

Université des Sciences et Technologies de Lille

THESE

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

par **Guillaume Adelmant**

**I ETUDE DU REPRESSEUR TRANSCRIPTIONNEL Rev-erbA α , UN
RECEPTEUR NUCLEAIRE ORPHELIN.**

**II ETUDE FONCTIONNELLE DE TLS-CHOP, UN ONCOGENE SPECIFIQUE
DES LIPOSARCOMES MYXOÏDES.**



Soutenue le 17 Septembre 1997 devant la commission d'examen:

Président: Pr Xavier Desbiens
Rapporteurs: Dr Régine Losson
Dr Olivier Delattre
Examineurs: Dr Christine Chomienne
Dr Svend Freytag
Pr Dominique Stéhelin

Je tiens d'abord à remercier les membres du Jury, Président, Rapporteurs et Examineurs qui ont fort aimablement accepté de juger ce travail.

La thèse en tant qu'apprentissage, ressemble peut-être au tour de France des compagnons du devoir: un parcours, une "œuvre". J'ai pour ma part effectué ce tour (un aller-retour) entre les laboratoires de Dominique Stéhelin et de Svend Freytag, que je remercie ici.

De nombreuses personnes ont été présentes à chaque étape de cette aventure: Agnès, Brigitte, Christian et Jeff ont été les fées et les magiciens, charmeurs d'ADN ou dresseurs de cellules, qui m'ont patiemment transmis leur savoir mystérieux.

Patrick ou Martin, j'hésite encore, m'a initié à sa théorie de la générale relativité des choses, fort salutaire quant il était nécessaire de prendre un peu de recul vis à vis de la vie en général et de la biologie moléculaire en particulier. Olivier a été un guide de tous les instants et une référence scientifique inestimable. J'ai aussi apprécié son écoute et son soutien dans certains moments difficiles. Philippe complète ce trio de scientifiques simples, sérieux et sans arrogance, qui m'ont donné de la science une vision lumineuse et loin de tout tape à l'œil.

Enfin Pierre-Antoine, mon frère spirituel, qui a toujours su, par rires et sourires, me faire voir les reflets apaisants d'un monde sans gravité. Il a aussi écouté, avec bienveillance, ma tendance saisonnière à vouloir aller construire des barques en Dordogne. A bientôt Wallace.

Aux gens que j'aime, famille et amis d'ici bas et d'ailleurs.

Je ne peut pas m'empêcher de sourire à présent. Vous m'accorderez que c'est plutôt drôle. Il reste dix lignes d'écriture sur cette page et j'ai décidé de ne pas me servir de la dernière. Je vais la laisser pour la vie de quelqu'un d'autre. J'espère qu'ils en feront meilleur usage que je ne l'aurais fait.

J'ai tout de même essayé.

Richard Brautigan

Résumé

La famille des récepteurs nucléaires est un ensemble de gènes codant des facteurs de transcription dont l'activité est modulée par une hormone. Cette famille contient aussi de nombreux gènes apparentés codant des récepteurs "orphelins" pour lesquels aucune hormone n'a été identifiée. Notre travail a porté sur l'un de ces récepteurs orphelins, Rev-erbA α , et a notamment concerné l'étude de sa fixation à l'ADN et de ses propriétés transcriptionnelles.

Nous montrons que Rev-erbA α se comporte comme un répresseur transcriptionnel constitutif. Nos résultats suggèrent que cet effet répresseur ne repose pas sur un mécanisme de compétition ou d'interférence avec un autre récepteur nucléaire, mais qu'elle résulte d'une propriété intrinsèque de la protéine Rev-erbA α portée par son domaine carboxy-terminal. Rev-erbA α est en effet dépourvu d'une courte séquence peptidique appelée AF2, très conservée chez les autres récepteurs et qui est impliquée dans l'activation transcriptionnelle. L'étude de la fixation de Rev-erbA α sur un élément de réponse identifié au sein des séquences régulatrices de son propre gène, nous a permis de mettre en évidence une autre propriété de ce récepteur orphelin: sa capacité à interagir avec l'ADN sous la forme d'un monomère et sous la forme d'un homodimère. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'expression du gène Rev-erbA α pourrait être modulée via une boucle d'autorégulation.

La deuxième partie de cette thèse a porté sur l'étude de TLS-CHOP, une protéine de fusion oncogénique résultant de la translocation chromosomique t(12;16) qui est spécifique des liposarcomes myxoïdes. Le fait que cette translocation implique le gène CHOP, qui code un membre de la famille des facteurs de transcription C/EBP impliqués dans la différenciation adipocytaire, nous a conduit à étudier l'interférence éventuelle de cet oncogène chimérique avec ce programme de différenciation.

Nous montrons que l'expression de TLS-CHOP inhibe fortement la différenciation adipocytaire induite par le facteur adipogénique C/EBP β . Nos résultats indiquent que l'expression de TLS-CHOP dans ces cellules est corrélée à la perte de l'induction de PPAR γ 2, un récepteur nucléaire impliqué dans les étapes ultérieures de l'adipogénèse, et qui est normalement induit par C/EBP β . L'expression ectopique de PPAR γ 2 dans ces mêmes cellules, permet en revanche de réinitier leur programme de différenciation. Des résultats *in vitro* suggèrent que le défaut d'induction de PPAR γ 2 pourrait reposer sur la séquestration de C/EBP β par TLS-CHOP, inhibant notamment les propriétés de fixation à l'ADN et de transactivation de ce facteur. Nous proposons que le blocage de la différenciation adipocytaire par TLS-CHOP pourrait être l'un des mécanismes conduisant au développement du phénotype indifférencié des liposarcomes myxoïdes.

Publications

TLS-CHOP inhibits C/EBP beta-driven adipocyte differentiation.

Adelmant, G., Gilbert, J. D. et Freytag, S. O.

soumis

A functional Rev-erb alpha responsive element located in the human Rev-erb alpha promoter mediates a repressing activity.

Adelmant, G., Bègue, A., Stéhelin, D. et Laudet, V.

Proc Natl Acad Sci U S A, (1996). 93: 3553-8.

Transactivation of a cellular promoter by the NS1 protein of the parvovirus minute virus of mice through a putative hormone-responsive element.

Vanacker, J. M., Corbau, R., Adelmant, G., Perros, M., Laudet, V. et Rommelaere, J.

J Virol, (1996). 70: 2369-77.

Nuclear receptors. Lonesome orphans.

Laudet, V. et Adelmant, G.

Curr Biol, (1995). 5: 124-7.

In vivo cooperation of two nuclear oncogenic proteins, P135gag-myb-ets and p61/63myc, leads to transformation and immortalization of chicken myelomonocytic cells.

Adelmant, G., Quatannens, B., Lagrou, C., Wernert, N., Torpier, G., Saule, S., Stéhelin, D. et Laudet, V.

J Virol, (1994). 68: 2097-107.

Interconnection between thyroid hormone signalling pathways and parvovirus cytotoxic functions.

Vanacker, J. M., Laudet, V., Adelmant, G., Stéhelin, D. et Rommelaere, J.

J Virol, (1993). 67: 7668-72.

Characterization of a functional promoter for the human thyroid hormone receptor alpha (c-erbA-1) gene.

Laudet, V., Vanacker, J. M., Adelmant, G., Bègue, A. et Stéhelin, D.

Oncogene, (1993). 8: 975-82.

Abréviations

AA:	Amino-acide
ADN:	Acide Désoxyribonucléique
ARN:	Acide Ribonucléique
C/EBP:	CAAT/Enhancer Binding Protein
CBP:	CREB Binding Protein
CHOP:	C/EBP Homologous Protein
hnRNP:	Heterogenous Ribonuclear Protein
kDa:	kilo Dalton
pb:	paire de bases
PML:	Promyelocytic Leukemia
SnRNP:	Small nuclear Ribonuclear Protein
TAF:	TBP-Associated Factor
TBP:	TATA-Box Binding Protein

Table des matières

INTRODUCTION

Présentation du mémoire

I. La fixation à l'ADN: entre spécificité et flexibilité.	11
1. Eléments de réponse: d'où vient la spécificité de la réponse aux hormones?	11
<u>1.1 Variations sur un thème.</u>	11
<u>1.2 A deux, c'est plus compliqué.</u>	12
<u>1.3 Autres éléments de spécificité.</u>	15
1.3.1 Patrons d'expression différentiels.	15
1.3.2 Inactivation des récepteurs "concurrents".	15
1.3.3 Restriction de l'accessibilité des séquences cibles, et "guidage".	15
<u>1.4 La spécificité de fixation à l'ADN: une nécessité absolue?</u>	17
<u>1.5 Conclusions.</u>	18
2. Modes de reconnaissance et de fixation.	18
<u>2.1 Le domaine de fixation à l'ADN.</u>	18
<u>2.2 Reconnaissance du site de fixation: rigueur et flexibilité.</u>	20
2.2.1 Bases de la spécificité (ou comment distinguer AGGTCA de AGAACA).	20
2.2.2 Bases de la flexibilité.	22
<u>2.3 Modes de fixation.</u>	22
2.3.1 Fixation de ER en homodimère: rôle de la boîte D.	22
2.3.2 Fixation des hétérodimères RXR/RAR, RXR/T ₃ R et RXR/VDR sur leurs motifs.	23
a) Comment distinguer un DR5 d'un DR4?	23
b) Sur le DR2, on tourne un peu et on recommence.	24
c) Polarité.	25
d) En bref.	25
2.3.3 Fixation de RXR/RAR sur le motif DR1, un cas à part.	25
2.3.4 Fixation monomérique: le cas de NGFI-B.	26
2.3.5 Fixation de T ₃ R en homodimère: rôle du domaine E.	28
2.3.6 La fixation ROR α : rôle du domaine A/B dans la spécificité de fixation.	29
2.3.7 Conclusions.	30
3. Données de structure tridimensionnelle.	30
<u>3.1 Structure générale.</u>	30

<u>3.2</u>	<u>Eléments structuraux de la reconnaissance de l'héxamère.</u>	32
<u>3.3</u>	<u>Eléments structuraux de la discrimination du motif de fixation.</u>	34
3.3.1	Interactions protéine/protéine:	34
a)	Du côté RXR.	34
b)	Du côté de T ₃ R, RAR, VDR.	35
3.3.2	Autres interactions:	35
4.	Conclusion:	37
II.	La fixation de l'hormone: bases structurales et fonctionnelles.	40
1.	Généralités.	40
1.1	<u>Classification.</u>	40
1.2	<u>Le domaine de fixation de l'hormone.</u>	42
2.	Hormones, récepteurs et protéines hsp.	42
2.1	<u>Les protéines hsp: inhibiteurs des récepteurs aux stéroïdes?</u>	43
2.2	<u>Les protéines hsp: un "mal" nécessaire?</u>	43
2.3	<u>ydj1: le vrai inhibiteur?</u>	44
2.4	<u>Localisation des protéines hsp.</u>	45
2.5	<u>Conclusion</u>	45
3.	Rôles de l'hormone sur la dimérisation et la fixation à l'ADN.	47
3.1	<u>L'acide 9-cis rétinolique et la fixation de l'homodimère RXR à l'ADN.</u>	47
3.2	<u>Hormone et homodimérisation.</u>	48
3.3	<u>Ligand et conformation.</u>	50
4.	Structure tridimensionnelle du domaine E.	51
4.1	<u>Structure primaire et architecture générale.</u>	51
4.2	<u>Fixation du ligand et transconformation.</u>	53
4.3	<u>Bases structurales de l'homodimérisation.</u>	53
4.4	<u>Conclusions.</u>	55
III.	La régulation transcriptionnelle.	56
1.	Introduction.	56
1.1	<u>Mécanismes de bases de la régulation transcriptionnelle.</u>	56
1.2	<u>Les domaines activateurs des récepteurs nucléaires.</u>	58
1.3	<u>AF2, un domaine sous influence.</u>	58
1.3.1	Identification fonctionnelle de AF2.	58
1.3.2	Structure du motif AF2.	60

2. Médiateurs de l'activation transcriptionnelle.	62
<u>2.1 Les composants de la machinerie transcriptionnelle comme cibles de RXR.</u>	62
2.1.1 Interaction RXR/TBP.	62
2.1.2 Interaction RXR/hTAF _{II} 28.	63
<u>2.2 Autres cofacteurs.</u>	64
2.2.1 Structure des cofacteurs.	64
a) ERAP160 (Estrogen-Receptor Activated Protein).	64
b) TIF2 et Src-1 (Steroid receptor co-activator)	64
c) RIP140 (Receptor Interacting Proteins).	66
d) Trip1/SUG1 (thyroid-hormone receptor interacting protein).	66
e) SPT6.	66
f) TIF1.	66
2.2.2 Motifs d'interaction.	67
<u>2.3 Rôle du ligand dans l'interaction récepteur/cofacteur.</u>	67
<u>2.4 Conclusion.</u>	68
3. Hypothèses sur les mécanismes d'action des cofacteurs.	68
<u>3.1 Fixation à l'ADN nucléosomal.</u>	69
3.1.1 Le complexe SWI/SNF.	69
3.1.2 SPT6.	69
<u>3.2 Recrutement de l'ARN polymérase: implication de TIF2, SRC-1 et p300/CBP</u>	70
3.2.1 TIF2 et SRC-1: des coactivateurs presque parfaits...	70
3.2.2 p300/CBP, le maillon manquant?	70
<u>3.3 Autres événements contemporains de l'activation: SUG1 l'atypique.</u>	73
<u>3.4 Conclusion.</u>	73
4. Répression de la transactivation.	74
<u>4.1 Introduction à la répression transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires.</u>	74
<u>4.2 T₃R et la répression de la transcription.</u>	76
<u>4.3 SMRT et NCoR: cofacteurs de la répression.</u>	76
<u>4.4 Domaines d'interaction.</u>	77
<u>4.5 Sin3 et HDAC: chevilles ouvrières de la répression?</u>	78
<u>4.6 Implication de TIF1alpha dans la répression transcriptionnelle.</u>	75
5. Conclusion.	80
IV. Allostérie: les relations fructueuses.	81
1. Effet de la dimérisation sur la fixation de l'hormone.	81
<u>1.1 Cas de la fixation des ecdystéroïdes par EcR.</u>	81
<u>1.2 RXR, un récepteur influençable.</u>	82

2. Effets de la fixation à l'ADN sur l'activité transcriptionnelle.	86
<u>2.1 Influence du mode de fixation.</u>	86
<u>2.2 Effet de la séquence du motif de fixation.</u>	86
3. Effet allostérique de la fixation de l'hormone.	89
4. Conclusions.	91
V. PML/RAR et les leucémies promyélocytaïres aiguës.	92
1. Généralités.	92
2. Effets dominants négatifs de PML/RAR.	94
<u>2.1 Interférence PML/RAR - RAR.</u>	94
2.1.1 PML/RAR dérègle-t-il l'expression des cibles de RAR?	95
a) Reconnaissance et fixation à l'ADN.	95
b) Activité transcriptionnelle de PML/RAR.	95
2.1.2 PML/RAR et interférence avec RXR.	97
2.1.3 PML/RAR et interférence transcriptionnelle avec AP1.	98
2.1.4 Conclusions.	100
<u>2.2 Interférence PML/RAR - PML.</u>	100
2.2.1 Que sait on de PML?	100
a) Structure de PML.	100
b) Localisation nucléaire de PML.	101
c) PML et la croissance cellulaire.	101
d) PML, infection adénovirale et interférons.	102
e) Conclusion.	103
2.2.2 PML/RAR, effet sur la prolifération cellulaire et l'apoptose.	103
3. Effet différenciateur de tRA: mécanisme(s) mis en jeu?	104
<u>3.1. PML/RAR, un récepteur à l'acide rétinoïque qui mime le rôle du récepteur à la vitamine D3?</u>	106
<u>3.2 PML/RAR, une version inductible de PML?</u>	106
<u>3.3 Restons simples!</u>	107
4. Conclusions.	110
RESULTATS	
Publication I	112
Discussion I	113
1. Propriétés de fixation à l'ADN de Rev-erbAα.	113
<u>1.1 Motifs de fixation à l'ADN.</u>	113

<u>1.2 Rev-erbAα et l'homodimérisation.</u>	115
2. Propriétés transcriptionnelles de Rev-erbAα.	115
<u>2.1 Rev-erbAα est un répresseur transcriptionnel.</u>	115
<u>2.2 Homodimérisation et répression.</u>	119
3. Conclusions.	119
Publication II	121
Discussion II	122
1. TLS-CHOP, une protéine de fusion spécifique des liposarcomes myxoïdes.	122
2. TLS-CHOP, un inhibiteur de l'adipogenèse.	124
<u>2.1. Etude comparée TLS-CHOP / PML/RAR.</u>	124
<u>2.2. Un peu d'autocritique.</u>	124
3. Hypothèses sur les bases de l'effet oncogénique de TLS-CHOP	126
<u>3.1. Interférence TLS-CHOP / C/EBP: d'une pierre deux coups?</u>	126
<u>3.2. TLS-CHOP et l'activation transcriptionnelle.</u>	127
<u>3.3. Interférence TLS/CHOP / TLS.</u>	128
3.3.1 TLS et la maturation des ARN messagers.	128
3.3.2 TLS et les TAFs.	129
4. Conclusions.	129
CONCLUSION	132
REFERENCES	134

INTRODUCTION

Présentation du mémoire

La famille des récepteurs nucléaires est un ensemble de gènes codant des facteurs de transcription dont l'activité transcriptionnelle est modulée par une hormone. Cette famille s'est agrandie suite à la découverte de nombreuses protéines apparentées pour lesquelles aucune hormone n'a été identifiée. Ce sont les récepteurs "orphelins".

Les récepteurs nucléaires sont impliqués dans divers processus de développement, de différenciation, ou encore d'apoptose. Nous laisserons de côté cet aspect fonctionnel, pour nous consacrer essentiellement à l'étude de leur fonctionnement. Nous aborderons notamment la fixation à l'ADN, et décrirons en particulier les bases structurales de sa spécificité. Nous analyserons ensuite une de leurs caractéristiques fondamentales, la fixation de l'hormone, et ses répercussions structurales sur les autres fonctions du récepteur. Nous traiterons dans la troisième partie, des mécanismes par lesquels les récepteurs nucléaires modulent la transcription. Enfin, et pour avoir un aperçu sur l'interdépendance de ces trois fonctions, nous donnerons quelques exemples des effets allostériques dont les récepteurs sont l'objet. Le dernier chapitre sera lui consacré à une étude plus "fonctionnelle" concernant le rôle de la protéine de fusion oncogénique PML/RAR dans les leucémies promyélocytaires aiguës.

Enfin, nous présenterons nos résultats, analysés à la lueur de l'ensemble des informations de l'introduction.

I. La fixation à l'ADN: entre spécificité et flexibilité.

1. Eléments de réponse: d'où vient la spécificité de la réponse aux hormones?

La spécificité des effets biologiques d'une hormone repose sur l'existence d'un groupe de récepteurs nucléaires qui fixent cette hormone (et elle seule) et modulent l'expression d'un ensemble de gènes cibles déterminés. La discrimination des gènes à réguler repose essentiellement sur la présence, au sein de leurs séquences régulatrices, d'éléments de réponse particuliers, spécifiques de ce groupe de récepteurs. Pour simplifier, ceci revient à dire qu'il faut à chaque groupe de récepteurs un élément de réponse qui lui soit spécifique. Pourtant, seules deux séquences consensus, PuGGTCA et PuGAACA ont été identifiées pour l'ensemble de cette famille de facteurs de transcription, qui compte à présent une cinquantaine de membres (Beato et al., 1989; Glass, 1994). Comment la voie de signalisation des hormones thyroïdiennes (relayée par les récepteurs T₃Rs) se distingue-t-elle alors de la réponse à l'acide rétinoïque (relayée par les récepteurs RARs)?

En fait, plusieurs moyens contribuent à établir la spécificité de chaque réponse hormonale. L'un de ces moyens, que nous détaillerons ici, repose sur une idée simple: diversifier le répertoire des sites de fixation, de manière à attribuer à chaque groupe de récepteurs un élément de réponse spécifique. Cette diversification repose sur deux principes essentiels:

- en autorisant la modification de certaines bases du site, ou en ajoutant des éléments de spécificité supplémentaires en dehors de celui-ci.
- en dupliquant le site de reconnaissance. Les différentes combinaisons rendues possibles par l'orientation et l'espacement respectif de deux sites permet en effet d'introduire un facteur de variabilité très important dans l'éventail des éléments de réponse.

Avant d'approfondir les bases structurales sur lesquelles repose la spécificité de fixation, prenons le temps de décrire, à travers les deux principes mentionnés ci-dessus, quelques uns des sites de ce répertoire.

1.1 Variations sur un thème.

Comme on l'a suggéré, la diversité peut provenir de la variation de certaines bases dans la séquence du consensus lui même. L'exemple le plus évident est fourni par les deux hexanucléotides identifiés initialement: le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) reconnaît

spécifiquement l'hexanucléotide PuGAACA alors que le récepteur aux oestrogènes (ER) reconnaît préférentiellement la séquence PuGGTCA.

En dehors de cet exemple simple, cette même stratégie est utilisée pour différencier, avec moins de "rigidité" il est vrai, les sites de fixation d'autres récepteurs: par exemple, les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (T₃R), à l'acide rétinoïque tout trans (RAR) et à l'acide 9-cis-rétinoïque (RXR) sont plus ou moins sensibles au changement de la troisième base du site (AGGTCA): la fixation du récepteur T₃R sera très affectée par la substitution de cette base en T alors que la fixation du récepteur RXR, et moins encore celle de RAR, n'en seront réduites (Mader et al., 1993).

Dans certains cas, la séquence flanquant le site hexamérique peut aussi contribuer à accroître la diversité des sites. Par exemple, le site TAAAGGTCA sera reconnu par le récepteur orphelin NGFI-B qui, en revanche, ne se fixera pas sur le site TCAAGGTCA, "spécifique" du récepteur SF1 (Wilson et al., 1992).

Cependant, cette stratégie a ses limites: certaines bases du consensus, notamment le triplet terminal de l'hexamère (TCA), ne peuvent être modifiées sans affecter sérieusement la fixation de la plupart des récepteurs. La modification de certaines bases du motif ne peut donc contribuer que marginalement à la diversification du répertoire des éléments de réponse.

1.2 A deux, c'est plus compliqué.

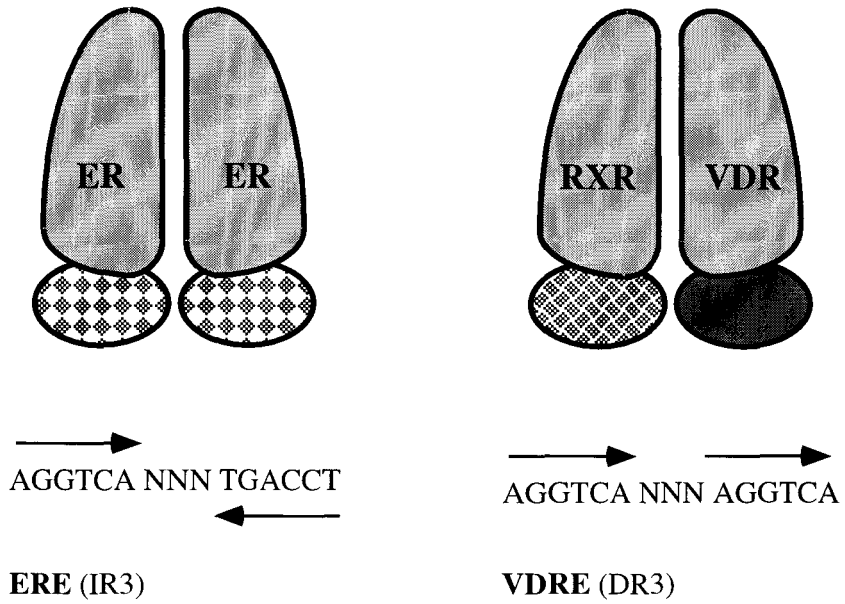
A l'exception de quelques récepteurs dont l'élément de réponse est constitué par un site de reconnaissance unique, la plupart des autres récepteurs se fixent sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère (avec le partenaire RXR) sur des éléments de réponse comportant deux hexamères (Glass, 1994). Il existe trois manières d'organiser les deux sites hexamériques de tels éléments de réponse (ici représentés par une flèche):

- une répétition palindromique ----> <---- (abréviation IR)
- une répétition inversée <---- ----> (abréviation ER)
- une répétition directe ----> ----> (abréviation DR)

En restant dans la limite de certaines contraintes structurales - il est nécessaire de conserver un contact entre les deux partenaires du dimère - la variation de la distance séparant ces deux sites accroît encore le registre des éléments de réponse (**Fig.1**). On peut ainsi avoir:

une répétition palindromique, (IR), où les deux sites sont espacés de trois nucléotides (IR3): c'est l'élément de réponse canonique des récepteurs aux stéroïdes (Beato et al., 1989). Le motif palindromique (TREpal ou IR0), correspond lui à un site de fixation relativement

A



B

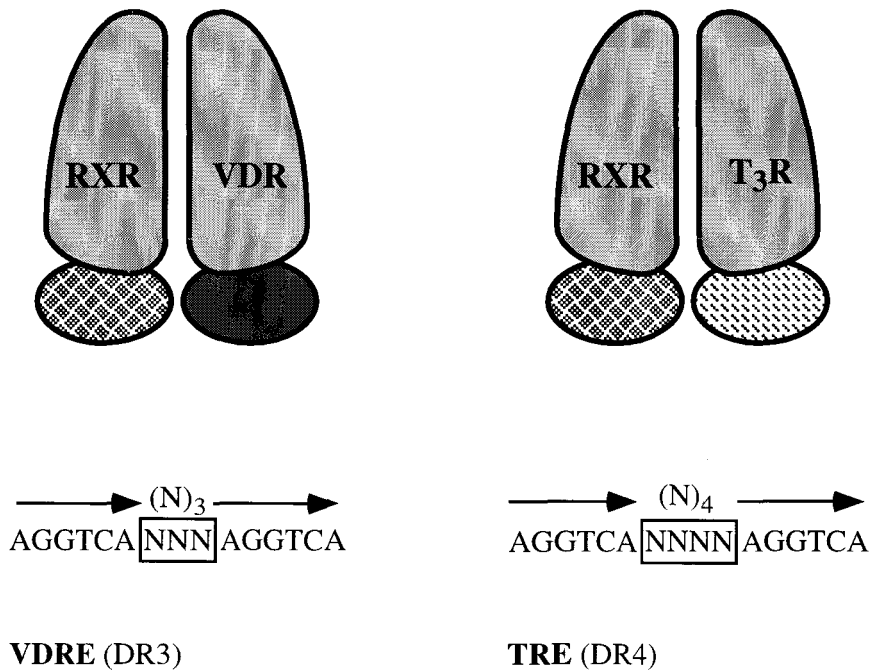


Fig.1: L'orientation et l'espacement des sites hexamériques d'un motif contribuent à la diversification des éléments de réponses. **A:** l'orientation des deux sites hexamériques différencie les éléments de réponse ERE (Estrogen Responsive Element) et VDRE. **B:** le nombre de nucléotides séparant les deux sites hexamériques différencie les éléments de réponse VDRE et TRE.

indifférencié pour la réponse aux hormones thyroïdiennes et à l'acide rétinoïque (Umesono et al., 1988).

les répétition inversées, (ER), semblent principalement relayer les réponses à l'acide rétinoïque (ER8 dans le gène de la F-crystalline gamma (Tini et al., 1993), ou à la T3 (ER5, dans le gène du récepteur des hormones thyroïdiennes de type bêta chez *Xenopus* (Suzuki et al., 1994).

