., 1995). Cependant, aucune mutation ponctuelle affectant l'affinité de l'interaction ligand/récepteur n'a pu être identifiée dans cette région. Elle semble donc être impliquée dans le maintien de la structure tridimensionnelle du HBD plutôt que dans une interaction directe avec le ligand. Le même type d'étude a été réalisé sur la partie C-terminale du récepteur comprenant la boucle H11/H12 et l'hélice H12. Des délétions ont pu être réalisées jusqu'en aval de l'hélice H11 (proline 403) n'affectant que très faiblement la liaison au ligand naturel (Lefebvre et al., 1995; Tate and Grippo, 1995). Toutefois, certaines mutations ponctuelles dans cette partie peuvent modifier considérablement les propriétés de liaison de certains ligands synthétiques. Ces résultats seront développés plus amplement dans la seconde

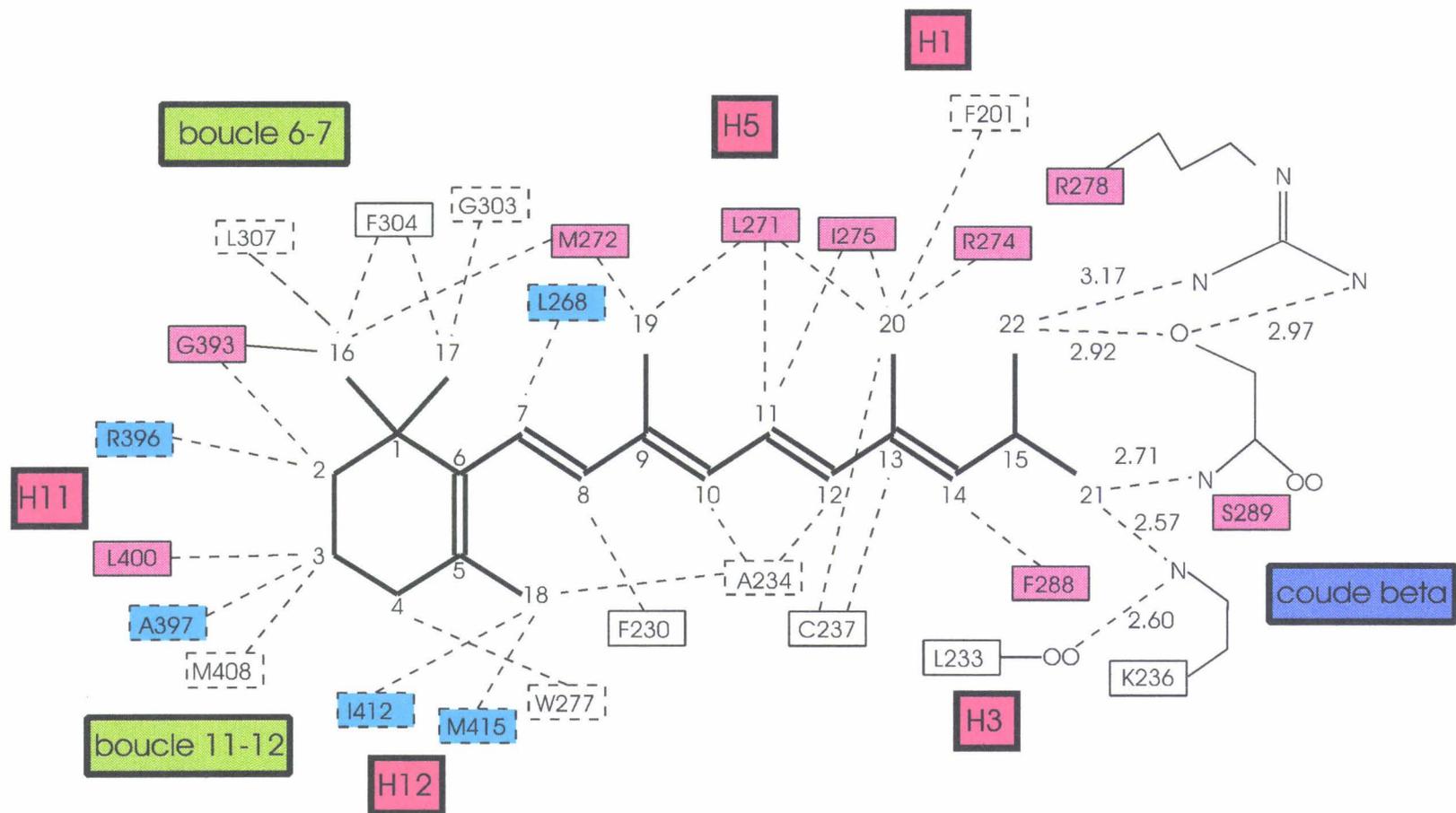


Figure 13 : Représentation schématique des interactions de Van der Waals et hydrogènes possibles entre le RAR gamma et l'ATRA (d'après Renaud et al. , 1995)

partie de ce mémoire car elles font partie des connaissances acquises au cours de ce travail. Nous pouvons également noter l'existence d'un sous type de RXR chez le poisson zébre. Ce récepteur possède une insertion supplémentaire de quatorze aminoacides au niveau C-terminal de la boucle entre H6 et H7 et ne lie pas le 9-cis RA (Jones et al., 1995).

A ce jour, aucune mutation ponctuelle affectant les fonctions biologiques induites par les rétinoïdes n'a pu être détectée. Ceci s'explique probablement par la redondance fonctionnelle présentée par ces récepteurs. Toutefois, certains auteurs en se basant sur l'homologie existante entre les membres de la super famille comme le TR ont transposé les mutations au niveau des RARs (voir figure 14). Ainsi, plusieurs résidus impliqués dans l'interaction ligand/récepteur ont pu être identifiés. Saitou et al. ont pu caractériser une mutation ponctuelle affectant l'interaction ATRA/récepteur. La mutation de la glycine 303 du RAR $\alpha$ , localisée au niveau de la boucle H6/H7, en acide glutamique entraîne une réduction considérable de l'affinité (Saitou et al., 1994). Avec la même méthodologie, deux autres mutations ayant le même effet ont été décrites. Elle concerne deux acides aminés chargés, la lysine 211 et l'arginine 260 du RAR $\beta$ . Le premier est localisé dans l'hélice H3 et le deuxième au niveau de la boucle H5/H6 mais très proche de la fin de l'hélice H5. La mutation en alanine entraîne une perte d'affinité de cinq fois pour la lysine 211 et de dix fois pour l'arginine 260. La double mutation augmente cette dernière d'un facteur six cents (Yu et al., 1994). Cet effet est considérablement augmenté par une substitution en glutamine, résidu polaire (30 fois pour la lys 220, 700 fois pour l'arg 269 et supérieur à 1000 pour la double mutation) (Tairis et al., 1995). Le résidu équivalent sur le RAR $\alpha$ , qui est l'arg 276, substituée en glycine ou alanine montre également cet effet pour l'ATRA mais aussi pour d'autres ligands synthétiques. D'après la structure cristallographique, il semble que cet acide aminé ainsi que l'arginine 272 jouerait un rôle dans le guidage électrostatique du ligand. Plusieurs autres mutations concernant les arginines et les cystéines du HBD et montrant une réduction de l'affinité ont été décrites. On trouve en particulier l'arginine 394 qui, mutée en glycine, sérine, alanine ou acide glutamique perturbe profondément la liaison ligand/récepteur pour l'ATRA et d'autres ligands. Ce résidu est localisé sur l'hélice H11. Il est proche du cycle de l'ATRA et interagit probablement avec la partie cyclique des ligands. Cette hypothèse est étayée par la mutation de l'alanine 397 du RAR $\gamma$  en thréonine qui montre une réduction faible de l'affinité et ceci probablement par une perturbation de la position spatiale de l'arginine 396 du RAR $\gamma$  (Lamour et al., 1996). La mutation des cystéines du HBD n'entraîne pas de modification

**H1**

hRAR $\alpha$	156	ESVRNDRNKK	KKEVPKPECS	ESYTL	TPEVG	ELIEKVRKAH	QET	FPALCQL
hRAR $\beta$	149	ESVRNDRNKK	KKETSKQECT	ESYEM	TAELD	DLTEKIRKAH	QET	FPSLCQL
hRAR $\gamma$	158	EAVRNDRNKK	KKEVKEEGSP	DSYEL	SPOLE	ELITKVSKAH	QET	FPSLCQL

**H3**

hRAR $\alpha$	206	GKYTTNNSSE	QRVSLD	IDLW	DKFSEL	STKC	IIK	TVEFAKQ	LPGFT	TLTIA
hRAR $\beta$	199	GKYTTNNSAD	HRVRLD	LGLW	DKFSEL	ATKC	IIK	TVEFAKR	LPGFT	GLTIA
hRAR $\gamma$	208	GKYTTNNSAD	HRVQLD	LGLW	DKFSEL	ATKC	IIK	TVEFAKR	LPGFT	GLSIA

		<b>H4</b>		<b>H5</b>				<b>H6</b>	
hRAR $\alpha$	256	DQITLLKAAC	LDILIL	RRICT	R	RYTPEQDTMT	FSDGLTLN	R	QMHNAGFGPL
hRAR $\beta$	249	DQITLLKAAC	LDILIL	RRICT	R	RYTPEQDTMT	FSDGLTLN	R	QMHNAGFGPL
hRAR $\gamma$	258	DQITLLKAAC	LDILML	RRICT	R	RYTPEQDTMT	FSDGLTLN	R	QMHNAGFGPL

*hr1*

		<b>H7</b>		<b>H8</b>				<b>H9</b>	
hRAR $\alpha$	306	TDLVFAFANQ	LLPLEMD	DAE	TGLLSAICLI	CGDRQDLEQ	P	DRVDMLOEPL	
hRAR $\beta$	299	TDLVFTFANQ	LLPLEMD	DTE	TGLLSAICLI	CGDRQDLEE	P	TKVDKLOEPL	
hRAR $\gamma$	308	TDLVFAFAGQ	LLPLEMD	DTE	TGLLSAICLI	CGDRMDLEE	P	EKVDKLOEPL	

*hr2*   *hr3*   *hr4*   *hr5*   *hr6*   *hr7*

				<b>H10</b>		<b>H11</b>					
hRAR $\alpha$	356	LEALKVYVRK	RRPSRPH	MFP	KMLMKITDLR	SISAK	GAE	R	ITLKM	E	IPGS
hRAR $\beta$	349	LEALKIYIRK	RRPSKPH	MFP	KILMKITDLR	SISAK	GAE	R	ITLKM	E	IPGS
hRAR $\gamma$	358	LEALRLYARR	RRPSQPY	MFP	RMLMKITDLR	GISTK	GAE	R	ITLKM	E	IPGS

*hr8*   *hr9*

**H12**

hRAR $\alpha$	406	MP	PLIQEMLE	NSE
hRAR $\beta$	400	MP	PLIQEMLE	NPE
hRAR $\gamma$	408	MP	PLIREMLE	DQE

**AF-2**

Figure 14 : Organisation fonctionnelle du HBD des RARs et principales mutations affectant la liaison au ligand (□)

de l'interaction pour le ligand naturel excepté la cystéine 265, localisée au niveau de l'hélice H5, et pour laquelle on observe une légère diminution de l'affinité. Cet effet est considérablement augmenté par la double mutation des cystéines 265 et 274 en glycine et ceci probablement par la perturbation de la position spatiale des résidus hydrophobes de l'hélice H5 pouvant potentiellement interagir avec le ligand (Lamour et al., 1996).

En raison des différences de structure entre les différents rétinoïdes, une question s'est très vite posée : est-ce que la position des différents rétinoïdes dans la poche hydrophobe et l'importance des différents aminoacides étaient la même ? Une première expérience en protéolyse limitée a en effet révélé des différences de profil de résistance pour l'antagoniste Ro41-5253 par rapport à l'ATRA (Keidel et al., 1994). Cette approche indirecte montre que la modification dans le changement de conformation induit par le ligand pourrait être due en partie à des interactions différentes avec les aminoacides du site de liaison. Cette technique a été étendue par la suite à d'autres ligands agonistes ou antagonistes sans toutefois révéler des différences de profil. Certaines mutations ponctuelles décrites précédemment ont été testées avec différents rétinoïdes (Lamour et al., 1996). C'est le cas des arginines 272, 276 et 394 qui montrent également une perte d'affinité pour tous les ligands testés indiquant de ce fait des interactions communes avec certains aminoacides impliqués dans la liaison au ligand naturel. Toutefois, certaines mutations affectent uniquement la liaison à certains ligands synthétiques (Lamour et al., 1996). C'est le cas de la cystéine 235 du RAR $\alpha$  qui, quand elle est substituée par une glycine, montre uniquement une réduction d'affinité pour les ligands antagonistes de structure voisine du Ro41-5253. Elle est localisée au niveau de l'hélice H3 et perturbe probablement l'interaction avec la chaîne hydrophobe commune à ces antagonistes. On trouve également une modification de la liaison des antagonistes pour l'arginine 217 et 294 pour lesquelles on observe une augmentation de l'affinité. Elles sont situées respectivement au début de l'hélice H3 et H6.

Un défi dans l'industrie pharmaceutique ces dernières années a été de développer des ligands spécifiques de chaque isoforme de RARs. En effet, malgré le fort pourcentage d'homologie entre les HBD des différents sous types, il a été possible d'obtenir des ligands montrant une forte sélectivité de liaison et d'activité de transactivation pour un sous type de récepteur donné. Le groupe de Peter Reczek s'est particulièrement investi dans cette problématique. Par des expériences élégantes utilisant la création de chimères entre le RAR  $\alpha$

et  $\beta$ , les auteurs ont pu localiser une région de 70 aminoacides en N-terminal du HBD impliquée dans l'interaction spécifique avec certains ligands. Basé sur les différences de structure primaire de cette région, ils ont pu par la suite identifier les acides aminés responsables. Il s'agit de la serine 232 et de la thréonine 239 du RAR $\alpha$  correspondant respectivement à l'alanine 225 et l'isoleucine 232 du RAR $\beta$ . Ces aminoacides sont localisés sur l'hélice H3 (Ostrowski et al., 1995).

Aux vues de ces résultats, il est clair que l'interaction des différents ligands dans la poche hydrophobe s'effectue de manière spécifique, en particulier lorsque l'on compare les ligands agonistes et antagonistes. Peu de mutations présentant des différences d'affinité entre différents agonistes ont été décrites, excepté pour la région 403/410 (voir partie résultats). Elles peuvent, comme nous le verrons par la suite, expliquer en partie les différences d'activité de transactivation de ces ligands.

### **3. Interface de dimérisation**

En plus de l'interface de dimérisation (boîtes D et DR) localisée dans le DBD, il en existe une autre située dans le domaine de liaison à l'hormone. La présence de cette dernière suggère que le DBD soit capable d'effectuer une rotation de 180 degrés par rapport à cette dernière, ce qui permettrait aux récepteurs de se fixer sous forme de dimère à la fois sur les DRs, les palindromes et les palindromes inversés (voir figure 15).

Deux régions localisées dans le HBD sont impliquées dans ce processus. L'une de ces régions, appelée Ti pour "inhibiteur de transcription" est très conservée parmi les récepteurs nucléaires (Forman and Samuels, 1990). Elle est localisée dans la partie N-terminale de l'HBD et correspond à l'heptade 1. Plusieurs mutations effectuées sur cette région inhibent la capacité du TR à former des homo ou hétérodimères sans affecter la liaison à l'hormone (O'Donnell et al., 1991; Lee et al., 1992; Rosen et al., 1993). Cette région est également essentielle pour la dimérisation du VDR, des RARs et du RXR $\beta$  (Rosen et al., 1993). On trouve une deuxième région impliquée dans ce mécanisme. Elle est localisée dans la partie C-terminale du HBD et comprenant la 9ème heptade et les régions environnantes (Forman et al., 1989). Plusieurs mutants affectant les processus de dimérisation dans cette partie du récepteur ont été identifiés. C'est le cas des lysines 360 et 365 et de la valine 361 du RAR $\alpha$ . Ces aminoacides ne sont pas

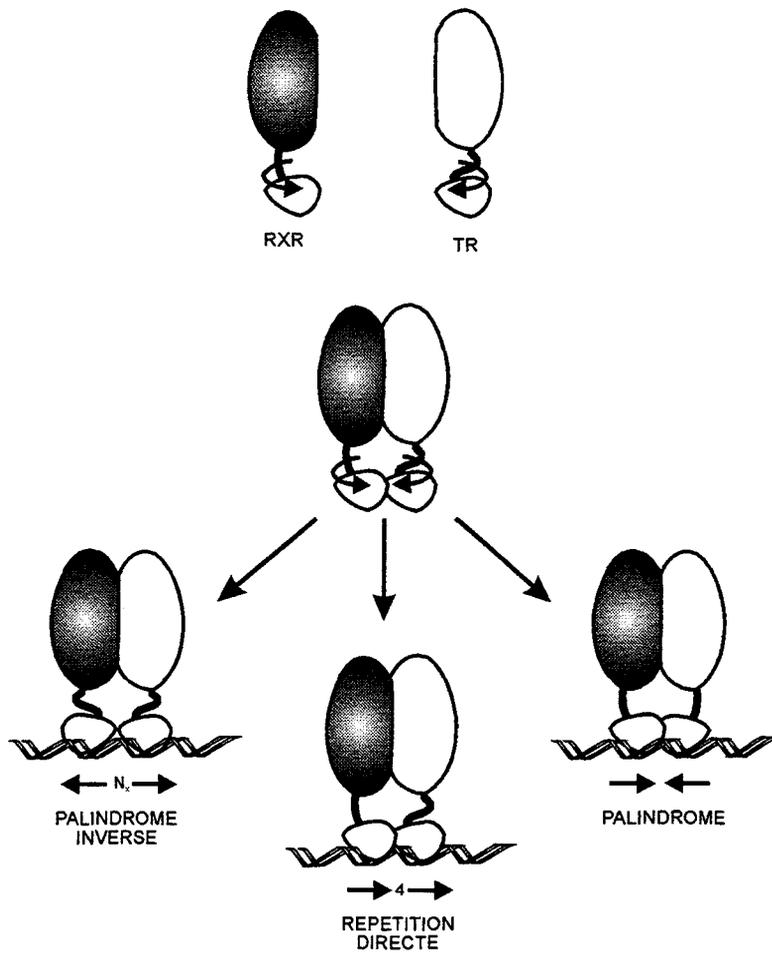


Figure 15 : Modèle de liaison d'un hétérodimère à des éléments de réponse organisés en répétition directe, en palindrome ou en palindrome inversé.

(Adapté à partir de Glass, 1994)

impliqués de la même façon dans l'homo ou l'hétérodimérisation. Alors que la lysine 360 contribue de la même manière dans les deux mécanismes, la valine 361 et la lysine 365 montre une implication plus importante dans l'homodimérisation (Rachez et al., 1996). La contribution de cette région a été également confirmée par la cristallographie d'un homodimère RXR $\alpha$ . L'interaction entre les deux sous unités implique les hélices H9 et H10 correspondantes aux heptades 8 et 9 et fait intervenir essentiellement des résidus acides et basiques (Bourguet et al., 1995). Certains aminoacides hydrophobes du TR et du RAR de l'heptade 9 ont été mutés et empêchent préférentiellement la formation des hétérodimères en affectant pas ou peu celle des homodimères (Aufliegner et al., 1993). De manière surprenante, l'activité de dimérisation de certains mutants peut être restaurée en présence de ligand suggérant que les changements de conformation dus à la liaison au ligand puissent influencer la dimérisation et réciproquement. Nous verrons par la suite que les relations existantes entre ces deux processus jouent un rôle essentiel dans la modulation de l'activité transcriptionnelle par les récepteurs aux rétinoïdes et autres appartenant au type II.

## **C. REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES PAR LES RECEPTEURS AUX RETINOIDES.**

La régulation de la transcription par les récepteurs aux rétinoïdes est un processus multifactoriel dans lequel le ligand joue un rôle prépondérant et ceci notamment par le changement de conformation qu'il induit sur ces récepteurs. Ce mécanisme est à l'origine :

\* Du déplacement d'une protéine liant les récepteurs au niveau de la partie C-terminale du domaine D et responsable de la répression de la transactivation en absence de ligand.

\* De la formation d'une nouvelle interface d'interaction au niveau du HBD permettant le recrutement de protéines apparemment impliquées dans l'activation transcriptionnelle.

\* D'une régulation de l'activité de dimérisation par le ligand et réciproquement.

\* De la liaison des hétérodimères RAR/RXR sur leur élément de réponse dans le contexte de la chromatine, tout au moins pour certains promoteurs.

Nous allons développer dans cette partie les différents mécanismes permettant d'aboutir à l'activation de la transcription.

## **I. AF1, AF2 : DEUX REGIONS IMPLIQUEES DANS LA TRANSACTIVATION.**

Les fonctions de transactivation par les récepteurs nucléaires sont attribuées à deux régions dénommées AF pour "activating fonction". La région AF1 est localisée dans la partie N-terminale du récepteur, au niveau du domaine AB. L'AF2, lui, est situé dans la partie C-terminale du HBD.

### **1. L'AF1.**

La région AF1 existe chez les trois types de RAR,  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ , mais seulement pour les RXR  $\alpha$  et  $\beta$  (Nagpal et al., 1993). Cette région est riche en prolines et en sérines. Plusieurs facteurs de transcription tels que CTF/NF-1, AR2 ou encore Oct-2 présentent ce type de région (Mermod et al., 1989; Williams et al., 1988; Ko et al., 1988). Les résidus prolines introduisent des coudes dans les hélices  $\alpha$  pouvant contribuer à la formation de structures spécifiques nécessaires à l'activité transcriptionnelle. On peut également noter l'importance des résidus aspartiques, notamment pour l'activité transcriptionnelle du RAR $\beta$ 2 (Folkers et al., 1995).

En elle-même, la région AF1 ne présente qu'une faible activité transcriptionnelle et ne nécessite pas la présence de ligand pour exercer cette activité. Il existe toutefois une synergie d'activation entre cette région et l'AF2, domaine d'activation ligand dépendant (Nagpal et al., 1993). Elle présente une spécificité d'action dépendante du promoteur et du type cellulaire étudiés (Nagpal et al., 1992; Kumar et al., 1987; Folkers et al., 1993). Cette dernière particularité semble indiquer que les AF1s n'interagissent pas directement avec la machinerie

transcriptionnelle mais avec des intermédiaires spécifiques d'un type cellulaire donné.

## 2. L'AF2.

L'AF2, localisé dans la partie C-terminale du HBD, est la région de transactivation ligand dépendante (Durand et al., 1994). Les études d'homologie de séquence dans la famille des récepteurs nucléaires révèle une région hautement conservée et un récepteur donné peut présenter une activité transcriptionnelle avec l'AF2 provenant d'un autre récepteur (Barettino et al., 1994). Le caractère interchangeable de ce motif provient de la conservation de certains résidus comme nous pouvons le voir ci-dessous :

RAR $\alpha$ , $\beta$	<u>L</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>N</u>
RAR $\gamma$	<u>L</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>N</u>
RXR $\alpha$	<u>F</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>A</u>
TR $\alpha$ , $\beta$	<u>L</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>D</u>
ER	<u>L</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>A</u>

L'implication de ces différents aminoacides dans le mécanisme de transactivation a été testée par mutagenèse dirigée, en particulier sur le RAR $\alpha$  et les TR $\alpha$  et  $\beta$  (Durand et al., 1994; Saatcioglu et al., 1993; Tone et al., 1994). Certains montrent une importance considérable dans tous les cas comme les acides glutamiques 412 et 415 du RAR $\alpha$  et ses équivalents pour les TRs. Ce domaine isolé présente une activité transcriptionnelle bien que moins importante que lorsqu'il se trouve dans le contexte du HBD.

Une question se pose : comment la région AF2 devient-elle active en présence de ligand?

Une étape essentielle dans ce processus est le changement de conformation induit par la liaison au ligand. Deux aminoacides sont essentiels dans ce processus au niveau de l'AF2, en particulier pour la stabilisation de l'hélice H12 dans sa nouvelle configuration. Nous trouvons les deux résidus décrits précédemment qui sont les acides glutamiques 414 et 417 du RAR $\gamma$ . La lysine 264, localisée dans l'hélice H4, est impliquée également dans ce processus par la formation d'une liaison saline avec l'acide glutamique 414 et une interaction électrostatique avec l'acide glutamique 417. La mutation de l'un de ces trois aminoacides confère au récepteur une

activité dominante négative (Renaud et al., 1995).

De façon générale, la présence de certains résidus de cette partie du récepteur semble être nécessaire pour une activité transactivatrice optimale et toute altération de structure par mutation ponctuelle entraîne une perte d'activité, mais peut également entraîner une modification de la pharmacologie des ligands. Ainsi, certains récepteurs, en particulier l'ER (double mutation L543/L544 ou M547/L548 en alanine(souris) ou la simple mutation L543G (homme)) ne présentent aucune activité transcriptionnelle en présence de leur ligand naturel mais par contre interprètent de façon agoniste un ligand normalement antagoniste (Mahfoudi et al., 1995; Montano et al., 1996). Ces expériences étayent l'hypothèse que le mécanisme d'action des ligands antagonistes passe par un positionnement de l'hélice H12, et donc de l'AF2, différent de celui induit par les ligands agonistes.

## **II. DIMERISATION, LIAISON AU LIGAND ET TRANSACTIVATION.**

La colocalisation de l'interface de dimérisation et du site de liaison au ligand suggère qu'il puisse exister par allostérie :

- \*Une influence du ligand sur l'état de dimérisation du récepteur

- \*Une influence de la dimérisation sur les propriétés de liaison au ligand de chaque partenaire dans le contexte de l'hétérodimère

En effet, le ligand semble réguler l'équilibre entre la formation des homodimères et des hétérodimères, tout au moins pour certains cas. Par exemple, la formation des homodimères RXR sur un DR1 est fortement stimulée en présence de 9-cis RA (Zhang et al., 1992b). Pour le VDR, la présence de vitamine D3 déstabilise les homodimères et de ce fait, favorise la formation des hétérodimères (Cheskis and Freedman, 1994). Nous trouvons un cas semblable pour les récepteurs à l'hormone thyroïdienne où le ligand inhibe la formation des homodimères (Ribeiro et al., 1992; Miyamoto et al., 1993).

Concernant les propriétés de liaison au ligand dans le contexte de l'hétérodimère, aucune différence n'a pu être mise en évidence pour les RARs par l'utilisation de test in vitro. Dans le cas du RXR, plusieurs rapports contradictoires ont été publiés. Pour Forman et al., le RXR ne peut lier son ligand et est inactif en transactivation dans le complexe DR5-RAR/RXR, excepté

quand le RAR lui-même a fixé son ligand. Ces auteurs ont également étudié le comportement du RXR dans le complexe DR4-TR/RXR. Le RXR est incapable de lier son ligand, le 9-cis RA, en présence ou en absence d'hormone thyroïdienne et est, de ce fait, inactif en transactivation (Forman et al., 1995). Pour Kurokawa et al., le RXR dans un complexe DR1- ou DR5-RAR/RXR est silencieux pour les propriétés de liaison au ligand et de transactivation, que le RAR ait fixé son ligand ou non (Kurokawa et al., 1994). Toutefois, d'autres études réalisées ultérieurement contredisent le rôle de partenaire silencieux ou contrôlé du RXR. Kerstern et al. ont montré par des études directes de liaison au ligand sur RAR et RXR par fluorescence que ni la dimérisation des deux sous unités ni la formation du complexe ternaire sur un DR1 ou DR5, n'altèrent les propriétés du RAR et du RXR (Kersten et al., 1996). Ces résultats ont été également confirmés par d'autres techniques de mesure d'affinité et par protéolyse limitée (Minucci et al., 1997; Apfel et al., 1995). La raison de ces rapports contradictoires n'est pas claire. Toutefois, de nombreuses observations suggèrent que le RXR puisse être une sous unité activable quand il est complexé avec le VDR, TR ou RAR. Des expériences de transfection transitoire montrent un effet synergique ou additif en présence des deux types de ligands spécifiques de chaque récepteur (Rosen et al., 1992; Carlberg et al., 1993). De façon plus significative, l'administration conjointe de concentrations suboptimales des ligands RAR ou RXR spécifiques aboutit à une activation synergistique de certains gènes répondant aux rétinoïdes tels que Hoxa-1 ou RAR $\beta$ 2 pour les lignées cellulaires P19 et F9 (Roy et al., 1995; Taneja et al., 1995).