Enfin, les motifs constitués par une répétition directe des deux sites hexamériques, (DR), ont été classés selon la règle dite "règle 1 à 5" (Naar et al., 1991; Umesono et al., 1991).

- le motif **DR1**, répétition directe ou les deux sites sont espacés d'un seul nucléotide, est la cible préférentielle de l'homodimère RXR/RXR et de l'hétérodimère **RXR/RAR**. L'exemple type de DR1 est trouvé dans les séquences régulatrices du gène CRBP-II chez le rat (Mangelsdorf et al., 1991). A noter que la réponse à l'acide rétinoïque est aussi médiée par des sites **DR2** et **DR5** (deThe et al., 1990; Smith et al., 1991).

Le motif **DR1** est aussi l'élément de réponse caractéristique des récepteurs de la sous-famille PPAR. C'est par un tel site que PPAR α régule l'expression du gène de l'Acyl CoA oxydase (ACO)(Dreyer et al., 1992).

- le motif **DR3**, tel celui du promoteur de l'ostéopontine, qui fixe avec haute affinité l'hétérodimère **RXR/VDR**, médiateur de la réponse à la vitamine D₃ (Noda et al., 1990).

- enfin, le motif **DR4** est reconnu spécifiquement par l'hétérodimère **RXR/T₃R**. Ce type de motif est par exemple retrouvé dans le gène du récepteur des hormones thyroïdiennes de type bêta chez le xénope (Machuca et al., 1995).

Cette "règle" - DR2 et DR5 pour l'hétérodimère RXR/RAR, DR3 pour RXR/VDR et DR4 pour RXR/T₃R - qui a l'avantage d'être très simple, fait fi d'un grand nombre d'exceptions. Les deux récepteurs prenant le plus de libertés vis à vis de celle-ci sont sans doute les récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR) et aux hormones thyroïdiennes (T₃R). Pour ce dernier, en plus du motif DR4 "conventionnel", la réponse aux hormones thyroïdiennes pourra être médiée à travers un site hexamérique unique (Day et Maurer, 1989), un TREpal (Park et al., 1993), ou les motifs DR0, DR3, DR5, DR18, ER4, ER6 { voir (Gronemeyer et Laudet, 1995) pour une liste indicative }.

La combinaison de ces deux moyens de diversification - variations de certaines bases de la séquence de l'hexamère et de l'organisation respective des deux sites d'un motif - conduit à diversifier et donc à spécialiser les éléments de réponse de chaque type de récepteur. Cependant, la spécificité de la réponse à chaque sous-famille de récepteurs repose aussi sur d'autres éléments extérieurs à la nature du motif de fixation.

1.3 Autres éléments de spécificité.

Le problème de reconnaissance entre un récepteur nucléaire et son élément de réponse peut être vu depuis deux perspectives: (i), pour un site donné, "d'attirer" le bon récepteur parmi ceux qui sont susceptibles de s'y fixer; (ii): pour un récepteur donné de trouver la - ou les cibles - parmi la multitude d'éléments de réponse semblables.

1.3.1 Patrons d'expression différentiels.

En plus des données de spécificité intrinsèques à l'élément de réponse lui-même (c'est à dire sa séquence et sa structure), la première des deux remarques mentionnées ci-dessus pourrait trouver une solution triviale: il n'y a pas lieu d'attirer le "bon" récepteur si seul l'un d'entre eux est alors exprimé. Le gène de la tyrosine amino-transférase (TAT) illustre clairement ce point: ce gène est naturellement induit par les glucocorticoïdes dans des cellules d'hépatomes mais pas par les hormones androgènes, dont le récepteur n'est pas exprimé. L'expression exogène de ce dernier (AR) rend l'expression du gène TAT inductible par les deux types d'hormones (Strähle et al., 1989).

1.3.2 Inactivation des récepteurs "concurrents".

Le nombre de récepteurs susceptibles de se fixer sur une même séquence est aussi minimisé par le fait que tous ne sont pas, au même moment, effectivement capables de se fixer à l'ADN. Leur inactivation peut reposer sur plusieurs mécanismes:

- en rendant la capacité de fixation dépendante d'une hormone: c'est notamment le cas pour l'homodimère RXR dont la fixation du ligand est requise pour son interaction avec sa séquence cible (Zhang et al., 1992).
- par inactivation de la fixation à l'ADN, par l'intermédiaire des protéines de choc thermique "hsp" dans le cas des récepteurs aux stéroïdes (**Fig.2A**, voir aussi **chapitre II§2**).
- par séquestration nucléaire, suite à l'interaction avec des protéines localisées dans un compartiment particulier du noyau. Ce mécanisme n'est pour l'instant illustré que dans le cas pathologique des leucémies promyélocytiques aiguës (APL): la chimère PML-RAR en séquestrant RXR, l'empêche de participer à la formation de complexes actifs, avec le récepteur à la vitamine D3 par exemple (Kastner et al., 1992), voir aussi le **chapitre V**).

1.3.3 Restriction de l'accessibilité des séquences cibles, et "guidage".

Plusieurs facteurs "environnementaux" peuvent restreindre ou guider le "choix" des

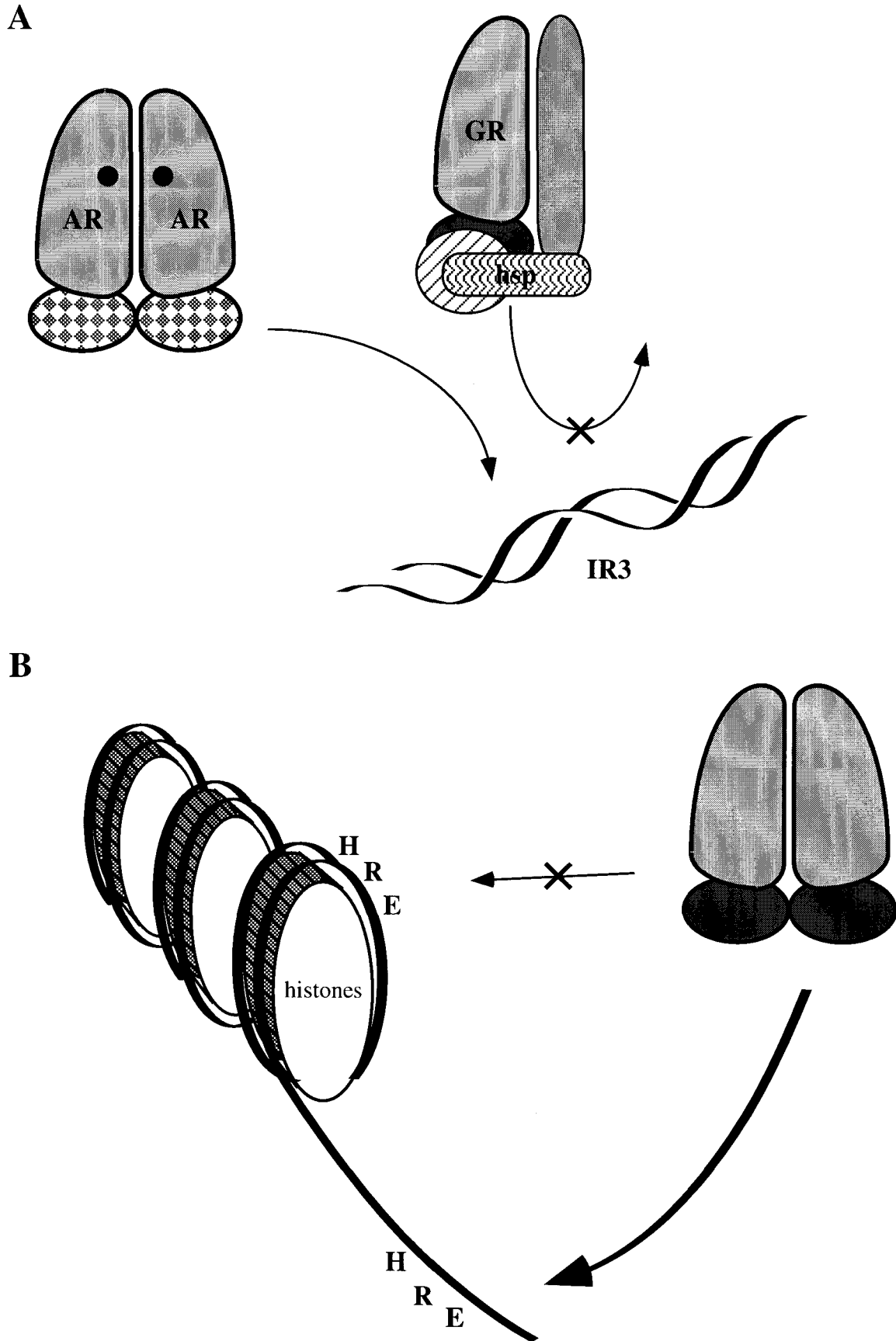


Fig.2: Restriction de la fixation à l'élément de réponse. A: inactivation du récepteur GR suite à la formation d'un complexe avec les protéines hsp. B: inaccessibilité de l'élément de réponse situé au sein d'une structure nucléosomale.

séquences cibles sur lesquelles doit se fixer un récepteur donné:

- l'accessibilité de l'élément de réponse : l'organisation nucléosomale de l'ADN peut par exemple masquer certaines séquences cibles, restreignant ainsi le nombre de séquences de fixation susceptibles d'être reconnues {**Fig.2B**, (Li et Wrangé, 1995)}.
- dans certains cas, la spécificité peut résulter d'interactions spécifiques entre un récepteur nucléaire et un autre facteur de transcription. Dans ce cas, le récepteur est "guidé" vers son élément de réponse grâce à l'interaction avec une protéine dont la séquence de fixation est située à proximité de celui-ci. Ce mécanisme est illustré dans le cas de la régulation du gène de l'apolipoprotéine B qui comporte un élément de réponse chevauchant pour le facteur C/EBP α et le récepteur orphelin HNF-4 (Metzger et al., 1993).

1.4 La spécificité de fixation à l'ADN: une nécessité absolue?

Comme nous l'avons indiqué en début de chapitre, il semble aller de soi que chaque couple hormone/récepteur régule un ensemble de gènes qui lui sont spécifiques. Pourtant, cette spécificité n'est pas toujours nécessaire, ni même souhaitable: certains gènes peuvent en effet être régulés par différents récepteurs nucléaires. Par exemple, l'expression du gène codant la protéine CRBP II , impliquée dans la fixation cytoplasmique de l'acide trans-rétinoïque (tRA), est modulée, via un même motif, aussi bien par les récepteurs orphelins HNF-4 et ARP-1, que par les récepteurs RAR et RXR (Nakshatri et Chambon, 1994).

Enfin, l'existence d'éléments de réponse reconnus par plusieurs récepteurs peut être un moyen de diversifier et de moduler finement l'expression d'un gène. Le gène hRAR β illustre bien ce type de régulation complexe. Ce gène par l'intermédiaire d'un motif DR5, pourrait ainsi être régulé par au moins trois complexes différents:

- l'hétérodimère RAR/RXR, pour médier une réponse spécifique à l'acide trans-rétinoïque (tRA) (deThe et al., 1990).
- le monomère NGFI-B, récepteur orphelin constitutivement actif, stimulé par le sérum et aussi impliqué dans l'apoptose des cellules T (Williams et Lau, 1993; Liu et al., 1994; Woronicz et al., 1994).
- et enfin l'hétérodimère RXR/NGFI-B, pour médier une réponse à l'acide rétinolique "cis" (cRA) (Perlmann et Jansson, 1995).

Cet exemple illustre bien que la régulation médiée par certains éléments de réponse peut être riche, diversifiée et surtout, complexe.

1.5 Conclusions.

Nous venons de voir que la distinction de chaque voie de réponse hormonale repose en partie sur la spécificité d'interaction du récepteur avec son élément de réponse. Cette spécificité de fixation repose sur deux éléments majeurs: la **séquence de l'hexanucléotide** et la **structure de l'élément de réponse** (composé lui même de deux variables: l'agencement et l'espacement des deux sites). En dehors de ces caractéristiques intrinsèques à l'élément de réponse, nous avons vu que la spécificité repose aussi sur "**l'environnement**" du **motif de fixation** (tel que son accessibilité ou la présence de sites de fixation pour d'autres facteurs de transcription). Enfin, nous avons vu que la spécificité peut être plus ou moins stricte, et que certains motifs permettent la régulation d'un gène par plusieurs couples hormone/récepteur.

Voyons maintenant quelles sont les bases structurales de la fixation à l'ADN et de sa spécificité. Avant d'aborder les données de structure tridimensionnelle, arrêtons nous quelques instants sur les nombreux résultats obtenus par les approches "biochimiques" et de biologie moléculaire.

2. Modes de reconnaissance et de fixation.

2.1 Le domaine de fixation à l'ADN.

Les premières études destinées à l'identification du domaine responsable de la fixation à l'ADN remontent à une dizaine d'années {voir (Evans, 1988) pour revue}.

Le domaine identifié, appelé domaine C, constitué par environ 65AA, est nécessaire et suffisant à l'interaction avec l'ADN, au moins pour les récepteurs "classiques" tels que GR, T₃R et RAR. Ce domaine est très conservé d'un point de vue phylogénétique entre les différentes classes de récepteurs, et constitue la "signature" de cette famille de facteurs de transcription (Laudet et al., 1992).

D'un point de vue structural, le domaine C comporte huit résidus cystéine régulièrement espacés qui, organisées en deux unités indépendantes complexées chacune à un atome de Zinc, constituent deux sous-domaines appelés "doigts de zinc". Le domaine de fixation à l'ADN que, par commodité, nous étendrons à la partie amino-terminale du domaine D adjacent, comporte plusieurs sous-régions auxquelles nous aurons à faire ultérieurement (**Fig.3**). Il s'agit:

- de la boîte P, située dans la troisième boucle du premier doigt de zinc CI.
- de la boîte D, correspondant à la première boucle du doigt CII.

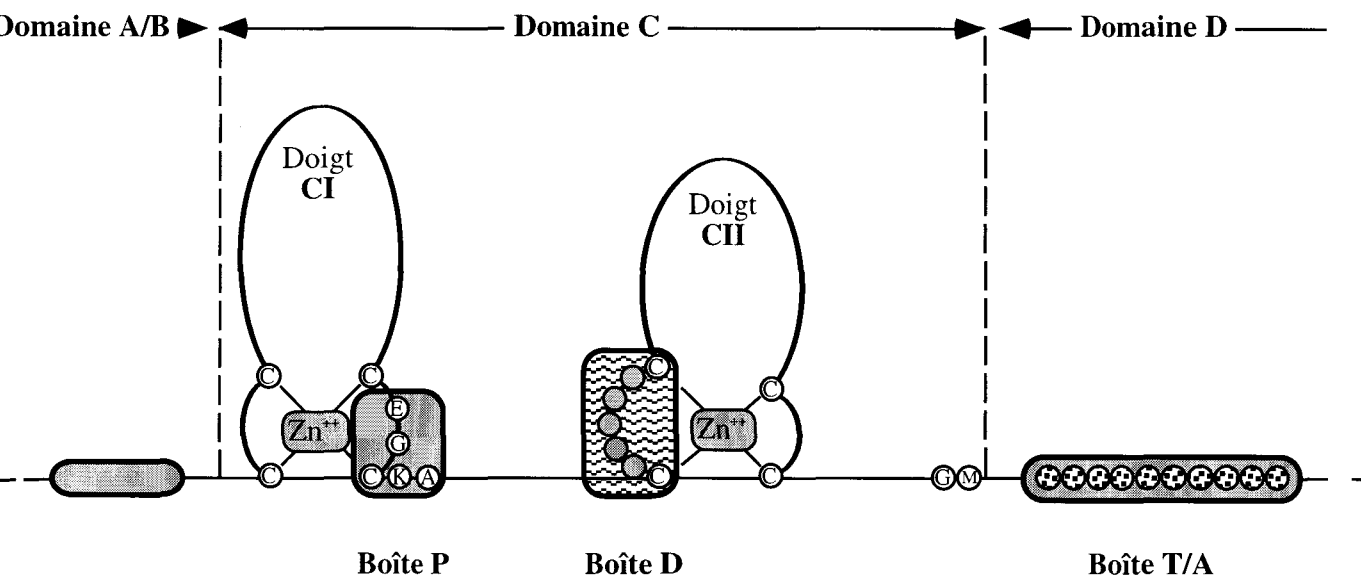


Fig.3: Motifs du domaine C et de ses régions flanquantes.

- et enfin de la structure généralement appelée boîte T/A, qui appartient au domaine D.

C'est donc sur ce domaine, commun à tous les récepteurs, que repose la reconnaissance du site de fixation et la discrimination du motif. La diversité de motifs sur lesquels se fixent les récepteurs, ainsi que les différents modes de fixation - en monomère, en homodimère ou en hétérodimère - pose différents problèmes:

- comment ce domaine permet-il la spécificité de l'interaction avec l'ADN?
- quels éléments structuraux régissent la discrimination entre motifs?
- comment les interactions protéines-protéines entre les partenaires d'un dimère sont-elles possibles?
- comment l'interaction d'un récepteur monomérique avec son élément de réponse est-elle stabilisée?

2.2 Reconnaissance du site de fixation: rigueur et flexibilité.

2.2.1 Bases de la spécificité (ou comment distinguer AGGTCA de AGAACA).

Nous avons vu qu'il existe deux types majeurs de sites de fixation:

- l'hexamère AGAACA, reconnu par les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR), aux androgènes (AR) et aux minéralocorticoïdes (MR).
- et l'hexamère AGGTCA, reconnu par le récepteur aux oestrogènes (ER) et par tous les autres membres de la famille.

C'est par une approche très élégante de chimérisation que le motif protéique responsable de la reconnaissance du site a été identifié: le remplacement, au sein de la boîte P du récepteur ER, des résidus Glu(25), Gly(26) et Ala(29) par les résidus équivalents du récepteur GR, {Gly(25), Ser(26) et Val(29)}, suffit à conférer au récepteur ER chimérique la spécificité de fixation au site AGAACA { (Danielsen et al., 1989; Umesono et Evans, 1989), **Fig.4** }.

Les résidus Glu(25) et Gly(26) du récepteur ER sont d'ailleurs très fortement conservés chez tous les autres récepteurs qui reconnaissent le site AGGTCA. Les récepteurs GR, AR et MR, sont eux caractérisés par les résidus Gly(25) et Ser(26){ voir (Gronemeyer et Laudet, 1995) pour un alignement de séquence récent }.

C'est donc la **boîte P** qui porte les informations dictant la **spécificité** de fixation sur les séquences AGGTCA et AGAACA.

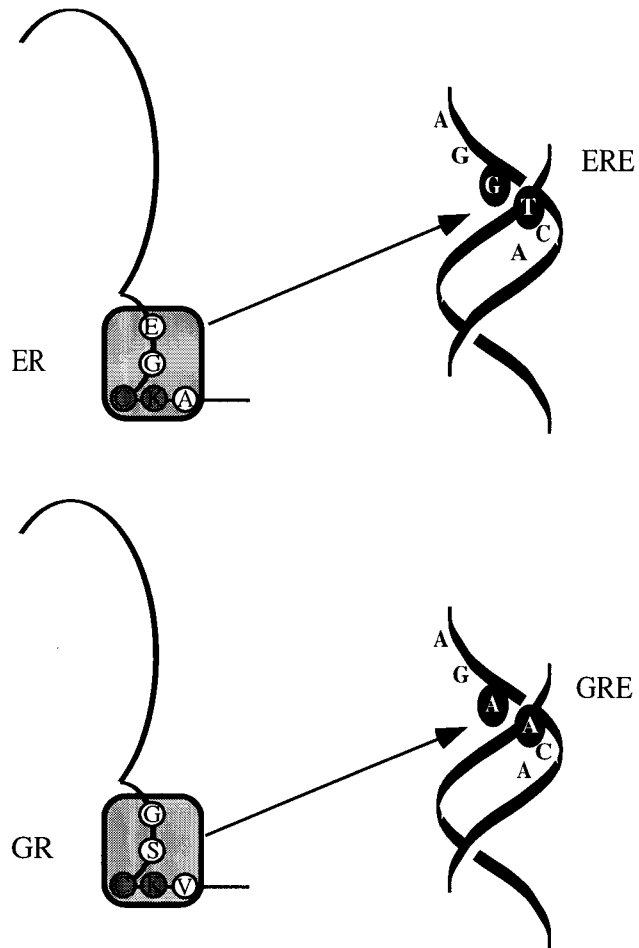


Fig.4: Boîte P et spécificité de reconnaissance de la séquence du motif.

2.2.2 Bases de la flexibilité.

S'il est vrai que la base n°3, et dans une moindre mesure la base n°4 des deux hexamères décrits sont très discriminantes, c'est à dire qu'elles sont très rarement trouvées dans un site reconnu par un récepteur comme T₃R ou RAR (de même que peu d'éléments de réponse au récepteur GR comportent à ces positions les bases G et T), peu de sites "naturels" ont une séquence entièrement identique à l'un ou à l'autre des deux consensus mentionnés ci dessus. A titre d'exemple, voici quelques sites 3' de motifs naturels fixés par le récepteur RAR:

- AGGTgA (promoteur du gène hRAR γ 2, (Lehmann et al., 1992).
- AGtTCA (promoteur du gène hADH3 (Duester et al., 1991).
- tGtTCA (promoteur du gène hMGP (Cancela et Price, 1992).

En fait, s'il est relativement simple d'identifier les aminoacides qui permettent à deux récepteurs distincts (ER et GR) de reconnaître leur site consensus respectif, il s'avère beaucoup plus difficile de comprendre en détail les bases structurales qui font qu'un même récepteur reconnaît plusieurs versions d'un même consensus (voir §3.2).

En conclusion, il n'existe pas en dehors de la boîte D, de relation simple (bijective) entre un résidu (ou un groupe de résidus) du domaine C et une base du motif AGGTCA. Il semble plutôt que **la reconnaissance du site repose sur une interaction "globale" des différents résidus du domaine C.**

2.3 Modes de fixation.

Après avoir vu quelles sont les bases de la reconnaissance du site hexamérique et les principes généraux de sa flexibilité, il nous reste à identifier les éléments de structure qui permettent à un récepteur de reconnaître les nombreux motifs constitués par les différents types de répétitions de l'hexamère PuGGTCA. Nous choisirons dans la mesure du possible, un exemple typique illustrant chacun des modes de fixation sur les principaux motifs existant.

2.3.1 Fixation de ER en homodimère: rôle de la boîte D.

Le récepteur aux oestrogènes se fixe sous forme d'homodimère sur le motif AGGTCA(X)₃TGACCT {IR3 (Beato et al., 1989)}. L'homodimère T₃R lui se fixe, entre autre, sur la séquence AGGTCA TGACCT {IR0 ou TREpal (Umesono et al., 1988)}. La séquence des deux sites de ces motifs est donc la même et seul leur espacement distingue ces éléments de réponse.

De même que la substitution, de la boîte P du récepteur ER par celle de GR lui permet de reconnaître la séquence AGAACA, la substitution de la boîte D de ER par celle du récepteur T₃R lui confère la capacité à se fixer sur le motif TREpal (IR0). En conséquence, le récepteur ER modifié perd sa capacité à se fixer sur le motif IR3 (Umesono et Evans, 1989). Ceci indique que la **boîte D** contient les éléments nécessaires et suffisants à la **discrimination de l'espace** entre les deux sites d'un motif à répétition palindromique.

Comme nous l'avons vu auparavant, ce type de fixation en homodimère sur des motifs palindromiques est typique des récepteurs aux stéroïdes (GR, ER, ...), mais est relativement marginale pour les autres récepteurs qui se fixent plutôt sous forme d'hétérodimères (avec RXR comme partenaire) sur des motifs à répétition directe (DR). Voyons ce qui change.

2.3.2 Fixation des hétérodimères RXR/RAR, RXR/T₃R et RXR/VDR sur leurs motifs.

Un simple regard sur l'agencement des sites composant un élément de réponse à répétition directe (DR) suggère plusieurs observations:

- la symétrie des motifs "IRs" est perdue.
- les deux partenaires de l'hétérodimère devront être en "tête à queue".
- l'absence de symétrie implique que les deux sites (amont et aval) ne sont pas équivalents.

a) Comment distinguer un DR5 d'un DR4?

Dans le but de préciser les domaines de RXR et de RAR requis pour la fixation au motif DR5, Perlman et collaborateurs ont eu recours à la technique classique de substitution de domaines {(Perlmann et al., 1993), voir aussi (Kurokawa et al., 1993; Zechel et al., 1994b) pour une approche alternative}.

- le premier résultat concernant le mode de fixation des hétérodimères RXR/RAR au motif DR5 indique que toutes les informations de spécificité, dictant notamment l'espace des sites du motif ainsi que le caractère coopératif de la fixation, sont portés par le domaine C de RXR et de RAR (Perlmann et al., 1993).
- deuxièmement, la substitution de la région de RAR située en amont de premier doigt de zinc par la région équivalente de T₃R, confère au RAR chimérique la capacité à se fixer, de manière coopérative avec RXR, sur un motif DR4 (au lieu de se fixer sur un DR5). Cette région, appelée **région PRF** (pour Pre-finger region), semble donc contenir les informations nécessaires et suffisantes pour spécifier l'**espace** des deux sites d'un motif à répétition directe (Kurokawa et al., 1993; Perlmann et al., 1993; Zechel et al., 1994b).

- enfin, suivant la même stratégie, ces auteurs montrent que la **boîte D** de **RXR** est requise pour la **stabilité** de la fixation de l'hétérodimère RXR/RAR sur le motif DR5.