Ces différentes expériences mettent également en évidence une notion importante qui est le contrôle de l'activité transcriptionnelle des deux sous unités de l'hétérodimère en fonction du type d'élément de réponse (La Vista-Picard et al., 1996). Une modification de l'affinité des ligands pour les deux partenaires de l'hétérodimère semble être en partie responsable des ces différences. Le ligand LG100754 nous donne un exemple précis de l'influence de la dimérisation sur les propriétés de liaison au ligand et de façon plus générale sur le changement de conformation qu'il induit dans le contexte de l'hétérodimère. En effet, ce ligand se comporte de façon antagoniste avec des homodimères RXR mais devient agoniste RXR pour le contexte RAR/RXR (Lala et al., 1996).

En conclusion, il semble donc que le RAR et le RXR sont deux partenaires actifs dans le contexte de l'hétérodimère mais que leurs propriétés de transactivation peuvent être modifiées

en fonction de l'élément de réponse, soit par changement des propriétés de liaison au ligand, soit par modification de la conformation du HBD lors de la formation du complexe ternaire HRE-RAR/RXR. Puisque les deux partenaires sont capables de lier leur ligand, cette explication est insuffisante pour expliquer la répression de l'activité transcriptionnelle sur un DR1. A ceci, on peut ajouter les différences observées selon le type cellulaire utilisé suggérant fortement l'existence de coactivateurs ou de corépresseurs différents dans le mécanisme d'activation transcriptionnelle des récepteurs aux rétinoïdes.

### **III. LES MODULATEURS DE L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE.**

#### **1. Les coactivateurs.**

Malgré l'existence d'une interaction directe avec certains composants de la machinerie basale de transcription tels que TBP, TFIIB ou encore TAF<sub>II</sub>110 (Schulman et al., 1995; Blanco et al., 1995; Baniahmad et al., 1993), les différences d'activité transcriptionnelle observées selon le type cellulaire utilisé suggère la présence de cofacteurs pouvant servir d'intermédiaires entre les récepteurs et la machinerie basale. Des efforts considérables ont été effectués ces dernières années afin d'isoler des protéines formant une interaction spécifique avec les récepteurs et notamment l'AF2. La plupart d'entre-elles ont été clonées en utilisant la technologie du double hybride. Ce sont des protéines nucléaires ne montrant pas ou peu de spécificité d'expression dans les tissus adultes de la souris ou de l'homme. L'interaction avec les récepteurs nécessite la présence de l'AF2 et d'un ligand agoniste et est inhibée en présence d'un antagoniste (voir figure 16).

Outre certaines protéines impliquées dans l'organisation de la chromatine et sur lesquelles nous nous attarderons plus tard, on recense plusieurs autres protéines pouvant être impliquées dans la transactivation :

\*RIP140, d'abord isolée en utilisant l'HBD de l'ER, interagit également de façon ligand dépendante avec le RAR et le RXR. Cette protéine est capable de stimuler l'activité transcriptionnelle de l'ER mais n'interagit pas directement avec les composants de la machinerie basale de transcription (Cavailles et al., 1995; Lhorset et al., 1996).

Autres noms	variants d'épissage	homologues d'espèces	protéines apparentées	commentaires
<b>LES CO-ACTIVATEURS</b>				
ERAP160	hSRC-1, p160	SRC-1b,1c, 1d	mSRC-1	mGRIP1, hTIF2
ERAP140	p140			
RIP160	p160			Différent d'ERAP160
RIP140	p140			Différent d'ERAP140
Trip1	p45, Mss1, CAD		ySUG1, mSUG1	sous-unité 26S du protéasome
ySTP6			ceSTP6, hSPT6	interagit avec les histones
ySWI1/SNF			hSWI1/SNF	réorganisation de la chromatine
ySWI2	ySNF2	hbrm, hSNF $\alpha$ , hSNF $\beta$ , BRG1	dbm (brahma)	réorganisation de la chromatine
ARA <sub>70</sub>	RFG			
hRPF1			yRSP5, mNEDD-4	E6-AP, Trip12 protéine ligase ubiquitine
RAP46				
TIF1				identité partielle avec l'oncogène T18
<b>LES CO-REPRESSEURS</b>				
TRUP	surf-3, L7a, PLA-X			inhibe la liaison à l'ADN
Calréticuline				inhibe la liaison à l'ADN
ySsn6/Tup1				interaction avec les histones, complexe répresseur chez la levure
mN-CoR		RIP13WT, RIP13 $\Delta$ 1e	hN-CoRf	SMRT
SMRT	TRAC-2	TRAC-1		N-CoR, RIP13WT
<b>LES CO-INTEGRATEURS</b>				
CBP				p300

**FIGURE 16 : COREGULATEURS DES RECEPTEURS NUCLEAIRES**

\*SRC-1 est capable, elle, d'augmenter l'activité transcriptionnelle de l'HBD des PR, GR, ER, TR et RXR. Sa surexpression empêche également le squelching de l'ER sur le PR (Onate et al., 1995). SRC-1, GRIP1, TIF2 et ERAP160 montrent de fortes homologies de séquence avec cette protéine. GRIP1 interagit avec l'HBD du GR, de l'ER et de l'AR de façon ligand dépendante, stimule l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs mais est aussi capable de réprimer le taux basal de transcription de ces récepteurs (Hong et al., 1996).

\*TRIP1, homologue de Sug1 chez la levure, lie le TR $\beta$  et les RXRs en présence de l'agoniste naturel (Lee et al., 1995b; Lee et al., 1995a). Des études préliminaires avec le TR ont montré également une interaction constitutive avec la partie N-terminale du récepteur et une interaction ligand dépendante au niveau de la partie C-terminale. Ceci suggère que TRIP1 puisse influencer l'AF1 et l'AF2 (Lee et al., 1995b). Sug1, lui, interagit uniquement de façon ligand et AF2 dépendante avec l'ER, le VDR, le RXR $\alpha$ , le RAR $\alpha$  et le TR $\alpha$  (vom Baur E et al., 1996). Ces deux protéines pourraient posséder plusieurs fonctions : certaines études ont montré une interaction directe avec la TBP (swaffield et al., 1995). Sug1/Trip1 est également une sous unité du complexe protéasome 26S qui catalyse la dégradation des protéines conjuguées à l'ubiquitine (rubin et al., 1996).

\*RXR $\alpha$  et  $\gamma$ , RAR $\alpha$ , VDR, PR et ER interagissent de manière hormono-dépendante avec TIF1 (Ledouarin et al., 1995). Cette protéine interfère avec plutôt qu'elle ne stimule la transactivation du RXR en présence de 9-cis RA. Elle inhibe également la transactivation ligand dépendante de l'ER et du RAR probablement par séquestration d'un facteur limitant nécessaire pour la transactivation.

\*Récemment, plusieurs groupes ont montré conjointement une interaction ligand dépendante de la protéine CBP/p300, déjà connue comme coactivateur de CREB (cAMP-response element binding protein), avec plusieurs récepteurs nucléaires dont RAR et RXR (voir figure 17) (Kamei et al., 1996; Chakravarti et al., 1996; hanstein et al., 1966). Des fibroblastes dans lesquels des anticorps anti-CBP/p300 ont été injectés ne répondent plus à l'induction par les rétinoïdes ou les glucocorticoïdes, démontrant le rôle de cette protéine dans la transactivation induite par les récepteurs in vivo (Kamei et al., 1996). Cette protéine interagit également avec TFIIB mais également avec d'autres facteurs pouvant influencer la réponse à la stimulation hormonale. De façon surprenante, cette protéine est également capable d'interagir avec SRC-1. Elle est actuellement considérée comme le cointégrateur des différentes voies de signalisation

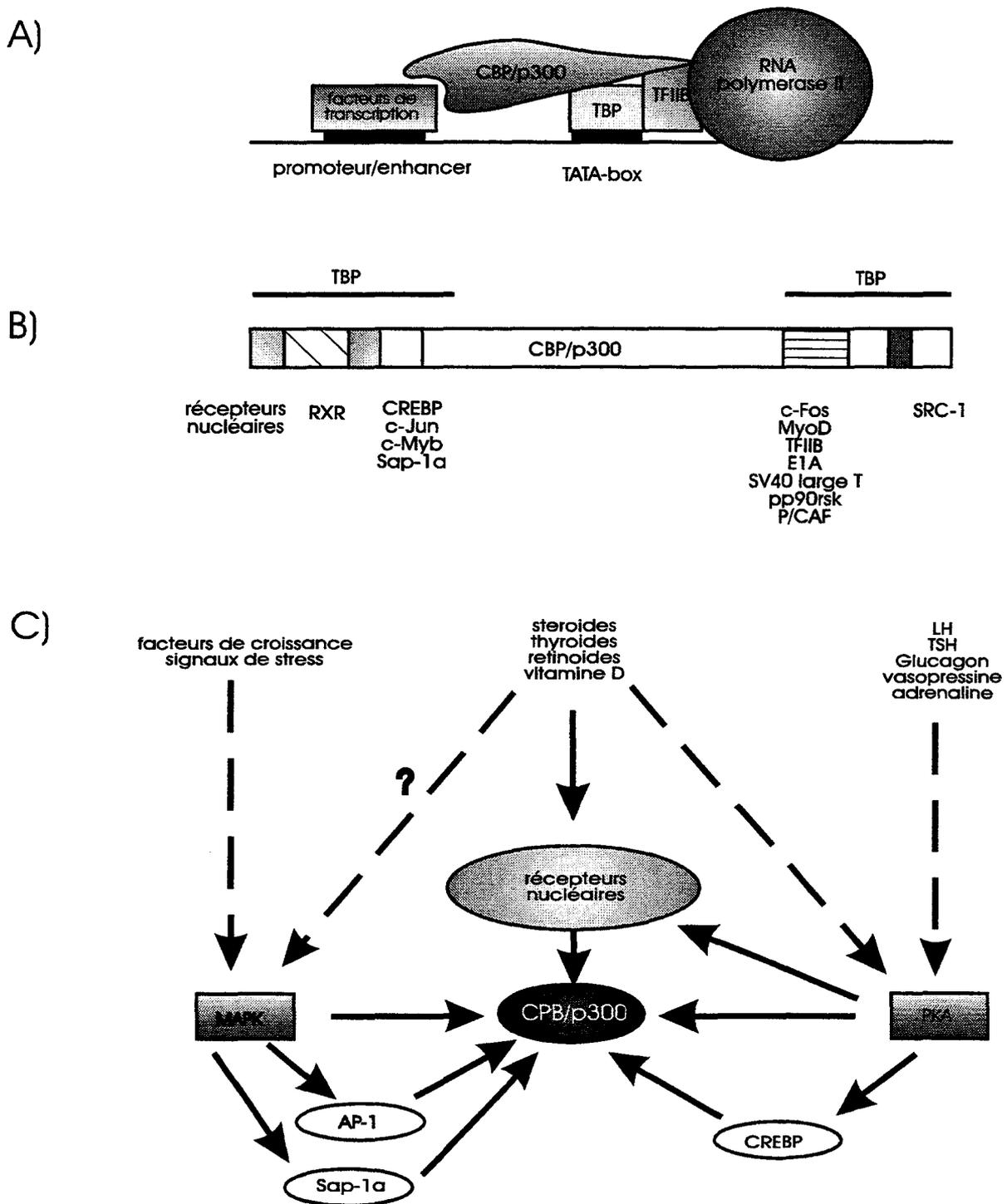


Figure 17 :  
 A) Modèle d'interaction pour la CBP/p300 avec les facteurs de transcription et la machinerie transcriptionnelle  
 B) Sites d'interaction de la CBP/p300 avec différentes protéines  
 C) Intégration des différentes voies de signalisation pour un gène régulé par la CBP/p300

pouvant affecter la réponse à la stimulation par les rétinoïdes et autres hormones (voir chapitre IV) (Janknecht and Hunter, 1996).

A cette liste non exhaustive s'ajoute chaque jour de nouvelles protéines présentant une interaction AF2 et ligand dépendante. Aucune jusqu'à présent, exceptée CBP/p300, ne montre d'interaction directe avec la machinerie basale de transcription laissant supposer l'existence d'autres protéines intermédiaires. L'équipe de Roeder, utilisant les techniques d'immunoprécipitation du TR à partir de cellules stimulées par l'hormone thyroïdienne, isole avec le récepteur un complexe d'au moins neuf protéines (Fondell et al., 1996). De façon surprenante, aucunes protéines citées précédemment ne se trouvent dans ce complexe (TIF1, ERAP160, RIP140, CBP/p300, TAFs...).

Certains récepteurs montrent des différences d'interaction avec ces protéines. Par exemple, RXR interagit de façon plus affine avec TIF1 qu'avec Sug1 alors que le TR $\alpha$  peut se lier fortement avec Sug1 mais pas TIF1. VDR, RARs et ER ne montrent pas d'affinité différente pour ces deux protéines (Baur et al., 1996).

L'existence de cette variété de coactivateurs pouvant se lier de façon différente aux récepteurs nucléaires en réponse au ligand accroît de manière considérable les possibilités de modulation de la réponse transcriptionnelle.

Outre les ligands antagonistes qui inhibent l'interaction avec ce type de protéines, on ne possède aucunes données sur le comportement d'autres ligands de synthèse agonistes sur le recrutement des coactivateurs. Toutefois, certains résultats laisse penser à un positionnement différent de ceux-ci dans le site de liaison et donc de ce fait pouvant modifier le positionnement de l'AF2. Deux questions sont suggérées par ces remarques :

- \* Ce positionnement différent influe-t-il sur le recrutement des coactivateurs ?
- \* Ce phénomène est-t-il à l'origine des différences observées en transactivation, malgré l'utilisation de ligands présentant une affinité identique que le ligand naturel ?

## **2. Les corépresseurs**

De manière différente des autres récepteurs nucléaires comme le RXR et les récepteurs stéroïdiens, les RARs et les TRs sont capables de réprimer fortement l'activité basale de transcription de différents promoteurs dans des cellules transfectées. Cet effet répresseur est

associé à la partie carboxy terminale du récepteur incluant le HBD. Deux candidats potentiels pouvant remplir cette fonction ont été isolés par le système de double hybride : N-CoR (Nuclear Receptor Corepressor) et SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid receptor) (Horlein et al., 1995; Kurokawa et al., 1995; Chen and Evans, 1995). Ces deux protéines interagissent avec les récepteurs en absence de ligand et se dissocient après la liaison de ce dernier (voir figure 16 et 18). Des expériences de mutagenèse ont permis d'identifier la zone d'interaction avec ces répresseurs. Elle est localisée dans la partie C-terminale du domaine D, région charnière entre le DBD et le HBD. De façon intéressante, *v-erbA* (oncogène dérivé du TR $\alpha$ ) possède des mutations au niveau de cette région abolissant l'interaction avec ce type de protéine, et établissant donc une corrélation entre la transformation oncogénique et l'effet répresseur (Chen and Evans, 1995; Perlmann and Vennstrom, 1995).

Le mécanisme moléculaire d'action des corépresseurs est décrit sur la figure 18. N-CoR s'associe aux RARs monomériques ou hétérodimériques liés à un DR5 (figure 18 A) où il réprime la transcription. La fixation du ligand sur le récepteur induit la dissociation du complexe et le recrutement des coactivateurs. Le complexe présente alors une activité transcriptionnelle. Sur un DR1 pour lequel on observe une répression constitutive de l'activité transcriptionnelle, le RAR occupe la position 5' du RARE (figure 18 b). La fixation du ligand est incapable dans ce cas de provoquer la dissociation de N-CoR (Kurokawa et al., 1995). La présence de mutation ponctuelle sur le RAR abolissant l'interaction entre ces deux protéines restaure l'activité transcriptionnelle de l'hétérodimère fixé à un DR1 et confirme ainsi leur rôle dans la répression de l'activité transcriptionnelle. Cette capacité de l'ATRA d'induire la dissociation de RAR/N-CoR sur un DR5 dans lequel le RAR occupe la position 3', et non sur un DR1 où il occupe la position 5' suggère que le type d'élément de réponse puisse réguler allostériquement cette interaction.

Le mécanisme exact par lequel le ligand induit la dissociation et comment ces protéines exercent leur effet répresseur reste encore indéterminé (pas de contact direct avec la machinerie basale de transcription). Toutefois, le fait qu'un RAR délété de l'AF2 ne provoque pas la dissociation du corépresseur à partir d'un DR5 en présence de ligand laisse fortement supposer l'implication du changement de conformation du HBD à la base du mécanisme de régulation de l'interaction ligand/corépresseur (Chen and Evans, 1995).

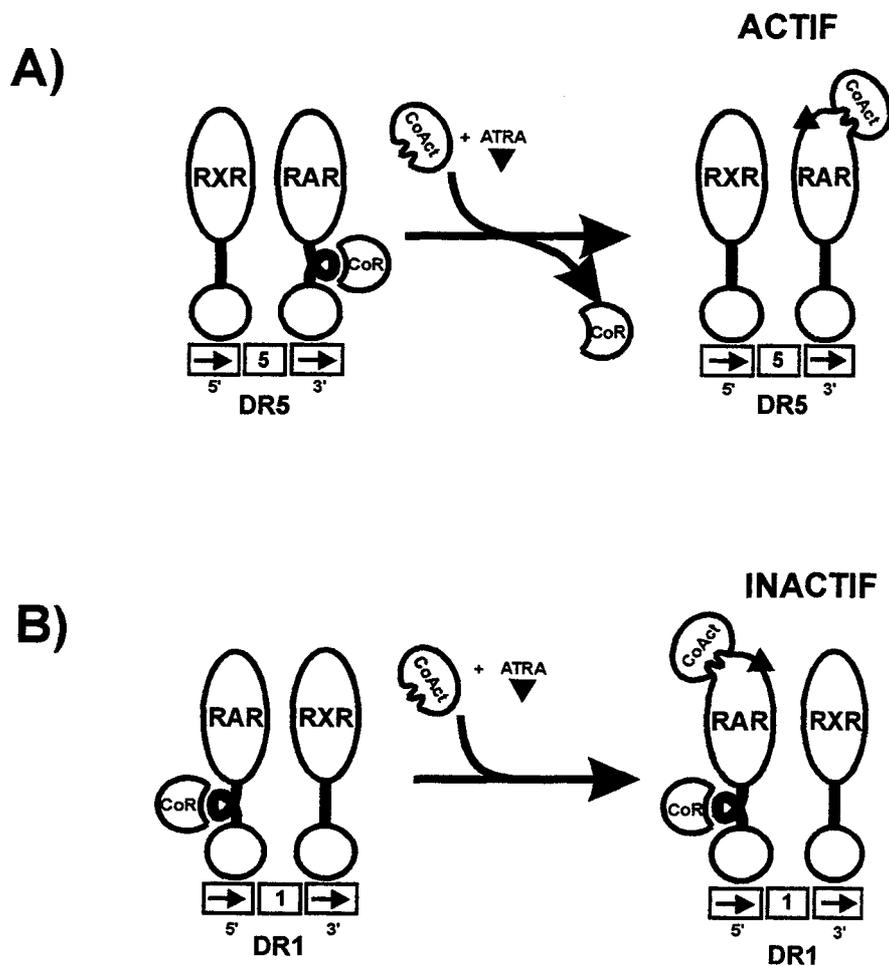


Figure 18 : (A) Les hétérodimères RAR/RXR se fixent à un DR-5. En absence de l'ATRA le corepresseur (CoR) se lie au complexe et réprime la transcription. Le ligand induit à la fois la dissociation du CoR mais aussi le recrutement du coactivateur (CoAct), ainsi le complexe devient actif.

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

#### IV. MODULATION DE LA TRANSACTIVATION

L'hétérodimérisation avec le RXR joue un rôle essentiel dans l'activité transcriptionnelle des gènes régulés par les récepteurs nucléaires de type II. Ainsi, ces différentes voies contrôlées par l'ATRA, T3 ou VD3 se régulent entre-elles par compétition pour le RXR (Davis and Lazar, 1992; Baretino et al., 1993; Damm and Evans, 1993). Ce dernier devient alors un facteur limitant pouvant favoriser une réponse donnée par rapport à une autre.

D'autres facteurs impliquant la dimérisation semblent pouvoir réguler la réponse après stimulation hormonale. C'est le cas de SHP, un membre de la famille des récepteurs nucléaires et ayant pour propriété essentielle de posséder une activité dominante négative. Ce récepteur ne possède pas de DBD mais est capable d'hétérodimériser avec plusieurs autres récepteurs tels que le RAR ou RXR par l'interface d'hétérodimérisation localisée dans le LBD (Seol et al., 1996).

Un autre processus compétitif peut également réguler la transactivation qui est l'accessibilité au site de liaison à l'ADN. Ce mécanisme a d'abord été mis en évidence pour l'hétérodimère PPAR/RXR qui peut lier certains éléments de réponse naturels de l'ER où il est inactif. Il inhibe donc, dans certains cas, la transactivation par l'ER via une compétition pour l'ERE (Keller et al., 1995). D'autres études montrent également que le récepteur orphelin COUP peut se fixer sous forme d'homodimère à un DR5 qui est l'élément de réponse le plus affiné pour RAR/RXR (Kliwer et al., 1992a; Cooney et al., 1993). C'est ce qui explique pour certains types cellulaires, l'absence de réponse pour des gènes comprenant un DR5 après stimulation par l'ATRA.

Nous avons précédemment vu l'importance des coactivateurs et certains semblent pouvoir induire une régulation par un processus compétitif. Un exemple classique est l'antagonisme existant entre les protéines Fos et Jun et les récepteurs nucléaires. Le produit des deux proto-oncogènes c-Fos et c-Jun, après stimulation de la cellule, forme un complexe au niveau du noyau (AP1 : activator protein 1). Ce dernier lie spécifiquement des séquences d'ADN (AP-1 binding site ou TPA responsive element) présentes dans la région promotrice de certains gènes. L'existence de ce "crosstalk" a été mise en évidence pour de nombreux gènes tels que celui de la stromélysine ou encore celui de la collagénase (Nicholson et al., 1990; Lafyatis et al., 1990) pour lesquels le traitement des cellules par l'ATRA inhibe la réponse induite par le TPA,

activateur du complexe AP-1. Plusieurs études ont permis de faire le lien entre ces deux voies de signalisation cellulaire : la surexpression de RXR inhibe l'activation d'AP1 par le TPA (Salbert et al., 1993). Inversement, la surexpression de Fos et Jun inhibe l'activation d'un gène rapporteur comportant un RARE et normalement inductible en présence d'ATRA (Yang-Yen et al., 1990). Le mécanisme moléculaire de cet antagonisme semble impliquer le facteur CBP/p300 présent dans la cellule à des concentrations limitantes (voir figure 17). La surexpression de cette protéine abolit l'inhibition des fonctions AP1 par les récepteurs nucléaires. De plus, les ligands antagonistes inhibant l'interaction CBP/p300 avec les récepteurs restaure la transactivation (Kamei et al., 1996).

Les processus de phosphorylation sont également impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes par les récepteurs aux rétinoïdes et autres. Ainsi, des cellules transfectées traitées par des activateurs de kinases ou de phosphatases présentent des différences dans les taux de transactivation observés (Tahayato et al., 1993; Lefebvre et al., 1995; Rochette-Egly et al., 1995). Ces différents mécanismes pourraient impliquer une phosphorylation directe des récepteurs mais également celles d'autres protéines intervenant dans la transduction du signal comme CBP/p300 qui voit son potentiel de transactivation augmenté par la phosphorylation (Janknecht and Hunter, 1996).

## **V. RECEPTEURS AUX RETINOÏDES ET CHROMATINE**

Au niveau du noyau, l'ADN est organisé sous forme de chromatine par l'intermédiaire des histones et d'autres protéines nucléaires. L'impact de cette structure dans la régulation de l'expression des gènes est considérable. De nombreuses études mettent en évidence l'accessibilité aux éléments de réponse des facteurs de transcription et du complexe basal de transcription est sous son contrôle (Lewin, 1994; Grunstein, 1990). De ce fait, elle est considérée comme un mécanisme général cellulaire pour réprimer l'expression des gènes. Les modifications posttraductionnelles des histones comme l'acétylation, déstabilisent cette organisation et sont en général associées à des régions transcriptionnellement actives (Felsenfeld, 1996).

Le comportement des récepteurs aux rétinoïdes au niveau de la chromatine montre de singulières différences avec celui observé *in vitro*. Utilisant la technique des empreintes *in vivo*

sur le promoteur du gène RAR $\beta$ , Dey et al. ont montré que seul le traitement des cellules par l'ATRA induit un footprint des hétérodimères RAR/RXR et des autres facteurs de transcription (Dey et al., 1994). De façon intéressante, la surexpression d'un RXR à caractère dominant négatif dans ce système abolit ce processus. Il semble donc que la formation du complexe RAR/RXR/RARE induit par le ligand soit l'événement initial aboutissant à la fixation des autres facteurs de transcription (Blanco et al., 1996). La régulation de la fixation de l'hétérodimère par l'organisation chromatinienne des RAREs a pu être également montrée sur le même promoteur reconstitué *in vitro*. L'inhibition de la fixation des hétérodimères RAR/RXR observée confirme la nécessité de déstabiliser cette structure. L'hyperacétylation des histones *in vivo* et *in vitro* est capable de mimer l'effet du ligand observé *in vivo* (Lefebvre P., Ozato K., communications personnelles).

Comment le ligand, par l'intermédiaire des récepteurs, pourrait-il induire une hyperacétylation des histones?

Nous avons vu dans un chapitre précédent que la fixation du ligand sur le récepteur induit le recrutement de coactivateurs, et plusieurs peuvent être à l'origine de ce mécanisme. La CBP/p300 elle-même est une acétylase, mais elle est capable aussi d'interagir avec p/CAF, autre protéine présentant cette activité (Janknecht and Hunter, 1996; Ogryzko et al., 1996; Bannister and Kouzarides, 1996). TIF1 $\alpha$  et  $\beta$  présentent dans le système double hybride une interaction avec hHP1, protéine présentant également une activité acétylase (Ledouarin et al., 1996). TAFII250 présente aussi cette activité enzymatique et interagit avec les récepteurs nucléaires (Mizzen et al., 1996)

Les récepteurs aux rétinoïdes nous apparaissent donc comme des protéines complexes et multifonctionnelles pour lesquelles le ligand joue un rôle essentiel dans leur mécanisme d'action. L'existence de plusieurs éléments de réponse et d'isoformes du RAR et RXR génère une grande possibilité de combinaison capable de transmettre directement le signal induit par l'hormone. A ceci s'ajoute la possibilité d'interconnexion avec d'autres récepteurs, d'autres protéines nucléaires et les différentes voies de signalisation qui sont capables de moduler leur activité.

# **RESULTATS**

L'importance des rétinoïdes dans les mécanismes de prolifération et différenciation cellulaire ont amené de nombreuses firmes pharmaceutiques à rechercher de nouvelles molécules plus actives, moins tératogènes et plus spécifiques des cibles thérapeutiques visées. Cet enjeu ne semble plus irréalisable depuis la mise en évidence des différents RARs et la description de rétinoïdes sélectifs des différents récepteurs. Ces composés ont été développés par modifications successives des trois parties de la molécule d'origine (extrémité polaire, chaîne polyénique et extrémité cyclique) et testés selon trois critères :

- \* Affinité pour les récepteurs (relation structure/affinité)
- \* Expériences de transactivation (relation structure/activité)
- \* Différents tests pharmacologiques

Au-delà de ce simple criblage, un point essentiel est la compréhension des mécanismes intimes de l'interaction ligand/récepteur. En effet, les molécules obtenues présentent des résultats hétérogènes quant à leur propriété de liaison ou de transactivation. Nous pouvons noter en particulier l'obtention de rétinoïdes présentant une dissociation complète de ces deux activités (antagoniste) ou plus simplement une affinité ne reflétant pas toujours la transactivation induite. Ces différentes observations suggèrent un mode d'interaction des différentes molécules testées avec le récepteur par rapport à l'ATRA.