On voit donc que, contrairement à la fixation de ER sur le motif symétrique IR3, qui fait intervenir le même domaine chez les deux parties de l'homodimère (la boîte D), chaque partenaire du complexe RXR/RAR (ou RXR/T₃R) contribue à l'interaction par des régions distinctes (boîte D pour RXR et région PRF pour RAR). **En bref, à motif de fixation asymétrique, interaction asymétrique.**

b) Sur le DR2, on tourne un peu et on recommence.

Sur un DR5, les DBD de RXR et de RAR sont espacés de "centre à centre" par environ 10 paires de base (bp) et se trouvent donc du même "coté" de l'hélice. Dans le cas d'un DR2, la distance de centre à centre n'est plus que de 7bp. Ceci a deux conséquences:

- les deux partenaires se rapprochent l'un de l'autre (d'environ 10,2Å). Il y a **translation**.
- les deux partenaires effectuent une **rotation** l'un par rapport à l'autre (de environ 118°)(**Fig.5**).

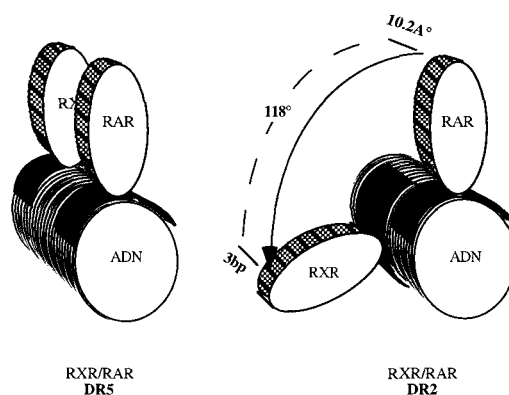


Fig.5: Conséquences de la réduction de l'espacement séparant les deux sites hexamériques d'un motif.

Ces changements ont de profondes conséquences sur les domaines impliqués dans l'interaction:

- pour **RXR**, l'interface est "décalée" en carboxy-terminal de la boîte D vers le **sommet du doigt CII** (Zechel et al., 1994a; Zechel et al., 1994b)
- en ce qui concerne **RAR**, la région requise pour l'hétérodimérisation est déléguée à un domaine symétriquement opposé à celui impliqué dans la fixation au DR5: il s'agit en effet de la **boîte T**, située en aval du doigt de zinc CII (Zechel et al., 1994a; Zechel et al., 1994b).

c) Polarité.

Nous avons vu que les éléments de réponse de types DR sont les cibles préférentielles de divers hétérodimères, comme RXR/RAR par exemple. On peut se demander si les deux partenaires de ce dimère peuvent se fixer indifféremment sur le site amont et sur le site aval du motif, ou si chacun a une "préférence" pour l'un de ces sites. En d'autres termes, l'interaction d'un hétérodimère avec son motif est-elle polarisée?

Cette question a été étudiée par Perlmann et coll. grâce à une stratégie très élégante: après avoir changé la spécificité de fixation de RAR de manière à ce qu'il reconnaisse la séquence AGAACA (en remplaçant sa boîte P par celle du récepteur GR, ce récepteur chimère sera noté RAR^{GR}), ces auteurs ont étudié la fixation de l'hétérodimère RXR/RAR^{GR} sur deux types de DR5: le DR5^{GR3'}: AGGTCA(N)₅AGAACA et le DR5^{GR5'}: AGAACA(N)₅AGGTCA {cette astuce permet de distinguer les deux sites amont et aval, (Kurokawa et al., 1993; Perlmann et al., 1993)}.

Les résultats montrent que l'hétérodimère RXR/RAR^{GR} ne peut se fixer que sur le motif DR5^{GR3'} et non sur l'autre, démontrant ainsi que sur un motif DR5, RXR se fixe exclusivement sur le site 5' alors que RAR (ou T₃R dans le cas d'un DR4) se fixe sur le site 3'.

d) En bref:

Sur un DR5:

- **RXR**, fixé en amont du motif, fourni par l'intermédiaire de sa **boîte D** (dirigée vers l'extrémité 3' du site) un domaine d'interaction **non discriminant** utilisé comme "ancrage" pour le partenaire situé en aval du motif.

- **RAR** fixé sur le site aval, interagit *via* sa **région PRF**, avec la boîte D de RXR. C'est la **région PRF**, dirigée vers l'espace formé par les 5 bases intermédiaires, qui **détermine l'espacement** requis pour l'interaction.

Sur un DR2:

- **RXR**, fixé en amont du motif, fourni par l'intermédiaire de son doigt de zinc **CII** un "ancrage" pour RAR situé en aval du motif.

- **RAR** fixé sur le site aval, interagit *via* sa **boîte T** avec la région CII de RXR.

Notons que les domaines impliqués dans la fixation de l'hétérodimère RXR/RAR au motif DR5 sont les mêmes que ceux employés pour la fixation de l'hétérodimère RXR/T₃R au motif DR4.

2.3.3 Fixation de RXR/RAR sur le motif DR1, un cas à part.

Outre sa capacité à se fixer sur les motifs DR5 et DR2, l'hétérodimère RXR/RAR se fixe aussi au motif DR1. Bien que les différences structurales qui distinguent un motif DR2 d'un motif DR1 soient en apparence bien modestes - les deux sites se rapprochent d'environ 3,4Å et pivotent de 36° l'un par rapport à l'autre - ces changements ont de profondes répercussions sur le mode de fixation de l'hétérodimère RXR/RAR: en choisissant une approche reposant sur la différenciation des deux sites du motif (pour la description de cette approche, voir §2.3.2), Kurokawa et coll. montrent que **sur le motif DR1, la polarité de fixation de l'hétérodimère RXR/RAR est inversée** (Kurokawa et al., 1994): **RAR** se fixe sur le site amont (**5'**) tandis que **RXR** se fixe sur le site aval (**3'**) (**Fig.6**).

Bien que les domaines impliqués dans la fixation sur ce site n'aient pas été étudiés en détail, il ressort que l'interaction implique la **boîte T/A** de **RXR** (Zechel et al., 1994a).

Nous verrons plus loin que ce changement de polarité a d'importantes conséquences sur l'activité transcriptionnelle de l'hétérodimère RXR/RAR (voir **chapitre III**).

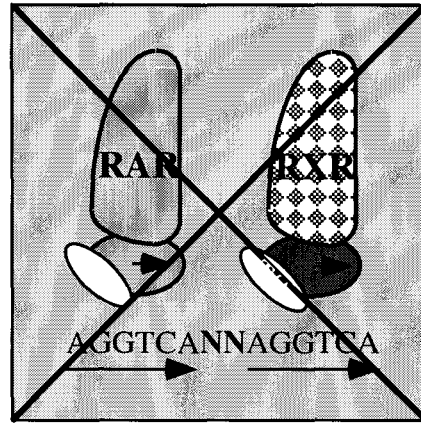
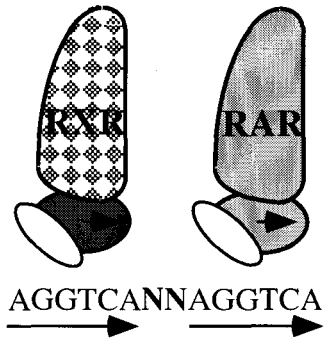
2.3.4 Fixation monomérique: le cas de NGFI-B.

De nombreux récepteurs se fixent sous forme de monomères sur des motifs ne comportant qu'un seul site de reconnaissance (Laudet et Adelmant, 1995). Sachant que la fixation en dimère (homo- ou hétérodimère) contribue à la stabilité et à la spécificité de l'interaction avec l'ADN, comment ces deux caractéristiques sont-elles assurées par le seul monomère?

L'un des exemples les mieux connus de l'interaction monomérique est celui du récepteur orphelin NGFI-B qui se fixe sur le motif monomérique AAAAGGTCA {appelé NBRE, (Wilson et al., 1992)}. Ce motif de fixation est donc constitué d'un hexamère AGGTCA classique étendu en 5' par une extension de 3 bases spécifiques, requises pour la fixation monomérique de NGFI-B (Wilson et al., 1992).

- Par une approche basée sur l'échange de domaines entre récepteurs ("domain swapping"), Wilson et coll. ont montré que la substitution de la région de RXR située juste en aval de son domaine C par la région homologue de NGFI-B, suffit à conférer au RXR chimérique la capacité à se fixer de manière **stable**, sous forme de monomère, au motif NBRE (Wilson et al., 1992). Cette région est appelée **boîte A**.

Motif
DR2:



Motif
DR1:

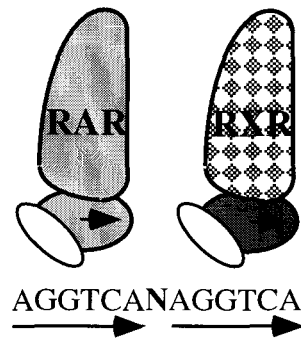


Fig.6: Polarité de fixation de l'hétérodimère RXR/RAR sur les motifs **DR2** et **DR1**. La flèche située dans le domaine C indique l'orientation N -> C-terminal.

- Des chimères, réalisées entre différents domaines de NGFI-B et SF1 {un récepteur orphelin qui se fixe en monomère sur la séquence TCAAGGTCA, (Ueda et al., 1992)}, démontrent que cette même région dicte également la spécificité: la **boîte A**, par son interaction avec l'extension 5' du site de fixation, détermine la **spécificité** du motif nonamérique. Il semble néanmoins dans le cas de SF1 que le bon fonctionnement de la boîte A nécessite la présence de sa propre boîte T, située juste en amont (Wilson et al., 1993).

En conclusion, la fixation sous forme de monomère fait intervenir deux caractéristiques nouvelles: (i) au niveau de l'ADN, par l'**extension du motif de fixation** grâce à l'ajout de 3 (ou plusieurs) bases en 5' de l'hexamère et; (ii) par l'implication, au niveau du récepteur, d'une région "distincte" du domaine C, la **boîte T/A**, qui interagit avec l'extension 5' du motif et **confère ainsi stabilité et spécificité**.

Notons enfin que cette capacité à fixer l'ADN en monomère n'exclue pas la possibilité de se fixer sous forme de dimère. NGFI-B est en effet capable d'interagir avec l'ADN sous forme d'hétérodimère avec RXR sur un motif DR5. Comme dans le cas de l'hétérodimère RAR/RXR, cette fixation est polarisée (RXR en 5', NGFI-B en 3'), mais l'interaction entre les deux partenaires semble n'impliquer que leur grand domaine E carboxy-terminal (Perlmann et Jansson, 1995). Dans ce cas, la boîte A de NGFI-B interagit de manière **spécifique** avec les bases situées en amont de son site 3'. En conséquence, les hétérodimères RXR/NGFI-B ne se fixent que sur certains motifs DR5 dont le site 3' présente les caractéristiques du NBRE.

2.3.5 Fixation de T₃R en homodimère: rôle du domaine E.

Le récepteur aux hormones thyroïdiennes est probablement le récepteur pour lequel les éléments de réponses connus sont les plus nombreux {voir (Gronemeyer et Laudet, 1995) pour une liste indicative}. La grande diversité des motifs reconnus par T₃R s'explique en partie par sa capacité à fixer l'ADN sous différentes formes:

- en hétérodimère avec RXR sur les motifs DR4 (voir §2.3.2).
- en monomère, sur un motif étendu en 5' (Katz et Koenig, 1993), d'une manière similaire à NGFI-B (voir ci-dessus).
- et enfin, sous forme d'homodimère, sur un motif TREpal (Umesono et al., 1988).

Bien que le TREpal (encore appelé IR0) soit un motif dont l'organisation est similaire à celui fixé par l'homodimère ER (IR3), la distance séparant les deux sites n'est pas suffisante pour permettre aux deux sous-unités T₃R d'interagir *via* leur boîte D, et donc de stabiliser le complexe (Rastinejad et al., 1995). Dans ce cas, cette **stabilisation** est assurée par le grand

domaine E carboxy-terminal (le "**LBD**") qui constitue une interface d'homodimérisation forte (Kliwer et al., 1992; Kurokawa et al., 1993).

2.3.6 La fixation ROR α : rôle du domaine A/B dans la spécificité de fixation.

Le gène ROR α code trois isoformes distinctes. Deux d'entre elles, ROR α 1 et ROR α 2, se distinguent uniquement par leur extrémité amino-terminale (Giguère et al., 1994). Alors que ROR α 1 et ROR α 2 sont strictement identiques dans leurs domaines C, D, et E, ces deux isoformes reconnaissent deux motifs distincts:

- (A/G/T)(T/A)(A/T)(T/A) C (A/T)AGGTCA: ROR α 1RE (ROR α 1 responsive element).
- (A/T) (T/A) A (A/T)(C/G/T)T AGGTCA: ROR α 2RE.

Les bases T(-1) et A(-4) (en gras dans le motif ROR α 2RE) sont strictement requises pour la fixation de ROR α 2, ROR α 1 étant plus "tolérant" vis à vis de la nature de celles-ci (Giguère et al., 1994). Le fait que la seule différence entre les deux isoformes α 1 et α 2 réside dans leur région A/B suggère que celle-ci intervient dans la discrimination entre ces deux motifs. Cette hypothèse est supportée par les résultats suivants:

- la délétion d'une partie du domaine A/B de ROR α 1 entraîne la perte de sa capacité à se fixer sur son motif (Giguère et al., 1994).
- ce même domaine A/B est capable de conférer au récepteur T₃R la capacité à se fixer spécifiquement, sous forme de monomère, sur le motif ROR α 1RE (Giguère et al., 1994).

Ces résultats indiquent que le domaine A/B de ROR α 1 est nécessaire et suffisant pour la fixation monomérique sur le motif ROR α 1RE. En revanche, il s'avère que cette propriété n'est pas partagée par la région équivalente de ROR α 2 qui, bien que nécessaire à sa fixation sur le motif ROR α 2RE, n'est semble-t-il pas suffisante pour conférer à T₃R la capacité à se fixer sur celui-ci. Il est donc probable que, contrairement à la boîte T/A de NGFI-B (voir §2.3.4), la fonction du domaine A/B de ROR n'est pas complètement indépendante de son domaine de fixation à l'ADN.

En revanche, il est plus probable que le domaine A/B agisse sur la conformation du domaine de fixation à l'ADN (incluant la boîte T/A) - par interaction intramoléculaire par exemple - et lui impose ainsi une certaine "rigidité". Cette hypothèse est étayée par le fait qu'une courte délétion dans le domaine A/B de ROR α 2 se traduit par un relâchement de sa spécificité et lui permet de se fixer sur le motif ROR α 1RE.

En conclusion, bien que les bases structurales soient encore inconnues, ces résultats nous montrent qu'une région extérieure au domaine de fixation à l'ADN peut influencer sévèrement la spécificité de l'interaction avec l'élément de réponse.

2.3.7 Conclusions.

Nous venons de voir à travers différents exemples, que la fixation à l'ADN résulte et dépend de plusieurs éléments:

- la reconnaissance du site hexamérique (AGACA/AGGTCA), assurée par la boîte P.
- la reconnaissance des séquences situées en amont de l'hexamère, confiée à la boîte T/A (cas de NGFI-B par exemple) ou à certaines séquences du domaine A/B (cas de ROR α 1).
- la discrimination du type de motif (éléments répétés de manière inversée ou directe, espacement des sites). Plusieurs domaines spécifiques sont impliqués par chaque partenaire selon le motif.
- enfin, la stabilisation du complexe protéine/ADN, repose soit sur la boîte T/A (NGFI-B), soit sur le domaine A/B (ROR α 2) dans le cas de fixations monomériques, soit encore sur le domaine E dans le cas de la fixation de l'homodimère T₃R sur le motif TREpal.

Il apparaît donc que **la fixation à l'ADN n'est pas une fonction "rigide", mais résulte d'une mobilisation souple, différentielle des "ressources" des récepteurs nucléaires, impliquant l'ensemble de leur structure (Fig.7).**

3. Données de structure tridimensionnelle.

De manière à simplifier la description de la structure tridimensionnelle, les données seront volontairement présentées en deux parties: le §3.2 sera consacré aux éléments de structure impliqués dans l'interaction avec la séquence d'ADN; le §3.3 sera lui consacré à la description des interfaces d'interaction protéine/protéine participant à la discrimination du type de motif.

3.1 Structure générale.

Le domaine de fixation à l'ADN est constitué de plusieurs motifs structuraux caractéristiques - hélices alpha, boucles - et de régions moins structurées. Le "noyau dur" de ce domaine est organisé autour de la structure "en croix" formée par les deux hélices alpha, stabilisées par la coordination à deux atomes de Zinc { (Luisi et al., 1991; Schwabe et al., 1993) **Fig.8** }:

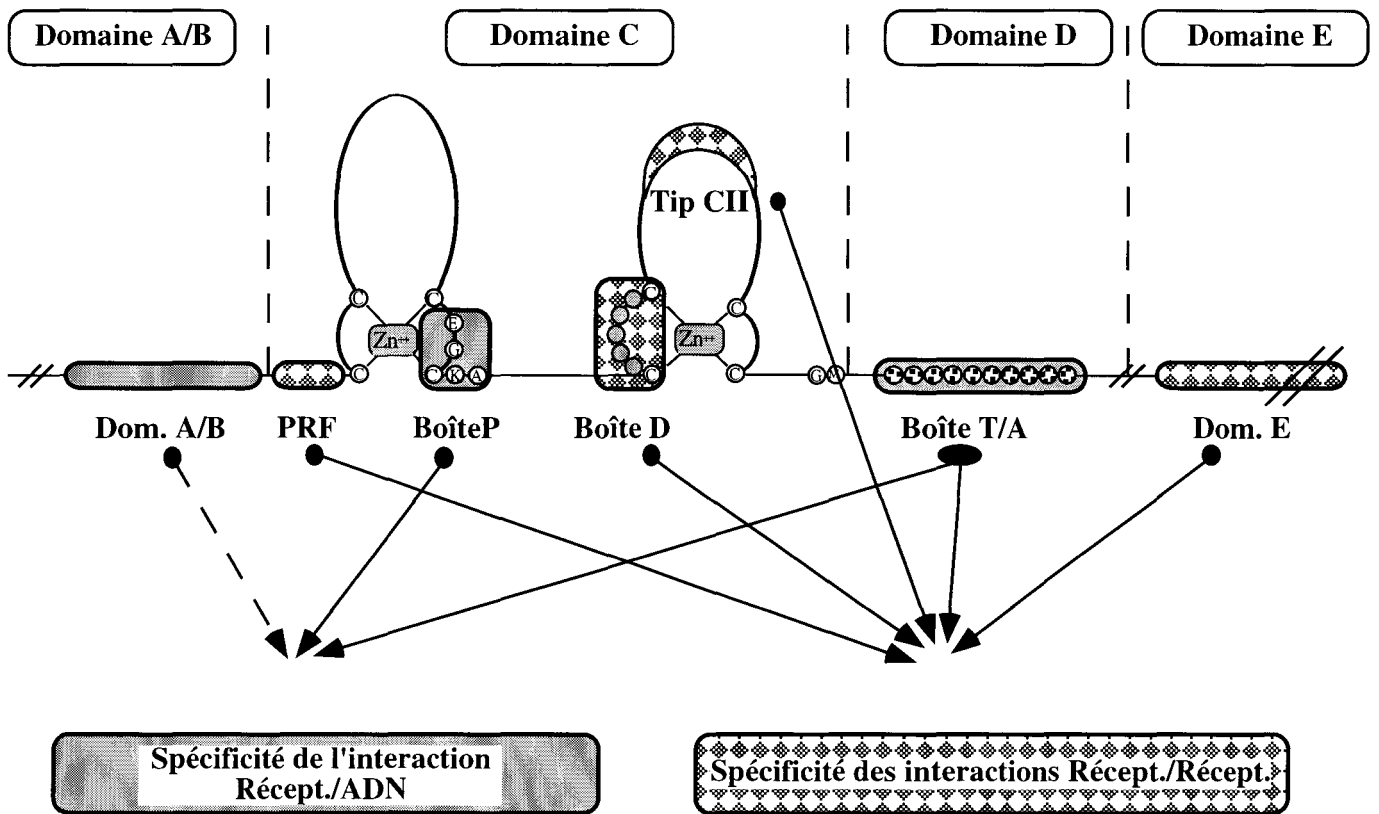


Fig.7: Domaines impliqués dans les interactions Récepteur/ADN et ceux impliqués dans l'interactions au sein d'un dimère.

- La première hélice (hélice I), constituée par la partie carboxy-terminale du premier doigt de zinc (CI), se place dans le grand sillon du site de fixation. Plusieurs résidus de cette hélice interagissent directement avec une (ou plusieurs) base(s) de l'ADN.
- la deuxième hélice (hélice II), formée par la partie carboxy-terminale du second doigt de zinc (CII) se positionne perpendiculairement au dessus de la première, probablement de manière à "structurer" l'ensemble du domaine.

Les données de structure montrent d'emblée que les domaines de fixation à l'ADN des récepteurs GR, ER, RXR et T₃R partagent une architecture très similaire (Rastinejad et al., 1995).

3.2 Eléments structuraux de la reconnaissance de l'hexamère.

L'hélice I, qui correspond à la boîte P (dont on a vu l'importance dans la reconnaissance du site, voir §2.2), est en position idéale pour établir les contacts discriminants permettant la distinction entre le site AGAACA et le site AGGTCA. Les résidus établissant des contacts directs avec les bases de ces hexamères sont les suivant:

- Glu(25), Lys(28), Lys(32), Arg(33) pour ER
- Lys(28), Val(29), Arg(33) pour GR

Ainsi, seuls les résidus Glu(25) et Val(29) qui distinguent les boîtes P de ER et de GR, établissent un contact direct, donc a priori discriminant, avec les bases. L'autre résidu spécifique de la boîte P de ER, Gly(26), n'étant impliqué que dans un contact a priori non discriminant avec l'ossature phosphate (**Fig.9A et A'**).

Il apparaît donc que la reconnaissance spécifique des bases de l'hexamère ne passe pas que par des contacts directs AA/base, et que d'autres résidus "secondaires" peuvent jouer un rôle déterminant, en permettant par exemple aux premiers d'être correctement positionnés.

Gewirth et Sigler ont montré que, dans le cas où les deux bases "critiques" du site hexamérique sont mutées (étude de la fixation de ER au site GRE: AGAACA), les contacts "aspécifiques" établis avec l'armature phosphate sont préservés, alors que les interactions entre les résidus {Glu(25), Lys(28), Lys(32), Arg(33)} et les bases de l'hexamère sont compromises (voir **Fig.9B**). Ce déficit d'interaction se traduit par l'insertion de molécules d'eau entre ces résidus et les bases nucléiques, engendrant ce que les auteurs ont qualifié de "fardeau d'entropie", ce qui déstabilise fortement l'interaction récepteur/ADN {pour les férés de structure RMN, se reporter à (Gewirth et Sigler, 1995)}.

La deuxième caractéristique de la fixation à l'ADN est la "flexibilité" ou la "tolérance", qui permet aux récepteurs nucléaires de se fixer sur des sites non consensuels. Cette flexibilité est

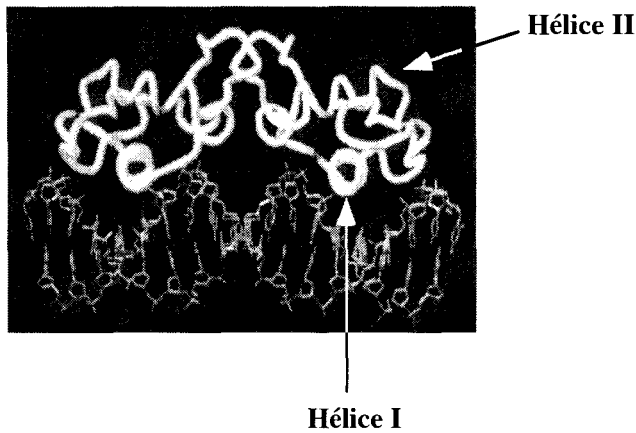
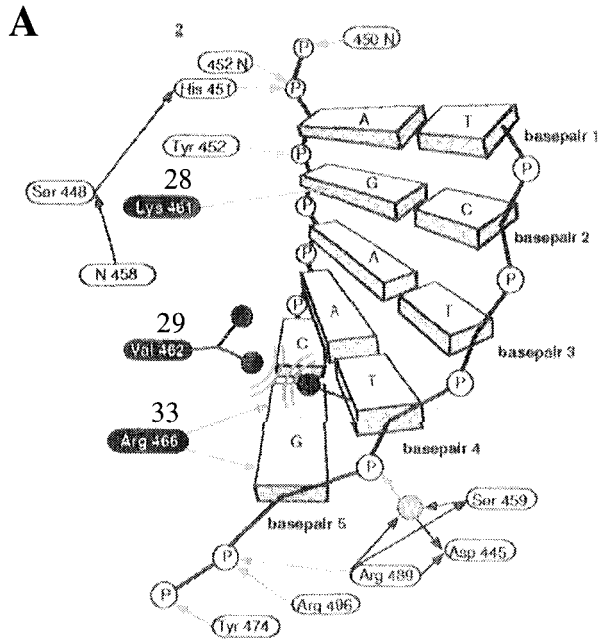
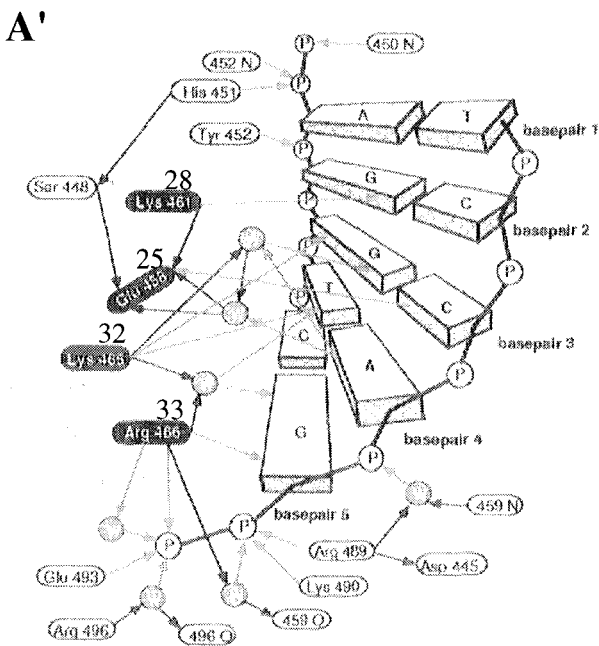


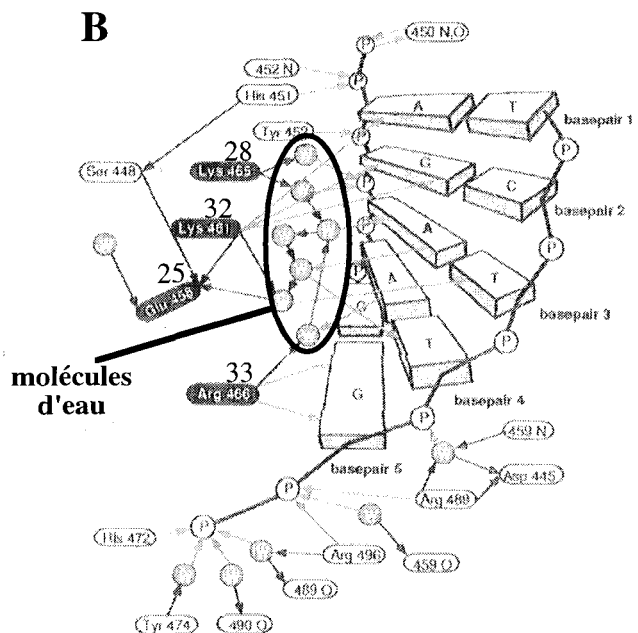
Fig.8: Interaction du dimère ER avec son élément de réponse ERE.