Ce travail a pour but de mettre en évidence les différences d'interaction pouvant exister entre l'ATRA et les autres rétinoïdes avec le récepteur et d'étudier leurs conséquences sur son mécanisme d'action.

## **A. DOMAINE MINIMUM DE LIAISON AUX RETINOIDES DU hRAR $\alpha$ : Importance des extrémités N et C-terminales et variations selon la nature du ligand.**

### **I. APPROCHE EXPERIMENTALE.**

La complexité du domaine E/F des récepteurs nucléaires pose un problème majeur pour l'étude de leur activité de liaison au ligand et des conséquences fonctionnelles que cette

interaction entraîne. L'absence de données structurales sur cette région du récepteur nous a amenée à rechercher dans un premier temps le domaine minimum de liaison au ligand du hRAR $\alpha$ . Pour cela, nous avons construit une série de mutants de délétion, en partant des extrémités N et C-terminales de la protéine. Ces récepteurs tronqués ont été ensuite testés pour leur activité de liaison pour les deux rétinoïdes naturels, l'ATRA et le 9-cisRA ainsi que pour divers rétinoïdes synthétiques (CD367, Am580, Am80 et Ch55).

## **II. RESULTATS : ARTICLE**

# Structural Determinants of the Ligand-Binding Site of the Human Retinoic Acid Receptor $\alpha^{\dagger}$

Bruno Lefebvre, Christophe Rachez, Pierre Formstecher, and Philippe Lefebvre\*

CJF-INSERM 92-03, Laboratoire de Biochimie Structurale, Faculté de Médecine de Lille,  
1 Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France

Received October 6, 1994; Revised Manuscript Received December 5, 1994<sup>⊗</sup>

**ABSTRACT:** The ligand-dependent transactivating properties of retinoic acid receptors are controlled through a complex structure at the C-terminus of these proteins, commonly referred to as the hormone binding domain. This domain is involved not only in ligand recognition but also in protein-protein interactions such as homo- and heterodimerization processes. To identify more precisely regions of the human *all-trans*-retinoic acid receptor  $\alpha$  (hRAR $\alpha$ ) that are involved in ligand binding, we constructed a series of deletion mutants of this molecule and overexpressed them in bacteria. We found that the C-terminal part of the D domain (amino acids 186-198) was necessary for ligand binding. The F domain and the 10 C-terminal amino acids of the E domain were dispensable for high-affinity binding of various natural and synthetic retinoids. A further deletion to position 403 resulted in a moderate decrease in affinity for *all-trans*-(ATRA) and 9-*cis*-retinoic acids, whereas the binding of two RAR $\alpha$ -specific ligands (Am80 and Am580) was abolished. In addition, hRAR $\alpha$  and the minimal hormone binding domain (amino acids 186-410) bound ATRA with a positive, cooperative mechanism. This behavior was not observed with CD367, a conformationally restricted synthetic retinoid. The positive cooperativity could be correlated with stable ATRA binding to RAR homodimers, whose formation was triggered by ligand. In the same conditions, only monomeric CD367-RAR $\alpha$  complexes were detected. These data indicate that ligand binding to hRAR $\alpha$  requires the presence of part of the D domain, whereas the C-terminal end of the E domain is involved in more subtle ligand recognition processes. They also clearly suggest that structurally distinct retinoids interact differently with the ligand-binding site of this receptor.

Retinoic acid receptors mediate the pleiotropic effects of retinoic acids, which exert strong effects on vertebrate development, cellular proliferation, and differentiation. On the basis of their sequence homologies with other nuclear receptors (steroid hormones, thyroid and vitamin D receptors), six functional domains have been defined for these proteins [reviewed in Leid et al. (1992)]. Among them, the hormone binding domain (HBD)<sup>1</sup> appeared as bearing multiple functions besides ligand binding [reviewed in Forman and Samuels (1990)]. Discrete regions of the HBD are involved in the ligand-dependent activation of transcription by steroid hormone receptors (Danielian et al., 1992), retinoic acids (Nagpal et al., 1993), and thyroid hormone receptors (Baretino et al., 1994), or repression of transcription (Banahmad et al., 1993), and this domain is also involved in protein/protein interactions. Steroid receptors interact most noticeably with heat-shock proteins, and this association is necessary to maintain the glucocorticoid receptor under a conformation compatible with hormone binding [reviewed in Pratt (1993) and Smith and Toft (1993)]. Thyroid, retinoic acid, and vitamin D<sub>3</sub> receptors

homo- or heterodimerize with each other, and this interaction involves discrete regions located in the DNA binding domain (noted C domain), the hinge region (D domain), and the HBD (E domain). This dimerization process modulates their DNA binding affinity for their cognate response elements and ultimately their transcriptional properties [reviewed in Zhang and Pfahl (1993)].

Agonist binding to the receptor increases the *in vitro* binding affinity of the androgen receptor (Wong et al., 1993), progesterone receptor (Elliston et al., 1992; Allan et al., 1992), estrogen receptor (Beekman et al., 1993), and RXR (Zhang et al., 1992) for their cognate response elements to which they bind as homodimers. *In vivo* studies showed that agonists, but not antagonists, promote binding to DNA in intact cells of the GR (Becker et al., 1986) and of RAR $\alpha$  (Minucci et al., 1994). Moreover, agonist binding to the progesterone receptor and retinoic acid receptor  $\alpha$  induces conformational changes that are clearly different from the one observed in the presence of antagonists. A correlation between the biological activity of the ligand and an altered conformation of the C-terminal end of these receptors has been established (Vegeto et al., 1992; Keidel et al., 1994). Very interestingly, the C-terminal end of the HBD of nuclear receptors contains the ligand-dependent activating function region 2 (AF-2) which is thought to interact with component(s) of the transcription complex (Halachmi et al., 1994).

The functional significance of the HBD subregions has been established by mutational and biochemical studies. In the case of the glucocorticoid receptor (GR), a minimal

<sup>†</sup> This work was supported by grants from INSERM, ARC, FN-CLCC, CIRD-Galderma, and University of Lille II.

\* Corresponding author [telephone (33) 20-62-67; fax (33) 20-62-68-68].

<sup>⊗</sup> Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, April 1, 1995.

<sup>1</sup> Abbreviations: HBD, hormone binding domain; ATRA, *all-trans*-retinoic acid; 9-*cis*-RA, 9-*cis*-retinoic acid; RAR, *all-trans*-retinoic acid receptor; RXR, 9-*cis*-retinoic acid receptor; hsp90, heat-shock protein of 90 kDa; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; NiTA, nitrilotriacetic acid; R<sub>s</sub>, Stokes radius.

domain of 16 kDa displays a fair affinity for hormone as well as its association with hsp90 (Chakraborti & Simons, 1991). However, it is not clear whether this fragment is the minimal ligand-binding site since further truncations resulted in the loss of the interaction of hsp90 and therefore of the ligand-binding activity. Potentially important residues have also been identified by point mutations or affinity labeling of GR or estrogen receptors. These results have yielded a three-dimensional model based on a motif-oriented structural search that identified the subtilisin-like proteases as the proteins having the closest structure to the HBD of the GR (Goldstein et al., 1993). The GR HBD is likely to belong to the mixed  $\alpha/\beta$  class of proteins, and this conclusion extended to the steroid receptor family a similar prediction made for the thyroid hormone receptor (T<sub>3</sub>R) (McPhie et al., 1993). Circular dichroism study of several deletion mutants of the  $\beta$ 1 isoform of this receptor revealed that the T<sub>3</sub>R HBD contains extensive regions of  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet. The cooperative nature of the structure is lost upon deletion of eight amino acids from the C-terminal region of the receptor, which correlates with the loss of hormone binding activity. These results have been interpreted as compatible with an  $\alpha/\beta$  barrel structure, in which only the first helix, located in the D domain, is dispensable (McPhie et al., 1993). In enzymes displaying such a structure, the substrate specificity is dictated by residues located in loops. Finally, the crystal structure of the retinol binding protein and the epididymal retinoic acid binding protein also revealed a  $\beta$ -barrel structure that, in the latter case, must undergo a conformational change to accommodate *all-trans*-retinoic acid (Zanotti et al., 1993; Newcomer et al., 1993).

The retinoic acid receptor family comprises two major types of receptor: the *all-trans*-retinoic acid (ATRA) receptors (RARs), which bind ATRA and 9-*cis*-retinoic acid (9-*cis*-RA), and the 9-*cis*-retinoic acid receptors (RXRs), which bind exclusively 9-*cis*-RA. Each of these receptor types is subdivided in  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subtypes, with each gene encoding a variable number of isoforms (Leid et al., 1992). A major challenge is to decipher specific biological effects for each receptor, and conceiving specific ligands for each of them is one way to achieve this goal as well as to identify therapeutically active retinoids (Bernard et al., 1992; Crettaz et al., 1990; Delescluse et al., 1991; Graupner et al., 1991; Lehman et al., 1991; Martin et al., 1992) and anti-retinoids (Apfel et al., 1992; Eyrolles et al., 1994).

As a first step to identify structural determinants of the HBD of the human RAR $\alpha$  responsible for the interaction with the ligand, we made a series of deletion mutants and assessed their hormone binding affinity. This allowed us to define two regions critical for *all-trans*-retinoic acid binding. Competition studies revealed the C-terminal end of the ligand-binding domain as bearing a sequence important for ligand recognition. Moreover, we detected a cooperative binding of ATRA to the receptor or the isolated HBD, which was not observed with CD367, a synthetic retinoid (Cavey et al., 1990). This particular behavior was correlated with the ability of ATRA to bind stably to RAR $\alpha$  homodimers, as opposed to CD367 which bound exclusively to RAR $\alpha$  monomers.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** [<sup>11</sup>C]-*all-trans*-Retinoic acid (55.6 Ci/mmol) was purchased from NEN-Dupont de Nemours (Les

Ulis, France). Tritiated and unlabeled CD367 (Cavey et al., 1990) was a gift from B. Shroot, CIRD Galderma, Valbonne, France. The purity of retinoid solutions was routinely assessed by reverse-phase chromatography essentially as described by Dawson et al., (1993). Radioinert *all-trans*-retinoic acid was purchased from Sigma (St. Louis, MO), as well as antiproteases. Taq DNA polymerase, isopropyl thio- $\beta$ -thiogalactopyranoside (IPTG), ampicillin, and kanamycin were from Appligene (Strasbourg, France). Acrylamide and bis(acrylamide) mix (Protogel) was from National Diagnostics (Atlanta, GA). Dextran T-70 and charcoal (Norit-A) were from Prolabo (Paris, France). Restriction enzymes were from Promega (Madison, WI), and oligonucleotides were purchased from Eurogentec (Le Sart-Tilman, Belgium).

**Plasmids and Bacterial Strains.** Plasmid pHK1, containing the cDNA of hRAR $\alpha$  (Giguere et al., 1987), was obtained from V. Giguere and R. M. Evans (The Salk Institute, HHMI, La Jolla, CA). The pQE-9 vector was obtained from Diagen GmbH (Dusseldorf, Germany). DNAs were obtained either by PCR amplification or by using appropriate restriction sites (see Figure 2) and inserted into the pQE-9 vector as a *Bam*HI-*Hind*III fragment, in order to generate an in-frame fusion protein made of a histidine tag followed by sequences coding for the receptor. Histidine residues were shown not to interfere with ligand and DNA binding properties of the receptor (C. Rachez, data not shown). DH5 $\alpha$  (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) cells were used for routine subcloning procedures; M15 or SG 10039 (Diagen) bacterial strains containing the Rep4 plasmid coding for the lac repressor were the host cells for overexpression of the receptor and its various deletion mutants.

**Expression of Full-Length and Deletion Mutants of RAR $\alpha$ .** Transformed bacteria were grown overnight in LB broth supplemented with 100  $\mu$ g/mL ampicillin and 25  $\mu$ g/mL kanamycin. These precultures were grown in 1 L of LB broth to an OD<sub>600</sub> = 0.7–0.9, and 1 mM IPTG was added. Derepression proceeded for 3 h after which time cells were pelleted and resuspended in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 2 mM DTT, 10 mM PMSF, and aprotinin, leupeptin, and pepstatin at 20  $\mu$ g/mL) supplemented with 50 mM glucose. Lysozyme was added to a final concentration of 0.5 mg/mL, and the cell suspension was incubated for 45 min on ice. Cells were lysed by five successive freeze-thawing cycles, and the lysate was brought to 0.4 M NaCl. The homogenate was centrifuged for 1 h at 100000g at 4 °C. The supernatant was submitted to a poly(ethylenimine) precipitation step (0.2% final) to remove most of the DNA (Burgess, 1991). Similar results were obtained with DNase I or poly(ethylene glycol)/NaCl. DNA removal from the extracts yielded receptor preparations with a strongly decreased nonspecific binding, which dropped from 20% of the total binding activity in untreated extracts to less than 5% (B. Lefebvre, data not shown). The bacterial extract was then adjusted to 10% glycerol and stored at -80 °C.

**Retinoid Binding Assays.** Bacterial extracts (15–20 mg/mL proteins) were adjusted to ca. 1–2 mg/mL by dilution in buffer A supplemented with 150 mM NaCl. Retinoids were added to the tubes in solution in either ethanol or DMSO, and solvents were evaporated to dryness in the dark. Then 200  $\mu$ L of extract was added to these tubes, in which the ligand concentration usually varied from 0.1 to 10 nM (labeled ligand), and the mixture was incubated for 16 h at

4 °C in the dark. Each assay was performed in triplicate as follows: 10  $\mu$ L of the extract was removed to assess the actual concentration of the ligand, and the remaining sample was incubated for 10 min at 4 °C with 100  $\mu$ L of a charcoal-dextran suspension (3% charcoal, 0.3% dextran in buffer A). Samples were then centrifuged for 10 min at 4 °C at 6000g, and the radioactivity content of the supernatant was assayed by scintillation counting. Nonspecific binding was assayed similarly, except that a 200-fold excess of radioinert ligand was added to the incubation mix. Scatchard analysis was performed using the Rack-Beta Receptor program from LKB-Pharmacia.

**Other Techniques.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting were performed as described previously (Tahayato et al., 1993). The anti-RAR $\alpha$  polyclonal antibody is directed against the 425–443 region of this receptor. Alternatively, the monoclonal antibody R $\alpha$ 10 directed against the 444–462 region of the same receptor was used (Ali et al., 1992.) Purification of the denatured proteins was performed exactly as suggested by the manufacturer, except that a batch adsorption procedure was substituted to the column protocol described in the manual (Diagen). High-performance size exclusion chromatography was performed according to Dallery et al. (1993).

## RESULTS

**Expression of Histidine-Tagged Full-Length and Truncated hRAR $\alpha$  Polypeptides.** The intact cDNA and several deletion mutants of hRAR $\alpha$  were cloned into the pQE9 expression vector (Figure 1). Deletions were introduced at either the N-terminal or the C-terminal end of the cDNA domain to remove successively the A, B, C, and D domains or the F domain, respectively. Smaller deletions were also made to remove smaller pieces from the N- and C-terminal extremities of the E domain of hRAR $\alpha$ . Numbers represent the first and the last amino acid from hRAR $\alpha$  present in the molecule, according to the sequence published by Giguere et al. (1987).  $\Delta$ N indicates that the molecule is deleted from its N-terminal end, whereas  $\Delta$ C designates a C-terminally truncated receptor.

Each of these mutants is bearing a histidine tag, allowing for a rapid purification and characterization of the protein. This property is exemplified for the mutant  $\Delta$ N186/462, made of the C-terminal part of the D domain and the intact E and F domains of hRAR $\alpha$ , which was expressed in *Escherichia coli* M15 strain under the control of an IPTG-inducible promoter (Figure 2A). Proteins were substantially overexpressed in this system (Figure 2B, left panel; compare lane Ind to lane NI) to reach levels of 60–100 nM (3–5 mg/L of culture). Although we noted dramatic differences in recovery between the full-length receptor (less than 1 mg/L of culture) and truncated versions of the same protein (more than 10 mg/L in some cases), soluble (His<sub>6</sub>) fusion proteins were easily purified under denaturing (Figure 2B, lane E) or under nondenaturing conditions (C. Rachez, in preparation). Histidine-tagged hRAR $\alpha$  displayed an affinity for the ligand (see below) or retinoic acid response elements (C. Rachez, in preparation) comparable to that of the wild-type molecule.

Mutants were characterized (Figure 3) for the expression of the protein by NiTA affinity chromatography (Figure 3A) and western blot analysis (Figure 3B). The expression

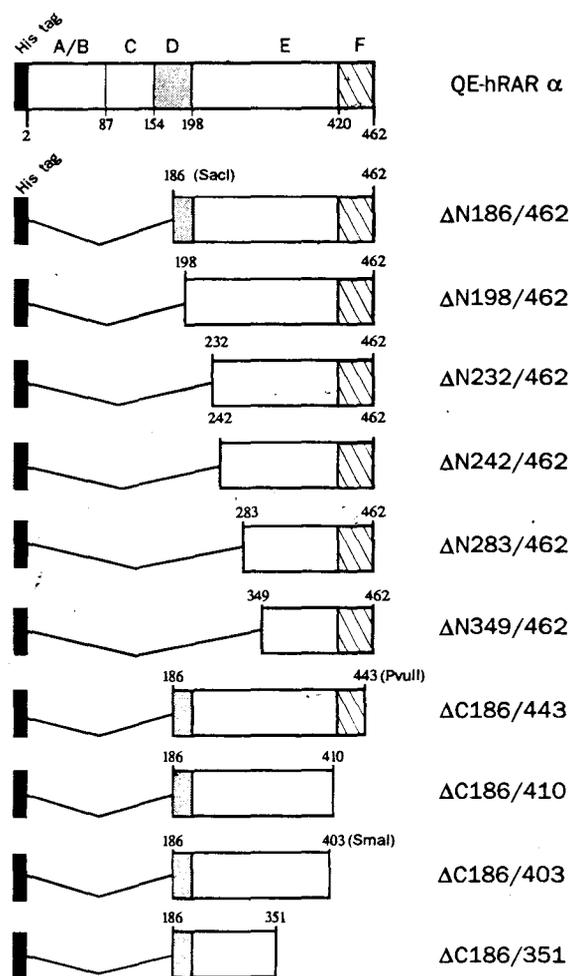


FIGURE 1: Construction of the full-length and truncated hRAR $\alpha$  expression vectors. The 5' and 3' ends of the hRAR $\alpha$  cDNA were modified by PCR amplification to create *Bam*HI and *Hind*III sites, respectively. The amplified cDNA was inserted into the pQE9 vector as a *Bam*HI/*Hind*III fragment. A similar procedure was used to generate other mutants, except when convenient restriction sites could be used ( $\Delta$ C186/351, *Pst*I;  $\Delta$ C186/403, *Sma*I;  $\Delta$ C186/443, *Pvu*II). In that case, the initial vector  $\Delta$ N186/462 was cut at the indicated position and a linker was ligated to generate a stop codon after the indicated amino acid. The conventional letter code (A–F) was used to designate the different receptor domains.

vectors encoded proteins with the expected molecular masses ranging from 17 to 31 kDa (Figure 3A) and were recognized, when the F domain was left intact, by a polyclonal antibody directed against this domain (Figure 3B). Thus this overexpression system allows for the production of a large amount of functional hRAR $\alpha$  and truncated receptors that can be tested for ligand binding activity.

**Ligand-Binding Properties of the Full-Length and Truncated hRAR $\alpha$  Polypeptides.** In order to define the structural determinant(s) of hRAR $\alpha$  required for hormone binding, we assessed the ligand binding activity of each mutant described above by the charcoal adsorption assay (Table 1). Each protein encoded by the vectors described above was expressed in M15 cells and extracted from the bacterial lysate as described in Materials and Methods. The full-length receptor displayed a dissociation constant ( $K_d$ ) for ATRA of  $2.8 \pm 1.3$  nM ( $n = 15$ ) and of  $4.8 \pm 1.2$  nM ( $n = 5$ ) for CD367, a synthetic retinoid binding to RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , and RAR $\gamma$  (Table 1). These values are in agreement with already published values, obtained by comparable assays, for the two ligands by our laboratory (Dallery et al., 1992) and others

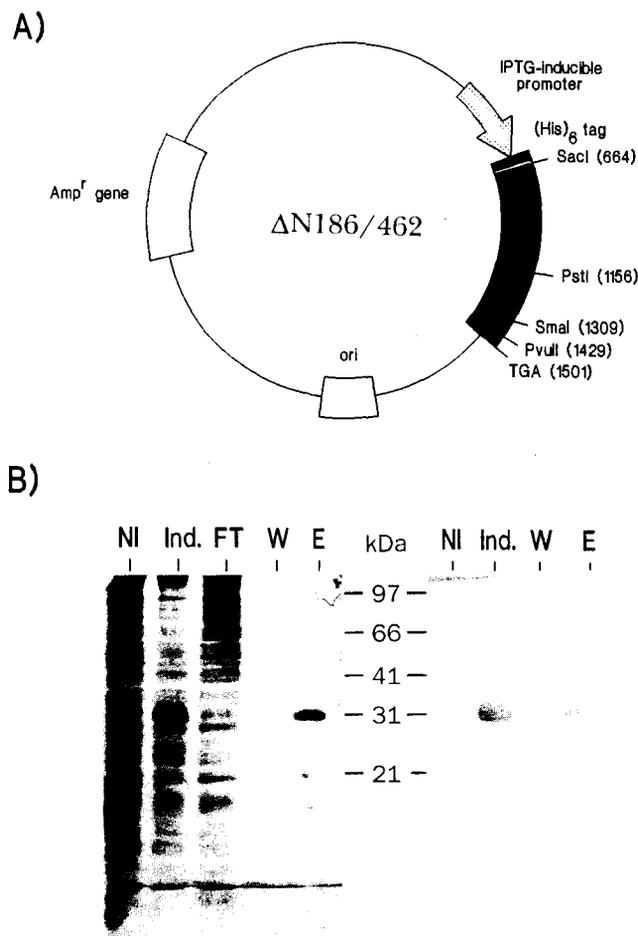


FIGURE 2: Description of the overexpression system. (A) Schematic diagram of the pQE9 expression vector. This vector contains a synthetic IPTG-inducible promoter driving the histidine-tagged protein (here the  $\Delta$ N186/462 mutant containing the C-terminal end of the D domain and the intact E and D domains). (B) Characterization of the isolated HBD of hRAR $\alpha$  following *E. coli* overexpression and purification under denaturing conditions over a NiTA column. Crude extracts from noninduced (NI) and IPTG-induced bacteria (Ind.) were resolved on an 8% SDS-PAGE that was either silver stained (left) or transferred on a nitrocellulose membrane and immunodetected using an anti-RAR $\alpha$  polyclonal antiserum (right). A similar analysis was performed for the NiTA column flow-through (FT), the last wash (W), and the eluate (E).

(Bernard et al., 1992; Keidel et al., 1992; Fukasawa et al., 1993). Deletion of the A, B, and C domains and the N-terminal half of the D domain (mutant  $\Delta$ N186/462; see Figure 1) did not induce major changes in the affinity for ATRA or CD367. However, these domains may stabilize the tertiary structure of the HBD since we noted that  $\Delta$ N186/462 has a 2–3-fold lower affinity for both ligands when compared to the full-length receptor (hRAR $\alpha$ ). Further deletions at either the N-terminal or the C-terminal end from the  $\Delta$ N186/462 molecule affected more dramatically the retinoid binding capacity of this protein. Indeed, deleting the last 12 amino acids from the C-terminal part of the D domain (186–198) abolished the receptor ability to bind ATRA and CD367 (Table 1, mutant  $\Delta$ N198/462). Further deletions ( $\Delta$ N232, 242, and 283 and 349/462) had no effect, indicating that the initial deletions did not unmask any structure that could have an inhibitory effect on hormone binding. Thus the highly charged sequence (186) EIIEKVRKAHQE (198) of the D domain is required for ligand binding.

Removal of 29 amino acids from the F domain ( $\Delta$ C186/443) yielded a mutant having ligand-binding affinities identical with that of the HBD ( $\Delta$ N186/462), demonstrating that this part of the F domain is dispensable for ligand recognition. The next mutant ( $\Delta$ C186/410) was built to remove the entire F domain plus 11 amino acids from the E domain, a sequence encompassing most of the AF-2 region. This mutant turned out to bind ATRA and CD367 as efficiently as the HBD, with a calculated  $K_d$  for ATRA of 5.2 nM and 7.0 nM for CD367. Seven amino acids were therefore removed to yield the  $\Delta$ C186/403 mutant. This deletion removed totally the AF-2 region and has been shown to yield a dominant negative mutant still able to heterodimerize with RXR (Pratt et al., 1990; Tsai et al., 1992; Damm et al., 1993), suggesting that the tertiary structure of the polypeptide is not strongly altered. The overexpressed protein displayed a 3-fold lower affinity for ATRA and CD367 than the isolated HBD and a 10-fold lower affinity for these ligands than the intact receptor, and we consistently observed a strong decrease in the number of binding sites in our extracts by at least 85–90%, when compared to other mutants, despite a similar rate of expression (data not shown). This is suggestive of a much lower stability of the interaction of the ligand with this truncated form of the HBD, indicative of an important role of the 403/410 region in ligand binding.

**Ligand-Binding Selectivity of hRAR $\alpha$  Mutants.** The ability of RAR $\alpha$  and  $\Delta$ N186/462,  $\Delta$ N186/410, and  $\Delta$ N186/403 mutants to bind other retinoids was investigated by competition experiments. The receptor or its derivatives were incubated with [ $^3$ H]ATRA concentrations yielding an 80% saturation, in the presence of increasing concentrations of the radioinert competitor. Retinoids used as such were ATRA itself, 9-*cis*-RA, and retinobenzoic acids Ch55, Am580, and Am 80 (Figure 4A). The order of potency of the compounds to inhibit ATRA binding was evaluated and expressed as  $K_i$  values in Figure 4B. ATRA, 9-*cis*-RA, and Am580 inhibited ATRA binding to the full-length receptor,  $\Delta$ N186/462, and  $\Delta$ N186/410 with a similar efficiency, giving  $K_i$  values in a range from 8 to 20 nM. Ch55 and Am80 were less efficient and yielded  $K_i$  values around 30–50 nM. Thus the order of potency for binding to the full-length receptor,  $\Delta$ N186/462, and  $\Delta$ N186/410 was identical with ATRA  $\approx$  9-*cis*-RA  $\approx$  Am580 > Am80 > Ch55. This ranking is in good agreement with values reported for hRAR $\alpha$  (Keidel et al., 1992) or the isolated HBD (Crettaz et al., 1990) expressed in *E. coli*. More surprisingly, we observed that the deletion to amino acid 403 caused the loss of the ability of Am80, and to a lesser extent of Am580, to inhibit ATRA binding to the receptor, whereas the affinity of Ch55 was not affected. The relative affinities of ATRA and its metabolic derivative 9-*cis*-RA decreased by 2–3. Thus the region 403/410 contains residues involved in the specific recognition of synthetic retinobenzoic derivative; and is also involved in maintaining a high affinity of the receptor for natural retinoids.