GR/GRE



ER/ERE



ER/GRE

Fig.9: Résidus du domaine C impliqués dans la reconnaissance de la séquence du site hexamérique. A: récepteur GR sur son GRE; B: récepteur ER sur son ERE; C: récepteur ER sur un GRE

illustrée au niveau moléculaire, par l'étude de la fixation du récepteur ER sur un élément de réponse non consensuel (celui du gène de la vitellogénine B1), dont l'une des bases du site 5' est substituée {AAGTCA, (Schwabe et al., 1995)}: dans cette situation, la chaîne latérale du résidu Lys(28) ne peut établir un lien hydrogène avec l'atome O6 de la base Guanine (ici remplacée par une Adénine). Cette chaîne latérale est en conséquence redirigée vers des interactions non optimales avec l'atome N7 de l'Adénine ou des interactions intramoléculaires. Ces résultats illustrent au niveau moléculaire le caractère adaptable de l'interface d'interaction avec l'ADN.

L'interface d'interaction avec l'ADN n'est donc pas rigide ou figée mais dans une large mesure est adaptable.

Après avoir décrit l'architecture globale du domaine C et les bases structurales de la reconnaissance de l'hexamère, il nous reste à définir les mécanismes qui permettent la discrimination des différents types d'élément de réponse.

3.3 Eléments structuraux de la discrimination du motif de fixation.

La récente résolution de la structure de l'hétérodimère RXR/T₃R fixé au motif DR4 nous permettra d'illustrer les bases de la discrimination des différents types d'élément de réponse. La plupart des résultats présentés dans ce paragraphe se référeront à l'article de Rastinejad et coll. (Rastinejad et al., 1995). Par mesure de clarté, les numéros des amino-acides seront attribués de manière arbitraire, le résidu n°1 correspondant au 1^{er} résidu Cys du 1^{er} doigt de zinc CI.

3.3.1 Interactions protéine/protéine:

a) Du côté RXR.

L'interface de RXR impliquée dans l'interaction avec T₃R est constituée par plusieurs résidus: Arg(38), Arg(48) et Arg(52). Curieusement, parmi ceux-ci, seul Arg(38) appartient à la boîte D, identifiée précédemment comme nécessaire et suffisante à la fixation du complexe RXR/T₃R sur le motif DR4 (voir §2.3.2) alors que les autres font partie du doigt de Zinc CII. A noter que RAR contient à la position équivalente de l'AA Arg(38) un résidu His, ce qui explique probablement pourquoi RAR ne peut former d'hétérodimère avec T₃R. Le résidu Arg(38) fait partie de l'interface que RXR propose indifféremment à ses partenaires (RAR, T₃R et VDR). En revanche, les autres résidus participant à cette interface sont eux spécifiques de chaque partenaire de RXR. Ces résultats montrent donc qu'il y a une mobilisation

différentielle des résidus constituant l'interface d'interaction de RXR en fonction de son partenaire d'interaction.

En bref, **l'interface d'interaction de RXR** se compose d'un résidu **non discriminant**, Arg(38), autour duquel s'organise un réseau de contacts **adaptables en fonction du partenaire**.

b) Du côté de T₃R, RAR, VDR.

Nous avons vu que c'est la région en amont du premier doigt de Zinc (région PRF) qui "détermine" le type de motif reconnu (DR4 pour T₃R, DR5 pour RAR, DR3 pour VDR). Différents résidus de cette région sont impliqués dans l'interface d'interaction de chacun des trois récepteurs avec RXR: Asp(-3) pour T₃R, Arg(-5) et Tyr(-3) pour RAR.

Encore une fois, contrairement à ce qu'avaient indiqué les expériences de chimérisation, l'interface d'interaction de T₃R avec RXR ne se limite pas à la seule région PRF: cette interface inclue en effet les résidus Asp(69) de la boîte T, et le résidu Arg(14) du doigt de zinc CI (Rastinejad et al., 1995).

Curieusement, l'interface d'interaction de l'hétérodimère RXR/VDR n'implique aucun résidu de la région PRF de VDR, mais est formée par d'autres amino-acides répartis sur l'ensemble du domaine C comme le résidu Asn(14) du premier doigt de zinc et les résidus Lys(68) et Glu(69) de la boîte T (Rastinejad et al., 1995). En conséquence, il semble que la région PRF de VDR ne pourrait pas conférer à RAR la capacité à se fixer sur un motif DR3 et même que ce RAR chimérique perdrait probablement la capacité à se fixer sur son motif DR2 initial (Rastinejad et al., 1995).

L'interface d'interaction de T₃R, RAR, et VDR, est constituée **d'un résidu discriminant** (il suffit à dicter le type de motif fixé, voir §2.3.2) et **de résidus "secondaires" contribuant à la stabilité de l'interaction avec RXR**.

3.3.2 Autres interactions:

Un autre domaine d'interaction semble important pour la fixation de T₃R. Il s'agit de la boîte T/A, située en aval du doigt CII. Cette région, qui adopte une structure en hélice très longue (Rastinejad et al., 1995), est rejetée vers l'espace de 4 bases situées entre les deux hexamères (**Fig.10**). Cette hélice supporte plusieurs fonctions:

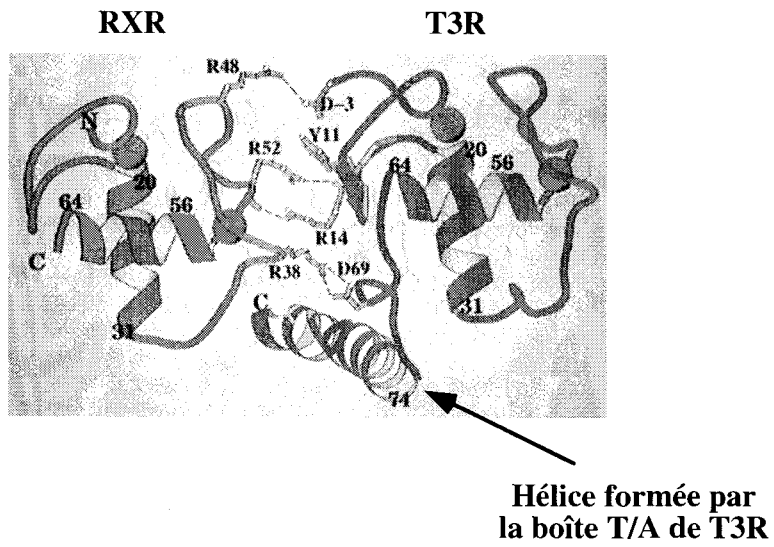


Fig.10: Fixation de RXR/T3R sur un motif DR4.

- grâce à de nombreux contacts avec l'armature phosphate, elle **stabilise** l'interaction avec l'ADN. C'est cette interaction qui permet à T₃R de se fixer de manière stable en monomère (Katz et Koenig, 1994).
- l'interaction des résidus Lys(80) et Arg(81) de la boîte A avec les bases situées entre les deux sites du motif, accroît la **spécificité** de reconnaissance de T₃R pour son site de fixation.
- se plaçant dans l'espace formé par les quatre bases intermédiaires, l'hélice renforce la **discrimination** du motif. Par un phénomène d'encombrement stérique celle-ci empêche la fixation aux motifs DRs dont les sites sont séparés de moins de 4 bases (**Fig.11**).

C'est probablement grâce à une hélice similaire que certains récepteurs orphelins comme NGFI-B ou SF1 (voir §2.3.4), peuvent interagir de manière stable et spécifique avec un élément de réponse monomérique possédant une extension en aval du site AGGTCA.

Ainsi, la **discrimination de l'espacement** entre éléments de réponse repose aussi sur un mécanisme d'**encombrement stérique** entre les partenaires de l'hétérodimère.

4. Conclusion:

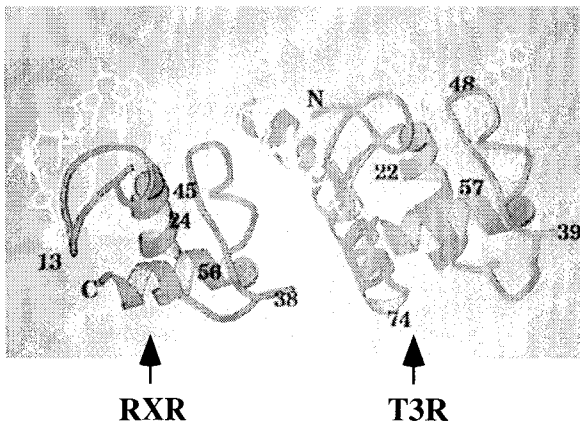
La principale voie de régulation transcriptionnelle des récepteurs nucléaires repose sur leur interaction directe et spécifique avec leurs éléments de réponse. La spécificité d'un élément de réponse repose sur trois caractéristiques essentielles:

- la séquence du site de fixation hexamérique, éventuellement étendu en 5'.
- l'orientation relative des deux sites d'un motif.
- et enfin la distance séparant ces deux sites.

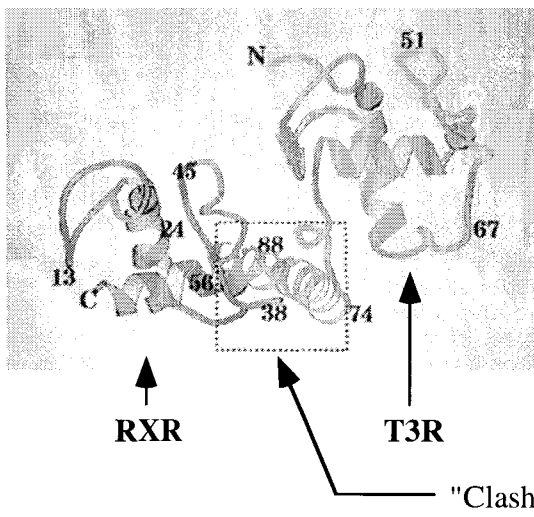
Nous avons vu que la reconnaissance de la séquence du site repose sur l'interaction spécifique et discriminante de résidus de la boîte D avec les bases de l'hexamère, et notamment les 2 bases qui distinguent fondamentalement un site GRE des sites reconnus par l'ensemble des autres récepteurs (AGAACA et AGGTCA respectivement).

La reconnaissance des bases situées en 5' de l'hexamère est quant à elle assurée par la boîte T/A, relativement indépendante du domaine C. Cette boîte T/A contribue aussi à stabiliser l'interaction récepteur/ADN dans les cas de fixations monomériques.

La discrimination de l'orientation et de l'espacement des sites d'un motif repose essentiellement sur les interactions protéine/protéine établies entre les partenaires du dimère et font intervenir une grande variété de domaines. Ces interactions, qui discriminent à la fois



RXR/T3R fixé au motif DR4



RXR/T3R fixé au motif DR3

Fig.11: L'encombrement stérique entre les partenaires RXR et T3R est la base de la spécificité de fixation au motif DR4.

le partenaire et le type d'élément de réponse, contribuent aussi à stabiliser l'interaction du dimère avec l'ADN.

Nous avons aussi tenté de souligner qu'il est restrictif de limiter la fonction de fixation à l'ADN au seul domaine C. En effet, d'autres domaines, comme le domaine A/B dans le cas de ROR, ou le domaine E dans le cas de la fixation homodimérique de T₃R, font aussi partie des éléments structuraux qui permettent l'interaction avec l'ADN.

II. La fixation de l'hormone: bases structurales et fonctionnelles.

Selon la définition classique, les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription inductibles par une hormone. Nous présenterons dans ce chapitre les différents modèles qui ont été proposés pour rendre compte de l'inductibilité de la fonction activatrice d'un récepteur:

- la translocation du récepteur vers le noyau (dans le cas unique de GR).
- la stimulation de sa capacité à se fixer sur son élément de réponse (pour certains récepteurs seulement).
- la révélation de sa fonction transactivatrice.

1. Généralités.

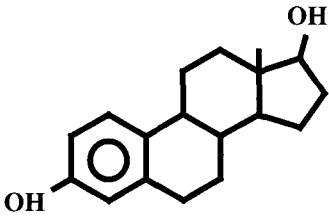
1.1 Classification.

Dans un organisme pluricellulaire, la communication diffusible entre cellules est relayée par deux groupes majeurs de messagers:

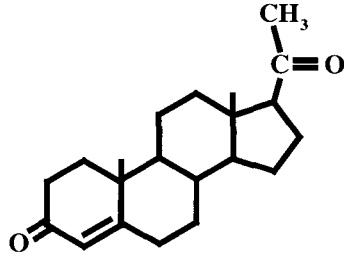
- le premier groupe comprend les neurotransmetteurs et les hormones peptidiques en général. Ces messagers se fixent sur des récepteurs membranaires qui, relayés par différentes voies de transduction du signal, transmettent l'information au noyau.
- l'autre groupe est constitué par de petites molécules hydrophobes, d'origine intra- ou exo-crine, qui agissent directement sur l'expression des gènes via un groupe spécialisé de facteurs de transcription, les récepteurs nucléaires d'hormones.

La spécificité de chaque voie de signalisation par les récepteurs nucléaires a pour origine la fixation, hautement discriminante, de l'hormone. A l'exception de quelques récepteurs comme RAR qui fixe différentes isoformes de la même hormone {Acide trans et cis-Rétinoïque, t-RA et c-RA respectivement (Giguere et al., 1987; Petkovich et al., 1987)} et PPAR qui fixe des hormones de structures assez dissemblables (Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995), chaque récepteur fixe spécifiquement une seule hormone. Celles-ci se répartissent dans différentes catégories et classes chimiques (**Fig.12**):

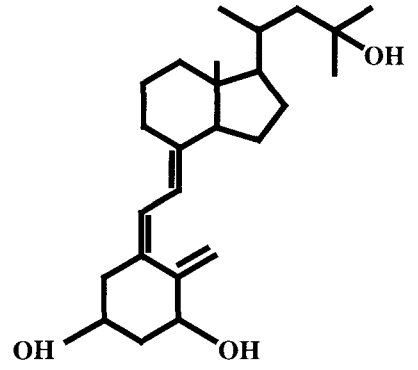
- les hormones sexuelles (œstrogène, androgène, progestérone).
- les corticoïdes (glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes).
- les vitamines et dérivés (vitamine D3, acides rétinoïques).
- les hormones thyroïdiennes.
- l'ecdysone (chez les insectes).
- différentes molécules apparentées aux prostaglandines.



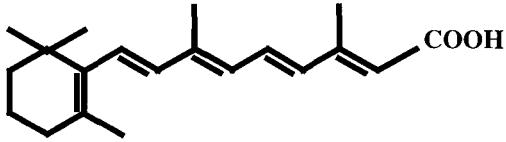
Oestradiol



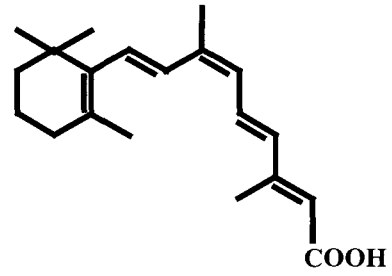
Progesterone



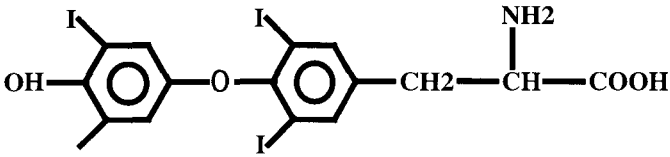
1,25 dihydroxyvitamine D3



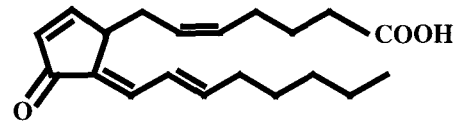
Acide trans-rétinoïque (t-RA)



Acide 9-cis rétinoïque (9c-RA)



3,5,3'-L-triodothyronine (T₃)



15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2

Fig.12: Quelques exemples d'hormones.

En plus de ces hormones "naturelles", de nombreuses molécules synthétiques (appelées "ligands") peuvent se fixer aux récepteurs, et se comporter, soit comme activateurs (agonistes), soit comme inhibiteurs (antagonistes) de leur activité transcriptionnelle. Afin d'éviter l'usage trop fréquent du même mot, nous emploierons indifféremment le terme hormone et ligand (pris dans le sens d'agoniste). On a proposé que chaque ligand pouvait être classé soit dans la catégorie des agonistes soit dans celle des antagonistes. Nous verrons à l'occasion du chapitre **IV** que cette classification n'est pas aussi simple et que certains ligands, en fonction du contexte, peuvent jouer le rôle d'activateur ou d'inhibiteur de l'activation transcriptionnelle d'un récepteur.

1.2 Le domaine de fixation de l'hormone.

La région responsable de la fixation du ligand est comprise dans le domaine E, un domaine carboxy-terminal globalement peu conservé entre différents récepteurs (Laudet et al., 1992). Ce domaine, constitué d'environ 250 résidus, est nécessaire et suffisant à la fixation spécifique du ligand {voir (Wurtz et al., 1996) pour revue}. En plus de la fixation de l'hormone, le domaine E assure de nombreuses fonctions:

- c'est un domaine d'homo- et d'hétérodimérisation fortes.
- il est impliqué dans l'interaction avec de nombreuses protéines (voir §2 ci dessous et le chapitre **III**).
- il contient aussi l'une des régions responsables de l'activation transcriptionnelle (voir chapitre **III**).

Il est important de noter que, à l'exception de l'activation transcriptionnelle, ces différentes fonctions ne sont pas portées par des motifs structuraux distincts, séparables les uns des autres, mais reposent toutes sur une seule structure d'organisation complexe (dont l'architecture tridimensionnelle sera décrite au §4). Ceci explique d'une part l'impossibilité d'avoir recours aux expériences de "chimérisation" simples, qui ont prouvé leur utilité dans l'étude du domaine de fixation à l'ADN, et rend compte, d'autre part, des difficultés rencontrées dans l'interprétation de certaines données de mutagenèse.

2. Hormones, récepteurs et protéines hsp.

La découverte de la présence du récepteur aux œstrogènes au sein d'un complexe cytoplasmique de taille 9S remonte à un peu plus de trente ans (Toft et Gorski, 1966). Cette forme du récepteur, incapable de fixer l'ADN, peut être convertie en un complexe de petite taille (4S) capable de fixer l'ADN {voir pour revue (Pratt, 1987; Evans, 1988)}.

Le complexe 9S correspond à un assemblage de nombreuses protéines parmi lesquelles on identifia la protéine de choc thermique hsp90 (heat shock protein de 90 kDa), très conservée des bactéries aux mammifères (Catelli et al., 1985; Sanchez et al., 1985), ainsi que de nombreuses autres protéines de cette même famille (comme hsp56 et hsp70) et des protéines d'autres origines { voir (Pratt, 1993) pour revue }

Il est important de noter que seuls les récepteurs aux stéroïdes semblent interagir avec les protéines hsp. En particulier, aucune interaction n'a été décrite entre hsp90 et les récepteurs T₃R et RAR (Dalman et al., 1990).

2.1 Les protéines hsp: inhibiteurs des récepteurs aux stéroïdes?

L'hypothèse selon laquelle les protéines hsp inhibent fonctionnellement les récepteurs aux stéroïdes repose sur plusieurs observations:

- le récepteur ER dans le contexte du complexe 9S est incapable de fixer l'ADN (Pratt, 1987).
- une version mutée de GR n'interagissant plus avec hsp est constitutivement active (Pratt et al., 1988).
- la fusion du domaine E (domaine d'interaction majeur avec les hsp) à d'autres protéines (facteurs de transcription ou autres) leur confère un état réprimé, réversible par le ligand { voir (Picard, 1994) pour revue }.

Cet effet inhibiteur a été attribué à plusieurs causes:

- le masquage du domaine de fixation à l'ADN (Renoir et al., 1990).
- la rétention cytoplasmique du récepteur (Scherrer et al., 1993).

Ce deuxième point est encore aujourd'hui sujet à controverse car il semble que ER et AR, qui interagissent avec hsp90, sont majoritairement nucléaires, même en l'absence de ligand { voir (Pratt, 1993) pour revue }.

Les protéines hsp furent donc initialement décrites comme des facteurs exerçant un rôle passif, inhibiteur, sur les récepteurs aux stéroïdes.

2.2 Les protéines hsp: un "mal" nécessaire?

Cependant, les travaux de Picard et coll. ont contribué à montrer que les protéines hsp n'ont pas simplement un rôle inhibiteur: alors que, selon le modèle "inhibiteur", on s'attend à ce que l'activité du récepteur GR soit maximale en absence de hsp90, ces auteurs ont montré que GR est incapable d'activer la transcription en réponse à son ligand dans des cellules de levure exprimant des taux réduits de hsp90 (Picard et al., 1990). Ce résultat suggère fortement

que **la protéine hsp90 est nécessaire à la signalisation par le récepteur aux glucocorticoïdes.**

En revanche, l'absence de hsp90 à une incidence moindre, bien que significative, sur l'activité du récepteur ER (Kimura et al., 1995). Dans ce cas pourtant, et contrairement à GR, la fixation de l'hormone par le récepteur n'est pas dépendante de hsp90 (Bresnick et al., 1989). L'implication de hsp90 dans la signalisation par les récepteurs aux stéroïdes ne se limite donc pas à son effet sur la fixation de l'hormone.

Notons que hsp90 a les mêmes répercussions fonctionnelles sur l'activité d'un membre d'une toute autre famille de protéines: l'oncogène viral pp60^{v-src}, qui code une protéine-kinase:

- l'activité kinase de pp60^{v-src} est inhibée par l'association à hsp90 (Brugge, 1986).
- cependant, la présence de hsp90 permet à pp60^{v-src} d'avoir une activité maximale.

Le fait que l'effet inhibiteur/potentiateur de hsp90 s'applique à des protéines de natures si différentes {voir (Rutherford et Zuker, 1994) pour une liste indicative} suggère que cette protéine exerce une fonction de type "chaperonne". Ce rôle a d'ailleurs été directement établi dans le cas du récepteur GR (Wiech et al., 1992).

Cette fonction chaperonne permettrait aux récepteurs nucléaires soit d'adopter une conformation optimale pour la fixation de l'hormone, ce rôle semblant toutefois se limiter au récepteur GR, soit d'adopter une conformation optimale pour leur activité transcriptionnelle.

En bref, hsp90 est une protéine de type chaperonne, aidant les récepteurs aux stéroïdes à acquérir un état compétent pour l'activation.

2.3 ydj1: le vrai inhibiteur?

Comme nous l'avons indiqué au début de ce chapitre, de nombreuses autres protéines sont associées aux récepteurs aux stéroïdes.

Parmi celles-ci, un criblage génétique en levure a permis d'identifier ydj1, une protéine de la famille des chaperonnes interagissant directement avec le récepteur GR (Kimura et al., 1995). Bien que ydj1 ait été isolé par un criblage destiné à trouver des homologues fonctionnels de hsp90, le phénotype résultant de son inactivation fonctionnelle diffère singulièrement du phénotype "mutant de hsp90". En effet, l'inactivation de ydj1 conduit le récepteur GR à transactiver en absence de ligand avec une efficacité comparable au récepteur activé par son ligand dans un contexte normal. L'addition d'hormone n'exerce plus alors qu'un faible effet stimulateur sur la fonction transactivatrice de GR (Kimura et al., 1995).

La **figure 13** propose un modèle récapitulatif basé sur les expériences d'inactivation fonctionnelle de hsp90 et de ydj1:

- l'état A correspond à un état inactif, incompetent pour l'activation, ici schématisé par un domaine E "déstructuré".
- l'état B est un état où hsp90 impose au récepteur un état compétent pour l'activation, schématisé par un domaine E structuré.
- l'état C correspond à un état compétent pour l'activation mais réprimé par ydj1, symbolisé par le masquage de la région transactivatrice AF2.
- enfin, la fixation de l'hormone induit le passage à l'état D, compétent pour la transactivation.

Il est intéressant de noter qu'en absence de ydj1, l'activité transcriptionnelle du récepteur GR est indépendante de l'hormone, ce qui est schématisé dans la **Fig.13** par une flèche pointillée (Kimura et al., 1995). Ce résultat est surprenant car de nombreux résultats montrent que l'hormone est nécessaire pour que le récepteur adopte une conformation adéquate pour l'activation transcriptionnelle (voir § 4.2).

ydj1 interviendrait comme un facteur conduisant le récepteur à adopter un **état transcriptionnellement inactif**, réversible par l'hormone.