**hRAR $\alpha$  Binds Cooperatively all-trans-Retinoid Acid but Not CD367.** While investigating the ligand-binding properties of hRAR $\alpha$ , we noted that the full-length receptor had peculiar behavior at low ATRA concentrations (0–1 nM). We were able to detect reproducibly this phenomenon when contaminating bacterial DNA was carefully removed from high salt extracts. This was achieved by either poly(ethylenimine) (Burgess, 1991), poly(ethylene glycol) pre-

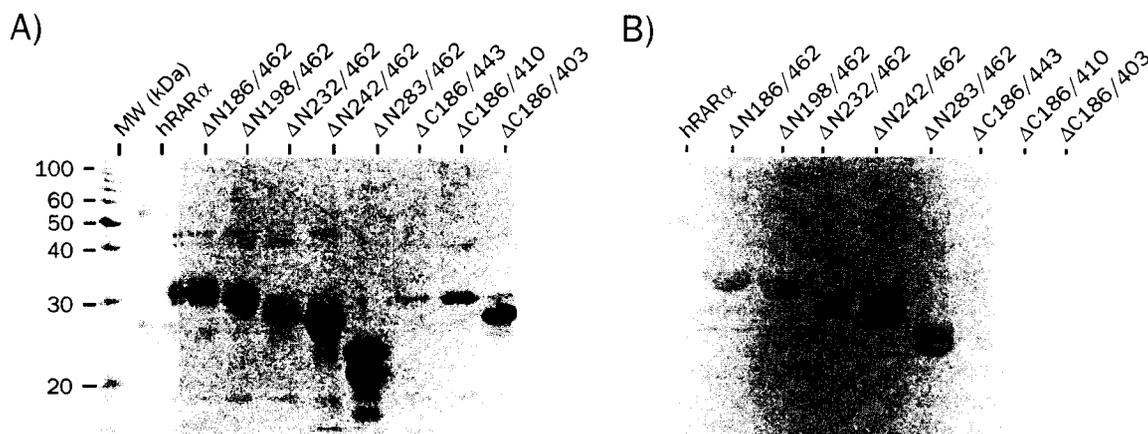


FIGURE 3: Characterization of overexpressed receptors. (A) Following overexpression in *E. coli*, His-tagged receptors were purified under denaturing conditions and resolved on a 15% SDS–polyacrylamide gel. After transfer on a PDVF membrane, proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue G250 (panel A). After destaining, the membrane was immunoprobed using an anti-RAR $\alpha$  monoclonal antibody directed against the 25–443 region of RAR $\alpha$  (panel B). Molecular masses are indicated on the left of the panel A.

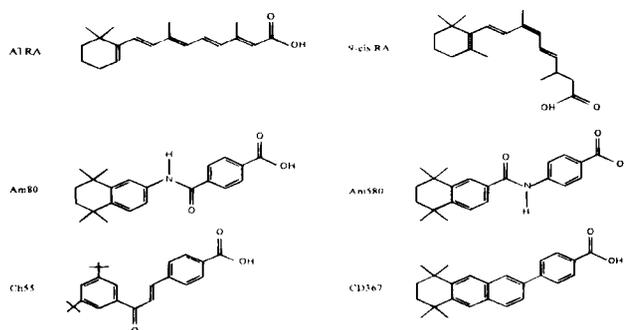
Table 1: Dissociation Constants for ATRA and CD367 of RAR $\alpha$  and Deletion Mutants Expressed in *E. coli*<sup>a</sup>

mutant	$K_d$ (nM)	
	ATRA	CD367
RAR $\alpha$	$2.8 \pm 1.3$	$3 \pm 2$
$\Delta$ N186/462	$6 \pm 2$	$5 \pm 2$
$\Delta$ N198/462	NB <sup>b</sup>	NB
$\Delta$ N232/462	NB	NB
$\Delta$ N242/462	NB	NB
$\Delta$ N283/462	NB	NB
$\Delta$ N349/462	NB	NB
$\Delta$ C186/443	$8 \pm 2$	$7 \pm 1$
$\Delta$ C186/410	$5 \pm 2$	$6 \pm 1$
$\Delta$ C186/403	$17 \pm 3$	$16 \pm 4$
$\Delta$ C186/351	NB	NB

<sup>a</sup> Intact or truncated RAR $\alpha$  were expressed in *E. coli*, and their affinities for tritiated ATRA or CD367 were assayed as described in Materials and Methods.  $K_d$  values were deduced from Scatchard plots and are the mean of at least four independent assays. <sup>b</sup> NB: no binding detectable.

precipitation, or DNase I treatment. Reproducible binding data could be obtained after optimization of the DNA removal procedure which reduced the nonspecific binding in a dramatic fashion and allowed for the accurate determination of ligand binding at low ligand concentrations (between 0.10 and 0.5 nM). As shown by saturation curves (Figure 5C), the amount of specifically bound ATRA increased in a quasilinear fashion at these low concentrations and then increased exponentially between 1 and 5 nM ATRA, to reach saturation at 8–10 nM ATRA. This triphasic curve, when plotted according to Scatchard (1949), yielded a convex curve typical of a cooperative binding of the ligand to the receptor (Figure 5D). The Hill coefficient  $n_H$  had a value of 2, suggesting that two receptor subunits interact with each other. On the contrary, CD367 saturation binding experiments (Figure 5A) yielded a linear Scatchard plot, with an estimated  $K_d$  of 5.0 nM and a Hill coefficient of 0.95 (Figure 5B), characteristic of a noncooperative binding mechanism. The receptor concentration in these experiments was typically around 1 nM (60  $\mu$ g/mL), and it should be noted that results shown here were obtained with different extracts. In comparative experiments, the number of binding sites for ATRA and CD367 was always equal. Interestingly, we observed a similar behavior for the mutants  $\Delta$ N186/462,  $\Delta$ N186/443, and  $\Delta$ N186/410 (data not shown).

A)



B)

Ligand	RAR $\alpha$	$\Delta$ N186/462	$\Delta$ N186/410	$\Delta$ N186/403
ATRA	$7.9 \pm 1.9$	$13.2 \pm 1.0$	$14.2 \pm 1.6$	$33.1 \pm 0.2$
9-cis-RA	$12.1 \pm 1.7$	$17.9 \pm 1.2$	$16.9 \pm 0.7$	$39.5 \pm 2.3$
Ch55	$32.9 \pm 4.4$	$53.1 \pm 1.0$	$44.4 \pm 1.2$	$35.3 \pm 0.1$
Am80	$18.5 \pm 1.6$	$34.9 \pm 5.4$	$47.6 \pm 1.8$	NB
Am580	$12.1 \pm 1.2$	$16.5 \pm 3.2$	$17.6 \pm 3.0$	>200

FIGURE 4: Ligand specificities of hRAR $\alpha$  and mutants  $\Delta$ N186/462,  $\Delta$ N186/410, and  $\Delta$ N186/403. (A) Structures of the ligands used in competition experiments. ATRA and 9-cis-RA are natural derivatives of vitamin A, whereas Ch55, Am580, and Am80 are retinobenzoic acid derivatives. Am80 and Am580 are RAR $\alpha$ -specific ligands. (B)  $K_i$  values of retinoids for hRAR $\alpha$  and mutants  $\Delta$ N186/462,  $\Delta$ N186/410, and  $\Delta$ N186/403. Bacterial extracts were incubated in the presence of a concentration of [<sup>3</sup>H] ATRA yielding an 80% saturation of the binding sites (6 nM for all receptors but  $\Delta$ N186/403, for which 30 nM was used) and with increasing concentrations of the unlabeled competitor, ranging from 1 nM to 1  $\mu$ M. Incubations were for 16 h at 4 °C in the dark. The  $K_i$  value for each compound is indicated in nanomolar and was calculated from the formula  $K_i = IC_{50}[(1 + ([^3H] ATRA)/K_d)]^{-1}$ .  $IC_{50}$  is the concentration in the competitor required to inhibit 50% of ATRA binding, [<sup>3</sup>H] ATRA is the concentration of ATRA used (6 or 30 nM), and  $K_d$  is the  $K_d$  of each receptor mutant for ATRA. Data are the average of at least four independent experiments.

Several parameters that could affect the dimerization state of the receptor were tested for their effects on the cooperative binding of ATRA to hRAR $\alpha$ . The presence of either RXR $\beta$  (Hamada et al., 1989) or a retinoic acid response element from the promoter of the RAR $\beta$  gene (de The et al., 1990),

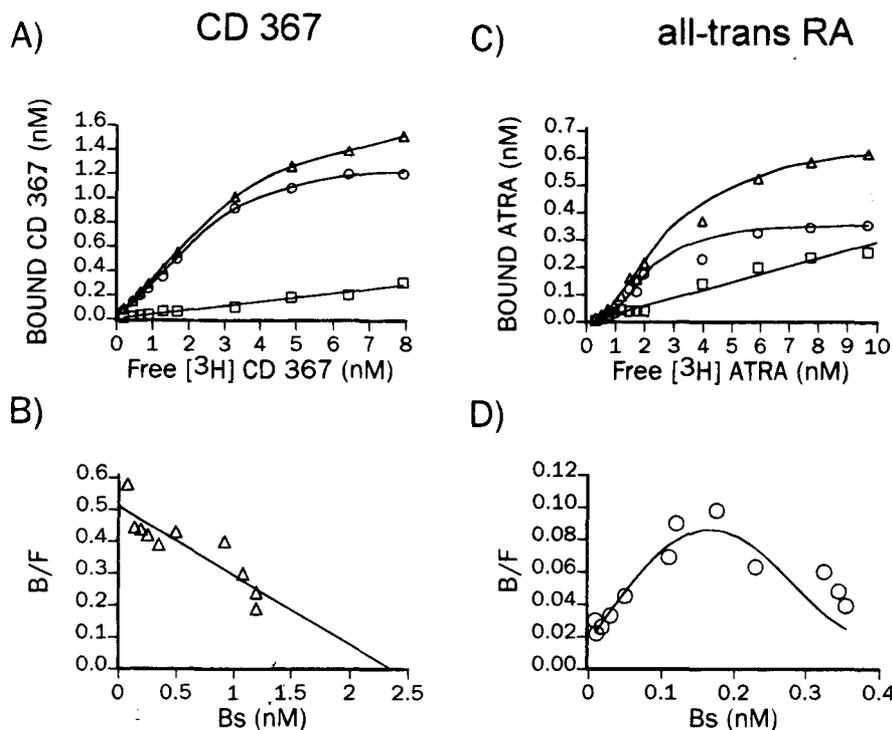


FIGURE 5: Saturation curves and Scatchard analysis of CD367 and ATRA binding to hRAR $\alpha$ . (A) CD367 binding assayed by the charcoal adsorption assay. Bacterial extracts were incubated with increasing concentrations of tritiated CD367 for 16 h in the dark at 4 °C. Nonspecific binding was determined by adding a 200-fold excess of unlabeled CD367. Each point was assayed in triplicate. Free radioactive ligand concentrations were calculated by subtracting the concentration of labeled ligand from that of the receptor-bound labeled ligand. (B) Scatchard analysis of CD367 binding to hRAR $\alpha$ . Data points were best fitted using a nonlinear regression analysis of the data by a Stanford Graphics program. (C) ATRA saturation curve. A procedure similar to that described in (A) was followed to determine ATRA binding properties of hRAR $\alpha$ . (D) Scatchard analysis of the ATRA saturation curve shown in (C). Similar results were obtained with  $\Delta$ N186/462 and  $\Delta$ N186/410 (data not shown). Note that representative experiments are shown here and were not performed with the same extract. Symbols:  $\Delta$ , total binding of the tritiated ligand;  $\circ$ , specific binding of the same ligand;  $\square$ , nonspecific binding of the labeled ligand detected in the presence of a 200-fold molar excess of the same radioinert ligand.

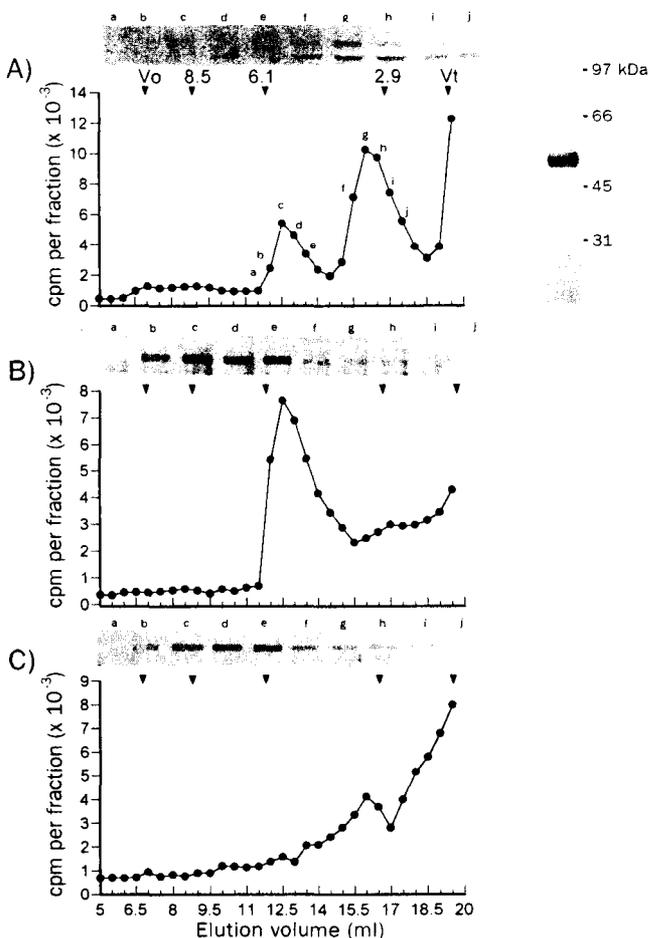
in proportions compatible with an optimal DNA binding activity, did not change the positive cooperativity. Similarly, physical parameters like elevated temperature (22 °C) or concentration (from 0.5 to 50 nM receptor) did not alter the cooperative nature of ATRA binding to hRAR $\alpha$ , which was equally detected with other expression vectors in different bacterial strains (data not shown).

We thus investigated a possible relationship between the dimerization state of the receptor and the observed cooperative binding mechanism. Identical samples were incubated with vehicle (DMSO), 30 nM [ $^3$ H]ATRA, or [ $^3$ H]CD367 and fractionated over a size exclusion column (panels A–C of Figure 6, respectively). [ $^{35}$ S]Methionine-labeled hRAR $\alpha$  was also used as a tracer for the unliganded form of the receptor (ca. 50 fmol, Figure 6A). In the latter case, the receptor was eluted mostly as a monomeric species (60–70% of total receptor), with a Stokes radius of 3.0 nm (Figure 6A). Western blotting of fractions eluting at positions corresponding to monomeric ( $R_s = 3$  nm, denoted from f to j) or dimeric species ( $R_s = 6$  nm, denoted from a to e) also showed that the RAR polypeptide was present essentially as a monomeric species under these conditions and appeared to be more sensitive to proteolysis than the liganded receptor (upper panel). Since two bands of apparent molecular masses 52 and 48 kDa were detected, it is likely that the 48 kDa polypeptide results from partial proteolysis of the A/B domain. The CD367-bound receptor was eluted as a monomeric species (Figure 6C), whereas, in sharp contrast, the ATRA-bound receptor was predominantly eluted (90–100% of total receptor) in fractions corresponding to a Stokes

radius of 6.0 nm, compatible with a dimeric state of the receptor (Figure 6B). More surprisingly, the RAR $\alpha$  polypeptide was eluted, as shown by western blot, as a dimeric species, whatever ligand was used (upper panels of Figure 6B,C). Thus ATRA appeared to induce the formation of a stable homodimeric form of the receptor and bind to it, whereas CD367, although equally able to promote homodimer formation, did not bind to these homodimers. This observation establishes a direct correlation between the observed cooperative ligand-binding mechanism of ATRA to RAR $\alpha$  and the quaternary structure of the protein.

## DISCUSSION

The study of the major function of the hormone binding domain of nuclear receptors, namely, its ligand binding activity, has been hampered by the structural and functional complexity of this domain. Indeed, the hormone binding domain not only has a structure conferring its ability to recognize specifically a subset of small molecules but is also involved in protein/protein interactions that dictate the quaternary structure and regulate the transcriptional activity of the receptor. To determine what parts of the hRAR $\alpha$  contribute to the hormone binding activity, we deleted systematically domains from the wild-type molecule. These truncated receptors were expressed in bacteria in which the receptor does not form heterodimers nor is involved in transcriptional regulation, and thus this system allowed the study of the hormone binding function per se. Deletion of the A and B domains, as well as the C- and the N-terminal part of the D domain, did not result in a major alteration of



**FIGURE 6:** Influence of ligand on the dimerization state of hRAR $\alpha$ . (A) Unliganded hRAR $\alpha$  (100  $\mu$ L of extract) was fractionated over a Superdex 200 HR10/30 equilibrated in 20 mM HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, and 1 mM PMSF.  $^{35}$ S-labeled hRAR $\alpha$  was used as a tracer in this particular experiment ( $\sim$ 100 000 cpm), and an autoradiogram shows a fraction of the labeled receptor. Note that this amount of labeled receptor is not detectable by western blot. hRAR $\alpha$  was detected by quantitating  $^{35}$ S radioactivity and by western blotting (upper panel). Five fractions, denoted from a to e, corresponding to the elution volume of the dimer (11.50–13.50 mL), and five fractions, denoted from f to j, corresponding to the elution position of the monomer (16.00–17.50 mL) were resolved by SDS-PAGE, blotted, and revealed by an anti-RAR $\alpha$  antibody. Arrowheads at the top of the elution profile show the elution volume of Blue dextran ( $V_0$ ), thyroglobulin ( $R_s = 8.5$  nM), ferritin (6.1 nM), and ovalbumin (2.9 nM).  $V_1$  is determined by injection of free radiolabeled ATRA. Blotted fractions are indicated by arrowheads located along the curve shown. (B) ATRA-bound hRAR $\alpha$  exists as a dimer. Bacterial extracts were incubated for 16 h at 4  $^{\circ}$ C in the dark with 30 nM [ $^3$ H]ATRA, fractionated, and analyzed as described in (A). Arrowheads indicate the elution volume of standard proteins. (C) CD367-bound hRAR $\alpha$  exists as a monomer. Bacterial extracts were processed exactly as described above, except that tritiated CD367 was used in place of ATRA.

the  $K_d$  of hRAR $\alpha$  for its natural ligand, *all-trans*-retinoic acid, or for a synthetic retinoid, CD367, which binds equally well to the RAR $\beta$  and RAR $\gamma$  (Martin et al., 1992). However, deletion of the remaining part of the D domain (mutant  $\Delta$ N198/462) yielded a receptor that did not bind either ATRA or CD367. The critical importance of the C-terminal end of the D domain has also been noticed for T3 binding to the human thyroid hormone receptors  $\alpha$ 1 and  $\beta$ 1 (Lin et al., 1991 and references therein). Interestingly, agonist-induced conformational changes of RAR $\alpha$  (Keidel et al., 1994) and of RXR $\alpha$  (Keidel et al., 1994; Leid, 1994) yielded a 30-kDa fragment resistant to proteolysis. In the case of RXR $\alpha$ , the N-terminal end of this protease-resistant fragment mapped to Ser 229, which is located in the middle of the D domain (Leid, 1994). Taken together, these results therefore point to a critical role of this region in ligand recognition.

Deletions removing the F domain did not prevent the receptor from binding ATRA and CD367, whereas further deletions introduced at the C-terminal end of the E domain led to the loss of the hormone binding capacity, identifying a region (403-PGSMPLI-410) required to confer a high affinity for ATRA and CD367 (see Figure 7). Our competition studies showed that this region is also responsible for the specific recognition of retinobenzoic derivatives Am80 and Am580, whereas ATRA, 9-*cis*-RA, and Ch55 still bound to the receptor lacking this region, albeit with a 10-fold decreased affinity when compared to the full-length receptor. This observation is intriguing since these two compounds, in opposition to ATRA, 9-*cis*-RA, and Ch55, have been shown to display a strong selectivity for RAR $\alpha$  (Bernard et al., 1992; Delescluse et al., 1991; Martin et al., 1992). Tate et al. (1994) reported that hRAR $\alpha$  truncated to amino acid 404 bound ATRA and Am580 with an affinity similar to that of the wild-type receptor, which would identify Gly 404 as the amino acid involved in Am80 and Am580 recognition. The role of Gly 404 is also emphasized by the fact that its deletion yielded a receptor with a 10-fold lower affinity for ATRA when compared to the full-length receptor (Tate et al., 1994, and our results). However, Gly 404 is conserved in the three RAR isoforms (see Figure 7), thereby excluding its involvement in the specific recognition of these compounds. In the same report, the authors reported that hRAR $\alpha$  truncated at position 404 was unable to bind 9-*cis*-RA, whereas our  $\Delta$ N186/403 mutant still binds this compound. The dramatically different experimental conditions for receptor overexpression and ligand-binding assays may be an explanation for this discrepancy, although the authors reported that the  $\Delta$ 404 mutant displayed an abnormal electrophoretic mobility in denaturing conditions, which could reflect an altered charge distribution of this particular receptor mutant. On the contrary, the  $\Delta$ 186/403 mutant did not display such an abnormal property (see Figure 3).



**FIGURE 7:** Sequence alignment of human *all-trans*-retinoic acid receptors  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  and of hRXR $\alpha$  and the *Drosophila* usp gene product. Regions conserved among ATRA-binding receptors are indicated by squares, and residues conserved among the five nuclear receptors are indicated by oval boxes. The 403–410 region is boxed in gray for hRAR $\alpha$ . Dots at the top of the sequences indicate conservative mutations.

These results demonstrate that a critical region located between amino acids 403 and 410 is involved in ligand recognition. Very interestingly, other mutants of retinoic acid receptors have been described, for which the ligand binding activity has been studied. A subclone of HL60 cells is partially resistant to ATRA-induced differentiation due to a truncation of RAR $\alpha$  to position 410 (Robertson et al., 1992). RAC 65 cells contain a truncated hRAR $\alpha$  at the amino acid 395, which acts as a dominant negative receptor devoid of any ATRA binding activity (Pratt et al., 1990). A dominant negative activity was also evidenced for  $\Delta$ 403 RAR $\alpha$ ,  $\Delta$ 397 RAR $\beta$ , and  $\Delta$ 406 RAR $\gamma$  (Damm et al., 1993). Other mutations were also described: the RAR $\beta$  deleted from the F domain binds ATRA with an affinity equal to that of the wild-type receptor (Shen et al., 1993). Taken together, our data and others show that the C-terminal end of the E domain has a critical role in hormone binding. The domain F is dispensable, whereas the 403–410 region contains critical residues or has a structure required for high-affinity ATRA binding. Importantly, this region contains the AF-2 region, a ligand-dependent transactivating sequence that can potentially form an  $\alpha$ -helix (see Figure 7). This sequence is highly conserved in ATRA binding receptors, whereas it displays strong divergence in RXRs, which do not bind ATRA. Whether specific residues are directly involved in a direct interaction with the ligand will be tested by site-directed mutagenesis. Moreover, RARs display a differential affinity for ATRA and 9-*cis*-RA (Allenby et al., 1993), and again, assessing the contribution of individual amino acids to this differential binding may prove useful to the conception of specific ligands.

ATRA binding to the intact receptor or the isolated HBD was characterized by a Hill coefficient of 2, indicative of positive cooperativity. In contrast, CD367 displayed no cooperative binding in identical conditions. This cooperative binding was observed at receptor concentrations ranging from 0.5 to 50 nM, which are close to that observed in nuclei (100–5000 sites/nucleus). At lower receptor concentrations, this cooperativity was hardly detected, due to the lack of sensitivity of the hormone binding assay. Indeed, ATRA binding has so far been reported to be noncooperative in various overexpression systems. The failure to observe such a mechanism can be explained by the lack of data points at low ligand concentration (Allegretto et al., 1993; Crettaz et al., 1990; Dallery et al., 1993) or to lower receptor concentrations (Fukasawa et al., 1993; Keidel et al., 1992; Yang et al., 1991). Such pitfalls have already been evoked to explain apparent discrepancies in the observed ligand-binding mechanism of the estrogen receptor [see Schwartz and Skafar (1993) and references therein]. Positive cooperativity has also been reported for the estrogen and progesterone receptors (Schwartz & Skafar, 1993; Skafar, 1991, and references therein). Like those for enzymatic complexes, this ligand-binding mechanism has been interpreted as a means to regulate closely the activity of steroid hormone receptors which bind to their cognate hormone response elements as homodimers. In contrast to these receptors, other nuclear receptors like RARs, T<sub>3</sub>R, or vitamin D receptors (VDR) are known to bind more efficiently to DNA when forming heterodimers with RXR than when forming homodimers (Mader et al., 1993a; Mader et al., 1993b). However, the exact role of the ligand remains unclear for these receptors since 9-*cis*-RA induces RXR

homodimerization (Zhang et al., 1992), whereas the cognate ligands for T<sub>3</sub>R and VDR favor homodimer dissociation and in turn facilitate heterodimer formation (Miyamoto et al., 1993; Cheskis & Freedman, 1994). Whether such differences can be evidenced for hRAR $\alpha$  bound to CD367 or ATRA remains a hypothesis, as well as the relation between CD367 particular behavior (i.e., binding to RARs with an affinity similar to that of ATRA but transient association with RAR homodimers) and its higher efficiency in transactivation assays (Martin et al., 1992). It is interesting to note that CD367 is a rigid polycyclic compound which probably cannot undergo conformational changes imposed by receptor structure alteration observed upon ligand binding, in opposition to the more flexible ATRA molecule which could still bind to the structurally reshaped ligand-binding site. Such conformational changes, already proposed to be related to the transcriptional efficiency of RAR $\beta$  induced by flexible or rigid ligands (Lombardo et al., 1994), could also play a role in the cooperative binding mechanism observed here.

## ACKNOWLEDGMENT

We thank Drs. R. M. Evans and V. Giguere for the gift of pHK1 plasmid and N. Dallery for providing the pHK1-BB construct. We also thank Prof. B. Sablonniere for providing us with the anti-RAR $\alpha$  polyclonal antibody IS39 and Dr. B. Shroot (CIRD-Galderma) for providing us with CD367. We also thank Hoffmann-La Roche for the gift of 9-*cis*-retinoic acid.

## REFERENCES

- Ali, M., Torian, B., & Vedeckis, W. V. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 1032.
- Allan, G. F., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., & O'Malley, B. W. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 11750.
- Allegretto, E. A., McClurg, M. R., Lazarchik, S. B., Clemm, D. L., Kerner, S. A., Elgor, M. G., Boehm, M. F., White, S. K., Pike, J. W., & Heyman, R. A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 26625.
- Allenby, G., Bocquel, M. T., Saunders, M., Kazmer, S., Speck, J., Rosenberger, M., Lovey, A., Kastner, P., Grippo, J. F., Chambon, P., & Levin, A. A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 30.
- Baniahmad, A., Ha, I., Reinberg, D., Tsai, S., Tsai, M. J., & O'Malley, B. W. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8832.
- Barettino, D., Ruiz, M. D. M. V., & Stunnenberg, H. (1994) *EMBO J.* 13, 3039.
- Becker, P. B., Gloss, B., Schmid, W., Strähle, U., & Schütz, G. (1986) *Nature* 324, 686.
- Beekman, J. M., Allan, G. F., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., & O'Malley, B. W. (1993) *Mol. Endocrinol.* 7, 1266.
- Bernard, B. A., Bernardon, J. M., Delescluse, C., Martin, B., Lenoir, M. C., Maignan, J., Charpentier, B., Pilgrim, W. R., Reichert, U., & Shroot, B. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 977.
- Burgess, R. R. (1991) *Methods Enzymol.* 208, 3.
- Cavey, M. T., Martin, B., Carlan, I., & Shroot, B. (1990) *Anal. Biochem.* 186, 19.
- Chakraborti, P. K., & Simons, S. S., Jr. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 1338.
- Cheskis, B., & Freedman, L. P. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 3329.
- Crettaz, M., Baron, A., Siegenthaler, G., & Hunziker, W. (1990) *Biochem. J.* 272, 391.
- Dallery, N., Sablonniere, B., Grillier, I., Formstecher, P., & Dautrevaux, M. (1993) *Biochemistry* 32, 12428.
- Damm, K., Heyman, R. A., Umesono, K., & Evans, R. M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 2989.
- Danielian, P. S., White, R., Lees, J. A., & Parker, M. G. (1992) *EMBO J.* 11, 1025.

- Dawson, M. I., Hobbs, P. D., Cameron, J. F., & Rhee, S. W. (1993) *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 33, 245.
- Delescluse, C., Cavey, M., Martin, B., Bernard, B. A., Reichert, U., Maignan, J., Darmon, M., & Schroot, B. (1991) *Mol. Pharmacol.* 40, 556.
- de The, H., Vivanco-Ruiz, M. M., Tiollais, P., Stunnenberg, H. G., & Dejean, A. (1990) *Nature* 343, 177.
- Elliston, J. F., Beekman, J. M., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W., & Tsai, M. J. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 5193.
- Eyrolles, L., Kagechika, H., Kawachi, E., Fukusawa, H., Iijima, T., Matsushima, Y., & Shudo, K. (1994) *J. Med. Chem.* 37, 1508.
- Forman, B. M., & Samuels, H. H. (1990) *Mol. Endocrinol.* 4, 1293.
- Fukasawa, H., Iijima, T., Kagechika, H., Hashimoto, Y., & Shudo, K. (1993) *Biol. Pharm. Bull.* 16, 343.
- Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P., & Evans, R. M. (1987) *Nature* 330, 624.
- Goldstein, R. A., Katzenellenbogen, J. A., Lutheyschulten, Z. A., Seielstad, D. A., & Wolynes, P. G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 9949.
- Halachmi, S., Marden, E., Martin, G., Mackay, H., Abbondanza, C., & Brown, M. (1994) *Science* 264, 1455.
- Hamada, K., Gleason, S. L., Levi, B.-Z., Hirschfield, S., Appella, E., & Ozato, K. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 8289.
- Keidel, S., Rupp, E., & Szardenings, M. (1992) *Eur. J. Biochem.* 204, 1141.
- Keidel, S., LeMotte, P., & Apfel, C. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 287.
- Leid, M. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 14175.
- Leid, M., Kastner, P., & Chambon, P. (1992) *Trends Biochem. Sci.* 17, 427.
- Lin, K.-H., Parkison, C., McPhie, P., & Cheng, S.-Y. (1991) *Mol. Endocrinol.* 5, 485.
- Lombardo, A., Costa, E., Chao, W.-R., Toll, L., Hobbs, P. D., Jong, L., Lee, M.-O., Pfahl, M., Ely, K. R., & Dawson, M. I. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 7297.
- Mader, S., Chen, J. Y., Chen, Z. P., White, J., Chambon, P., & Gronemeyer, H. (1993a) *EMBO J.* 12, 5029.
- Mader, S., Leroy, P., Chen, J. Y., & Chambon, P. (1993b) *J. Biol. Chem.* 268, 591.
- Martin, B., Bernardon, J. M., Cavey, M. T., Bernard, B., Carlvann, L., Charpentier, B., Pilgrim, W. R., Shroot, B., & Reichert, U. (1992) *Skin Pharmacol.* 5, 57.
- McPhie, P., Parkison, C., Lee, B. K., & Cheng, S. Y. (1993) *Biochemistry* 32, 7460.
- Minucci, S., Zand, D. J., Dey, A., Marks, M. S., Nagata, T., Grippo, J. F., & Ozato, K. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 360.
- Miyamoto, T., Suzuki, S., & Degroot, L. J. (1993) *Mol. Endocrinol.* 7, 224.
- Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H., & Chambon, P. (1993) *EMBO J.* 12, 2349.
- Newcomer, M. E., Pappas, R. S., & Ong, D. E. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 9223.
- Pratt, M. A., Kralova, J., & McBurney, M. W. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10, 6445.
- Pratt, W. B. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 21455.
- Robertson, K. A., Emami, B., & Collins, S. J. (1992) *Blood* 80, 1885.
- Scatchard, G. (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660.
- Schwartz, J. A., & Skafar, D. F. (1993) *Biochemistry* 32, 10109.
- Shen, S., Vandersaag, P. T., & Kruijer, W. (1993) *Mech. Dev.* 40, 177.
- Skafar, D. F. (1991) *Biochemistry* 30, 10829.
- Smith, D. F., & Toft, D. O. (1993) *Mol. Endocrinol.* 7, 4.
- Tahayato, A., Lefebvre, P., Formstecher, P., & Dautrevaux, M. (1993) *Mol. Endocrinol.* 7, 1642.
- Tate, B. F., Allenby, G., Janocha, R., Kazmer, S., Speck, J., Sturzenbecker, L. J., Abarzua, P., Levin, A. A., & Grippo, J. F. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 2323.
- Tsai, S., Bartelmez, S., Heyman, R., Damm, K., Evans, R., & Collins, S. J. (1992) *Genes Dev.* 6, 2258.
- Vegeto, E., Allan, G. F., Schrader, W. T., Tsai, M. J., McDonnell, D. P., & O'Malley, B. W. (1992) *Cell* 69, 703.
- Wong, C. I., Zhou, Z. X., Sar, M., & Wilson, E. M. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 19004.
- Zanotti, G., Malpeli, G., & Berni, R. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 24873.
- Zhang, X. K., & Pfahl, M. (1993) *Trends Endocrinol. Metab.* 4, 156.
- Zhang, X. K., Lehmann, J., Hoffmann, B., Dawson, M. I., Cameron, J., Graupner, G., Hermann, T., Tran, P., & Pfahl, M. (1992) *Nature* 358, 587.

BI942345Y

### **III. CONCLUSION**

Dans le but de déterminer les parties du hRAR $\alpha$  impliquées dans l'activité de liaison au ligand, nous avons construit une série de mutant de délétion à partir du récepteur sauvage. La délétion du domaine A/B, C et de la partie N-terminale du domaine D n'entraîne pas de modification notable de l'affinité des ligands testés. Toutefois, la partie C-terminale du domaine D se révèle essentielle pour la liaison des deux rétinoïdes de référence testés, l'ATRA et le CD367. L'importance de ce domaine a été également mise en évidence pour la liaison de l'hormone T3 aux récepteurs Tr $\alpha$ 1 et Tr $\beta$ 1 (Lin et al., 1991).

La délétion du domaine F résulte en une protéine présentant les mêmes propriétés que le récepteur sauvage tandis que des délétions plus importantes de la partie C-terminale aboutissent à une altération des caractéristiques de liaison. Elles identifient la région 403/410 comme essentielle pour une liaison de forte affinité de liaison avec les deux rétinoïdes naturels, l'ATRA et le 9-cis RA. La présence de cette région est également requise pour la liaison de deux ligands spécifiques du hRAR $\alpha$ , l'Am580 et l'Am80. Ces résultats montrent que la région C-terminale du domaine E contient des résidus ou une structure nécessaire pour l'interaction avec le ligand.

### **B. ETUDE DE LA CONTRIBUTION DES REGIONS 186/198 ET 403/410 DANS L'INTERACTION LIGAND/RECEPTEUR**

Dans la partie précédente, nous avons montré que deux régions non contiguës au niveau de la séquence primaire du hRAR $\alpha$  sont nécessaires soit au maintien d'une conformation appropriée du site de liaison au ligand, soit directement impliquées dans l'interaction ligand/récepteur. Une étude systématique par mutagenèse dirigée de ces deux régions a été effectuée afin d'identifier les acides aminés impliqués dans la liaison au ligand. Dans le but de faciliter cette étape, la substitution des différents résidus a été réalisée à l'aide de système de cassette à oligonucléotides. Cette cassette est dotée en 5' et 3' de sites de restriction équivalents

à ceux existant ou créés artificiellement sur la séquence d'ADNc du hRAR $\alpha$ .

## I. REGION 186/198

### 1. Mutagénèse dirigée

La conception du système de cassette à oligonucléotides au niveau de cette région a nécessité plusieurs étapes. L'observation de la séquence d'ADNc du hRAR $\alpha$  de cette région nous donne un seul site de restriction utilisable, le site BamH1 localisé en 661. Toutefois, une étude réalisée à l'aide du programme PCgene<sup>R</sup> montre qu'il est possible, en effectuant une mutation ponctuelle de créer artificiellement un site HindIII en 698.

La première étape a donc consisté à supprimer le site HindIII existant déjà dans le site de clonage multiple du vecteur pQE-9. Pour cela, nous avons digéré le vecteur pQ9 $\Delta$ N198/462 (voir article) par HindIII puis traité le produit obtenu par la nucléase S1 et le fragment de Kleenow. Nous avons ainsi obtenu le vecteur pQ9 $\Delta$ N198/462-HindIII. Pour la réalisation de la cassette, le vecteur précédent, digéré préalablement par BamH1, a été soumis à l'action de la mung bean nucléase (voir figure 7). Cette enzyme digère l'ADN simple brin donnant dans notre cas des extrémités franches au niveau du site BamH1. Le produit obtenu a été recircularisé en présence de l'oligonucléotide 186/198 conçu pour créer les sites BamH1 et HindIII après insertion.

Le caractère fortement hydrophile de la région étudiée suggère qu'elle puisse interagir avec le groupement carboxylique des rétinoïdes. Pour tester cette hypothèse, trois mutations touchant des acides aminés chargés ont été réalisées : l'acide glutamique 189, l'arginine 192 et la lysine 193, tous trois mutés en alanine. Chaque mutation a été réalisée en digérant le vecteur par BamH1 et HindIII et en insérant un oligonucléotide portant la mutation désirée.

### 2. Résultats

Nous avons dans un premier temps vérifié que la mutation portant sur la thréonine 198, substituée en serine lors de la réalisation de la cassette, n'affecte pas les propriétés de liaison au ligand du récepteur. Les différentes études d'affinité ont été réalisées avec le [<sup>3</sup>H] CD367,

coupure par Bam HI du pQ9ΔN198/462

199  
 Gly Thr Phe  
 5'...AA GGA TCC TTC CC...3'  
 3'...TT CCT AGG AAG GG...5'

5'...AA GGA TC C TTC CC...3'  
 3'...TT C CT AGG AAG GG...5'

traitement mung bean nucléase

5'...AA G C TTC CC...3'  
 3'...TT C G AAG GG...5'

clonage linker 186/198

186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198..199  
 Gly Ser Glu Leu Ile Glu Lys Val Arg Lys Ala His Gln Glu Ser Phe  
 5'..AA GGA TCC GAG CTC ATT GAG AAG GTG CGC AAA GCG CAC CAG GAA AGC TTC CC..3'  
 3'..TT CCT AGG CTC GAG TAA CTC TTC CAC GCG TTT CGC GTG GTC CTT TCG AAG GG..5'  
*Bam* HI *Hind* III

DBox

**Figure 7** : Montage de la cassette à oligonucléotide 186/198

rétinoïde synthétique plus stable que l'ATRA. La constante d'affinité obtenue pour cette protéine (récepteur DBox) est de 1 nM, valeur comparable à celle obtenue pour le récepteur sauvage (voir figure 8). De la même manière, nous avons mesuré l'affinité des trois mutants pour ce ligand. Le mutant E189A présente une constante d'affinité de 4,4 nM, le R192A de 7 nM et le K193A de 3 nM. Ces trois valeurs sont du même ordre que celles obtenues pour le témoin indiquant que les trois aminoacides étudiés ne sont pas impliqués dans l'interaction ligand/récepteur.

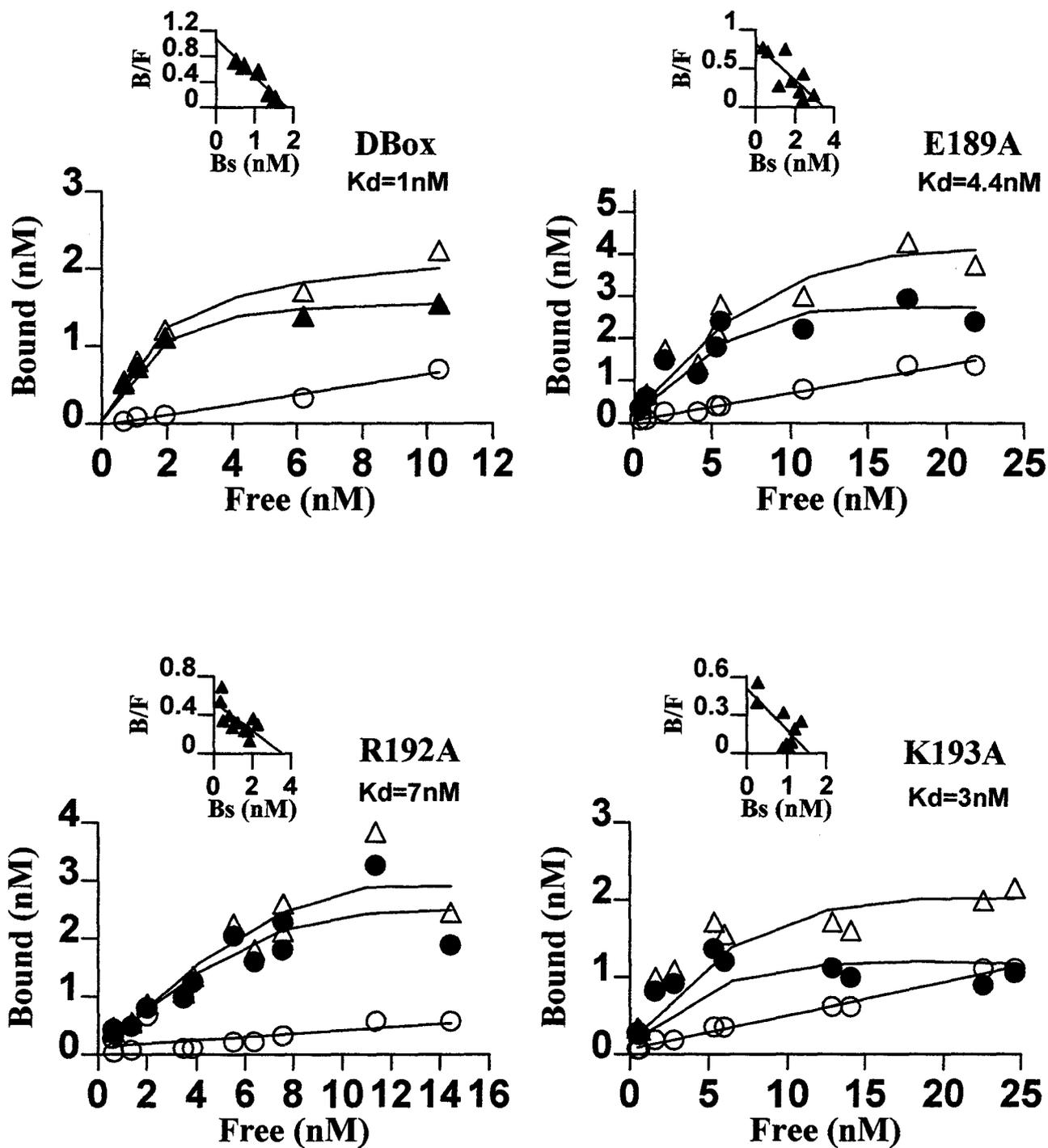
Alors que nous réalisons ces expériences, la structure cristallographique du RAR $\gamma$  complexé avec l'ATRA a été publiée et a montré qu'il n'existe pas d'interaction directe entre la région étudiée et le ligand (Renaud et al., 1995). Nous pouvons voir sur la figure 9 la modélisation du LBD du hRAR $\alpha$  complexé à l'ATRA. Elle a été réalisée par le docteur E. Thoreau du CIRD Galderma à partir des données publiées par le groupe de Dino Moras sur le hRAR $\gamma$ . Le caractère indispensable à l'activité de liaison de la séquence 186/198 s'explique probablement par un rôle de stabilisation du site de liaison au ligand et de façon plus générale du HBD. Par la suite, cette région a été définie comme responsable de l'interaction avec les co-répresseurs (Chen and Evans, 1995).

## II. REGION 403/410

Nous avons vu dans la première partie de ce chapitre que l'affinité pour l'ATRA et le CD367 est conservée pour un récepteur tronqué en C-terminal jusqu'à l'acide aminé 410 ( $\Delta$ C186/410) mais chute d'un facteur trois quand la délétion est étendue jusqu'à l'acide aminé 403 ( $\Delta$ C186/403). De plus, cette dernière délétion entraîne une perte d'affinité considérable pour certains ligands synthétiques (Am580 et Am80) suggérant une implication directe de cette région dans la liaison au ligand. Afin de mieux comprendre son rôle, nous avons muté individuellement chacun de ces sept acides aminés, du résidu 404 au résidu 410.

### 1. Mutagenèse dirigée

La position et la nature des mutations effectuées sur cette région sont indiquées sur la figure 10. Les études portant sur la structure secondaire positionnent la région 403/410 dans une boucle. Pour tester l'importance de cette structure dans la liaison au ligand, nous avons substitué



**Figure 8 : courbes de saturation et linéarisation selon Scatchard des différents mutants du domaine D pour le CD367**

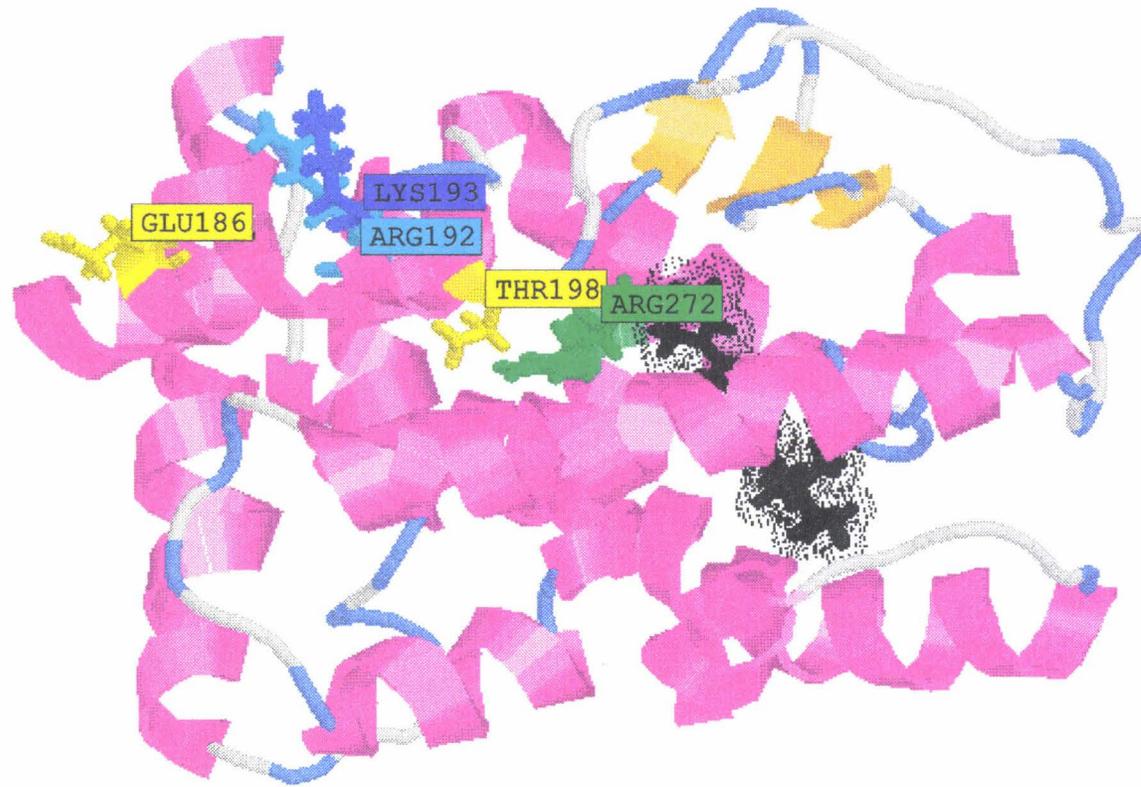
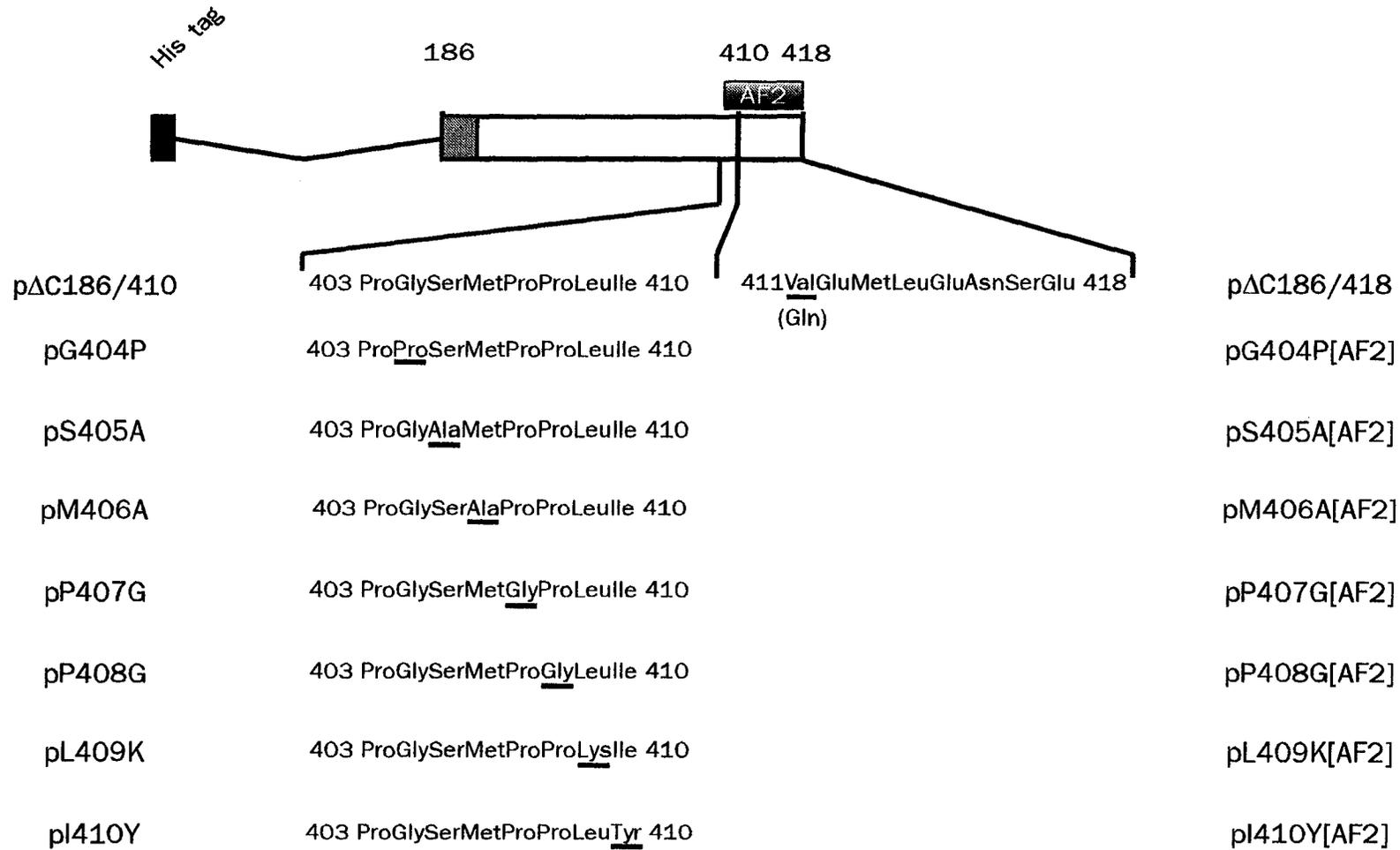


Figure 9 : position des différents acides aminés de la région 186/198 du hRAR alpha (d'après E. Thoreau, CIRD Galderma) par rapport à l'ATRA (en noir)



76

Figure 10 : positions et natures des mutations effectuées sur la région 403/410

la glycine 404 par une proline qui introduit une très forte restriction de flexibilité. La sérine 405 et la méthionine 406 ont été mutées en alanine pour tester le rôle respectif des groupements hydroxyl et méthylmercapto. Les deux acides aminés suivants sont des prolines. Sachant les contraintes qu'imposent ces résidus dans le repliement des protéines, nous les avons mutés en glycine qui confère une liberté maximale dans la conformation. Enfin, la leucine 409 et l'isoleucine 410 ont été mutées respectivement en lysine (introduction d'une charge) et tyrosine (renforcement du caractère hydrophobe) pour vérifier l'implication de ces résidus hydrophobes dans la liaison au ligand.

La région 403/410 chevauche en partie la région impliquée dans la transactivation ligand-dépendante du récepteur, l'AF2. Cette dernière subit un important réarrangement conformationnel après la liaison du ligand et se retrouve positionnée dans le site de liaison. Elle peut donc potentiellement influencer sur l'interaction du récepteur avec les différents rétinoïdes. Pour évaluer l'importance de la région 403/410 dans son positionnement dans le site, nous avons testé l'effet des diverses mutations ponctuelles sur l'affinité du récepteur délété du domaine F mais porteur ou non de l'AF2.

La mutagenèse dirigée a été effectuée en utilisant également un système de cassette à oligonucléotides. Pour les études d'affinité pour les récepteurs tronqués en 410, nous avons utilisé le site *Sma*I existant en position 1309 du hRAR $\alpha$  et un site *Cla*I créé artificiellement dans le site de clonage multiple du pQE-9. Les récepteurs mutés possédant l'AF2 ont été obtenus en insérant un oligonucléotide codant pour cette région en aval de la région 403/410. L'insertion de ce dernier crée une mutation ponctuelle en 411 (Gln en Val). Toutefois, la mutation de ce résidu en alanine est inactive sur la liaison au ligand (ATRA et 9-cisRA) et sur les propriétés de transactivation du récepteur (ATRA) (Tate et al., 1996; Tate and Grippo, 1995). Ce résultat est en accord avec la non conservation de ce résidu dans la famille des récepteurs nucléaires ainsi que le montre la comparaison des séquences des différents AF2.

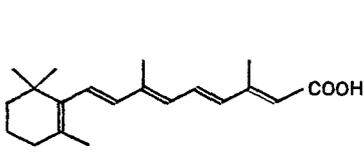
## 2. Résultats

### 2. a. $\Delta$ N186/462, $\Delta$ C186/418 et $\Delta$ C186/410 : implication du domaine F dans l'interaction avec l'antagoniste Ro41-5253

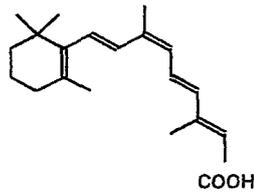
Dix rétinoïdes naturels ou synthétiques ont été testés sur le récepteur  $\Delta$ N186/462 (le récepteur  $\Delta$ N186/462 est la référence et chaque délétion est effectuée à partir de celui-ci) ou tronqués en C-terminal ( $\Delta$ C186/410 et  $\Delta$ C186/418). Le [<sup>3</sup>H]CD367 qui se lie aux trois types de RARs et qui présente une plus grande stabilité que l'ATRA a été utilisé comme ligand de référence (Delescluse et al., 1991; Martin et al., 1992). Nous avons d'abord testé une série de ligands qui ne présentent pas de spécificité de liaison par rapport aux différents sous types de récepteurs (CD367, ATRA, 9-cis RA et TTNPB) (Delescluse et al., 1991; Martin et al., 1992; Dawson et al., 1995). Une seconde série comprenant des ligands sélectifs du RAR $\alpha$  (Am580, Am80 et Ro41-5253), du RAR $\beta$  (TTNN et CD417) et du RAR $\gamma$  (CD437) a été également étudiée (voir figure 11) (Martin et al., 1992; Apfel et al., 1992). Ce sont des agonistes à l'exception du Ro41-5253 qui est un antagoniste.

Les valeurs des constantes de dissociation ou d'inhibition obtenues pour la protéine  $\Delta$ N186/462 sont du même ordre que celles présentées dans la littérature confirmant ainsi la validité du système d'expression utilisé (voir table 2)(Delescluse et al., 1991; Martin et al., 1992; Apfel et al., 1992). Les rétinoïdes testés possèdent une forte affinité pour le récepteur (ATRA, 9-cis RA, CD367 et Ro41-5253 environ 5 nM; Am80 et TTNN environ 40 nM) excepté le CD437 et CD417 qui présentent respectivement une constante d'inhibition de 5000 et 400 nM. La faible affinité observée pour les deux derniers ligands est logique compte-tenu de leur sélectivité  $\beta$  ou  $\gamma$ .