2.4 Localisation des protéines hsp.

On a longtemps pensé que les protéines hsp faisaient partie d'un complexe strictement cytoplasmique {voir (Pratt, 1993) pour revue}. En réalité, hsp90 et hsp56, associées au récepteurs ER et PR, sont tout autant nucléaires (Sanchez et al., 1990). Il semble donc que les hsp pourraient circuler entre le compartiment cytoplasmique et le compartiment nucléaire, ce qui est cohérent si l'on considère que le récepteur doit garder jusque dans le noyau un état compétent pour l'interaction avec l'ADN et la transactivation. Certains composants du complexe 9S pourraient aussi participer à d'autres fonctions, et notamment au transport de certains récepteurs aux stéroïdes vers le noyau (Ruff et al., 1992; Czar et al., 1994)

2.5 Conclusion

Notre vue sur la fonction du complexe 9S est donc passée d'un schéma répresseur, passif et statique, à un schéma potentiateur, actif et dynamique. Il en ressort finalement que **le complexe 9S a une fonction cruciale dans la signalisation par les hormones stéroïdes.**

La fonction des protéines hsp semble si importante que l'on se demande comment les autres récepteurs nucléaires fonctionnent sans celles-ci. S'il semble établi qu'en dehors des

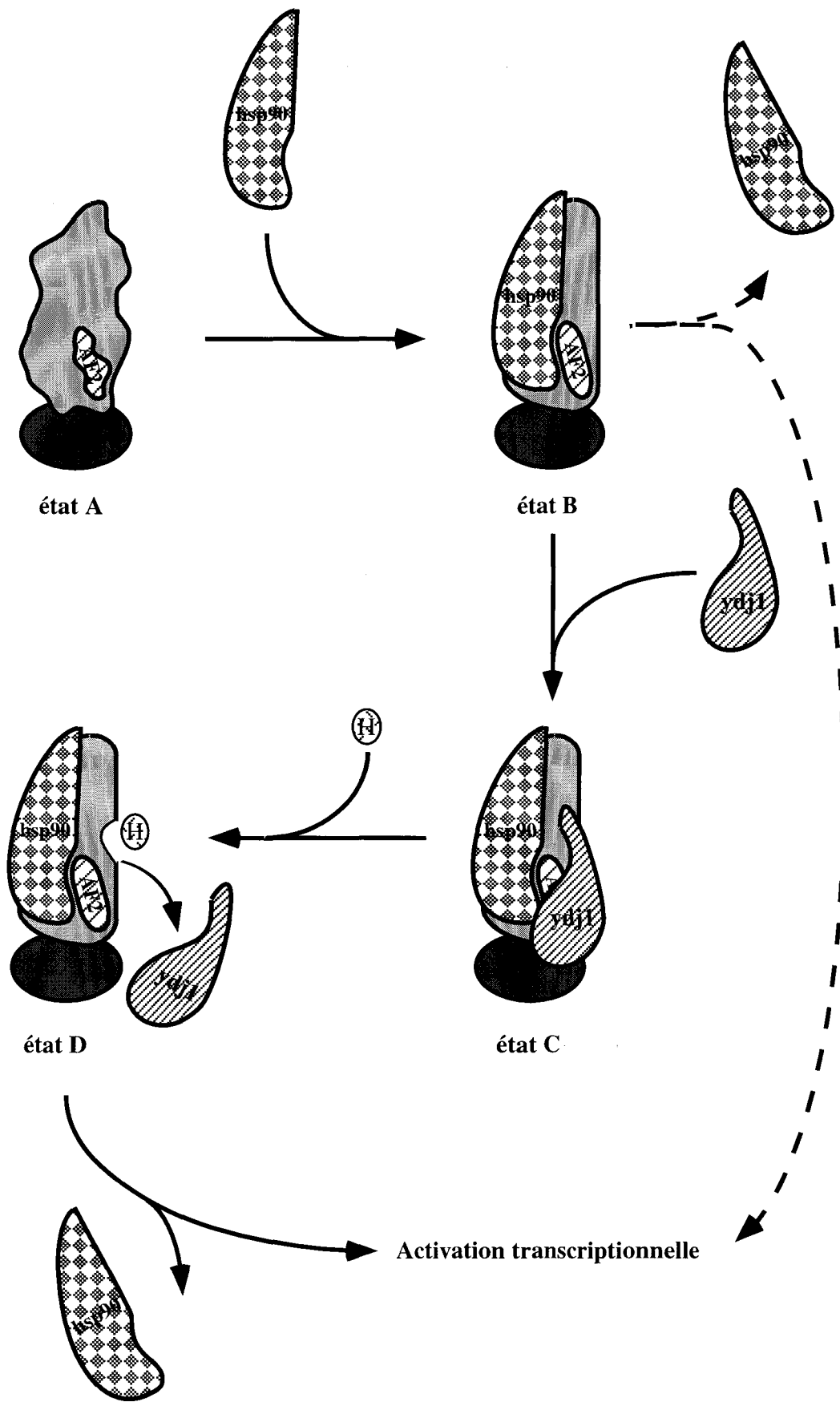


Fig.13: Effets respectifs de hsp90 et de ydj1 sur la fonction des récepteurs aux stéroïdes. Par mesure de clarté, ce modèle est détaillé en plusieurs étapes qui n'ont pas de réalité fonctionnelle.

récepteurs aux stéroïdes aucun autre membre de la superfamille n'interagit avec les protéines hsp - une seule exception semble être PPAR (Huang et al., 1994) - il reste que d'autres protéines pourraient jouer ce rôle de chaperonne. Nous discuterons ce point ultérieurement (voir chapitre III §3.3).

3. Rôles de l'hormone sur la dimérisation et la fixation à l'ADN.

Nous venons de voir que l'association des récepteurs aux stéroïdes avec le complexe 9S est l'un des événements sur lesquels l'hormone peut exercer son rôle activateur. Il nous reste cependant à comprendre par quel(s) autres mécanisme(s) l'hormone pourrait activer les récepteurs qui n'interagissent pas avec le complexe 9S.

Le fait que la dimérisation des récepteurs influence très fortement l'affinité et la spécificité de leur fixation à l'ADN, et que la principale interface de dimérisation réside dans le domaine E, suggère que l'hormone pourrait réguler l'activité des récepteurs au niveau de leur dimérisation et de leur fixation à l'ADN.

3.1 L'acide 9-cis rétinoïque et la fixation de l'homodimère RXR à l'ADN.

L'effet du ligand sur la fixation à l'ADN a initialement été étudié pour les récepteurs RXR et RAR. Ces deux récepteurs sont en apparence très similaires: ils ont l'acide 9-cis rétinoïque (9-cRA) comme ligand commun et se fixent en tant qu'homodimère sur certaines séquences cibles communes (le TREpal notamment). RXR et RAR, en tant qu'hétérodimère, se fixent aussi sur des motifs de type DR1, DR2 et DR5. En outre, ces deux récepteurs sont aussi impliqués dans des voies de signalisation distinctes, et notamment une voie qui est spécifique de l'homodimère RXR/RXR et d'autres qui sont spécifiques de l'hétérodimère RXR/RAR (voir chapitre I §2.3).

Afin d'identifier quels facteurs influençaient le "choix" entre ces voies, Zhang et Coll. ont étudié l'effet du ligand 9c-RA sur la fixation de l'homodimère RXR/RXR et de l'hétérodimère RXR/RAR sur l'élément de réponse TREpal (Zhang et al., 1992): contrairement à l'hétérodimère RXR/RAR dont la fixation sur le motif TREpal est constitutive (indépendante de l'hormone), l'acide 9-cis rétinoïque induit fortement la fixation des homodimères RXR/RXR sur ce motif (Zhang et al., 1992).

Pendant, cet effet fut mis en doute dans un travail ultérieur utilisant des protéines RXR produites en bactérie et hautement purifiées {contrairement à leur production en lysat de réticulocyte, (Chen et al., 1994)}. Afin d'expliquer cette divergence, Chen et coll. ont suggéré que le rôle du ligand sur la fixation à l'ADN observé initialement ne reflète qu'un effet "trivial", relatif au mauvais repliement des protéines exprimées en lysat de réticulocyte: ainsi,

selon ces auteurs, le ligand "forcerait" la protéine à adopter une conformation favorable à l'interaction avec l'ADN (Chen et al., 1994).

Si l'effet du ligand sur la fixation à l'ADN est encore aujourd'hui controversé, ces résultats suggèrent néanmoins, de manière indirecte, que **le ligand exerce un effet conformationnel sur la structure du récepteur**.

3.2 Hormone et homodimérisation.

L'effet du ligand sur la dimérisation et la fixation à l'ADN a été approfondi dans une étude détaillée du récepteur à la vitamine D3 (Cheskis et Freedman, 1994).

Il existe au moins deux voies distinctes d'activation par le récepteur à la vitamine D3: une voie médiée par les homodimères VDR par l'intermédiaire d'éléments de réponses du type DR6 ou IR12, une autre médiée par les hétérodimères RXR/VDR fixés sur des motifs DR3 (Carlberg et al., 1993).

La vitamine D3 a un effet singulier sur la fixation de VDR sur le motif DR3: alors qu'en absence d'hormone, VDR se fixe sur ce motif sous forme d'homodimère, la pré-incubation du récepteur avec l'hormone a deux effets principaux:

- elle déstabilise l'interaction de l'homodimère avec ce motif.
- elle empêche l'homodimérisation du récepteur déjà fixé sur son site en monomère.

En conséquence, la vitamine D3 semble favoriser la fixation monomérique de son récepteur sur le motif DR3. Cet effet, en apparence paradoxal, a un effet connexe: elle engendre l'apparition d'un "réservoir" de récepteurs monomériques, disponibles pour la formation d'hétérodimères avec RXR, hétérodimères qui à leur tour pourront se fixer et transactiver depuis les motifs DR3. Si l'on admet que l'hormone n'a pas d'effet déstabilisateur sur l'interaction entre l'homodimère VDR et les motifs DR6 (comme celui du gène de l'ostéocalcine), la vitamine D3 pourrait avoir un effet radicalement différent dépendant de l'élément de réponse et de la présence de RXR. Ceci est illustré dans la **figure 14**.

- Sur un motif DR6, la fixation de l'hormone par l'homodimère VDR/VDR ne déstabilise pas le complexe et induit l'activation transcriptionnelle (**A**).
- Sur un motif DR3 comme celui du gène de l'ostéopontine, la fixation de l'hormone déstabilise l'interaction de l'homodimère avec l'ADN et défavorise l'homodimérisation. L'activation transcriptionnelle est impossible (**B**). Si RXR est exprimé, la formation de l'hétérodimère et son interaction avec le motif DR3 se traduit par l'activation transcriptionnelle (**C**).

Ce modèle illustre l'un des mécanismes essentiels de la diversification de la réponse hormonale et met en lumière le fait que **le ligand, en conjonction avec d'autres éléments**

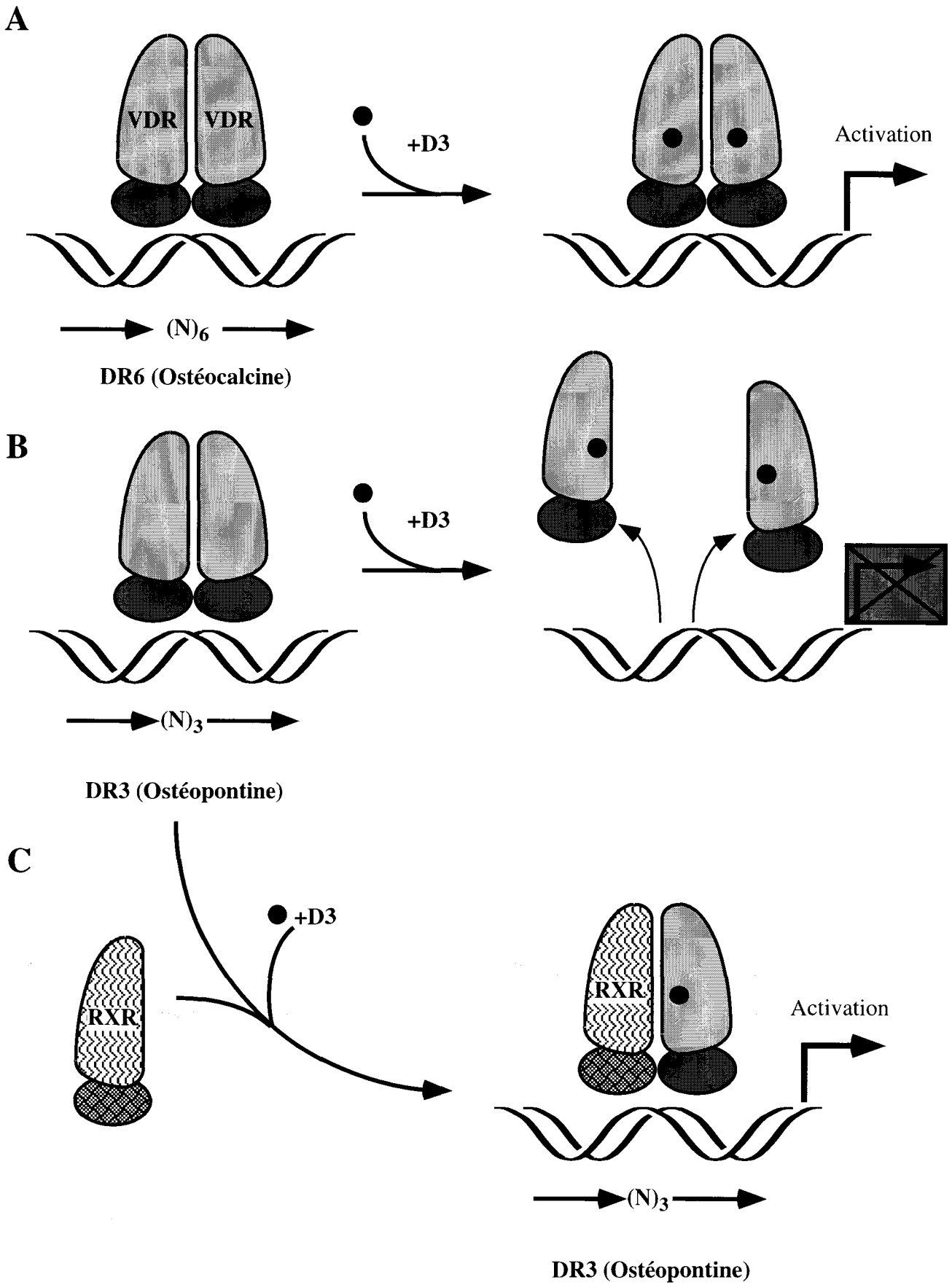


Fig.14: Effet différentiel de la vitamine D3 sur les gènes cibles de VDR en fonction de l'élément de réponse et de la présence de RXR.

(comme la présence d'un partenaire ou la nature du l'élément de réponse) **permet l'activation sélective de certains gènes cibles.**

Ce modèle pourrait être assez général pour les récepteurs qui forment des hétérodimères avec RXR. Des résultats similaires ont d'ailleurs été obtenus avec le récepteur aux hormones thyroïdiennes (Miyamoto et al., 1993). Dans ce cas pourtant, l'effet du ligand sur la déstabilisation du complexe homodimère/ADN semble être spécifique non seulement du type de motif (DR4 versus TREpal) mais aussi de la séquence du site (site rME-TRE ou rGH-TRE).

3.3 Ligand et conformation.

Nous avons vu jusqu'ici deux niveaux de régulation par l'hormone, l'un dépendant du relarguage de protéines chaperonnes inhibitrices (comme ydj1, voir §2.3), l'autre reposant sur l'altération des propriétés de fixation à l'ADN. Ces mécanismes reposent tous deux sur un effet présumé de l'hormone: l'induction de changements de conformation du récepteur. Qu'en est-il réellement?

L'étude de ces changements de conformation a principalement été abordée par la technique de digestion modérée par protéases dont le principe est que l'interaction de l'hormone avec le récepteur entraîne l'apparition d'une structure moins exposée, donc résistante à la digestion enzymatique.

Valcárcel et coll. (Valcarcel et al., 1994) ont ainsi montré que l'incubation d'hétérodimères RXR/RAR (produits en cellules eucaryotes) avec l'un des deux isomères de l'acide rétinoïque (cis-RA ou t-RA) conduit à l'apparition d'un peptide protégé dérivé de RAR. Ces résultats ont dans l'ensemble été reproduits par Leng et coll., qui ont étudié l'effet de t-RA sur les monomères RAR (Leng et al., 1995). Cependant, alors que les résultats de Valcárcel indiquent que la fixation du ligand par l'hétérodimère RXR/RAR ne fait qu'accroître le phénomène de protection de RAR déjà observé en l'absence de tout ligand, l'effet du ligand sur le monomère RAR est de type tout-ou-rien. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la divergence entre ces résultats:

- en raison du mode de production (en cellule eucaryotes) les hétérodimères RXR/RAR utilisés dans l'étude de Valcárcel sont contaminés par des traces de ligand.
- l'interaction avec RXR induit une modification allostérique de RAR qui le conduit à adopter une conformation mimant partiellement la fixation du ligand. Nous parlerons ultérieurement de ce type d'effet allostérique (voir §5).

La fixation du ligand induit donc effectivement une modification de la conformation du récepteur.

Nous verrons ultérieurement que les changements de conformation induits par l'hormone sont assez subtils, et peuvent influencer l'interaction d'un récepteur nucléaire avec ses différents co-facteurs.

4. Structure tridimensionnelle du domaine E.

Par convention, nous appellerons **apo-récepteur** le récepteur non associé à l'hormone et **holo-récepteur** le récepteur complexé à l'hormone.

4.1 Structure primaire et architecture générale.

Le pourcentage d'identité de séquence dans le domaine E est assez élevé entre les membres d'une même sous-famille comme RAR α 1, RAR β 2 ou RAR γ 1, mais est très divergente entre les différentes sous-familles de récepteurs, comme TR α 1 et PPAR γ 2 (Laudet et al., 1992).

Trois structures tridimensionnelles ont été publiées à ce jour: la structure de l'apo-RXR α (sans ligand), et celles de RAR γ et TR α 1 en présence de leur ligand respectif (Bourguet et al., 1995; Renaud et al., 1995; Wagner et al., 1995).

L'organisation générale de ces trois protéines est similaire. L'architecture de base est constituée par 11 ou 12 hélices alpha, reliées par des boucles, et 2 ou 4 bêta hairpin (pour RXR et RAR d'une part, et pour T₃R d'autre part, **Fig.15**). Ces différents motifs structuraux s'organisent selon un modèle d'empilement d'hélices alpha anti-parallèles (antiparallel-alpha-helical sandwich en anglais) assez compact: les hélices H4, H5, H6, H8 et H9 empilées les unes sur les autres, sont enserrées entre, d'un côté les hélices H1 et H3, et de l'autre les hélices H7, H10 et H11 (**Fig.16**).

En dépit de la faible homologie dans leur séquence primaire, un récent alignement des séquences de différents domaine E, a permis d'identifier plusieurs motifs globalement conservés, répartis essentiellement dans les hélices H1, H3, H4, H5, H8, H9 et les boucles 3-4 et 8-9. Ces motifs contiennent plusieurs résidus hautement conservés, qui par un réseau complexe d'interactions hydrophobes assurent la cohésion du domaine (Wurtz et al., 1996). Ces résidus semblent importants à différents niveaux, soit parce qu'ils assurent la cohésion du domaine, soit parce qu'ils déterminent la structure d'un motif, soit enfin parce qu'ils sont impliqués directement dans la fixation de l'hormone.

Un seul motif s'individualise de la structure globulaire du domaine: c'est l'hélice 12, dont plusieurs résidus sont très conservés entre tous les récepteurs (**Fig.17**). Notons que cette

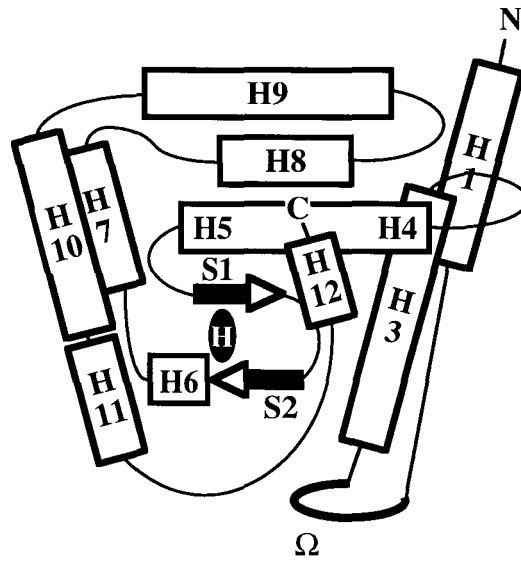


Fig.15: Motifs structuraux du domaine E de holo-RAR γ . Les hélices sont indiquées par H suivi de leur n $^{\circ}$, S1 et S2 sont les feuillets bêta.

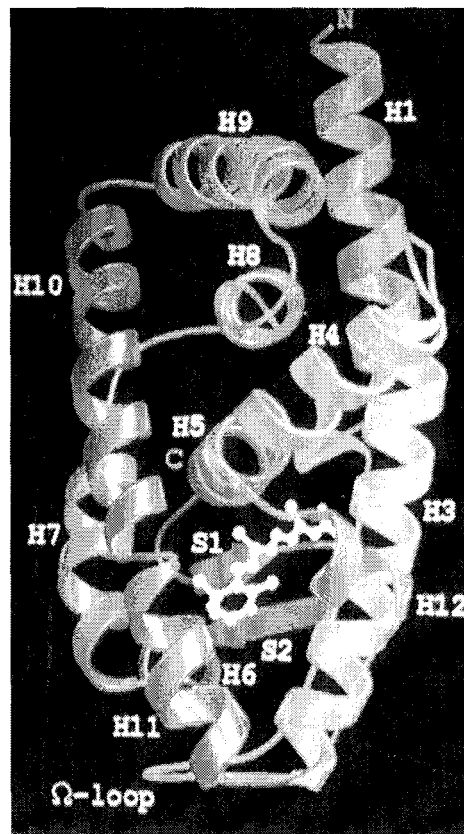


Fig.16: Structure tridimensionnelle du domaine E de RAR γ . Reproduit avec l'autorisation de D. Moras

hélice, qui correspond au domaine d'activation transcriptionnel AF2 { voir chapitre **III**, §1.2, (Danielian et al., 1992; Durand et al., 1994)}, est le seul motif du domaine E qui soit interchangeable entre les différentes classes de récepteurs (Durand et al., 1994).

4.2 Fixation du ligand et transconformation.

Les ligands des récepteurs nucléaires étant de petites molécules hydrophobes, il est logique que le domaine permettant leur fixation soit constitué par des résidus hydrophobes eux aussi. Ces résidus (24 au total pour RAR γ), se répartissent tout au long du domaine E (à l'exception peut-être de l'hélice n°12), et, rassemblés au coeur du domaine, constituent la poche de fixation du ligand (Wurtz et al., 1996). Nous n'énumérerons pas ici les très nombreuses interactions établies entre ces résidus et le ligand mais nous insisterons sur le fait que **ces interactions sont** à la fois très **spécifiques** mais restent toutefois **adaptables**. Cette adaptabilité est notamment illustrée par la modélisation comparée de la fixation de t-RA et 9cis-RA par le domaine E de RAR γ (Renaud et al., 1995).

La comparaison du domaine E de RXR α non lié à l'hormone et du domaine E de RAR γ complexé à t-RA a permis de relever plusieurs modifications susceptibles d'intervenir suite à la fixation du ligand (Renaud et al., 1995), et à conduit les auteurs à proposer le modèle de la "trappe à souris". Ce modèle repose sur trois événements majeurs (**Fig.17**):

- l'hélice H11 se place dans le prolongement de H10.
- l'hélice H12, grâce à un pont salin établi entre son résidus Glu(414) et le résidus Lys(264) de H4, vient fermer la cavité hydrophobe.
- la cavité où se loge le ligand est refermée par le repliement de la boucle oméga (Ω).

L'un des événements les plus importants du point de vue fonctionnel, est sans aucun doute le repliement de l'hélice H12, hélice qui comporte le domaine d'activation transcriptionnel dépendant du ligand. Ce repliement permettrait donc de révéler une interface nécessaire à l'interaction entre H12 et différents co-activateurs (voir chapitre **III** §2).

4.3 Bases structurales de l'homodimérisation.

Curieusement, la structure cristallographique de RXR α révèle qu'environ 50% des molécules du cristal se présentent sous forme d'homodimère, ce qui n'est le cas ni pour RAR γ , ni pour TR α 1, cristallisés en présence d'hormone.

Les données cristallographiques indiquent que l'interface d'homodimérisation de RXR est constituée essentiellement par l'hélice 10 de RXR (Bourguet et al., 1995). L'hélice H10 est partiellement colinéaire à un motif appelé heptade n°9, de longue date identifiée comme un

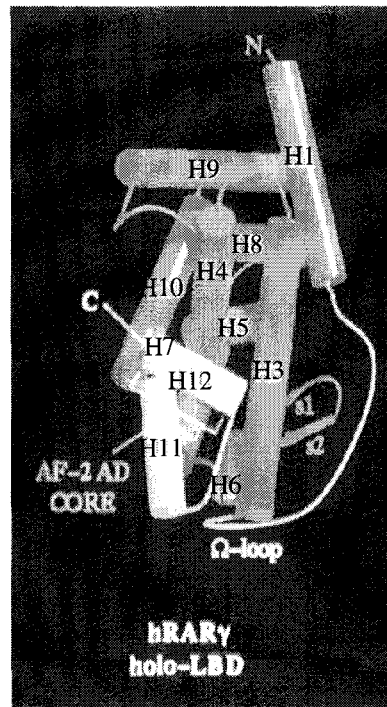
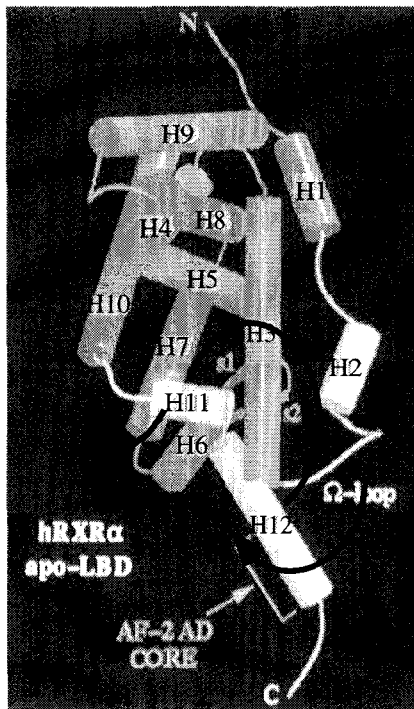


Fig.17: Illustration du modèle "trappe à souris". Paneau de gauche, structure tridimensionnelle du domaine E de RXR en l'absence de ligand. Paneau de droite, structure tridimensionnelle du domaine E de RAR complexé à son ligand. Les flèches indiquent les diverses modifications de structure survenant suite à la fixation du ligand. Reproduit avec la permission de D. Moras.

motif nécessaire à la dimérisation des récepteurs (Forman et Samuels, 1990). Le fait que cette interface représente 10% de la surface externe de RXR α suggère que cette interaction confère à l'hétérodimère une très grande stabilité (Bourguet et al., 1995).