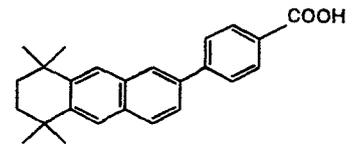
La délétion du domaine F (protéine  $\Delta$ C186/418) n'affecte pas l'affinité des différents ligands testés sauf le Ro41-5253 qui voit son affinité diminuée d'un facteur dix en l'absence de ce dernier. Ces observations suggèrent soit un rôle dans la liaison du domaine F dans son ensemble, soit un effet spécifique de la mutation Q411V introduite dans le récepteur  $\Delta$ C186/418 (voir chapitre mutagenèse dirigée). En effet, l'absence de conséquence sur la liaison de l'ATRA ou du 9-cis RA ne préjuge en rien d'un effet éventuel sur l'interaction avec un antagoniste de synthèse présentant une structure très particulière. Le fait que la protéine  $\Delta$ C186/410 présente



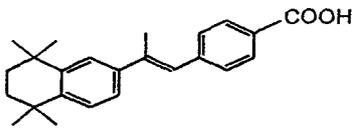
ATRA (RARs)



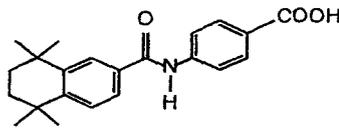
9-cis RA (RARs, RXRs)



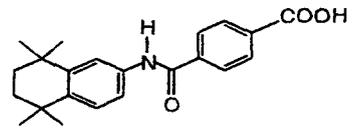
CD367 (RARs)



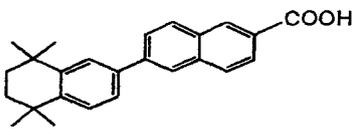
TTNPB (RARs)



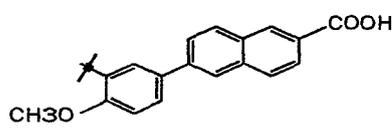
Am580 (RAR alpha)



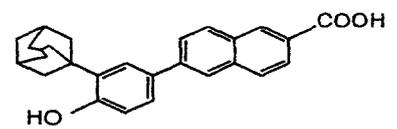
Am80 (RAR alpha)



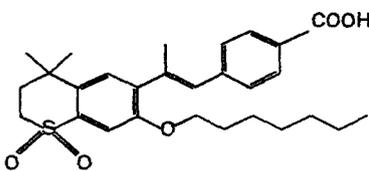
TTNN (RAR beta)



CD417 (RAR beta)



CD437 (RAR gamma)



541-5253 (antagoniste RAR alpha)

FIGURE 11 : rétinoïdes naturels et synthétiques utilisés (leur sélectivité est indiquée entre parenthèse)

mutant	CD367 Kd (nM)	Ki (nM)								
		ATRA	9-cisRA	TTNPB	Am580	Am80	TTNN	CD417	CD437	Ro41-5253
$\Delta$ C186/462	4	3.3	7.1	2.17	8.1	37.1	38.8	408	4895	4.4
$\Delta$ N186/418	2	6.15	9.3	3.1	7.5	59.3	71	329	4109	46
$\Delta$ N186/410	6	11.15	15.92	7.45	8.58	66.7	63.05	546	5586	42.7
$\infty$ $\Delta$ N186/403	16	33.1	39.5	NA	>200	NB	NA	NA	NA	NA

RAR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 
RAR  $\alpha$ 
RAR  $\beta$ 
RAR  $\gamma$ 
RAR  $\alpha$

agoniste



antagoniste

Tableau 2 : Affinités des mutants de délétion (NA : non mesuré ; NB : pas de liaison)

exactement les mêmes propriétés de liaison que la protéine  $\Delta C186/418$  suggère fortement que le résidu 411 n'est pas impliqué dans l'interaction avec le Ro41-5253 et que la diminution est due à la délétion du domaine F. L'importance de ce domaine dans la liaison et les propriétés de transactivation des antagonistes a déjà été montrée pour les récepteurs stéroïdiens (Montano et al., 1995). L'affinité pour les ligands des protéines  $\Delta 186/418$  et  $\Delta 186/410$  est pratiquement inchangée. Ceci suggère que, malgré le repositionnement de l'AF2 dans le site de liaison au ligand, cette région ne possède pas de déterminants structuraux impliqués dans l'interaction des ligands testés.

## 2. b. Effets des mutations ponctuelles sur les récepteurs $\Delta C186/410$ .

Les résultats des études d'affinité réalisées sur ces mutants sont indiqués dans le tableau 3. Des différences importantes sont observées en fonction de la mutation et du rétinoïde considéré. Ainsi, nous pouvons définir plusieurs groupes de ligands présentant des variations identiques. Le premier comprend les deux ligands naturels, l'ATRA et le 9-cis RA. Ils présentent un comportement identique quelque soit la mutation introduite. Les variations d'affinité observées sont faibles à l'exception des mutations S405A et I410Y pour lesquelles on observe un  $K_i$  environ sept fois supérieur. Un deuxième groupe de ligands peut être défini selon le même critère. Il comprend le TTNPB et les deux ligands spécifiques du  $RAR\alpha$ , l'Am580 et l'Am80. Leurs structures varient en fonction du connecteur utilisé pour relier le cycle naphthalène à l'acide benzoïque (voir figure 11). Ils présentent une forte diminution d'affinité pour les mutations G404P, M406A et L409K. Une exception est à noter, la mutation P407G, où l'inversion de l'orientation de la liaison amide dans le dérivé Am80 s'accompagne d'une diminution d'affinité. Deux ligands présentent également un comportement semblable. Il s'agit du TTNN, sélectif des  $RAR\beta$  et de façon moindre  $\gamma$ , et du CD417, sélectif du  $RAR\beta$ . Leur affinité est particulièrement élevée pour les mutants P407G, P408G et L409K. Ces deux ligands appartiennent à la même série chimique que le CD437, ligand sélectif du  $RAR\gamma$ . Ils diffèrent selon le substituant du noyau phényl naphthoïque introduit, substituant dont la nature conditionne la sélectivité vis à vis des récepteurs  $\beta$  et  $\gamma$  (voir figure 11). Le CD437 présente toutefois un comportement particulier avec une augmentation d'affinité pour les mutants S405A, P407G et I410Y.

Le CD367 présente des variations spécifiques en fonction des mutations. Nous pouvons

Mutant	CD367 Kd (nM)	Ki (nM)								
		ATRA	9-cis RA	TTNPB	Am580	Am80	TTNN	CD417	CD437	Ro41-5253
$\Delta$ C186/410	6	9.94	15.1	7.45	8.58	66.77	63.05	546.5	6741	46.21
G404P	4.79	11.15	15.92	186.2	147.33	> 700	184.26	1473	5586	42.75
S405A	0.19	1.22	2.33	4.94	2.21	9.66	12.33	354	1577	11.44
M406A	4.71	39.77	44.45	37.16	68.51	> 650	187.4	1243	4205	50.16
P407G	0.46	6.27	6.61	10.03	13.42	192.5	14.3	39.6	1528	39.14
P408G	0.84	22.9	31.29	24.75	13.24	69.83	17.96	45.47	4100	40.08
L409K	6.2	40.62	46.56	501.9	272.2	> 800	317.6	1381.8	6683	159.1
I410Y	0.08	1.64	2.76	3.54	2.64	23.15	4.27	14.83	705	4.23

RAR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 
RAR  $\alpha$ 
RAR  $\beta$ 
RAR  $\gamma$ 
RAR  $\alpha$

agoniste
antagoniste

Tableau 3 : effets des mutations ponctuelles sur l'affinité du récepteur  $\Delta$ C198/410

noter l'obtention de mutants à très forte affinité pour les positions 405, 407 et 410 pour lesquelles on observe une diminution de la constante de dissociation de trente à cinquante fois la valeur du témoin.

Enfin, la liaison de l'antagoniste Ro41-5253 est au contraire peu sensible aux mutations étudiées. On trouve pour la L409K et la I410Y respectivement une diminution d'affinité d'un facteur trois et une augmentation d'un facteur 10, ce qui reste modéré comparativement aux autres ligands sélectifs du RAR $\alpha$ .

L'impact des mutations sur la conformation et l'hydrophobicité relative de la région entraîne un comportement différent des ligands. Deux mutations produisent le même effet quelquesoit le rétinolide étudié. Il s'agit de S405A et I410Y pour lesquelles on observe une augmentation d'affinité. Elles sont également caractérisées par une forte diminution de la sélectivité  $\beta$  et de façon moindre  $\gamma$ . Il est à noter que seul le RAR $\gamma$  présente une structure primaire différente de celle du RAR $\alpha$  au niveau de la région 403/410, où la sérine 405 est substituée par une proline. Cette variation peut expliquer en partie le comportement particulier du CD437. La mutation de la glycine 404 en proline, supposée restreindre la flexibilité de la région, affecte plus particulièrement les ligands les plus rigides (TTNPB, Am580 et Am80). Ce groupe se singularise également au niveau des mutations M406A et L409K. La mutation P407G entraîne une forte diminution de la sélectivité  $\beta$  et de façon moindre la  $\gamma$  et la mutation P408G diminue spécifiquement la sélectivité  $\beta$ .

Les mutations effectuées sur la région 403/410 induisent de fortes variations d'affinité des rétinolides étudiés. Elles soulignent des similarités structurales pouvant exister entre certains groupes de ligand. Les mutations P407G et P408G augmentent considérablement l'affinité des ligands  $\beta$  et  $\gamma$  sélectifs démontrant leur rôle important dans la discrimination des rétinolides. Finalement, les mutations S405A et I410Y produisent le même effet sur tous les ligands suggérant que ces résidus interagissent avec une structure commune à tous les ligands. Une exception notable est la faible influence de cette région sur la liaison de l'antagoniste Ro41-5253 suggérant un mode d'interaction différent qui était déjà fortement suggéré par les études d'affinité réalisées sur les mutants de délétion (voir partie précédente).

## 2. c. Effets des mutations ponctuelles sur les récepteurs $\Delta$ C186/418

La présence de la région AF2 modifie de façon considérable les affinités décrites précédemment (voir tableau 4). Excepté pour le Ro41-5253 et le CD437 qui montrent un comportement particulier, le sens des variations observées reste identique et, en général, l'AF2 tend à minimiser les variations observées dans la partie précédente. Cet effet est particulièrement visible pour les ligands les plus rigides (TTNPB, Am580 et Am80). Quelques exceptions sont toutefois à noter. La première est l'impact de la mutation G404P sur les deux ligands naturels où l'on observe une baisse d'affinité d'un facteur cinq. La deuxième est la mutation I410Y qui montre une inversion totale du sens de variation. Il n'y a plus, comme dans le cas précédent, un gain d'affinité mais au contraire une diminution. Le groupe des ligands naturels présente de grandes disparités. Alors que ces derniers se comportent de façon identique en l'absence de cette région, on observe maintenant un effet plus important des mutations sur la liaison du 9-cis RA. L'ATRA montre uniquement une diminution d'affinité pour la mutation G404P et de façon moindre la I410Y. On trouve un effet identique de ces deux mutations sur la liaison du 9-cisRA mais plus important. Les mutations M406A, P408G et L409K présentent également une augmentation de la constante d'inhibition pour ce ligand. La dissociation des effets des mutations sur les deux ligands est particulièrement nette pour les mutants M406A et P408G où l'affinité du 9-cis RA est cinq fois inférieure à celle de l'ATRA. Elle est également présente pour les autres mutations mais plus faible. La région AF2 augmente également l'affinité de l'antagoniste pour tous les mutants. Elle peut varier d'un facteur deux (mutant G404P, L409K et I410Y), quatre (M406A, P408G) à vingt (S405A, P407G).

Au vu de l'ensemble des résultats portant sur les études d'affinité, il est clair que la région 403/410 revêt une importance considérable dans le mécanisme de liaison au ligand et de sélectivité. L'implication des différents résidus selon le ligand étudié suggère une certaine flexibilité de cette région qui aboutit à un positionnement variable des chaînes latérales des différents acides aminés. Ce phénomène est toutefois modifié en présence de l'AF2 et ceci probablement par l'existence d'interaction électrostatiques et salines avec l'hélice H5 (voir partie générale) du HBD introduisant des contraintes stériques sur la région 403/410 (Renaud et al., 1995). Ceci est bien illustré par le comportement de la mutation I410Y en présence ou non de l'AF2. Sans cette région, on observe une augmentation d'affinité pour tous les ligands. La

Mutant	CD367 Kd (nM)	Ki (nM)								
		ATRA	9-cis RA	TTNPB	Am580	Am80	TTNN	CD417	CD437	Ro41-5253
$\Delta$ C186/418	2	6.15	9.3	3.1	7.5	59.3	71	329	4109	46
G404P	4.6	28.8	50.4	21.1	50.4	216	468	2160	5040	25.2
S405A	0.2	1.4	2.4	0.8	0.9	2.74	27	183	1215	2.45
M406A	4.8	7.5	37.4	8.6	54.2	290	180	650	1590	9.8
P407G	0.4	6.6	13.3	4.6	30	78.2	28.6	140	333	4.4
P408G	0.8	4.4	19.2	2.2	5	40	110	125	2388	15
L409K	4	8.8	21.2	3.3	17.2	103	113	1347	4864	23.8
I410Y	1.2	16.5	28	9.7	12	142	191	1874	4347	20
		RAR $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$			RAR $\alpha$		RAR $\beta$		RAR $\gamma$	RAR $\alpha$
					agoniste					antagoniste

Tableau 4 : effets des mutations ponctuelles sur l'affinité du récepteur  $\Delta$ C186/418

stabilisation du complexe ligand/récepteur provient probablement de la formation d'interactions hydrophobes entre le noyau aromatique de la tyrosine et la partie  $\beta$ -ionone des ligands. En présence de l'AF2, on obtient une diminution d'affinité pour tous les ligands, contrairement au cas précédent, et qui s'expliquerait par un positionnement différent du noyau aromatique, à distance du ligand. Un autre exemple est celui du comportement de l'antagoniste Ro41-5253. En effet, la liaison de ce dernier n'est pas modifiée pour les récepteurs  $\Delta$ C186/410 ou  $\Delta$ C186/418 et faiblement influencée par les mutations en absence de l'AF2. Toutefois, les mêmes mutations montrent un effet beaucoup plus important en sa présence.

L'influence de la région 403/410 sur la liaison au ligand est en accord avec la structure cristallographique du RAR $\gamma$  complexé avec l'ATRA (figure 12) (Renaud et al., 1995). Selon cette étude, deux résidus sont potentiellement aptes à établir une interaction avec le ligand : la méthionine 406 ( $\gamma$ 408) et l'isoleucine 410 ( $\gamma$ 412). Dans notre cas, il est clair que le résidu 410 joue un rôle dans l'interaction avec l'ATRA puisque l'on obtient une diminution d'affinité en le mutant en tyrosine (en présence de l'AF2). Cependant, la mutation de la méthionine 406 en alanine n'entraîne pas d'altération de la liaison. Il est à noter que ce résidu dans le RAR $\gamma$  est précédé d'une proline qui aboutit sans aucun doute à un positionnement différent du groupement méthyl mercapto et donc un rôle différent dans l'interaction avec l'ATRA.

## **C. INFLUENCE DE LA REGION 403/410 DANS LE MECANISME D'ACTION DU RECEPTEUR**

### **I. PROTEOLYSE LIMITEE : IMPLICATION DE LA REGION 403/410 DANS LE CHANGEMENT DE CONFORMATION**

Nous avons vu précédemment que le changement de conformation induit par la liaison au ligand est une étape essentielle dans le mécanisme d'action du récepteur. Il provoque notamment le départ des corépresseurs et la formation d'une interface d'interaction

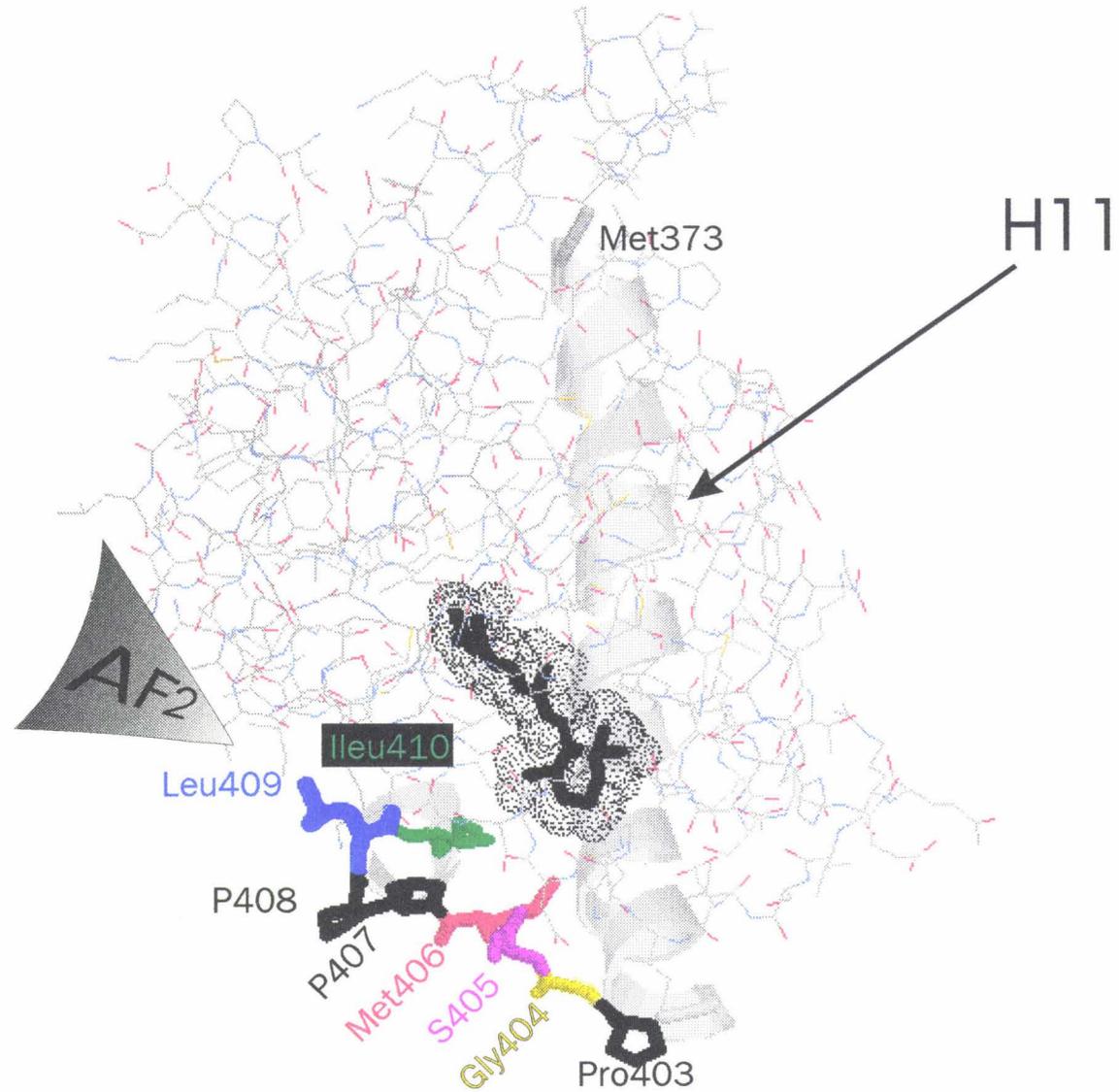


Figure 12 : position des différents acides aminés de la région 403/410 du hRAR alpha (d'après E. Thoreau, CIRD Galderma) par rapport à l'ATRA (en noir)

protéine/protéine permettant le recrutement des coactivateurs. Cette modification conformationnelle se traduit par l'obtention d'une structure plus compacte au niveau du HBD qui devient résistante à la digestion ménagée par certaines enzymes protéolytiques telles que la trypsine. Nous avons cherché à visualiser par ce moyen l'implication de la région 403/410 dans ce mécanisme.

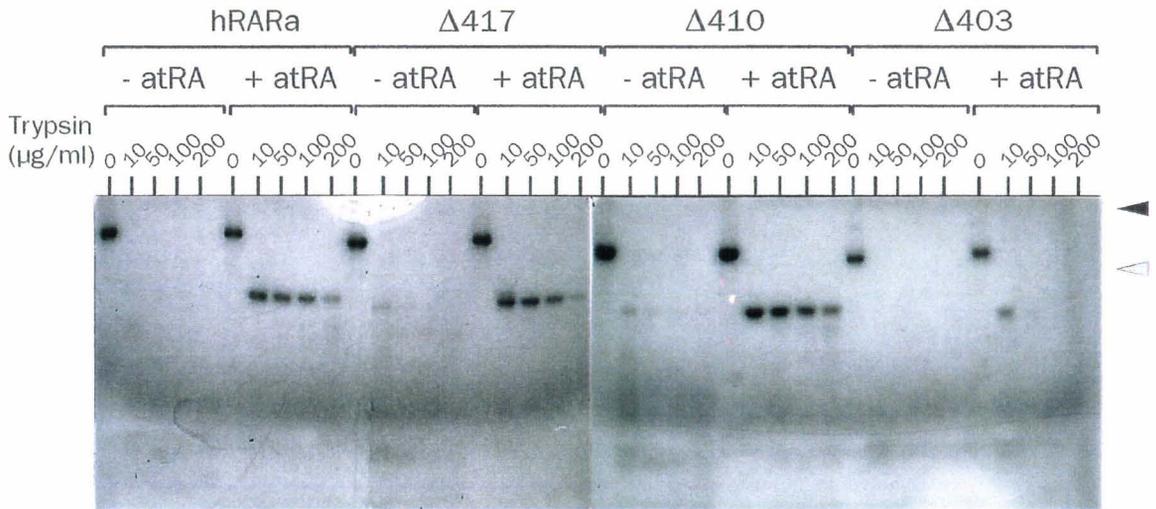
### 1. Etudes réalisées sur les mutants de délétion (sauvage, $\Delta C1/418$ , $\Delta C1/410$ , $\Delta C1/403$ )

Pour cette expérience, nous avons utilisé le hRAR $\alpha$  sauvage et créé les mutants de délétion en C-terminal à partir de ce dernier. Les ADNc de ces récepteurs ont été sous clonés dans le vecteur pGEM-3Z sous un promoteur T7 qui permet le marquage in vitro des récepteurs par la méthionine [ $^{35}\text{S}$ ]. Les récepteurs, préalablement incubés ou non avec de l'ATRA, sont ensuite soumis à l'action de la trypsine à des concentrations croissantes (30 min à température ambiante). Les produits de digestion sont ensuite analysés en SDS-PAGE et autoradiographiés.

La figure 13 A montre que le récepteur sauvage seul est entièrement digéré pour une concentration en trypsine de 10 $\mu\text{g/ml}$ . En présence de ligand, nous observons une forte réduction de la protéolyse du récepteur avec l'apparition d'une bande résistante d'environ trente kilodaltons et jusqu'à des concentrations en enzyme de 200  $\mu\text{g/ml}$ . Les récepteurs tronqués en C-terminal pour les positions 418 et 410 présentent le même profil de résistance. Cependant, pour une délétion supplémentaire de sept acides aminés, nous observons une très forte réduction de la bande de trente kilodaltons et ceci dès les premières concentrations en trypsine utilisées. Ce récepteur montre un profil identique en absence ou en présence de ligand.

Ces expériences suggèrent plusieurs commentaires. Premièrement, l'AF2 et le domaine F ne sont pas requis pour obtenir le changement de conformation. Deuxièmement, la présence de la région 403/410 est essentielle pour son obtention. Cette différence de profil ne semble pas pouvoir s'expliquer par l'affinité légèrement inférieure de ce récepteur pour l'ATRA (2 à 3 fois inférieure). Cette protéine présente donc une conformation apte à lier le ligand, mais différente de celle du récepteur  $\Delta C1-410$ , et se traduisant par une sensibilité accrue à la digestion par la trypsine. De façon intéressante, ce mutant de délétion possède une interaction constitutive avec

## A) mutants de délétion



## B) mutants ponctuels

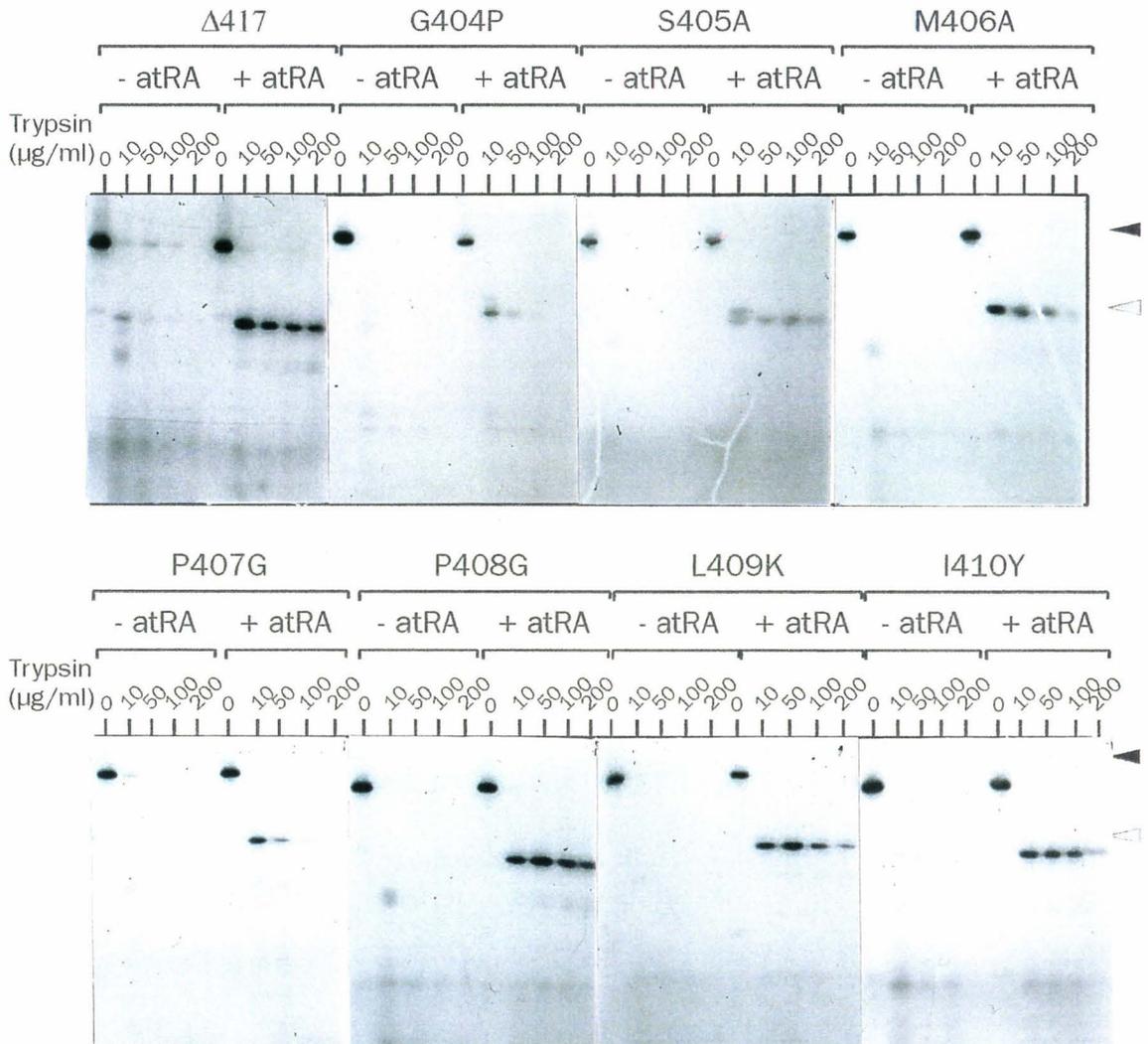


Figure 13 : protéolyse limitée sur les mutants de délétion et les mutants ponctuels

le corépresseur SMRT suggérant que la modification conformationnelle induite par le ligand soit à la base de la dissociation de ces protéines du récepteur (Chen and Evans, 1995).

## 2. Etudes réalisées sur les mutants ponctuels $\Delta C1/418$ .

L'expérience précédente nous a montré clairement l'implication de la région 403/410 dans le changement de conformation et nous avons cherché à savoir quel pouvait être les acides aminés impliqués dans ce processus. Ces études ont été réalisées sur les mutants ponctuels délétés du domaine F (résidus 1 à 418).

Comme précédemment, nous obtenons pour le récepteur sauvage une bande résistante à la protéolyse de 30 KD (voir figure 13 B). Les mutants M406A, P408G, L409K et I410Y montrent un profil pratiquement identique, caractérisé par l'existence d'une bande unique de 30 KD résistante à la protéolyse. On observe toutefois une baisse d'intensité pour le mutant P407G à partir de 100 $\mu$ g/ml. Deux mutants montrent un profil différent, les G404P et S405A, qui sont caractérisés par l'obtention d'une double bande pour les faibles concentrations en trypsine (10  $\mu$ g/ml) et la conservation d'une bande résistante à la protéolyse plus légère.

Malgré une diminution d'intensité plus rapide de l'intensité de la bande de 30 KD, le mutant P407G montre un profil de résistance identique au récepteur sauvage. Cette différence peut refléter une vitesse de dissociation plus grande du ligand. Il en résulterait une augmentation du nombre de récepteurs non complexés avec le ligand pendant une courte période. Durant ce temps, ils deviennent accessibles à la trypsine entraînant de ce fait une plus forte digestion du récepteur. De manière intéressante, les mutants G404P et S405A donnent un profil différent. La bande résistante devient plus légère et reflète une perturbation du changement de conformation induit par le ligand. Ce résultat suggère un rôle particulier de la glycine 404 et la sérine 405 dans ce mécanisme.

## **II. EFFETS DES MUTATIONS PONCTUELLES SUR L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DU RECEPTEUR**

La proximité de la région 403/410 et de l'AF2 suggère que les mutations ponctuelles, en réponse à la liaison du ligand, puissent influencer les propriétés transcriptionnelles du récepteur

par modification de l'interface d'interaction avec les coactivateurs. A ceci s'ajoute également son implication dans le changement de conformation. Notre approche expérimentale a consisté à introduire dans les cellules Cos-7, par la technique de transfection transitoire, trois plasmides. Le premier code pour le hRAR $\alpha$  (sauvage ou muté :  $\Delta$ C1/418), le deuxième pour le hRXR $\alpha$  et le troisième pour un gène rapporteur, en l'occurrence la luciférase. Ce dernier est sous le contrôle d'un promoteur minimal constitué de la TATA-box et d'une répétition de trois TRE-palindromique. Malgré sa faible affinité pour les hétérodimères RAR/RXR, ce gène rapporteur a été choisi pour son absence de réponse vis à vis des récepteurs endogènes des cellules Cos-7. Les cellules, une fois transfectées, ont été traitées par différents rétinoïdes.

### 1. Effets différentiels des mutations sur deux agonistes : l'ATRA et le CD367

Les cellules cos-7, transfectées comme il a été décrit précédemment, ont été traitées dans un premier temps par de l'ATRA 1  $\mu$ M. Comme nous pouvons le voir sur la figure 14 A, deux mutants présentent une variation significative par rapport au témoin, les G404P et S405A. On observe dans les deux cas une diminution de l'activité transcriptionnelle induite d'environ 60%. Le CD367, contrairement au cas précédent, conduit à une grande hétérogénéité des réponses observées (voir figure 14 B). Seule la mutation P407G donne un taux d'induction comparable à celui observé pour le témoin. Les mutations M406A et P408G augmentent la réponse d'environ 100%. Les mutations S405A et I410Y diminuent respectivement l'activité transcriptionnelle de 90% et 50% tandis que l'on observe pour les mutations G404P et L409K une répression de la réponse. Cette activité agoniste inverse est rare dans le cas des récepteurs nucléaires. Jusqu'à présent, un seul ligand possédant cette activité a été décrit (Klein et al., 1996).

### 2. Effets des mutations ponctuelles sur l'antagoniste Ro41-5253

Deux séries d'expériences ont été menées conjointement avec le Ro41-5253. Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si les mutations pouvaient modifier le profil pharmacologique de ce ligand. Aucune augmentation de l'activité transcriptionnelle n'a été observée après traitement des cellules transfectées par l'antagoniste à une concentration de 1  $\mu$ M (résultats non montrés). Dans un deuxième temps, nous avons voulu vérifier son effet

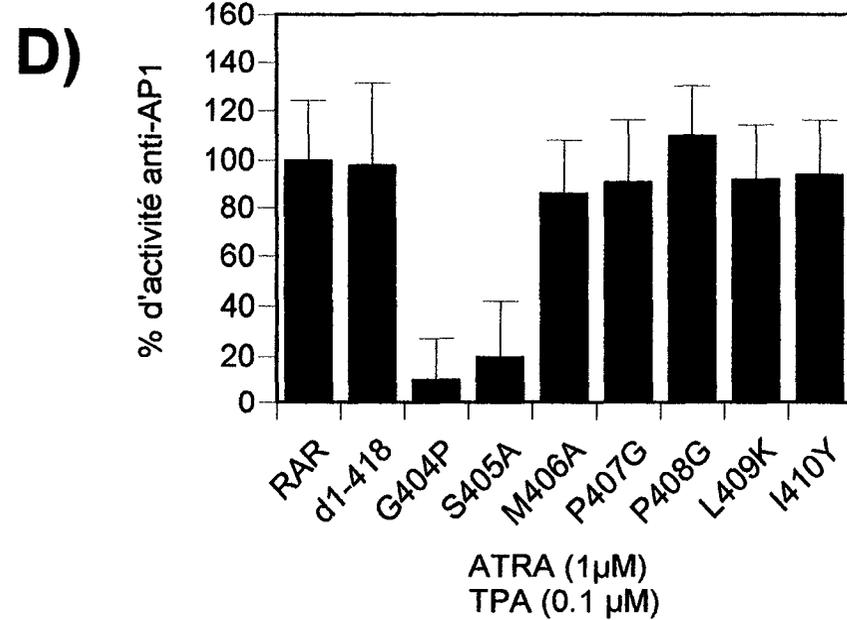
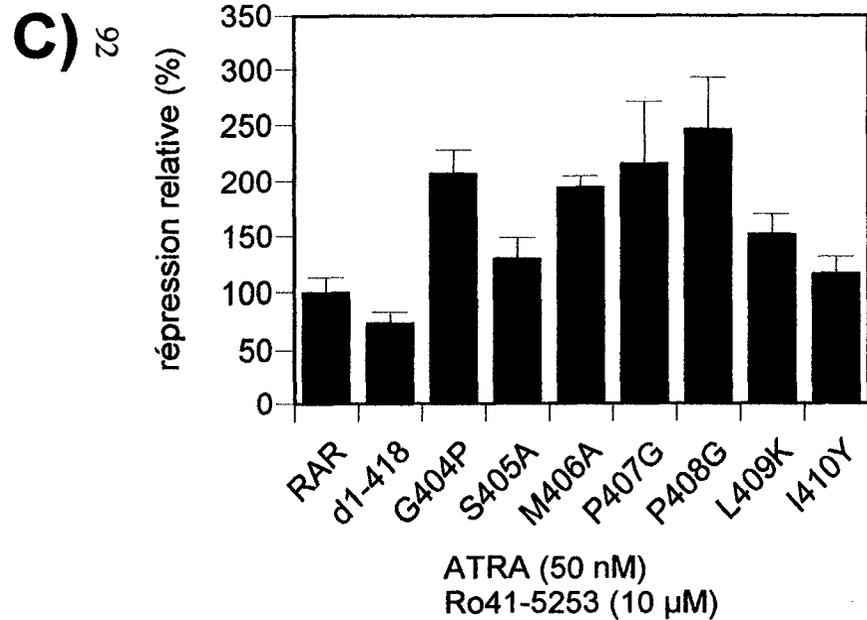
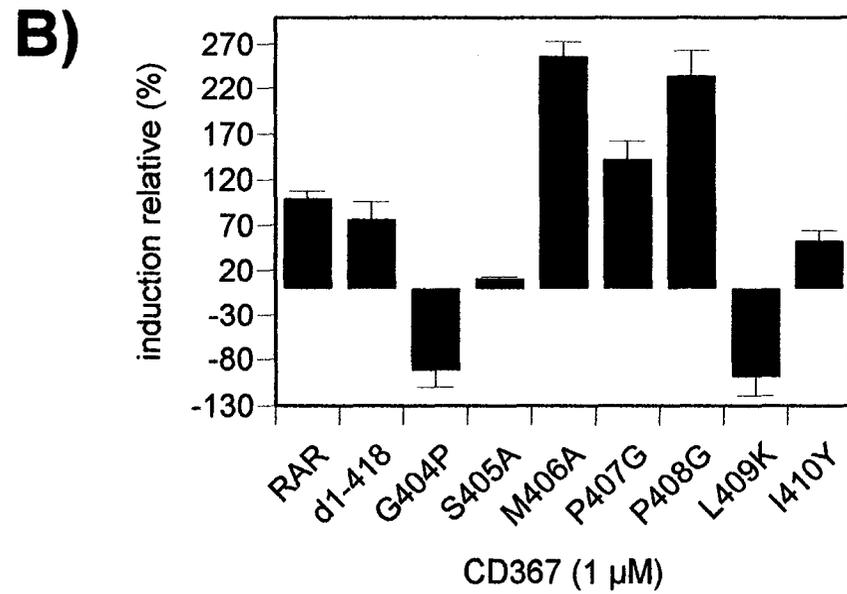
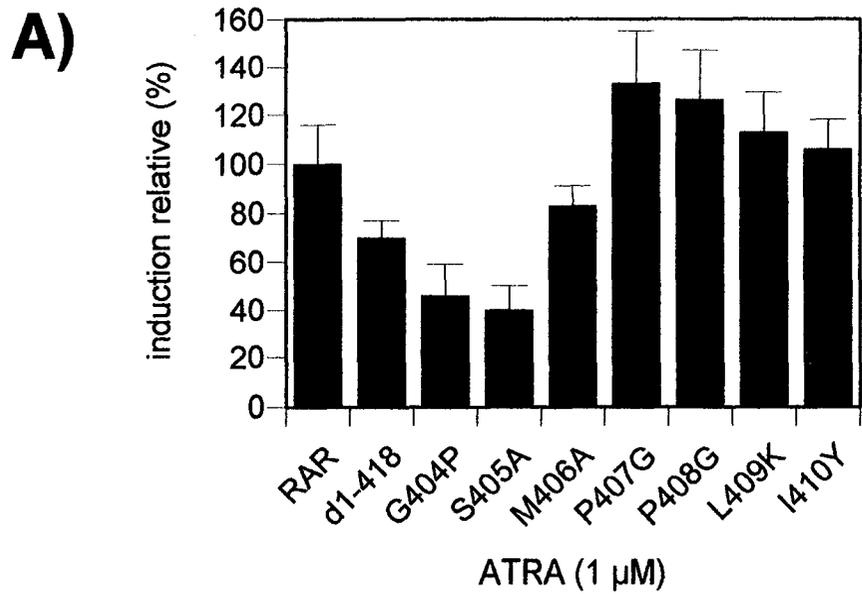


Figure 14 : activité transcriptionnelle des différents mutants  
 A, B, C : gène rapporteur TRE-palTATA luc  
 D: gène rapporteur TPA-RE luc

antagoniste. Pour cela, nous avons traité conjointement les cellules par de l'ATRA (50 nM) et du Ro41-5253 (10  $\mu$ M). Comme nous pouvons le voir sur la figure 14 C, l'antagoniste garde sa propriété de répression de la réponse transcriptionnelle induite par l'ATRA. L'amplitude de la répression observée reste toutefois variable. Les mutants S405A et I410Y présentent une réponse proche de celle observée pour le RAR sauvage tandis que les autres mutants se montrent beaucoup plus sensibles à l'effet antagoniste.

De façon identique aux variations observées sur l'affinité, les mutations effectuées semblent conduire à des variations spécifiques en fonction de chaque ligand étudié. Elles peuvent aboutir soit à une diminution, soit à une augmentation, soit à une répression de l'activité transcriptionnelle en présence d'agonistes mais également à un renforcement de l'effet antagoniste du Ro41-5253. On ne trouve pas sur l'ensemble des résultats de corrélation directe entre le taux d'induction observé et l'affinité du ligand testé (voir tableau 4). Par exemple, le récepteur S405A possède une affinité de 1.5 nM pour l'ATRA, soit cinq fois supérieure au récepteur sauvage, mais l'activité transcriptionnelle chute de 60%. La même discordance est observée pour l'antagoniste Ro41-5253. Le mutant S405A a une affinité augmentée d'un facteur 18 sans modification de son effet en transfection transitoire. Au contraire, les mutations G404P et P408G ne montrent pas de fortes variations d'affinité mais montrent un effet antagoniste très important.

Comment expliquer ces différences d'activité ?

Nous avons cherché à relier la diminution de l'activité transcriptionnelle des mutants S405A et G404P avec l'ATRA avec le recrutement des coactivateurs. Pour cela, nous avons utilisé un moyen indirect en testant l'activité anti-AP1 de chaque mutant (voir figure 14 D). En effet, ce mécanisme implique une compétition pour un coactivateur, en l'occurrence la CBP/p300 (voir partie générale). Les deux mutants montrant une diminution de l'activité transcriptionnelle ne répriment plus la réponse AP-1. Cette expérience indique clairement l'influence de la région étudiée sur le recrutement des coactivateurs. L'effet répresseur de certains mutants avec le CD367 est plus difficile à expliquer. L'activation de la réponse par les récepteurs nucléaires passe par un équilibre entre différentes formes de récepteurs (voir figure 15 ). Il semble que certaines mutations et en réponse à un certain ligand soient capables de le modifier, en l'occurrence dans notre cas vers la forme répressive du récepteur lié au ligand.

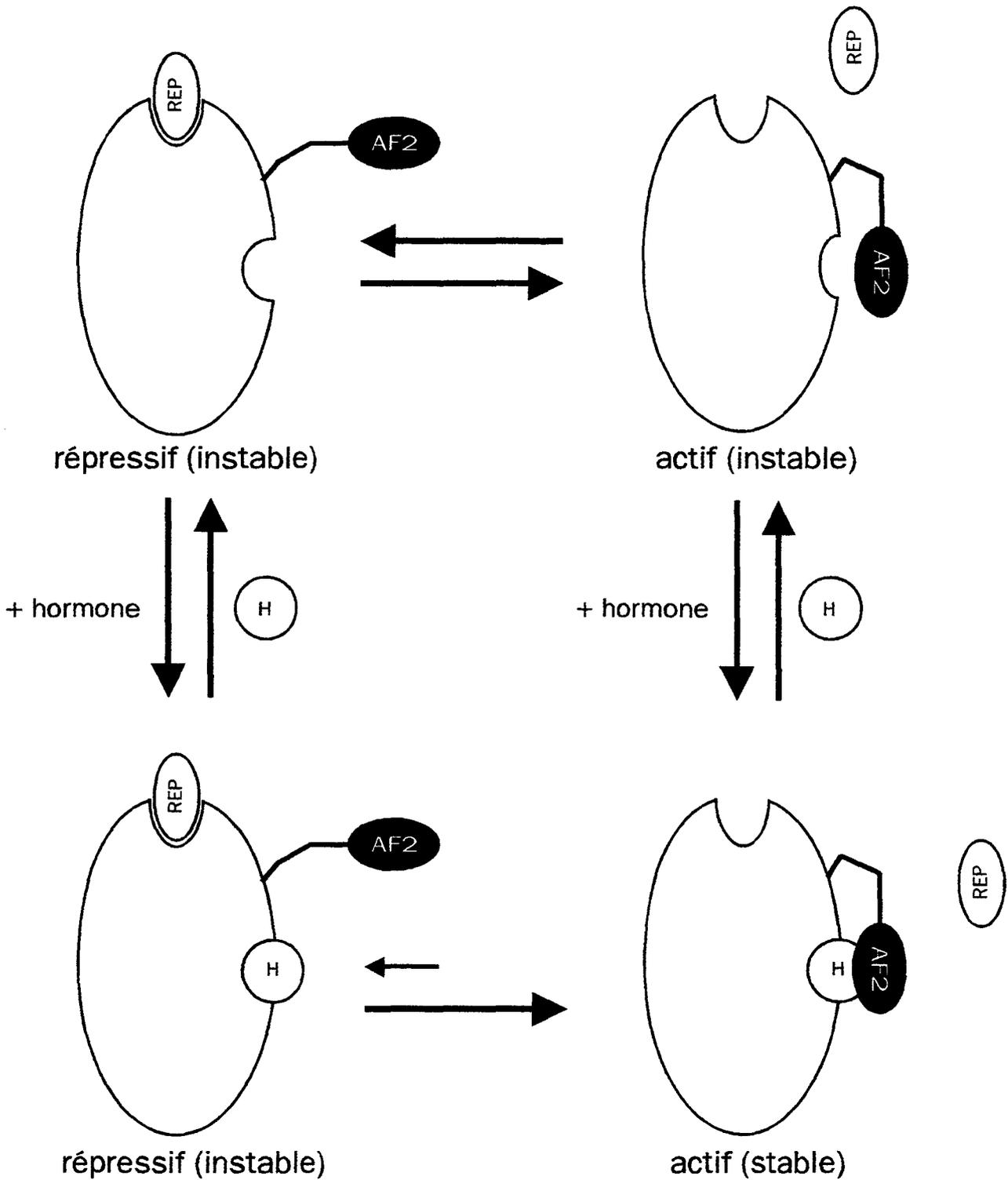


Figure 14 : Equilibre entre les différentes formes de récepteurs

En absence de ligand, le récepteur existe sous forme d'un équilibre entre une conformation active ou répressive. Sous la forme répressive, il peut lier le corépresseur alors que dans l'autre cas, la conformation du récepteur ne le permet pas. En présence de l'hormone, l'équilibre est déplacé vers la forme active et stable par déstabilisation de la forme répressive ou stabilisation de la forme active (d'après Schulman et al., 1996)

## CONCLUSION

Nombre de fonctions qui permettent aux RARs d'agir comme des facteurs de transcription ligand dépendants impliquent la partie C-terminale de la protéine. Dans ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'une d'entre-elles qui est l'interaction avec le ligand. La première étape a consisté à définir la partie minimale de la protéine requise pour cette activité. Utilisant la technique de mutagenèse par délétion, nous avons montré que cette structure comprend la partie C-terminale du domaine D et d'une partie du domaine E, des acides aminés 186 à 410. Ces résultats indiquent également que l'AF2, malgré son repositionnement dans le site de liaison, n'intervient pas directement dans le mécanisme d'interaction avec le ligand. Il existe une exception sur l'ensemble des ligands testés, l'antagoniste Ro41-5253. En effet, ce rétinoïde requiert la présence du domaine F pour une liaison de haute affinité. Toutefois, ce dernier n'intervient pas sur la pharmacologie du ligand puisque le récepteur  $\Delta C1-418$  présente un comportement semblable au récepteur sauvage en transfection transitoire (voir figure 14, C). Cette différence reflète vraisemblablement le positionnement différent de ce ligand dans le site de liaison et qui a déjà été mis en évidence par des expériences de protéolyse limitée (Keidel et al., 1994). Il est à noter que cette antagoniste possède une structure très particulière et ne préjuge en rien du comportement des autres antagonistes qui d'ailleurs ne montrent pas de différence de profil en protéolyse limitée (Lee et al., 1996). Ces expériences de mutagenèse par délétion nous ont permis également de définir deux régions fonctionnellement importantes. La première est localisée dans la partie C-terminale du domaine D (acides aminés 186 à 198). Elle n'est pas impliquée directement dans l'interaction ligand/récepteur mais concourt à la stabilité du site de liaison au ligand. Par la suite, elle a été montrée comme responsable de l'interaction avec les corépresseurs (Chen and Evans, 1995; Horlein et al., 1995). La deuxième région, de l'acide aminé 403 au 410, intervient directement dans la liaison aux ligands naturels et synthétiques. Ces résultats montrent de fortes analogies avec le récepteur aux hormones thyroïdiennes T3R- $\beta 1$  pour qui ces deux régions sont également requises pour l'interaction avec le ligand naturel (Lin et al., 1991). Ils sont également conformes à la structure cristallographique du hRAR $\gamma$ -LBD qui identifie la présence de certains résidus pouvant interagir avec la partie cyclique des rétinoïdes (Renaud et al., 1995). Cette région est localisée entre l'hélice H11 impliquée dans les processus

de dimérisation et l'hélice H12 (contenant l'AF2) responsable de la formation d'une nouvelle interface d'interaction protéine/protéine après liaison au ligand (Renaud et al., 1995; Glass, 1994). Nous avons donc effectué des mutations non conservatives dans le but d'évaluer la contribution des différents résidus dans la liaison au ligand. L'importance de certains acides aminés a pu être ainsi mise en évidence pour la liaison à l'ATRA mais s'est révélé différente pour d'autres rétinoïdes naturels ou synthétiques. Ces différences peuvent être attribuées à une certaine flexibilité de la région étudiée, hypothèse conforme aux prédictions de structure secondaire et aux données issues de la cristallographie qui positionne la région 403/410 dans une boucle (Renaud et al., 1995). Nous avons également montré que la présence de l'AF2 influe fortement sur la flexibilité de cette région et modifie l'effet des mutations étudiées sur l'affinité des ligands.

Ces résultats suggèrent un rôle essentiel de la région 403/410 dans la liaison et la discrimination des ligands.

Finalement, nous avons étudié les propriétés transcriptionnelles des récepteurs mutants par transfection transitoire. Deux résidus de cette région se sont avérés essentiels pour la transactivation induite par l'ATRA, la glycine 404 et la sérine 405. La faible activité des mutants a pu être corrélée avec une perturbation du changement de conformation induit par la liaison au ligand, élément intéressant sachant que ce mécanisme est à la base du recrutement des coactivateurs et du départ des corépresseurs (Glass et al., 1997; Minucci and Ozato, 1996). De façon surprenante, l'effet des mutations s'est révélé différent pour un autre agoniste testé, le CD367. En particulier, on trouve deux acides aminés, la glycine 404 et la leucine 409, qui lorsqu'ils sont mutés, modifie la pharmacologie de ce ligand et l'interprète de façon agoniste inverse.

Nous avons donc défini une région fonctionnellement importante pour la liaison des ligands, l'amplitude de la réponse transcriptionnelle induite ainsi que dans l'interprétation de la pharmacologie du ligand. Nous nous attachons actuellement à définir par quel mécanisme ces effets sont induits. Des expériences préliminaires suggèrent que les mutations effectuées perturbent le recrutement des protéines coactivatrices comme le montre les activités anti-AP1 des différents récepteurs. En effet, il a été montré précédemment que ce mécanisme passe par la séquestration de la CBP/p300, coactivateur potentiel des récepteurs aux rétinoïdes (Kamei et al., 1996). De plus, des modifications du changement de conformation induit par le ligand ont

pu être également corrélé avec une liaison constitutive des corépresseurs (Chen and Evans, 1995). Nous testons actuellement ces hypothèses in vitro avec le RIP140, coactivateur potentiel des RARs, ainsi que le corépresseur SMRT (Joyeux et al., 1997; Chen and Evans, 1995).

# **MATERIELS & METHODES**

Tout les protocoles utilisés sont détaillés dans le matériels et méthodes de l'article excepté :

## **I. PROTEOLYSE LIMITEE**

### **\* Matériels :**

- Récepteurs marqués à la méthionine [ $^{35}\text{S}$ ] à l'aide du kit TnT (promega)
- Tampon HG : Hepes 10mM; Glycérol 10%; DTT 1mM

### **\* Protocole :**

1. Mélanger : ligand 0,2  $\mu\text{l}$  (1 $\mu\text{M}$  et une concentration finale en DMSO de 2%)  
Tampon HG 8,8  $\mu\text{l}$   
1  $\mu\text{l}$  de récepteur marqué
2. Laisser incuber 30 min à 4°C
3. Ajouter 1  $\mu\text{l}$  de trypsine à la concentration voulue. Mélanger
4. Incuber 30 min à 4°C.
5. Stopper la réaction en ajoutant du SDS-PAGE loading buffer
6. Electrophorèse et autoradiographie

## **II. Transfections transitoires**

### **Matériels et solutions :**

Boîtes à six puits

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

PBS 1X

NaCl 150 mM

Plasmides à transférer.

Tampon de lyse (pour 100 ml) :

25 mM Glygly, 1% Triton X-100, 15 mM  $\text{MgSO}_4$ , 4 mM EGTA

Tampon de dosage (pour 100 ml) :

25 mM Glygly, 15 mM de phosphate de potassium, 15 mM  $\text{MgSO}_4$ , 4 mM EGTA

Solution stock de luciférine (pour 5 mg de luciférine) :

1mM D-luciférine (5 mg) (Promega), 25 mM gly-gly, pH 7.8, 10 mM DTT, H<sub>2</sub>O qsp 15 ml

PBS 1X:

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**Protocole:**

1-Faire pousser 100000 cellules dans des boites à 6 puits

2-Changer le milieu le lendemain (1 ml / puits )

3-Préparer les mélanges d'ADN suivants dans des eppendorfs stériles

40 ng pSG5RAR  $\alpha$  /puits ou 40 ng de mutants du RAR / puits

40 ng pSG5RXR/puits

400 ng de TRE pal luc /puits

791  $\mu$ l de NaCl 150 mM

4-Mettre dans d'autres eppendorfs 44  $\mu$ l d'Exgen 500 (Euromedex) et 756  $\mu$ l de NaCl 150 mM stérile

5-Ajouter le mélange Exgen au mix DNA

6-Agiter sur le vortex et attendre 10 mn

7-Ajouter 200  $\mu$ l/puits

8-Remplacer le milieu par 2 ml de frais le lendemain matin et induire par 2  $\mu$ l d'ATRA 10<sup>-3</sup> le soir

9-Laver les cellules 3 fois par du PBS 1X froid

10-Ajouter 200  $\mu$ l de tampon lyse sur les cellules

11-Placer 100  $\mu$ l du lysat dans un tube contenant 400  $\mu$ l de tampon dosage

12-Lire l'activité luciférase au luminomètre

2. Edwards, J.B.D.M., J. Delort and J. Mallet. 1991. Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs—a new tool for cloning 5'-ends of messenger RNAs and for constructing cDNA libraries by in vitro amplification. *Nucleic Acids Res.* 19:5227-5232.
3. Novick, D., B. Cohen and M. Rubinstein. 1994. The human interferon  $\alpha/\beta$  receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 77:391-400.
4. Oliner, J.D., K.W. Kinzler and B. Vogelstein. 1993. In vivo cloning of PCR products in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 21:5192-5197.
5. Sarkar, G. and S.S. Sommer. 1988. RNA amplification with transcript sequencing (RAWTS). *Nucleic Acids Res.* 16:5197.
6. Siebert, P.D. and J.W. Larrick. 1992. Competitive PCR. *Nature* 359: 557-558.
7. Tessier, D.C., R. Brousseau and T. Vernet. 1986. Ligation of single-stranded oligodeoxyribonucleotides by T4 RNA ligase. *Analytical Biochem.* 158:171-178.

Address correspondence to Stefan Kaluz, Department of Animal Physiology, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough LE12 5RD, UK.

Received 30 January 1995; accepted 10 April 1995.

**Stefan Kaluz, Milota Kaluzova and Anthony P.F. Flint**

University of Nottingham  
Loughborough, UK

## Improvement of the Gene Splicing Overlap (SOE) Method

The recombinant polymerase chain reaction (PCR) can be used for site-directed mutagenesis or the creation of chimeric constructs (2). Recently, a method has been developed to recombine DNA sequences on the basis of a common strategy that does not rely on available restriction sites. This method is called "gene splicing by overlap extension" (SOE) or "gene SOEing" (3) and requires the use of four primers. A modification of the SOE method increased its versatility by allowing for

the combination of any DNA sequence with the template of interest using only three primers (5). In this paper, we describe and compare this method and its modification to obtain the same chimeric product. We have successfully obtained a chimeric protein containing domains from the nuclear receptors for all-trans retinoic acid (hRAR $\alpha$ ) and 9-cis retinoic acid (hRXR $\alpha$ ) (1,4).