4.4 Conclusions.

Le domaine E est un domaine multifonctionnel asservi au ligand: il regroupe les fonctions de fixation du ligand, de dimérisation et de transactivation. L'interdépendance de toutes ces fonctions est illustrée par l'effet d'une mutation ponctuelle introduite dans l'hélice H10 affectant le résidu Leu(430). Sa mutation en résidu Phe conduit à un phénotype singulier et complexe (Zhang et al., 1994):

- cette mutation affecte indirectement la fixation à l'ADN. En effet, contrairement à la protéine RXR sauvage, la fixation de l'hétérodimère RXR^{mut}/RXR^{mut} sur un TRE_{pal} est indépendante du ligand (voir §3.1).
- cette mutation affecte aussi les propriétés de transactivation, ce mutant se révélant incapable de transactiver depuis un motif DR1 (cible des homodimères RXR/RXR).
- pourtant, cette mutation n'affecte pas la capacité de RXR à potentialiser la transactivation par le récepteur aux hormones thyroïdiennes depuis un DR4.

Cela illustre le fait que la structure du domaine E est un tout et que des altérations minimales dans cette structure peuvent avoir des effets importants sur le reste du domaine. Nous verrons ultérieurement que cette "sensibilité" est à la base d'un phénomène crucial, l'**allostérie** (voir le chapitre IV).

Enfin, terminons ce chapitre par trois petites remarques:

- nous avons vu, tout au moins pour les récepteurs aux stéroïdes et notamment GR, que la fonctionnalité du récepteur dépend de son interaction avec un complexe comprenant des protéines chaperonnes comme hsp90 (voir §2). Existerait-il des facteurs similaires pour des récepteurs comme RAR γ et T₃R?
- basés sur les résultats de structures tridimensionnelles comparées, les auteurs nous proposent un scénario complexe pour le ligand: l'effet "trappe à souris". Il semble surprenant que de si profonds changements structuraux résultent de la seule interaction du ligand avec sa poche hydrophobe. On pourrait imaginer que cette restructuration est en partie aidée par une protéine de type chaperonne, qui reste toutefois à identifier.
- enfin, nous avons vu que le ligand est "bloqué" à l'intérieur de sa cavité suite au repliement de l'hélice n°12. Cette structure fermée est-elle figée une fois le ligand fixé - et dans ce cas comment désactive-t-on le récepteur - ou est-ce une structure dynamique?

Nous proposerons dans le chapitre III §3.3 quelques hypothèses qui pourraient apporter un début de réponse à certaines de ces questions.

III. La régulation transcriptionnelle.

1. Introduction.

1.1 Mécanismes de bases de la régulation transcriptionnelle.

Avant de commencer à étudier comment les récepteurs nucléaires induisent l'expression de leurs gènes cibles, il sera utile de revoir rapidement quelques bases générales de la régulation transcriptionnelle.

L'activation transcriptionnelle résulte principalement du recrutement de l'ARN polymérase II (pour les ARN messagers) à proximité du site d'initiation de la transcription d'un gène (**Fig.18A**). C'est, dans une large mesure cet événement, le recrutement, qui est la cible des régulations par les facteurs de transcription {voir la revue de (Ptashne et Gann, 1997)}.

L'ARN polymérase est constituée d'environ douze sous-unités. Parmi celles-ci, on distinguera des sous-unités générales - comme la polymérase elle-même, TFIIB, TFIIE ou encore TFIIF - de la sous-unité TFIID. Cette sous-unité est constituée de TBP (TATA-binding protein, protéine de fixation à la boîte TATA) et de nombreuses protéines associées, les TAFIIs {TBP associated factors **Fig.18B**, voir (Tansey et Herr, 1997)}. De manière simpliste, TFIID, grâce à TBP, se fixe à la boîte TATA, et recrute, par l'intermédiaire de différents TAFIIs, et de TFIIB, l'ARN polymérase II {voir la revue de (Roeder, 1996)}.

Il y a donc a priori plusieurs moyens de recruter l'ARN polymérase:

- en recrutant directement l'une des sous-unités générales, TFIIB étant parmi celles-ci l'une des cibles préférées (Ptashne et Gann, 1997).
- en recrutant TFIID, soit par l'intermédiaire des TAFIIs, soit en contactant directement TBP (Tansey et Herr, 1997).

Ce modèle d'activation transcriptionnelle considère implicitement que l'ADN est prêt à être transcrit. Or, l'ADN est organisé sous forme de nucléosomes (environ 140bp d'ADN enroulé autour d'un octamère constitué des histones H2A, H2B, H3 et H4), structure globalement réfractaire à la fixation des facteurs de transcription et à la progression de l'ARN polymérase {revue dans (Felsenfeld, 1996)}. La déstabilisation de cette structure nucléosomale répressive constitue donc, dans la plupart des cas, un préalable à l'activation transcriptionnelle.

Nous verrons dans la dernière partie de ce chapitre que la modification de la structure nucléosomale de l'ADN est aussi l'un des principaux mécanismes par lequel certains récepteurs nucléaires répriment la transcription en absence de leur hormone.

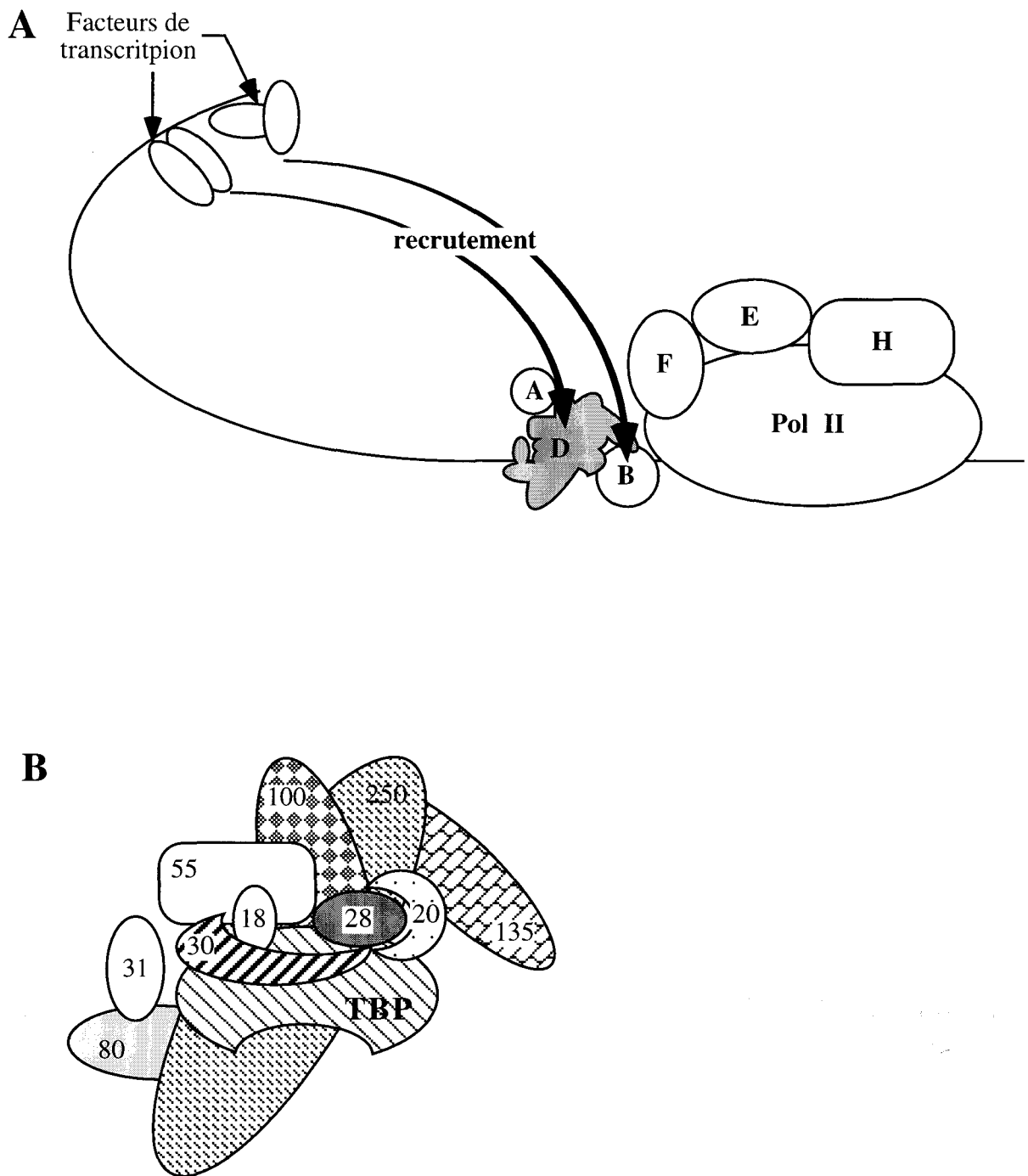


Fig.18. L'initiation de la transcription peut résulter du recrutement de l'ARN polymérase . A: Le complexe TFIID est constitué de TBP et de différents TAFs, ici identifiés par leur masse moléculaire. **B:** Le recrutement de la machinerie de transcription peut se faire, entre autre, par l'intermédiaire de TFIID (TBP et TAFIs), ou de TFIIB.

1.2 Les domaines activateurs des récepteurs nucléaires.

La fonction de transactivation est portée chez les récepteurs nucléaires par deux domaines distincts, le domaine A/B et le domaine E, ce dernier étant aussi responsable de la fixation de l'hormone. Ces deux domaines comprennent chacun une ou plusieurs région(s) transactivatrice(s), les plus étudiées étant AF1 dans la région A/B et AF2 dans la grande région E:

- le domaine AF1 {situé dans la partie amino-terminale (A/B)}, qui possède une activité transcriptionnelle constitutive (indépendante du ligand), a initialement été identifié chez les récepteurs aux stéroïdes {revue dans (Gronemeyer, 1991)}.
- le domaine AF2, situé à l'extrémité carboxy-terminale de la région E, est un médiateur de l'activation transcriptionnelle dépendante du ligand {voir par exemple (Danielian et al., 1992; Nagpal et al., 1992; Nagpal et al., 1993)}.

Ces deux domaines sont structurellement et fonctionnellement très différents: plusieurs résultats, principalement basés sur des expériences d'interférence transcriptionnelle ("squenching" en anglais), suggèrent que les domaines AF1 et AF2 activent la transcription par des voies différentes (Tora et al., 1989; Tasset et al., 1990; Nagpal et al., 1992).

Nous nous intéresseront plus particulièrement au mécanisme d'action de AF2, qui d'une part, est celui pour lequel nous disposons du plus grand nombre d'informations, et d'autre part, est celui dont l'activité, modulée par le ligand, constitue l'un des aspects les plus caractéristiques de la régulation par les récepteurs nucléaires d'hormones.

1.3 AF2, un domaine sous influence.

1.3.1 Identification fonctionnelle de AF2.

La première identification du domaine d'activation porté par le domaine E peut être attribuée à Zenke et coll. qui ont étudié les différences d'activité transcriptionnelle entre le récepteur aux hormones thyroïdiennes "naturel" (c-erbA1 ou T₃R) et sa version altérée, l'oncogène v-erbA (Zenke et al., 1990). Des expériences de chimérisation entre ces deux versions du récepteur à la T₃ montrent que la perte de la fonction de transactivation ligand-dépendante de v-erbA résulte de la délétion d'une courte région de 9 AA dans sa partie amino-terminale (**Fig.19A**).

Barettino et coll. ont ensuite identifié un domaine de 35 amino-acides capable de conférer une activité transactivatrice au domaine de fixation à l'ADN de Gal4 (Barettino et al., 1994). Cependant, l'activité transcriptionnelle de cette chimère est constitutive et échappe à la régulation par les hormones.

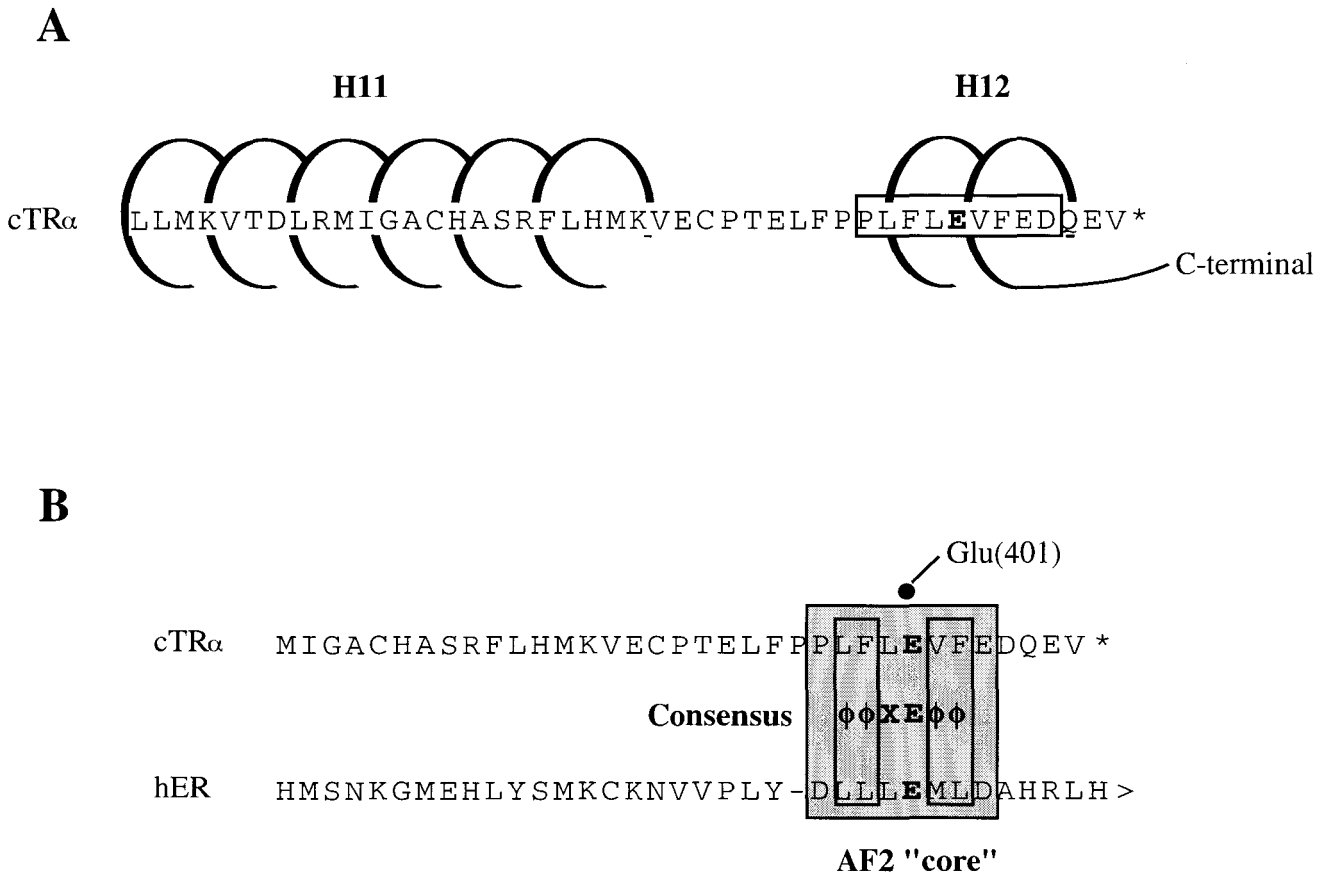


Fig.19: Structure du domaine transactivateur AF2. **A:** Séquence carboxy-terminale du récepteur T3R de poulet. La position des hélices n°11 et n°12 est indiquée. La partie encadrée correspond à la séquence délétée dans v-erbA. **B:** Comparaison de la partie C-terminale de cT3R et de hER. Les résidus conservés sont encadrés. Le cadre grisé correspond au motif AF2. * indique la fin de la séquence codante, > sa continuation.

Enfin, des études ultérieures ont montré que ce domaine de 35 AA contient un motif peptidique très conservé (appelé AF2), nécessaire à la fonction de transactivation (Danielian et al., 1992; Baretino et al., 1994; Durand et al., 1994). De plus, ce motif AF2 est parfaitement interchangeable entre RAR, RXR et T₃R et n'affecte pas la réponse à leur propre ligand, ce qui suggère: (i) que c'est un domaine relativement indépendant du reste du domaine E et (ii) qu'il a un mode d'action similaire entre ces récepteurs (Durand et al., 1994).

Le domaine AF2 est donc nécessaire à la transactivation ligand-dépendante des récepteurs nucléaires; il est suffisant pour activer la transcription, mais n'est pas suffisant pour conférer la régulation par un ligand.

1.3.2 Structure du motif AF2.

D'un point de vue structural, à l'exception de quelques récepteurs dont nous parlerons dans la section résultats, l'alignement du domaine AF2 de nombreux récepteurs nucléaires fait ressortir une séquence peptidique très conservée dont le consensus est: $\Phi\Phi X E\Phi\Phi$, où Φ représente un résidu hydrophobe, E un résidu Glu et X un résidu quelconque (**Fig.19B**, (Baretino et al., 1994)). Les études cristallographiques de RXR, RAR et T₃R ont montré que le domaine AF2 correspond à l'hélice n°12, motif structural dont nous avons souligné l'indépendance par rapport au reste du domaine E {(Bourguet et al., 1995; Renaud et al., 1995; Wagner et al., 1995) voir chapitre II§4.1}.

Au delà de ces homologies de structure, le fonctionnement du domaine AF2 pourrait être plus varié qu'on ne l'attend: ainsi, alors que ER, et T₃R interfèrent mutuellement au niveau transcriptionnel (ce qui suggère qu'ils utilisent certains coactivateurs communs), les résidus nécessaires à la transactivation diffèrent entre ces deux récepteurs: en effet, la mutation du résidu Glu(401) en Gln abolit complètement la fonction de transactivation du récepteur T₃R mais n'affecte que modérément la capacité de ER à transactiver (Danielian et al., 1992; Baretino et al., 1994).

Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces résultats: (i) soit ER et T₃R contactent directement le même cofacteur, mais que ces interactions font appel à deux surfaces de AF2 sensiblement distinctes (**Fig.20A**), soit plus vraisemblablement T₃R et ER partagent un (ou plusieurs) cofacteur commun, ce que révèlent les expériences d'interférence transcriptionnelle, mais ne contactent directement que des cofacteurs qui leur sont spécifiques, révélés dans les expériences de mutagenèse (**Fig.20B**).

Ce schéma se complique encore un peu plus si l'on considère cette fois l'activité transcriptionnelle d'un même récepteur dans deux contextes différents: ainsi, la mutation du résidu Phe(403) en Ala abolit la transactivation du récepteur T₃R depuis un motif TREpal,

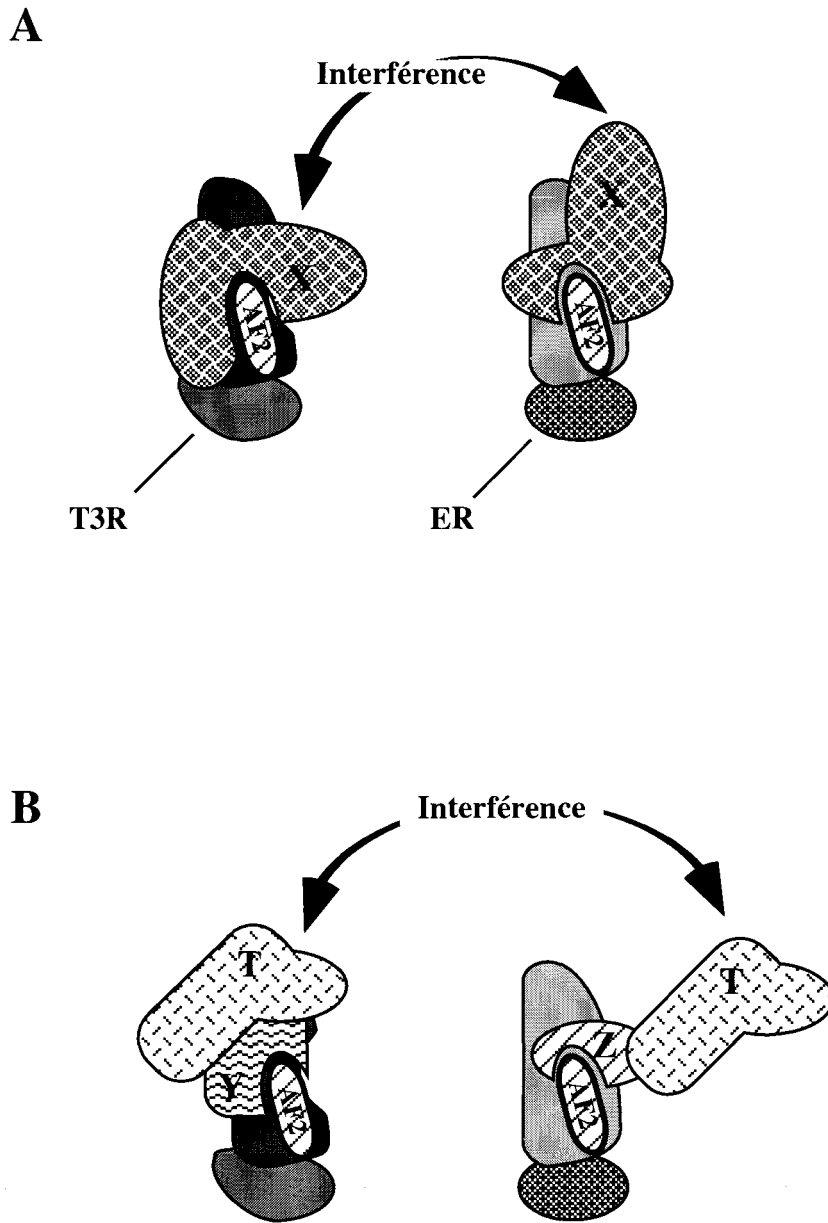


Fig.20: Modes d'interférence transcriptionnelle entre T3R et ER. **A:** T3R et ER contactent le même cofacteur (X) grâce à des interfaces différentes. **B:** T3R et ER partagent un cofacteur commun (T), mais le recrutent via deux intermédiaires différents, Y et Z respectivement.

mais n'affecte que modérément la transactivation depuis le motif situé dans le promoteur MoMLV (Barettino et al., 1994). Deux hypothèses peuvent être proposées pour rendre compte de ces résultats:

- T₃R transactive à partir de ces deux éléments de réponse *via* des cofacteurs distincts dont l'interaction avec AF2 repose sur des AA différents.
- T₃R, en fonction de l'élément de réponse, utilise deux interfaces d'interactions différentes pour un même cofacteur.

On peut aussi imaginer que cette variabilité dans le "choix" du cofacteur ou de l'interface d'interaction, résulte plutôt d'une opportunité, dictée notamment par "l'environnement" du récepteur (partenaires de dimérisation ou facteurs de transcription fixés à proximité, par exemple).

AF2 est donc une interface d'interaction très conservée entre récepteurs nucléaires, qui pourrait cependant être **versatile dans son mode d'interaction** avec les cofacteurs éventuels.

On verra que cette diversité dans les modes d'activation transcriptionnelle se reflète dans la diversité des cofacteurs identifiés à ce jour pour les récepteurs nucléaires. Nous distinguerons ici deux groupes de cofacteurs:

- les cofacteurs appartenant au complexe de pré-initiation de la transcription, membres de l'holoenzyme, ou de TFIID.
- d'autres cofacteurs externes à cet ensemble.

2. Médiateurs de l'activation transcriptionnelle.

De nombreux facteurs activent la transcription grâce à un contact direct avec un composant de la machinerie de transcription, les constituants de TFIID (TBP et TAFIIs) étant les cibles préférentielles (Choy et Green, 1993). L'étude de l'interaction des récepteurs nucléaires avec ces facteurs de transcription généraux fut assez fructueuse {(Baniahmad et al., 1993; Fondell et al., 1993; Jacq et al., 1994; Schulman et al., 1995; May et al., 1996); pour n'en citer que quelques uns}. Nous limiterons ici notre coup d'oeil au cas de RXR.

2.1 Les composants de la machinerie transcriptionnelle comme cibles de RXR.

2.1.1 Interaction RXR/TBP.

La capacité du domaine AF2 de RXR à transactiver seul en cellules mammifères et en levure suggérait que cet effet transactivateur impliquait un facteur conservé entre ces deux organismes, comme TBP par exemple (Schulman et al., 1995).

Cette hypothèse s'est révélée juste: le domaine AF2 de RXR est capable d'interagir directement avec TBP, à la fois dans un test d'interaction en levure et dans un test *in vitro* utilisant des protéines partiellement purifiées. Cette interaction est fortement corrélée à sa capacité à activer la transcription puisque l'activation est abolie par des mutations affectant quantitativement la formation du complexe AF2/TBP *in vitro* (Schulman et al., 1995).

Dans le contexte du domaine E entier, la mutation des deux résidus Glu(453) et Glu(456), réduit, sans complètement abolir, l'interaction *in vitro* du domaine E et de TBP. Ces deux mêmes mutations, introduites dans le contexte du domaine AF2 isolé, proscrivent totalement cette interaction. Ces résultats suggèrent que l'interaction entre le domaine transactivateur entier (domaine E) et TBP fait intervenir d'autres surfaces de contact en dehors du seul domaine AF2.

Si, grâce à son interaction avec RXR, TBP souscrit à l'une des caractéristiques attendue d'un coactivateur transcriptionnel, une caractéristique cruciale lui fait défaut: l'interaction domaine E/TBP n'est que modérément stimulée *in vitro* par le ligand (Schulman et al., 1995). Ce résultat suggère que si l'activation transcriptionnelle fait effectivement intervenir TPB, un autre facteur est requis pour rendre compte de la stimulation par le ligand.

Restait donc à trouver ce facteur...hTAF_{II}28 fut un candidat prometteur.

2.1.2 Interaction RXR/hTAF_{II}28.

Le domaine AF2 de RXR isolé est incapable d'activer la transcription en cellules Cos depuis un promoteur minimal (May et al., 1996). Les résultats de May et coll. montrent que cette fonction transactivatrice est restaurée, de manière dépendante du ligand, par l'expression exogène de hTAF_{II}28, un composant de TFIID qui n'est pas exprimé dans cette lignée (May et al., 1996).

Notons cependant que TAF_{II}28 affecte différemment la fonction transactivatrice des récepteurs nucléaires: par exemple, sa surexpression ne stimule que faiblement l'activité transcriptionnelle médiée par le domaine AF2 de RAR. De plus, la dépendance de RXR vis-à-vis de ce facteur varie en fonction de la lignée cellulaire: son activité transcriptionnelle n'est en effet pas stimulée par TAF_{II}28 dans des cellules HeLa (May et al., 1996).

Ces résultats indiquent donc que TAF_{II}28 n'est pas un coactivateur "général" des récepteurs nucléaires, mais serait plutôt un coactivateur facultatif, requis seulement dans certaines configurations de promoteur ou dans certaines cellules.