All PCRs were carried out on a thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) using *Taq* DNA Polymerase (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). The reaction buffer contained 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 200  $\mu$ M each deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP; Pharmacia Biotech, Paris, France). The experimental procedure is outlined in Figure 1A. The two outside primers are 5'-GGGAAGATC-TAAGCGGGAAGCC-3' (A primer) and 5'-GCCGAATTCTGTCCATGT-GGC-3' (D primer). Each primer contains a unique restriction enzyme site (*Bgl*II and *Eco*RI, respectively). The two partially overlapping primers are 5'-TTTGAGCCCGATGGAGCGCAG-3' (B primer) and 5'-CTGCGTCCATCGGGCTCAAAGGGGCTGAGCGG-3' (B'C primer), which pair on 21 bp.

hRXR $\alpha$  and hRAR $\alpha$  PCR fragments were obtained with the following conditions: (i) hRXR $\alpha$ , 20 ng of template (circular plasmid) and 20 pmol of primers A and B were mixed in 100  $\mu$ L of reaction buffer. After addition of 2.5 units of *Taq* DNA polymerase, the reaction mixture was covered with 50  $\mu$ L of mineral oil (Perkin-Elmer, Roissy, France). The cycling parameters were 94°C for 1 min, 48°C for 1 min and 72°C for 1 min, 30 cycles. (ii) Amplification of the hRAR $\alpha$  product was performed under the same conditions with primers B'C and D and an annealing temperature of 45°C. The major products were 260 bp for hRAR $\alpha$  and 700 bp for hRXR $\alpha$  (Figure 1B, lanes 2 and 3), and their identities were confirmed by restriction mapping. These products were purified from agarose gel using DEAE membrane NA-45 (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany).

SOE reactions were carried out by mixing an equal amount of hRAR $\alpha$  and hRXR $\alpha$  PCR products (about 50 fmol

and 20 pmol of primers A and D. However, when SOE PCR was performed under the conditions outlined by Horton et al. (3), no chimeric product was obtained. One important step of SOE is the annealing of the two initial PCR products to form template 3. It is possible that a 5-min denaturation at 94°C does not permit the complete separation of their strands and prevents template 3 formation. To overcome this problem, a preliminary step of a 10-min denaturation at 100°C was found to be necessary before adding the *Taq* DNA polymerase. The major product displayed a molecular weight of 960-bp as expected (Figure 1B, lane 4) and contained the expected restriction sites. The following parameters were found to be optimal: The preliminary denaturation step was 100°C for 10 min, after which samples were transferred on ice and dNTPs and *Taq* DNA polymerase were added. The cycling parameters were 94°C for 2 min, 50°C for 2 min, 72°C for 3 min and 25 cycles. Using these conditions, we tried to amplify the chimeric construct by the two-step recombinant PCR method. The hRAR $\alpha$  product was first mixed with a circular plasmid containing the hRXR $\alpha$  cDNA. Under these conditions, we did not obtain any chimeric product, even after denaturation at 100°C (Figure 1B, lane 5). It is possible that the circular plasmid is too stable to allow its denaturation and template 3 formation. To verify this hypothesis, we first purified a DNA fragment containing the hRXR $\alpha$  cDNA. We obtained the expected chimeric product only after a preliminary denaturation at 100°C for 10 min (Figure 1B, lane 6). A similar amplification was also performed from the linearized plasmid at a site close to the hRXR $\alpha$  cDNA (*Hind*III, located at 20 bp of the ATG codon). As shown in Figure 1B, lane 7, a major band at 960 bp was also observed, but the yield of the reaction was much lower. We have to note that the denaturation step had to be increased 5 min. This can be explained by the fact that the linearized plasmid was not entirely denatured, thus allowing for self-annealing and thereby reduced formation of template 3. All recombinant PCR products were successfully cloned into pSP72 (Promega, Madison, WI, USA) using

# Benchmarks

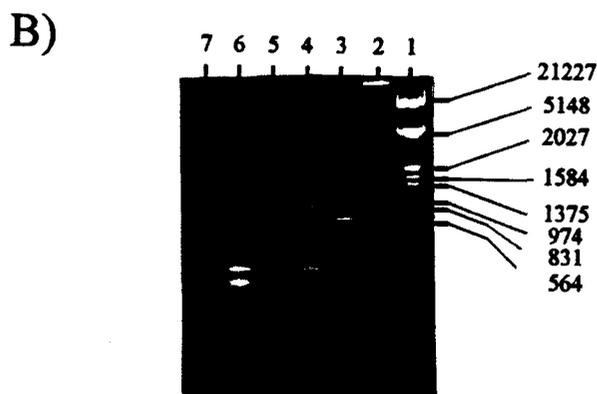
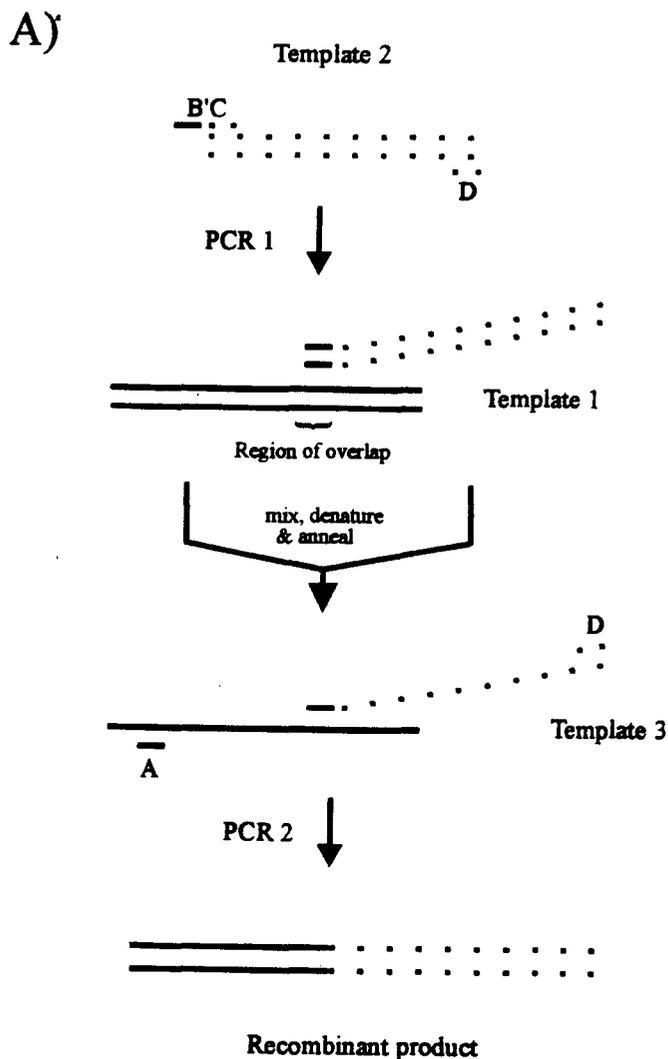


Figure 1. Panel A. Outline of the SOE strategy. Panel B. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel of PCR products. Lane 1,  $\lambda$  *EcoRI/HindIII* ladder; lane 2, hRAR $\alpha$  PCR product; lane 3, RXR $\alpha$  PCR product; lane 4, SOE PCR; lane 5, modified SOE PCR with circular plasmid; lane 6, modified SOE PCR with purified DNA fragment; lane 7, modified SOE PCR with linear plasmid.

the newly introduced *BgIII* and *EcoRI* restriction sites.

Thus, from our experiments, we found that a critical step was the denaturation of the initial PCR products (or template). Consequently, extensive care should be taken when designing gene SOEing experiments with DNA templates longer than one kilobase.

## REFERENCES

1. Giguere, V., E.S. Ong, P. Segui and R.M. Evans. 1987. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330:624-629.
2. Higuchi, R. 1990. Recombinant PCR, p.177-183. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, CA.
3. Horton M.R., Z. Cai, S.N. Ho and L.R. Pease. 1990. Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *BioTechniques* 8:528-535.
4. Mangelsdorf, D.J., U. Borgmeyer, R.A. Heyman, J.Y. Zhou, E.S. Ong, A.E. Oro, A. Kakisuka and R.M. Evans. 1992. Characterisation of three hRXR $\alpha$  genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev.* 6:329-344.
5. Pont-Kingdon, G. 1994. Construction of chimeric molecules by a two-step recombinant PCR method. *BioTechniques* 16:1010-1011.

This work was supported by grants from I.N.S.E.R.M., A.R.C. and Université de Lille II. We thank Dr. R.M. Evans for the gift of the hRAR $\alpha$  and hRXR $\alpha$  cDNAs. Address correspondence to Philippe Lefebvre, CJF-INSEEM 92-03, Laboratoire de Biochimie Structurale, Faculté de Médecine de Lille, 1 Place de Verdun, 59045 Lille CEDEX, France.

Received 7 February 1995; accepted 10 April 1995.

**Bruno Lefebvre, Pierre Formstecher and Philippe Lefebvre**  
 CJF-INSEEM  
 Faculté de Médecine de Lille  
 Lille, France

# **BIBLIOGRAPHIE**

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.

Apfel, C.M., Kamber, M., Klaus, M., Mohr, P., Keidel, S., and Lemotte, P.K. (1995). Enhancement of HL-60 differentiation by a new class of retinoids with selective activity on retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* *270*, 30765-30772.

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.

Baniahmad, A., Ha, I., Reinberg, D., Tsai, S., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1993). Interaction of human thyroid hormone receptor-beta with transcription factor TFIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *90*, 8832-8836.

Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* *384*, 641-643.

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.

Baur, E.V., Zechel, C., Heery, D., Heine, M.J.S., Garnier, J.M., Vivat, V., Ledouarin, B., Gronemeyer, H., Chambon, P., and Losson, R. (1996). Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J.* *15*, 110-124.

Blanco, J.C., Dey, A., Leid, M., Minucci, S., Park, B.K., Jurutka, P.W., Haussler, M.R., and Ozato, K. (1996). Inhibition of ligand induced promoter occupancy in vivo by a dominant negative RXR. *Genes Cells* 1, 209-221.

Blanco, J.C.G., Wang, I.M., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., O'Malley, B.W., Jurutka, P.W., Haussler, M.R., and Ozato, K. (1995). Transcription factor TFIIB and the vitamin D receptor cooperatively activate ligand-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92, 1535-1539.

Blaner, W.S. and Olson, J.A. (1994). Retinol and retinoic acid metabolism. *Retinoids: Biology, chemistry* 229-255.

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

Blumberg, B., Bolado, J., Derguini, F., Craig, A.G., Moreno, T.A., Chakravarti, D., Heyman, R.A., Buck, J., and Evans, R.M. (1996). Novel retinoic acid receptor ligands in *Xenopus* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93, 4873-4878.

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.

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

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. USA*. 77, 2936-2940.

Carlberg, C., Bendik, I., Wyss, A., Meier, E., Sturzenbecker, L.J., Grippo, J.F., and Hunziker, W. (1993). Two nuclear signalling pathways for Vitamin-D. *Nature* 361, 657-660.

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.

Cavaillès, V., Dauvois, S., Lhorset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P.J., and Parker, M.G. (1995). Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J.* *14*, 3741-3751.

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.

Chakravarti, D., LaMorte, V.J., Nelson, M.C., Nakajima, T., Schulman, I.G., Juguilon, H., Montminy, M., and Evans, R.M. (1996). Role of CBP/p300 in nuclear receptor signalling. *Nature* *383*, 99-103.(Abstract)

Chen, J.D. and Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* *377*, 454-457.

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.

Damm, K. and Evans, R.M. (1993). Identification of a domain required for oncogenic activity and transcriptional suppression by v-erbA and Thyroid- Hormone receptor-alpha. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA. *90*, 10668-10672.

Davis, K.D. and Lazar, M.A. (1992). Selective Antagonism of Thyroid Hormone Action by Retinoic Acid. *J. Biol. Chem.* *267*, 3185-3189.

Dawson, M.I., Chao, W.R., Pine, P., Jong, L., Hobbs, P.D., Rudd, C.K., Quick, T.C., Niles, R.M., Zhang, X.K., Lombardo, A., Ely, K.R., Shroot, B., and Fontana, J.A. (1995). Correlation of retinoid binding affinity to retinoic acid receptor alpha with retinoid inhibition of growth of estrogen receptor-positive MCF-7 mammary carcinoma cells. *Cancer Res.* *55*, 4446-4451.

de Thé, H., Vivanco-Ruiz, M.M., Tiollais, P., Stunnenberg, H.G., and Dejean, A. (1990). Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature* *343*, 177-180.

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.

Dey, A., Minucci, S., and Ozato, K. (1994). Ligand-dependent occupancy of the retinoic acid receptor beta 2 promoter in vivo. *Mol. Cell Biol.* *14*, 8191-8201.

Driscoll, J.E., Seachord, C.L., Lupisella, J.A., Darveau, R.P., and Reczek, P.R. (1996). Ligand-induced conformational changes in the human retinoic acid receptor detected using monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* *271*, 22969-22975.

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.

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.

Felsenfeld, G. (1996). Chromatin unfolds... *Cell* 86, 13-9X.

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.

Folkers, G.E., Vanheerde, E.C., and Vandersaag, P.T. (1995). Activation function 1 of retinoic acid receptor beta 2 is an acidic activator resembling VP16. *J. Biol. Chem.* 270, 23552-23559.

Fondell, J.D., Ge, H., and Roeder, R.G. (1996). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8329-8333.

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., Umesono, K., Chen, J., and Evans, R.M. (1995). Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* 81, 541-550.

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.

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.

Giguere, V. (1994). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins -complex interplay in retinoid signaling. *Endocrine Rev.* 15, 61-79.

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

Glass, C.K., Rose, D.W., and Rosenfeld, M.G. (1997). Nuclear receptor coactivators. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9, 222-232.

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.

Gronemeyer, H. (1992). Control of Transcription Activation by Steroid Hormone Receptors. *FASEB J.* 6, 2524-2529.

Grunstein, M. (1990). Nucleosomes: Regulators of transcription. *Trends Genet.* 6, 395-400.

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

Gudas, L.J., Sporn, M.B., and Roberts, A.B. (1994). Cellular biology and biochemistry of the retinoids. *Retinoids: Biology, chemistry* 443-520.

Hanstein, B., Eckner, R., Drenth, J., Halachmi, S., Liu, H., Searcy, B., Brown, M. (1996). p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 21, 11540-11545 (1996).

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.

Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D.L., and Stallcup, M.R. (1996). GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93, 4948-4952.

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.

Janknecht, R. and Hunter, T. (1996). Transcription. A growing coactivator network. *Nature* 383, 22-23.

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

190, 42-49.

Jones, B.B., Ohno, C.K., Allenby, G., Boffa, M.B., Levin, A.A., Grippo, J.F., and Petkovich, M. (1995). New retinoid X receptor subtypes in zebra fish (*Danio rerio*) differentially modulate transcription and do not bind 9-cis retinoic acid. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5226-5234.

Joyeux, A., Cavailles, V., Balaguer, P., and Nicolas, J.C. (1997). RIP 140 enhances nuclear receptor-dependent transcription in vivo in yeast. *Mol. Endocrinol.* 11, 193-202.

Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403-414.

Kastner, P., Mark, M., and Chambon, P. (1995). Nonsteroid nuclear receptors: What are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 83, 859-869.

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

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

Keller, H., 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.

Kersten, S., Dawson, M.I., Lewis, B.A., and Noy, N. (1996). Individual subunits of heterodimers comprised of retinoic acid and retinoid X receptors interact with their ligands independently. *Biochemistry* 35, 3816-3824.

Klein, E.S., Pino, M.E., Johnson, A.T., Davies, P.J., Nagpal, S., Thacher, S.M., Krasinski, G., and Chandraratna, R.A. (1996). Identification and functional separation of retinoic acid receptor neutral antagonists and inverse agonists. *J. Biol. Chem.* 271, 22692-22696-22696.

Kliewer, 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.

Kliewer, 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.

Ko, H.S., Fast, P., McBride, W., and Staudt, L.M. (1988). A human protein specific for the immunoglobulin octamer DNA motif contains a functional homeobox domain. *Cell* 55, 135-144.

Koeffler, H.P., Heitjan, D., Mertelsmann, R., Kolitz, J.E., Schulman, P., Itri, L., Gunter, P., and Besa, E. (1988). Randomized study of 13-cis retinoic acid v placebo in the myelodysplastic disorders. *Blood* 71, 703-708.

Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.R., and Chambon, P. (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51, 941-951.

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.

Kurokawa, R., Soderstrom, M., Horlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (1995). Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* 377, 451-454.

La Vista-Picard, N., Hobbs, P.D., Pfahl, M., and Dawson, M.I. (1996). The receptor-DNA complex determines the retinoid response: a mechanism for the diversification of the ligand signal. *Mol. Cell. Biol.* 16 (8): 4137-4146, 41374146

Lafyatis, R., Kim, S.J., Angel, P., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Karin, M., and Wilder, R.L. (1990). Interleukin-1 stimulates and all-trans-retinoic acid inhibits collagenase gene expression through its 5' activator protein-1-binding site. *Mol. Endocrinol.* 4, 973-980.

Lala, D.S., Mukherjee, R., Schulman, I.G., Koch, S.S., Dardashti, L.J., Nadzan, A.M., Croston, G.E., Evans, R.M., and Heyman, R.A. (1996). Activation of specific RXR heterodimers by an antagonist of RXR homodimers. *Nature* 383, 450-453.

Lamour, F.P., Lardelli, P., and Apfel, C.M. (1996). Analysis of the ligand-binding domain of human retinoic acid receptor alpha by site-directed mutagenesis. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5386-5392.

Ledouarin, B., Zechel, C., Garnier, J.M., Lutz, Y., Tora, L., Pierrat, B., Heery, D., Gronemeyer, H., Chambon, P., and Losson, R. (1995). The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J.* 14, 2020-2033.

Ledouarin, B., Nielsen, A.L., Garnier, J.M., Ichinose, H., Jeanmougin, F., Losson, R., and Chambon, P. (1996). A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.* 15, 6701-6715.

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, J.W., Choi, H.S., Gyuris, J., Brent, R., and Moore, D.D. (1995a). Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* 9, 243-254.

Lee, J.W., Ryan, F., Swaffield, J.C., Johnston, S.A., and Moore, D.D. (1995b). Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. *Nature* 374, 91-94.

Lee, M.O., Dawson, M.I., Picard, N., Hobbs, P.D., and Pfahl, M. (1996). A novel class of retinoid antagonists and their mechanism of action. *J. Biol. Chem.* 271, 11897-11903.

Lee, M.S., Kliewer, 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,

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.

Lefebvre, P., Gaub, M.P., Tahayato, A., Rochette-Egly, C., and Formstecher, P. (1995). Protein phosphatases 1 and 2A regulate the transcriptional and DNA binding activities of retinoic acid receptors. *J. Biol. Chem.* 270, 10806-10816.

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.

Lewin, B. (1994). Chromatin and gene expression: Constant questions, but changing answers. *Cell* 79, 397-406.

Lhorset, F., Dauvois, S., Heery, D.M., Cavailles, V., and Parker, M.G. (1996). RIP-140 interacts with multiple nuclear receptors by means of two distinct sites. *Mol. Cell Biol.* 16, 6029-6036.

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

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.

Macgregor, T.M., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Giguere, V. (1992). The Murine Gene for Cellular Retinoic Acid-Binding Protein Type-II - Genomic Organization, Chromosomal Localization, and Post-Transcriptional Regulation by Retinoic Acid. *J. Biol. Chem.* 267, 7777-7783.

Maden, M. (1994). Vitamin a in embryonic development. *Nutr. Rev.* 52, 3-12.

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.

Mahfoudi, A., Roulet, E., Dauvois, S., Parker, M.G., and Wahli, W. (1995). Specific mutations in the estrogen receptor change the properties of antiestrogens to full agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *92*, 4206-4210.

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., Umesono, K., and Evans, R.M. (1994). The retinoid receptors. *Retinoids: Biology,chemistry* 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.

Mermod, N., O'Neill, E.A., Kelly, T.J., and Tjian, R. (1989). The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell* *58*, 741-753.

Minucci, S., Leid, M., Toyama, R., Saintjeannet, J.P., Peterson, V.J., Horn, V., Ishmael, J.E., Bhattacharyya, N., Dey, A., Dawid, I.B., and Ozato, K. (1997). Retinoid X receptor (RXR) within the RXR-retinoic acid receptor heterodimer binds its ligand and enhances retinoid-dependent gene expression. *Mol. Cell Biol.* *17*, 644-655.

Minucci, S. and Ozato, K. (1996). Retinoid receptors in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Develop.* *6*, 567-574.

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.

Mizzen, C.A., Yang, X.J., Kokubo, T., Brownell, J.E., Bannister, A.J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S.L., Kouzarides, T., Nakatani, Y., and Allis, C.D. (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87, 1261-1270.

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.

Montano, M.M., Ekena, K., Krueger, K.D., Keller, A.L., and Katzenellenbogen, B.S. (1996). Human estrogen receptor ligand activity inversion mutants: Receptors that interpret antiestrogens as estrogens and estrogens as antiestrogens and discriminate among different antiestrogens. *Mol. Endocrinol.* 10, 230-242.

Nagpal, S., Saunders, M., Kastner, P., Durand, B., Nakshatri, H., and Chambon, P. (1992). Promoter Context-Dependent and Response Element-Dependent Specificity of the Transcriptional Activation and Modulating Functions of Retinoic Acid Receptors. *Cell* 70, 1007-1019.

Nagpal, S., 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.

Napoli, J.L. (1996). Retinoic acid biosynthesis and metabolism... *FASEB J.* 10, 993-1001X.

Nicholson, R.C., Mader, S., Nagpal, S., Leid, M., Rochette-Egly, C., and Chambon, P. (1990). Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoic acid is mediated by an AP1 binding site. *EMBO J.* 9, 4443-4454.

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.

Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-957.

Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270, 1354-1357.

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. *Genes & Develop.* 9, 769-782.

Perlmann, T. and Vennstrom, B. (1995). The sound of silence. *Nature* 377, 387-388.

Petkovich, M., Brand, N.J., Krust, A., and Chambon, P. (1987). A human retinoic acid 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.*, Vol. 49. 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.

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.

Rachez, C., Sautiere, P., Formstecher, P., and Lefebvre, P. (1996). Identification of amino acids critical for the DNA binding and dimerization properties of the human retinoic acid receptor alpha. Importance of lysine 360, lysine 365, and valine 361... *J. Biol. Chem.*, 271, 17996-8006X.

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). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *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.

Rochette-Egly, C., Ouladabdelghani, M., Staub, A., Pfister, V., Scheuer, I., Chambon, P., and Gaub, M.P. (1995). Phosphorylation of the retinoic acid receptor-alpha by protein kinase A. *Mol. Endocrinol.* 9, 860-871.

Rosen, E.D., O'Donnell, A., and Koenig, R.J. (1992). Ligand-dependent synergy of thyroid

hormone and retinoid X receptors. *J. Biol. Chem.* 267, 22010-22013.

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.

Roy, D.Y., Taneja, R., and Chambon, P. (1995). Synergistic activation of retinoic acid (RA)-responsive genes and induction of embryonal carcinoma cell differentiation by an RA receptor alpha (RAR alpha)-, RAR beta-, or RAR gamma-selective ligand in combination with a retinoid X receptor-specific ligand. *Mol. Cell Biol.* 15, 6481-6487.

Rubin, D.M., Coux, O., Wefex, I., Hengartner, C., Young, R.A., Goldberg, A.L., Finley, D. (1996). Identification of the *gal4* suppressor Sug1 as a subunit of the yeast 26S proteasome. *Nature* 379, 655-657

Saatcioglu, F., Bartunek, P., Deng, T., Zenke, M., and Karin, M. (1993). A conserved C-terminal sequence that is deleted in v-erb-A is essential for the biological activities of c-Erb-A (the thyroid hormone receptor). *Mol. Cell. Biol.* 13,

Saitou, M., Narumiya, S., and Kakizuka, A. (1994). Alteration of a single aminoacid residue in retinoic acid receptor causes dominant-negative phenotype. *J. Biol. Chem.* 269, 19101-19107.

Salbert, G., Fanjul, A., Piedrafita, F.J., Lu, X.P., Kim, S.J., Tran, P., and Pfahl, M. (1993). Retinoic acid receptors and Retinoid-X receptor-alpha Down-Regulate the transforming growth factor-beta(1) promoter by antagonizing AP-1 activity. *Mol. Endocrinol.* 7, 1347-1356.

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

Schulman, I.G., Chakravarti, D., Juguilon, H., Romo, A., and Evans, R.M. (1995). Interactions between the retinoid X receptor and a conserved region of the TATA-binding protein mediate hormone-dependent transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 8288-8292.

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.

Schwabe, J.W., Neuhaus, D., and Rhodes, D. (1990). Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature* 348, 458-461.

Seol, W., Choi, H.S., and Moore, D.D. (1996). An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science* 272, 1336-1339.

Shudo, K. and Kagechika, H. (1993). Structural evolution of retinoids. *Advances in Drug Research*, Vo. 24, 81-119.

Sucov, H.M., Murakami, K.K., and Evans, R.M. (1990). Characterization of an autoregulated response element in the mouse retinoic acid receptor type  $\beta$  gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5392-5396.

Swaffield, J.C., Melcher, K., Johnston, S.A. (1995). A highly conserved ATPase protein as a mediator between acidic activation domains and the TATA-binding protein. *Nature* 374, 88-91

Tahayato, A., Lefebvre, P., Formstecher, P., and Dautrevaux, M. (1993). A protein kinase C-Dependent activity modulates retinoic Acid-Induced transcription. *Mol. Endocrinol.* 7, 1642-1653.

Tairis, N., Gabriel, J.L., Soprano, K.J., and Soprano, D.R. (1995). Alteration in the retinoid specificity of retinoic acid receptor-beta by site-directed mutagenesis of Arg(269) and Lys(220). *J. Biol. Chem.* 270, 18380-18387.

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.

Taneja, R., Roy, B., Plassat, J.L., Zusi, C.F., Ostrowski, J., Reczek, P.R., and Chambon, P. (1996). Cell-type and promoter-context dependent retinoic acid receptor (RAR) redundancies for RAR beta 2 and *Hoxa-1* activation in F9 and P19 cells can be artefactually generated by gene knockouts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *93*, 6197-6202.

Tate, B.F., Allenby, G., Perez, J.R., Levin, A.A., and Grippo, J.F. (1996). Systematic analysis of the AF-2 domain of human retinoic acid receptor alpha reveals amino acids critical for transcriptional activation and conformational integrity. *FASEB J.* *10*, 1524-1531.

Tate, B.F. and Grippo, J.F. (1995). Mutagenesis of the ligand binding domain of the human retinoic acid receptor alpha identifies critical residues for 9-cis-retinoic acid binding. *J. Biol. Chem.* *270*, 20258-20263.

Thaller, C. and Eichele, G. (1990). Isolation of 3,4-didehydroretinoic acid, a novel morphogenetic signal in the chick wing bud [see comments]. *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.

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.

Tone, Y., Collingwood, T.N., Adams, M., and Chatterjee, V.K. (1994). Functional analysis of a transactivation domain in the thyroid hormone beta receptor. *J. Biol. Chem.* *269*, 31157-31161.

Umesono, K., Giguere, V., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M. (1988). Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature* *336*, 262-265.

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

vom Baur E, Zechel C, Heery D, Heine MJ, Garnier JM, Vivat V, Le Douarin B, Gronemeyer H, Chambon P, and Losson, R. (1996). Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J.* 15, 110-124.

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.

Wanek, N., Gardiner, D.M., Muneoka, K., and Bryant, S.V. (1991). Conversion by retinoic acid of anterior cells into ZPA cells in the chick wing bud. *Nature* 350, 81-83.

Weigel, N.L., Beck, C.A., Estes, P.A., Prendergast, P., Altmann, M., Christensen, K., and Edwards, D.P. (1992). Ligands Induce Conformational Changes in the Carboxyl- Terminus of Progesterone Receptors Which Are Detected by a Site-Directed Antipeptide Monoclonal Antibody. *Mol. Endocrinol.* 6, 1585-1597.

Wieselthier, J.S., Bhawan, J., and Koh, H.K. (1990). Transformation of Sezary syndrome and the sign of Leser-Trelat: a histopathologic study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 23, 520-522.

Williams, T., Admon, A., Lüscher, B., and Tjian, R. (1988). Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes & Develop.* 2, 1557-1569.

Wilson, T.E., 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.

Yang-Yen, H.F., Chiu, R., and Karin, M. (1990). Elevation of AP1 activity during F9 cell differentiation is due to increased c-jun transcription. *New. Biol.* 2, 351-361.

Yu, R.T., McKeown, M., Evans, R.M., and Umesono, K. (1994). Relationship between *Drosophila* gap gene *tailless* and a vertebrate nuclear receptor *Tlx*. *Nature* 370, 375-379.

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.

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.

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.