Enfin, s'il est avéré que TAF_{II}28 est nécessaire à la transactivation par RXR, aucune interaction directe n'a été détectée entre le domaine AF2 et ce cofacteur. Ainsi, aucun des deux cofacteurs (TBP ou TAF_{II}28) n'explique à lui seul les deux caractéristiques principales de l'activation hormone-dépendante médiée par les récepteurs nucléaires:

- TAF_{II}28 n'interagit pas directement avec AF2.
- l'interaction AF2/TBP n'est pas dépendante du ligand.

Les efforts ultérieurs ont donc été consacrés à l'identification de cofacteurs possédant ces deux caractéristiques.

2.2 Autres cofacteurs.

Comme on l'a indiqué précédemment, la machinerie de transcription peut être recrutée de manière indirecte, par des cofacteurs intermédiaires ("bridging factors"). De tels cofacteurs ont été recherchés et sélectionnés sur la base de deux caractéristiques principales:

- la capacité à interagir d'une manière dépendante du ligand avec la région des récepteurs nucléaires contenant le domaine AF2.
- avoir eux même la capacité à induire la transcription lorsqu'ils sont artificiellement recrutés à proximité d'un site d'initiation.

On s'apercevra au fil des exemples présentés ci-dessous que peu de cofacteurs possèdent ces deux caractéristiques. Par prudence, nous appellerons donc ces protéines "cofacteurs" et réserverons le terme de coactivateurs pour celles dont l'activité transcriptionnelle aura été démontrée.

2.2.1 Structure des cofacteurs.

a) ERAP160 (Estrogen-Receptor Activated Protein).

Cette protéine fut identifiée par criblage avec le domaine E du récepteur ER (Halachmi et al., 1994). Comme attendu, cette protéine interagit avec le domaine E de manière dépendante du ligand et requiert un domaine AF2 intact pour interagir. Parallèlement, un ligand antagoniste tel que l'hydroxy-tamoxifen (4-OHT) n'est pas capable d'induire l'association de ERAP160 avec le récepteur { **Fig.21**, (Halachmi et al., 1994) }.

b) TIF2 et Src-1 (Steroid receptor co-activator)

Ces deux protéines ont été respectivement identifiées en raison de leur interaction avec le domaine E de RAR et celui de ER (Onate et al., 1995; Voegel et al., 1996). Plusieurs variants de Src-1 furent ensuite mis en évidence (Kamei et al., 1996). Ces protéines apparentées présentent plusieurs régions riches en couple de résidus Ser/Thr ou riche en résidus Gln, ainsi qu'un motif de type bHLH/PAS, situé à l'extrémité amino-terminale (Kamei et al., 1996).

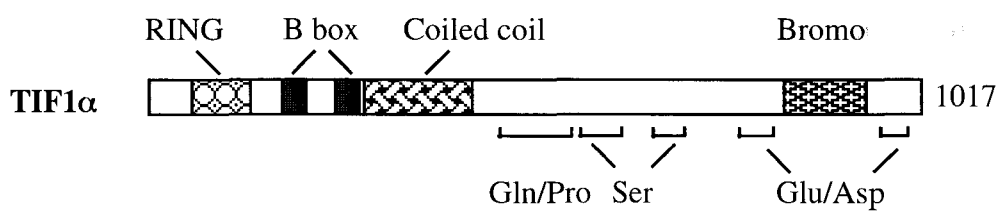
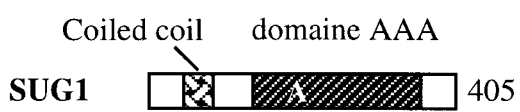
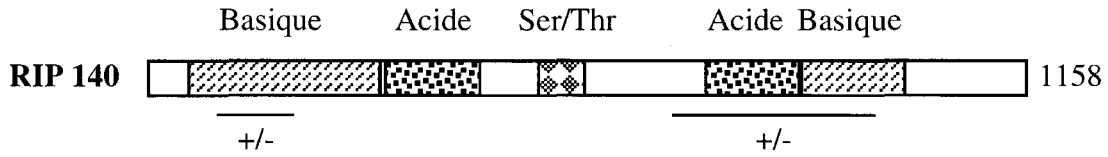
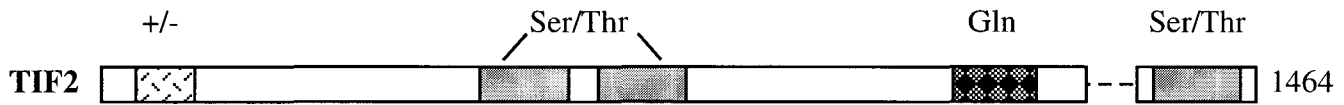


Fig.21: Structure de quelques cofacteurs. +/-: domaine chargé; Ser/Thr, Gln, Basique, Acides, Gln/Pro, Glu/Asp: Amino-acides majoritaires; A: domaine de fixation de l'ATP; RING: RING finger; Bromo: Bromodomain.

c) RIP140 (Receptor Interacting Proteins).

Suivant une stratégie similaire, Cavailles et coll. ont isolés plusieurs protéines (de masse 140, 160 et 80kd) interagissant avec ER en présence de ligand (Cavailles et al., 1994; Joyeux et al., 1997). RIP140 est une protéine de 1158 amino-acides, ne présentant pas de motifs structuraux particuliers en dehors de régions chargées riches en résidus acides et basiques et d'une région riche en résidus Ser { **Fig.21**, (Cavailles et al., 1995) }.

d) Trip1/SUG1 (thyroid-hormone receptor interacting protein).

Cette protéine fut isolée grâce à un criblage par double-hybride en levure avec le domaine E du récepteur T₃Rβ1 ou celui de RARα (Lee et al., 1995; vom Baur et al., 1996) respectivement). Trip1 est l'homologue d'un gène de levure nommé SUG1 dont l'inactivation complémente une version mutée du gène de l'activateur Gal4 (Swaffield et al., 1992). SUG1 comporte deux motifs remarquables { **Fig.21** }:

- la partie amino-terminale comprend un court domaine "Coiled-coil", probablement impliqué dans les interactions protéine/protéine.
- la partie carboxy-terminale est constituée par un grand domaine appelé AAA (pour ATPases associated with a variety of cellular activities) très conservé entre les protéines de levure et de souris.

e) SPT6.

SPT6 n'a pas été directement isolé par criblage "en aveugle" mais fut initialement caractérisé comme suppresseur de mutations dans les protéines SWI/SNF chez la levure (Neigeborn et al., 1986). Le fait que les protéines SWI/SNF sont requises pour la transcription par les récepteurs nucléaires (Yoshinaga et al., 1992) a suscité l'étude du rôle de SPT6 dans la transcription par le récepteur ER (Baniahmad et al., 1995b).

f) TIF1.

TIF1 (Transcriptional intermediary factor) fut isolé par criblage génétique en levure comme une protéine interagissant de manière ligand-dépendante avec les domaines D et E de RXR (Le Douarin et al., 1995). TIF1, plus tard rebaptisé TIF1alpha, est une protéine de 1017 amino-acides contenant plusieurs motifs structuraux (**Fig.21**):

- la partie amino-terminale contient un domaine "RING finger", deux motifs de structure similaire à des doigts de zinc (B-Box) et un domaine "Coiled coil". L'ensemble de cette région ressemble d'un point de vue structural à la protéine PML (voir chapitre V §2.2.1).

- la partie carboxy-terminale contient un domaine riche en couples de résidus Cys/His, un "bromodomain" - motif structural très conservé dans de nombreuses protéines (et notamment des cofacteurs tel que p300/CBP ou hBRM) - ainsi que plusieurs petites régions riches en couples de résidus Gln/Pro ou en résidus acides Glu/Asp caractéristiques des activateurs transcriptionnels (Tjian et Maniatis, 1994).

Bien qu'il ait été isolé par un criblage destiné à l'identification des coactivateurs, nous verrons que TIFalpha est vraisemblablement impliqué dans des phénomènes de répression de la transcription (voir §4.6).

2.2.2 Motifs d'interaction.

La plupart des criblages destinés à l'identification des cofacteurs ont utilisé le domaine E entier comme "appât". Les différents travaux mentionnés ci-dessus ont montré que le motif AF2 est généralement nécessaire, parfois suffisant pour l'interaction avec les cofacteurs.

Pour RIP140, le domaine impliqué dans l'interaction avec ER est constitué de deux motifs d'interaction indépendants assez éloignés l'un de l'autre (L'Horset et al., 1996). Curieusement ces deux motifs ne partagent pas d'homologie de séquence évidente.

Dans le cas de TIF1alpha, la région impliquée dans l'interaction correspond aux 300 résidus de la partie C-terminale qui inclue les groupes de séquences riches en amino-acides Glu/Pro ou riches en résidus Ser, à l'exclusion du bromodomaine, et de la région riche en AA Cys/His (Le Douarin et al., 1995). Des études récentes ont permis de réduire cette région d'interaction à un motif d'une dizaine d'acides-amino. Cette courte séquence, appelée "boîte NR", contient quatre résidus Leu cruciaux, et est retrouvée dans la région de RIP140 impliquée dans l'interaction avec ER (Le Douarin et al., 1996).

2.3 Rôle du ligand dans l'interaction récepteur/cofacteur.

La caractéristique principale que l'on attend d'un cofacteur de récepteur nucléaire est qu'il interagisse avec celui-ci de manière dépendante d'un ligand. Pourtant, si l'effet stimulateur du ligand sur l'interaction récepteur/cofacteur est spécifique et n'est pas mimé par des antagonistes (Halachmi et al., 1994; Schulman et al., 1995), son rôle n'est pourtant pas du type "tout-ou-rien": dans presque tous les cas décrits (TBP, RIP140, SUG1...), cofacteurs et récepteurs interagissent faiblement en absence de ligand (Cavailles et al., 1994; Schulman et al., 1995).

Comment concilier l'existence de cette interaction entre le récepteur et le coactivateur en absence d'hormone, avec le fait que certains récepteurs répriment la transcription dans ces conditions (voir §4) ? Deux hypothèses peuvent être évoquées:

- cette interaction basale n'est observée qu'*in vitro* avec des protéines isolées et ne reflète pas la complexité de l'interaction *in vivo*. Nous verrons plus tard qu'en absence d'hormone, le domaine E de certains récepteurs est déjà impliqué dans une interaction avec d'autres protéines pouvant ainsi empêcher l'interaction basale avec les coactivateurs (voir §4.3).

- il est possible que cette interaction basale soit déstabilisée *in vivo*, par la fixation à l'ADN par exemple. L'effet de la fixation à l'ADN sur la dépendance d'une interaction vis-à-vis de l'hormone a déjà été documenté dans le cas de l'interaction de NCoR avec RAR (Kamei et al., 1996).

- enfin, il est possible que les cofacteurs ne soient pas constitutivement actifs mais qu'ils puissent être "activés" suite à l'interaction du récepteur avec l'hormone.

Outre la stimulation de l'interaction entre récepteur et cofacteur(s), le ligand pourrait avoir un rôle dans le "choix" du cofacteur: alors que l'interaction de RAR avec SUG1 est induite aussi bien par un agoniste synthétique que par tRA, l'interaction de RAR avec TIF1alpha n'est induite que par tRA. De subtiles différences de conformation du domaine E, induites par les différents ligands (ou par la séquence cible, voir chapitre IV §3), pourraient donc participer au "choix" du cofacteur.

2.4 Conclusion.

De ce rapide survol des éléments de bases de l'activation transcriptionnelle par les récepteurs, nous pourrions retenir:

- que AF2 est un motif structural nécessaire et suffisant à l'activation transcriptionnelle.
- que l'activité transcriptionnelle de AF2, en tant que domaine transactivateur isolé, peut être corrélée à son interaction avec divers cofacteurs, comme TBP par exemple.
- mais que la modulation de cette fonction activatrice par l'hormone repose sur l'ensemble du domaine E.

3. Hypothèses sur les mécanismes d'action des cofacteurs.

Nous avons vu dans l'introduction que l'activation transcriptionnelle repose sur un événement central: le recrutement de la machinerie de transcription. Pourtant, d'autres mécanismes moins connus jouent un rôle crucial à cette étape. Nous présenterons ici, grâce à quelques exemples choisis parmi les cofacteurs décrits précédemment, quels autres événements contemporains du recrutement de l'ARN polymérase pourraient être régulés par les récepteurs nucléaires.

3.1 Fixation à l'ADN nucléosomal.

Nous avons indiqué dans l'introduction que l'ADN sous forme nucléosomale est fortement réfractaire à la fixation des facteurs de transcription et à la progression de l'ARN polymérase {revue dans (Felsenfeld, 1996)}. Comment certains récepteurs nucléaires surmontent-ils cette barrière initiale?

3.1.1 Le complexe SWI/SNF.

Plusieurs expériences ont montré l'implication des membres de la famille SWI/SNF (et de ses homologues hBrm et BRG1) dans la transactivation par le récepteur GR chez la levure et chez les eucaryotes supérieurs (Yoshinaga et al., 1992; Muchardt et Yaniv, 1993; Muchardt et al., 1996). Le lien entre protéines SWI/SNF d'une part et structure chromatinienne d'autre part, repose sur deux observations {voir la revue de (Pazin et Kadonaga, 1997a)}.

- la plupart des gènes issus des criblages génétiques destinés à l'identification de suppresseur du phénotype mutant SWI/SNF, codent des composants de la chromatine tels que l'histone H3 { (Kruger et al., 1995), voir aussi la revue de (Kingston et al., 1996).
- l'inactivation de composants du complexe SWI/SNF en levure entraîne une réduction de l'expression de certains gènes, corrélée à l'altération de l'organisation nucléosomale de leur promoteur.

Pourtant, le complexe SWI/SNF ne semble pas altérer directement l'interaction entre ADN et nucléosome (comme le fait p300/CBP par exemple, voir §3.2.2): en fait ce complexe, par un mécanisme encore inconnu (impliquant entre autre une activité ADN-hélicase), potentialise la transcription en facilitant la fixation de certains facteurs de transcription à l'ADN nucléosomal (Cote et al., 1994).

La manière dont ce complexe est recruté par les facteurs de transcription reste toutefois mal comprise. Il a été suggéré que le récepteur GR pourrait directement recruter ce complexe grâce à l'interaction avec l'un de ses composants, SWI3 (Yoshinaga et al., 1992). Enfin, le complexe SWI/SNF pourrait aussi être recruté en même temps que le complexe d'initiation de la transcription auquel il semble associé (Wilson et al., 1996).

3.1.2 SPT6.

SPT6 fut identifié sur la base de sa capacité à compenser des mutations affectants les gènes SWI/SNF chez la levure (Winston et Carlson, 1992). C'est pour cette raison que Baniahmad et coll. se sont intéressés au rôle de SPT6 dans l'activation par le récepteur ER

(Baniahmad et al., 1995b). La surexpression de SPT6 potentialise effectivement la transactivation ligand-dépendante de ER en levure - et dans une moindre mesure en cellules mammifères - sans affecter l'activité constitutive médiée par son domaine AF1 (Baniahmad et al., 1995b).

Le fait que SPT6 puisse atténuer un phénotype mutant de SWI suggère qu'il joue un rôle au niveau de la structure nucléosomale de l'ADN. Cette hypothèse fut récemment étayée par la découverte d'une interaction, chez la levure, entre SPT6 et l'histone H3 (Bortvin et Winston, 1996). L'activité "assembleur de nucléosomes" de SPT6 décrite dans cet article est cependant peu compatible avec une fonction potentiatrice de la transcription. Le mécanisme d'action de ce cofacteur reste donc en grande partie énigmatique.

3.2 Recrutement de l'ARN polymérase: implication de TIF2, SRC-1 et p300/CBP

3.2.1 TIF2 et SRC-1: des coactivateurs presque parfaits...

TIF2 et SRC-1 possèdent plusieurs caractéristiques attendues pour des coactivateurs.

- TIF2 est l'un des seuls cofacteurs qui est capable d'activer la transcription lorsqu'il est recruté à proximité d'un promoteur minimal (Voegel et al., 1996).
- la surexpression de TIF2 et de SRC-1 en cellule eucaryote augmente la transactivation ligand-dépendante de différents récepteurs nucléaires (Onate et al., 1995; Voegel et al., 1996).
- la surexpression de SRC-1 annule les effets d'interférence entre PR et ER, indiquant que SRC-1 est l'un des cofacteurs limitants de l'activation transcriptionnelle (Onate et al., 1995).
- la surexpression de la partie carboxy-terminale de SRC-1 (celle qui interagit avec le domaine E de PR) inhibe fortement la transactivation médiée par les récepteurs, probablement en empêchant leur interaction avec la protéine SRC-1 endogène (Onate et al., 1995).

TIF2 et SRC-1 se comportent donc comme des coactivateurs à part entière, nécessaires et suffisants à l'activation transcriptionnelle. Cependant, TIF2 n'interagit ni avec TBP, ni avec TFIIB, ni avec de nombreux TAFs testés (Voegel et al., 1996). Comment TIF2 et SRC-1 recrutent-ils alors le complexe d'initiation de la transcription?

3.2.2 p300/CBP, le maillon manquant?

Il semble que ce lien entre SRC-1 et le complexe d'initiation soit indirectement assuré par une autre protéine déjà connue pour son rôle dans d'autres processus d'activation de la

transcription: CBP (CREB binding protein, protéine se fixant à CREB en français), et son proche cousin p300. CBP est une protéine de grande taille (un peu plus de 2400 AA) interagissant avec une grande variété de protéines fixant l'ADN comme CREB ou AP-1, ou faisant partie du complexe d'initiation de la transcription comme TBP ou TFIIB {voir (Janknecht et Hunter, 1996) pour revue}. Son implication comme coactivateur de nombreux facteurs de transcription lui a valu le qualificatif "d'intégrateur" (Kamei et al., 1996).

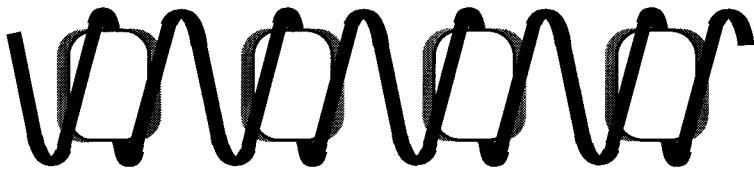
CBP combine à lui seul toutes les caractéristiques d'un cofacteur:

- sa surexpression stimule l'activation transcriptionnelle médiée par les récepteurs nucléaires (Chakravarti et al., 1996; Kamei et al., 1996).
- son inactivation fonctionnelle se traduit par la perte de la transactivation par les récepteurs nucléaires (Kamei et al., 1996).
- il interagit directement et de manière dépendante du ligand avec les récepteurs, et interagit simultanément avec le coactivateur SRC-1 (Kamei et al., 1996).
- enfin, il interagit avec TBP et TFIID (Zhou et Berk, 1995).

On voit donc que p300/CBP peut relier directement, et d'une manière dépendante du ligand, les récepteurs à la machinerie transcriptionnelle.

Le fait que p300/CBP puisse interagir à la fois avec les récepteurs et avec leur coactivateur SRC-1 est assez surprenant: on ne comprend pas bien pourquoi un récepteur, ayant déjà contacté CBP, aurait encore "besoin" de contacter un autre activateur comme SRC-1. On peut toutefois imaginer que les récepteurs nucléaires aient deux moyens de recruter p300/CBP: grâce à une interaction directe avec p300/CBP, ou indirectement, par l'intermédiaire de SRC-1. De manière implicite, ceci suggère que SRC-1 est un cofacteur facultatif pour l'activation de certains gènes ou encore que sa participation au recrutement de p300/CBP altérerait la fonction de ce dernier.

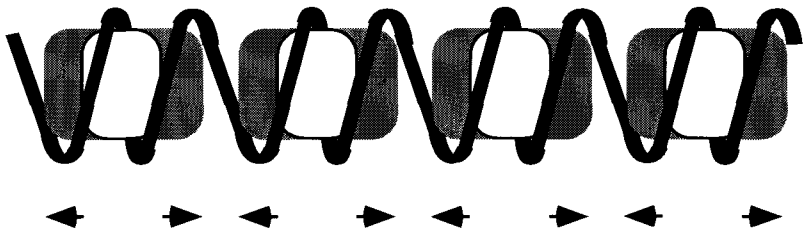
p300/CBP possède une autre caractéristique intéressante pour un coactivateur: son activité "histone-acétylase" (Ogryzko et al., 1996). Le degré d'acétylation de la chromatine a de longue date été corrélé à son activité transcriptionnelle, les régions les plus fortement acétylées étant transcriptionnellement plus actives (ou activables) et inversement (Pazin et Kadonaga, 1997b). Par un mécanisme encore inconnu, l'acétylation de la queue amino-terminale des histones rendrait l'ADN plus "accessible" à la fixation de différents facteurs et plus "perméable" à la progression de l'ARN polymérase { **Fig.22**, voir (Wolffe et Pruss, 1996; Pazin et Kadonaga, 1997b), pour revue }.



- Interaction Histones/ADN **forte**
- **Faible** mobilité des nucléosomes
- Fixation à l'ADN **difficile**



Acétylation
des histones



- Interaction Histones/ADN **faible**
- Mobilité des nucléosomes **accrue**
- Fixation à l'ADN **facilitée**

Fig.22: Effets probables de l'acétylation des histones sur "l'accessibilité" de l'ADN. Dans le schéma inférieur, les flèches indiquent la mobilité de l'octamère d'histones par rapport à l'ADN.

3.3 Autres événements contemporains de l'activation: SUG1 l'atypique.

SUG1 et p300/CBP se trouvent être les seuls cofacteurs de récepteurs nucléaires étant capables d'interagir directement avec des composants du complexe de pré-initiation: SUG1 interagit avec TBP et TAFII30 (Swaffield et al., 1995; vom Baur et al., 1996), et on l'a même décrit comme constituant de l'holoenzyme ARN polymérase II (Kim et al., 1994). En bref tout pour faire un transactivateur bon teint. Pourtant, en dépit de ces interactions très "favorables", SUG1 est incapable d'activer la transcription (vom Baur et al., 1996)! Son rôle dans l'activation repose donc sur d'autres mécanismes que le recrutement de la machinerie transcriptionnelle.

Curieusement, SUG1 est homologue à la sous-unités p45 du complexe régulateur du protéasome 26S, un complexe impliqué dans différents processus de dégradation dépendants de l'ubiquitination (Ghislain et al., 1993; Akiyama et al., 1995; Swaffield et al., 1995; DeMartino et al., 1996). Le rapport avec l'activation transcriptionnelle semble donc assez lointain. Pourtant deux hypothèses très intéressantes ont été émises:

- une revue récente de M.Hochstrasser, mentionnée dans le travail de vom Baur et coll., établit un rapprochement entre la sous-unité catalytique du protéasome (dont SUG1 fait partie) et une protéine bactérienne, ClpA (Hochstrasser, 1995; vom Baur et al., 1996). Or ClpA, sous-unité catalytique (fixant l'ATP) de la protéase clpP, possède une fonction propre, indépendante de la dégradation des protéines: c'est une chaperonne dépendante de l'ATP. De là à imaginer que SUG1 partage cette fonction... Rappelons toutefois que nous avons suggéré que la reconformation du domaine E suite à la fixation de l'hormone ne souffrirait pas d'un petit "coup de main" (voir chapitre II §4.4). Une autre hypothèse serait que SUG1 joue un rôle similaire au complexe hsp, dont nous avons souligné l'importance dans la signalisation par les récepteurs aux stéroïdes (voir chapitre II §2). Cette fonction chaperonne a d'ailleurs été démontrée dans le cas de la protéine bactérienne RepA, dont ClpA favorise la fixation à l'ADN (Wickner et al., 1994).

- enfin, ClpA possède une activité "débobinase" ("defoldase" en anglais) {voir la revue de (Gottesman et al., 1997)}. SUG1, si elle possède cette même fonction pourrait ainsi participer à la dégradation ou la dénaturation partielle du récepteur. Ceci apporterait une réponse à la question, "comment désactive-t-on un récepteur nucléaire", réponse drastique il est vrai!

Citons pour terminer que SUG1 a été décrit comme ADN-hélicase (Fraser et al., 1997). A suivre...

3.4 Conclusion.

Ce petit survol des différentes fonctions attribuées aux cofacteurs des récepteurs nucléaires révèle de manière évidente que l'activation transcriptionnelle n'est pas chose simple. Nous

sommes en tous cas bien loin du modèle selon lequel l'activation transcriptionnelle repose sur le simple recrutement de certains composants du complexe de pré-initiation.

Il est probable que la complexité de la transactivation par les récepteurs nucléaires, que nous avons ici présentée, ne soit pas une exception à la "règle du recrutement" mais plutôt un exemple réaliste des processus d'activation transcriptionnels en général.

4. Répression de la transactivation.

Nous venons de consacrer quelques chapitres aux mécanismes d'activation transcriptionnelle. La répression de la transcription est tout autant cruciale dans de nombreux processus comme le développement ou la différenciation cellulaire {revue dans (Johnson, 1995)}. Nous verrons par ailleurs que activation et répression de la transcription ont un point commun: la complexité des mécanismes qu'ils mettent en jeu.

4.1 Introduction à la répression transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires.

La capacité des récepteurs nucléaires à réprimer la transcription a initialement été mise en évidence pour v-erbA, la version oncogénique du récepteur aux hormones thyroïdiennes (Sap et al., 1986; Zenke et al., 1990). Cette fonction a ensuite été étendue au récepteur T₃R et à RAR en absence d'hormone, mais n'est cependant pas partagée par d'autres récepteurs comme RXR, VDR ou PPAR (Damm et al., 1989; Baniahmad et al., 1990).

On distingue généralement deux types de mécanismes de répression {revue dans (Johnson, 1995)}:

- une répression **passive**, qui peut reposer sur le "déplacement" d'un activateur par un facteur transcriptionnellement inactif, lorsque ceux-ci se fixent sur des éléments de réponse identiques ou chevauchant (**Fig.23A**). Cet effet peut aussi reposer sur la compétition pour un coactivateur commun (voir ci-dessus l'exemple de CBP/p300).
- une répression **active**, reposant soit sur l'inhibition de la formation ou du recrutement du complexe de pré-initiation (**Fig.23B**), ou sur l'établissement d'une structure nucléosomale empêchant l'accessibilité des facteurs de transcription et/ou de la progression de la machinerie transcriptionnelle (**Fig.23C**).

Ces deux mécanismes ont des répercussions distinctes sur l'activité transcriptionnelle d'un gène: la répression "passive" bloque l'état d'activation d'un promoteur, tandis que la répression active est capable d'altérer son activité transcriptionnelle basale.

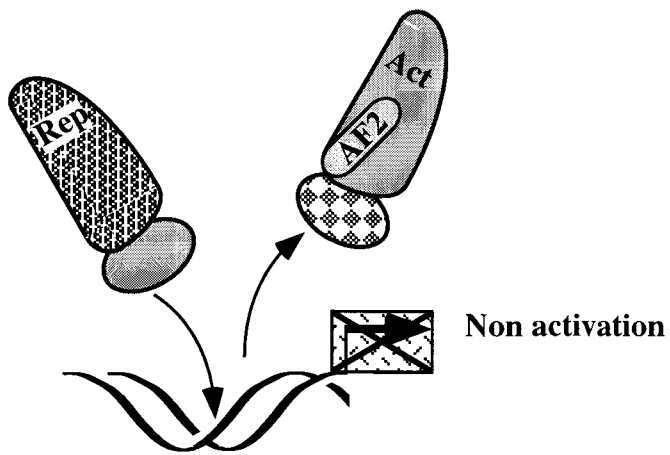
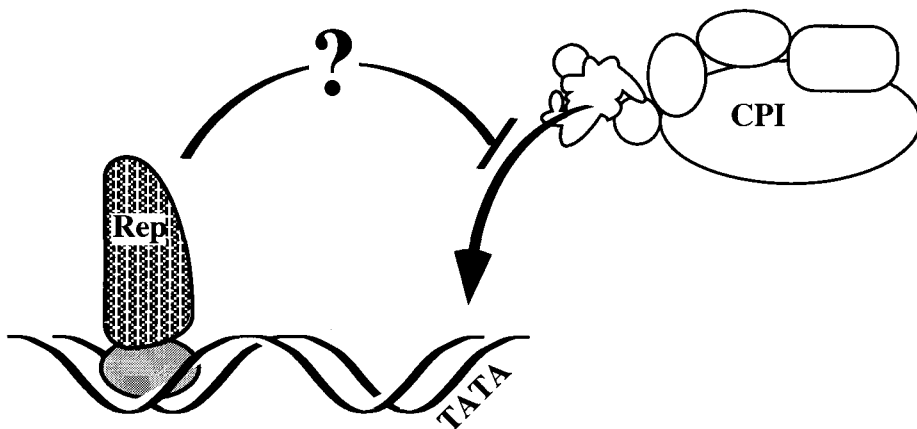
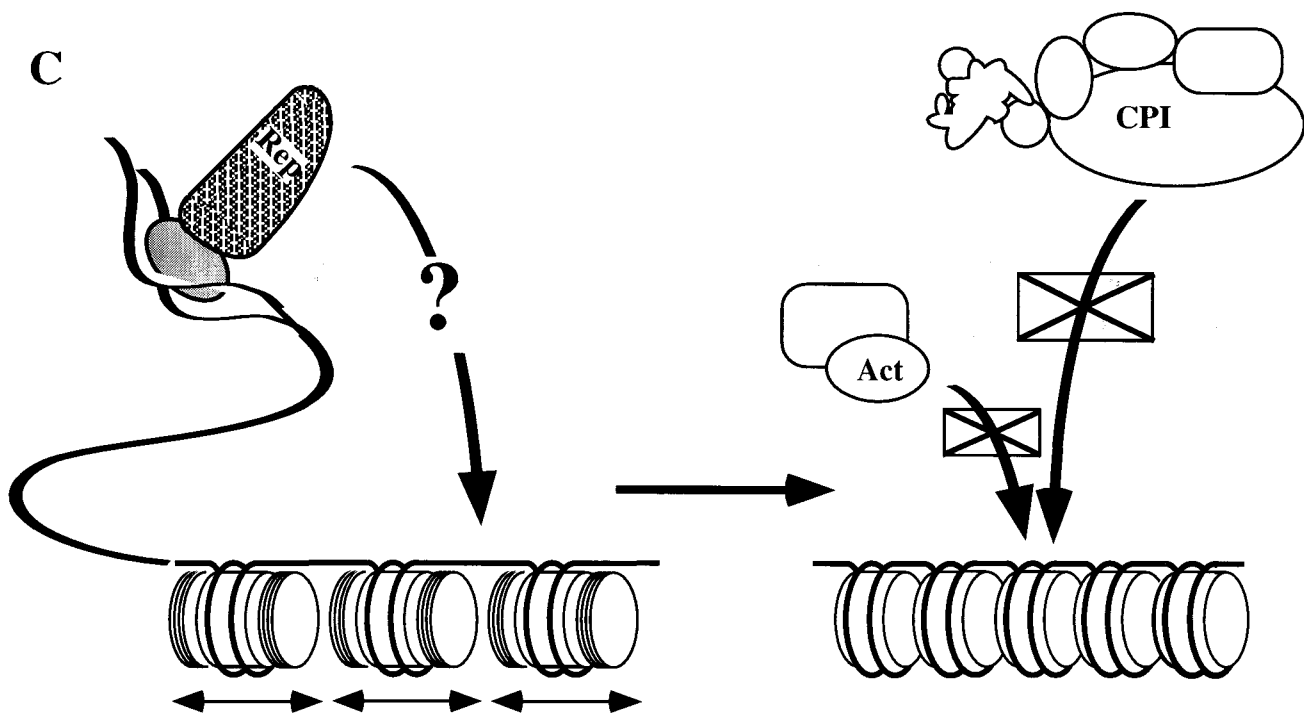
A**B****C**

Fig.23: Modes d'inactivation de la transcription: A: par compétition, l'inhibiteur déplace un activateur; B: par l'inhibition de la fixation ou du recrutement du complexe de préinitiation (CPI); C: par modification de l'organisation nucléosomale de l'ADN, en stabilisant l'interaction nucléosome/ADN par exemple.

Contrairement au mécanisme de la répression passive, conceptuellement simple (principe de compétition), la répression active semble résulter d'une fonction spécialisée, plus complexe, des récepteurs.

C'est sur cette fonction que nous allons nous attarder un peu.

4.2 T₃R et la répression de la transcription.

L'hypothèse selon laquelle la répression médiée par le récepteur T₃R est un phénomène actif repose sur deux éléments principaux:

- la fixation à l'ADN est nécessaire à la fonction de répresseur (Privalsky et al., 1988)
- la fonction de répression, comprise dans le domaine E est transférable à un domaine de fixation à l'ADN hétérologue (Baniahmad et al., 1992). Ce résultat écarte notamment un mécanisme reposant sur la compétition pour un site commun ou sur la formation d'un dimère inactif).

Deux modèles distincts et non exclusifs ont été proposés pour expliquer l'activité répresseur de T₃R.

Le premier modèle repose sur l'inhibition de la formation du complexe d'initiation de la transcription (Fondell et al., 1993). Dans ce cas, T₃R, qui interagit avec TFIIB, bloque la formation du complexe de pré-initiation de la transcription, mais est incapable de réprimer la transcription une fois que celui-ci est formé. Cependant, aucun lien causal n'a pu être établi entre l'interaction T₃R/TFIIB et la répression. En effet, le domaine C-terminal de T₃R par lequel il interagit avec TFIIB n'est pas suffisant pour médier un effet répresseur (Baniahmad et al., 1995a).

Le second modèle repose sur l'implication de T₃R dans le maintien (ou l'établissement) d'une structure nucléosomale répressive. Ceci a notamment été décrit dans le cas de la régulation du promoteur TRβA chez le xénope (Wong et al., 1995): dans un test *in vitro*, T₃R ne manifeste son activité répressive sur l'activité basale du promoteur TRβA que lorsque celui-ci est organisé sous forme nucléosomale. Cet effet répresseur est accru lorsque T₃R est fixé sur son élément de réponse durant le processus de réplication de l'ADN, période durant laquelle l'ADN se réassocie avec les nucléosomes. Ces résultats suggèrent donc que la répression de la transcription était intimement liée à la structure nucléosomale de l'ADN. Restait à trouver ces corépresseurs...

4.3 SMRT et NCoR: cofacteurs de la répression.

Le principe expérimental fut donc de rechercher des protéines interagissant avec les récepteurs en absence de ligand, et "relargués" une fois le ligand fixé.

Deux protéines furent identifiées: NCoR - pour Nuclear hormone Co-Repressor - et SMRT - pour Silencing Mediator for Retinoids and Thyroid-hormone receptors, ces deux corépresseurs étant parfois appelés communément TRAC (Thyroid hormone and Retinoic Acid receptor Corepressor, (Chen et Evans, 1995; Horlein et al., 1995; Kurokawa et al., 1995; Sande et Privalsky, 1996).

SMRT et NCoR sont des protéines de grande taille, respectivement de 160 et de 270kDa. Toutes deux interagissent avec RAR et T₃R en absence de ligand (mais pas avec un récepteur dépourvu d'activité répresseur comme VDR) et sont relarguées suite à la fixation du ligand (Chen et Evans, 1995; Horlein et al., 1995; Kurokawa et al., 1995). Curieusement, Sande et coll. ont décrit une interaction entre SMRT et le récepteur RXR, dont on ne connaît pourtant pas d'activité répresseur (Sande et Privalsky, 1996).

L'implication de SMRT et NCoR dans la répression par les apo-récepteurs a été étayée par plusieurs résultats:

- ils ont un effet répresseur intrinsèque lorsqu'ils sont recrutés à proximité des séquences d'initiation de la transcription (Horlein et al., 1995).
- lorsque la répression médiée par Gal4-RAR est abolit par l'expression de v-erbA (qui "titre" son corépresseur), la surexpression de SMRT restaure cet effet (Chen et Evans, 1995).
- des mutations ponctuelles abolissant l'interaction récepteur/corépresseur se traduisent par la perte de l'activité répresseur du récepteur en absence de ligand, sans affecter son inductibilité (Kamei et al., 1996).

Il serait toutefois restrictif de limiter la fonction de NCoR ou de SMRT à la seule médiation de l'effet répresseur des apo-récepteurs: ainsi PPAR γ , pour lequel aucune activité répressive n'a été démontrée, forme un complexe avec SMRT en solution (Zamir et al., 1997). Cependant, contrairement aux récepteurs T₃R et RAR, l'interaction PPAR γ /NCoR est déstabilisée une fois le récepteur fixé sur son élément de réponse. Ceci suggère que NCoR pourrait avoir d'autres fonctions en dehors de son rôle de corépresseur. On pourrait par exemple imaginer que l'interaction avec PPAR ait pour but d'empêcher l'interaction de l'apo-récepteur avec ses coactivateurs (et donc leur "séquestration"), interaction qui, on l'a vu, semble exister à un niveau basal en absence d'hormone (voir §2.3).

4.4 Domaines d'interaction.

En premier lieu, il est encore difficile d'identifier des motifs structuraux particuliers au sein de ces deux corépresseurs. On sait seulement que NCoR interagit avec T₃R et RAR grâce à une séquence carboxy-terminale d'une soixantaine de résidus, comportant un polypeptide

fortement conservé chez SMRT (Sande et Privalsky, 1996). Ce domaine adopterait potentiellement une structure en hélice alpha (Horlein et al., 1995).

Du côté récepteur le domaine d'interaction est constitué par le domaine LBD et le domaine "charnière" D. La partie carboxy-terminale de ce dernier (en aval de la boîte T/A) contient un groupe de résidus conservés entre T₃R, v-erbA et RAR appelé "CoR Box". L'introduction de mutations dans cette CoR Box suffit à abolir l'interaction avec NCoR (Kamei et al., 1996).

Si le motif "CoR box" joue un rôle important, il n'est pas suffisant pour permettre l'interaction des récepteurs nucléaires avec les corépresseurs: en effet, bien que le récepteur VDR contienne un motif "CoR-Box" très similaire à celui de T₃R et de RAR, celui-ci n'interagit pas avec les corépresseurs (Horlein et al., 1995).

Le domaine AF2 semble lui aussi jouer un rôle indirect dans l'interaction récepteurs/corépresseurs: En effet, ce domaine est nécessaire au "relarguage" du corépresseur suite à la fixation de l'hormone. En conséquence, les différents récepteurs dépourvus de ce domaine, comme v-erbA ou des mutants de délétion de T₃R ou de RAR, sont constitutivement associés aux corépresseurs, indépendamment de la fixation de l'hormone (Schulman et al., 1996; Zamir et al., 1996).

Il est possible de tirer deux informations importantes à partir de ces résultats: (i) **l'interface d'interaction entre récepteur et corépresseur** est assez "diffuse", et **ne se limite pas à une seule région** bien définie. (ii) **SMRT et NCoR pourraient servir d'autres fonctions que la seule répression** de la transcription.

A noter cependant que l'on a fait que déplacer le problème: si l'identification de SMRT et de NCoR a permis de faire un pas en direction de la compréhension du mécanisme par lequel T₃R et RAR répriment la transcription en absence d'hormone, la question reste entière: comment SMRT et NCoR induisent ils l'état réprimé? De nombreux résultats récents contribuent à éclairer ce point.

4.5 Sin3 et HDAC: chevilles ouvrières de la répression?

La recherche d'intermédiaires reliant fonctionnellement SMRT et NCoR à la répression de la transcription fut orientée par des découvertes effectuées sur d'autres répresseurs de la transcription. C'est ainsi que plusieurs équipes ont trouvé que Sin3, un cofacteur de Mad:Max, interagit avec SMRT et NCoR (Alland et al., 1997; Heinzl et al., 1997; Nagy et al., 1997).

Le fait que Sin3 soit fonctionnellement impliqué dans une interaction avec la protéine de levure Rpd3, a suscité un grand intérêt: en effet, Rpd3, dont l'homologue de mammifère est appelé HDAC, a une fonction "histone-déacétylase" (Rundlett et al., 1996; Taunton et al., 1996). L'apo-récepteur, recrute donc par l'intermédiaire de SMRT (ou de NCoR) et de l'adaptateur Sin3, la protéine HDAC1, qui induit de la déacétylation des nucléosomes. Or, nous avons déjà vu que l'état d'acétylation d'une région de la chromatine est corrélé à son activité transcriptionnelle.

Cependant, ce schéma cache une réalité beaucoup plus complexe dont on trouvera quelques indices dans la revue de Pazin et coll. (Pazin et Kadonaga, 1997b):

- on ne connaît pas encore le mécanisme par lequel l'état d'acétylation influence l'activité transcriptionnelle d'une région d'ADN.
- un mutant de Sin3 n'interagissant plus avec HDAC est toujours capable de réprimer la transcription.
- les régions de NCoR importantes pour la répression ne sont pas celles qui sont impliquées dans l'interaction avec Sin3 (Heinzel et al., 1997).

4.6 Implication de TIF1alpha dans la répression transcriptionnelle.

TIF1alpha a été isolé grâce à un criblage en levure destiné à identifier des protéines stimulant l'activité transcriptionnelle du domaine E de RXR en présence de son ligand. Plusieurs éléments suggèrent pourtant que TIF1alpha est un répresseur:

- sa fixation à un promoteur (*via* le domaine de fixation à l'ADN de Gal4) réduit considérablement (de 95%) l'activation transcriptionnelle médiée par VP16.
- TIF1alpha a aussi été identifié comme cofacteur de répresseurs transcriptionnels à domaines "KRAB". L'effet répresseur du domaine KRAB corrèle avec sa capacité à interagir avec TIF1alpha (Margolin et al., 1994; Witzgall et al., 1994).
- TIF1alpha interagit avec une protéine nommée HP1 (Heterochromatin associated protein) impliquée dans des phénomènes d'hétérochromatisation dose-dépendante chez la Drosophile {revue dans (Elgin, 1996)}.

Ces résultats suggèrent que TIF1alpha est un corépresseur à part entière. Il semble que la protéine HP1 avec laquelle il interagit, et qui a d'elle même un effet répresseur, puisse être l'un des éléments par lesquels TIF1alpha induit un état transcriptionnel réprimé (Le Douarin et al., 1996). Cependant, HP1 n'est pas absolument requise à l'effet de TIF1alpha puisque la mutation du motif par lequel TIF1alpha interagit avec celle-ci n'abolit pas sa fonction de répresseur (Le Douarin et al., 1996).

Curieusement, HP1 semble aussi interagir avec une protéine de la famille SWI/SNF dont nous avons vu le rôle dans la fixation de certains facteurs à l'ADN nucléosomal, généralement

impliqué dans les premières phases de l'activation transcriptionnelle { voir §3.1.1, (Le Douarin et al., 1996) }. Il est donc possible que HP1, bien qu'impliquée dans les phénomènes de répression par "fermeture" de l'ADN, soit aussi un "point d'ancrage" permettant à d'autres protéines comme SWI d'induire la "réouverture" de cette structure répressive.

5. Conclusion.

Il apparaît assez clairement que de nombreux événements, jouant en amont ou en aval du recrutement de l'ARN polymérase, peuvent influencer l'activation de la transcription médiée par un récepteur nucléaire. Il semble par exemple, que le complexe SWI/SNF permette à certains récepteurs de se fixer sur des éléments de réponse situés dans un contexte nucléosomal normalement réfractaire. Nous avons aussi suggéré que des protéines comme SUG1, pourraient jouer un rôle de type chaperonne (ou médier le recrutement de telles protéines), permettant au récepteur d'adopter une conformation optimale pour l'activation. Les adaptateurs TIF2 et SRC-1 joueraient eux, un rôle plus classique dans le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. L'interaction des récepteurs avec p300/CBP semble aussi, entre autres fonctions, permettre le recrutement direct de composants du complexe de pré-initiation. La diversité des fonctions portées par la protéine p300/CBP illustre d'ailleurs à elle seule le fait que de nombreux événements concourent à l'activation de la transcription. Cette protéine, grâce notamment à sa fonction histone-acétylase pourrait aussi permettre de "préparer" la chromatine pour des étapes ultérieures de la transcription.

Nous avons vu de même que la répression de la transcription repose sur différents mécanismes. L'un d'entre eux résulte de la modification de la structure nucléosomale de l'ADN, médiée grâce à un complexe de déacétylation des histones (comprenant notamment HDAC1), recruté par les récepteurs *via* deux corépresseurs, NCoR et SMRT.

Notons une fois encore, que la diversité des mécanismes impliqués dans ces deux versants de la régulation transcriptionnelle, ne constitue pas une exception aux modèles simples initialement proposés, mais représente plutôt une vision réaliste de la complexité de la régulation de l'expression des gènes.

IV. Allostérie: les relations fructueuses.

Par leur capacité à former des dimères, les récepteurs nucléaires sont une terre propice aux effets allostériques. Pourtant, bien que sous-jacent à de nombreux aspects de la fonction des récepteurs nucléaires (et des protéines en général), ce phénomène crucial est resté longtemps ignoré.

Par mesure de clarté, nous avons présenté la fonction des récepteurs nucléaires sous forme d'un triptyque: fixation à l'ADN, fixation de l'hormone, transactivation. Le but de ce chapitre sera de présenter la fonction des récepteurs nucléaires reconstitués dans leur globalité, et d'étudier plus particulièrement les interconnexions entre les trois fonctions mentionnées ci-dessus. On s'intéressera en particulier aux effets:

- de la dimérisation sur la fixation de l'hormone.
- de la fixation à l'ADN sur la transactivation.
- de la fixation de l'hormone sur la transactivation.

1. Effet de la dimérisation sur la fixation de l'hormone.

Nous avons vu dans le cas de RXR et de VDR que la fixation de l'hormone peut influencer l'état de dimérisation du récepteur et en conséquence sa fixation à l'ADN (voir chapitre II §3.1 et 3.2). De manière réciproque, la dimérisation joue, pour certains récepteurs, un rôle déterminant sur l'affinité et la spécificité de fixation de l'hormone. En voici quelques exemples.

1.1 Cas de la fixation des ecdystéroïdes par EcR.

Yao et coll. ont montré que la formation de l'hétérodimère EcR/USP augmente très fortement l'affinité de EcR pour son hormone, la 20-hydroxy-ecdysone {20E, (Yao et al., 1993)}. De manière surprenante, cet effet est spécifique de cette hormone puisque la muristérone A, un dérivé des ecdystéroïdes, est fixée par EcR, que celui-ci interagisse ou non avec USP.

Le fait que cette augmentation d'affinité de EcR pour l'hormone 20E repose sur un phénomène d'allostérie a été étayé par des expériences de résistance à la chymotrypsine (voir le chapitre II §3.3 pour la description de ce principe): l'hétérodimérisation de USP avec EcR se traduit en effet par l'apparition d'un peptide résistant à la digestion, dérivé de EcR, indiquant que celui-ci a subi un changement de conformation suite à son hétérodimérisation

avec USP (**Fig.24**). Cette nouvelle conformation est d'ailleurs similaire à celle qu'il adopte une fois l'hormone fixée. Rappelons que nous avons déjà suggéré dans le chapitre **II §3.3** que l'hétérodimérisation de RAR avec RXR conduisait RAR à adopter une conformation "mimant" la fixation de son hormone.

En conclusion, **l'hétérodimérisation avec USP conduirait EcR à adopter une conformation plus affine pour l'un de ses ligands naturels.**

A noter que l'hétérodimérisation de EcR et de USP se traduit aussi par l'augmentation de son affinité pour l'ADN. Ceci indique que les trois événements, dimérisation, fixation à l'ADN et fixation de l'hormone sont intimement reliés.

1.2 RXR, un récepteur influençable.

Le fait que l'hétérodimérisation se traduise par un changement de conformation soulève un problème fondamental dans le cas où les deux partenaires du dimère sont des récepteurs *stricto sensu*, c'est à dire ayant tous deux la capacité de fixer une hormone: qui fixe l'hormone? Cette question est particulièrement importante dans le cas de RXR qui est à la fois un récepteur à l'acide 9-cis rétinoïque et le partenaire d'hétérodimérisation de nombreux autres récepteurs. Quel est donc l'effet de l'hétérodimérisation sur la capacité de RXR à fixer le 9-cis RA?

En fait, tout dépend du partenaire, de la présence de sa propre hormone et de l'élément de réponse. En voici quelques exemples:

a Dans le cadre d'un hétérodimère **RXR/PPAR** (Kliwer et al., 1992):

- PPAR fixe son ligand et transactive.
- RXR fixe son ligand et transactive.
- RXR et PPAR fixent simultanément leur ligand respectif et transactivent de manière synergique.

Dans ce cas, **l'hétérodimérisation** à PPAR est "**tolérante**" et laisse toutes ses fonctions à RXR. On retrouve cette situation dans le cas de l'hétérodimérisation de RXR avec le récepteur VDR ou avec les récepteurs orphelins tels que NGFI-B ou LXR (Carlberg et al., 1993; Perlmann et Jansson, 1995; Willy et al., 1995).

b Dans le cadre des hétérodimères **RXR/RAR**.

*Sur un motif **DR5** (Durand et al., 1994; Forman et al., 1995):

- RXR ne peut fixer son ligand.

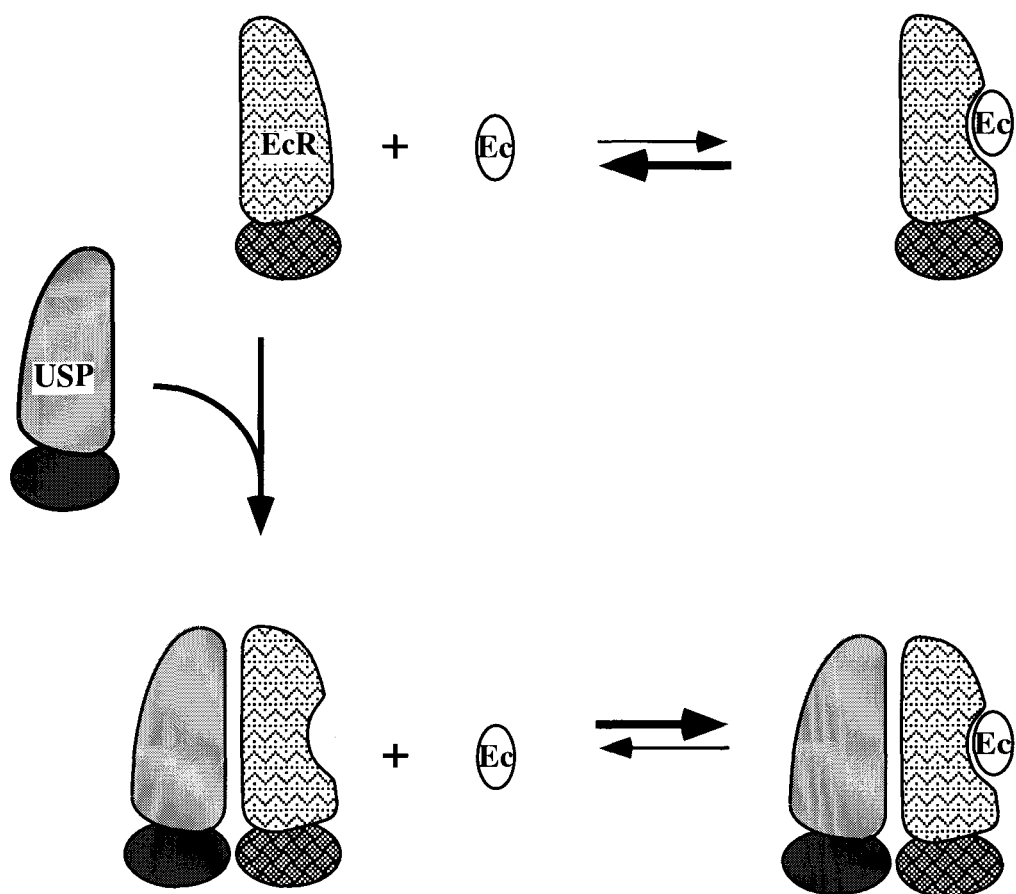


Fig.24: Effet de l'hétérodimerisation sur l'affinité de EcR pour son hormone. L'invagination du domaine E de EcR schématise sa plus grande affinité pour son ligand. Ec: Ecdystéroïde.

- Si RAR est complexé à son ligand, RXR fixe le sien. Les deux facteurs transactivent alors, sans toutefois synergiser.

Dans ce cas, l'hétérodimérisation de RXR avec RAR se traduit par la perte de sa capacité à fixer son hormone. Notons que sur un motif **DR2**, Durand et coll. ont montré que l'effet transactivateur de l'hétérodimère RXR/RAR n'est pas additif mais repose uniquement sur le domaine AF2 de RAR, RXR étant alors un partenaire "silencieux" (Durand et al., 1994).

*Sur un motif **DR1** (Kurokawa et al., 1994):

- RXR ne peut fixer son ligand.
- RAR, bien qu'il fixe son ligand ne peut activer la transcription (ce résultat est toutefois controversé, voir le §2).

c Dans le cadre d'un hétérodimère **RXR/T₃R sur un DR4** (Forman et al., 1995).

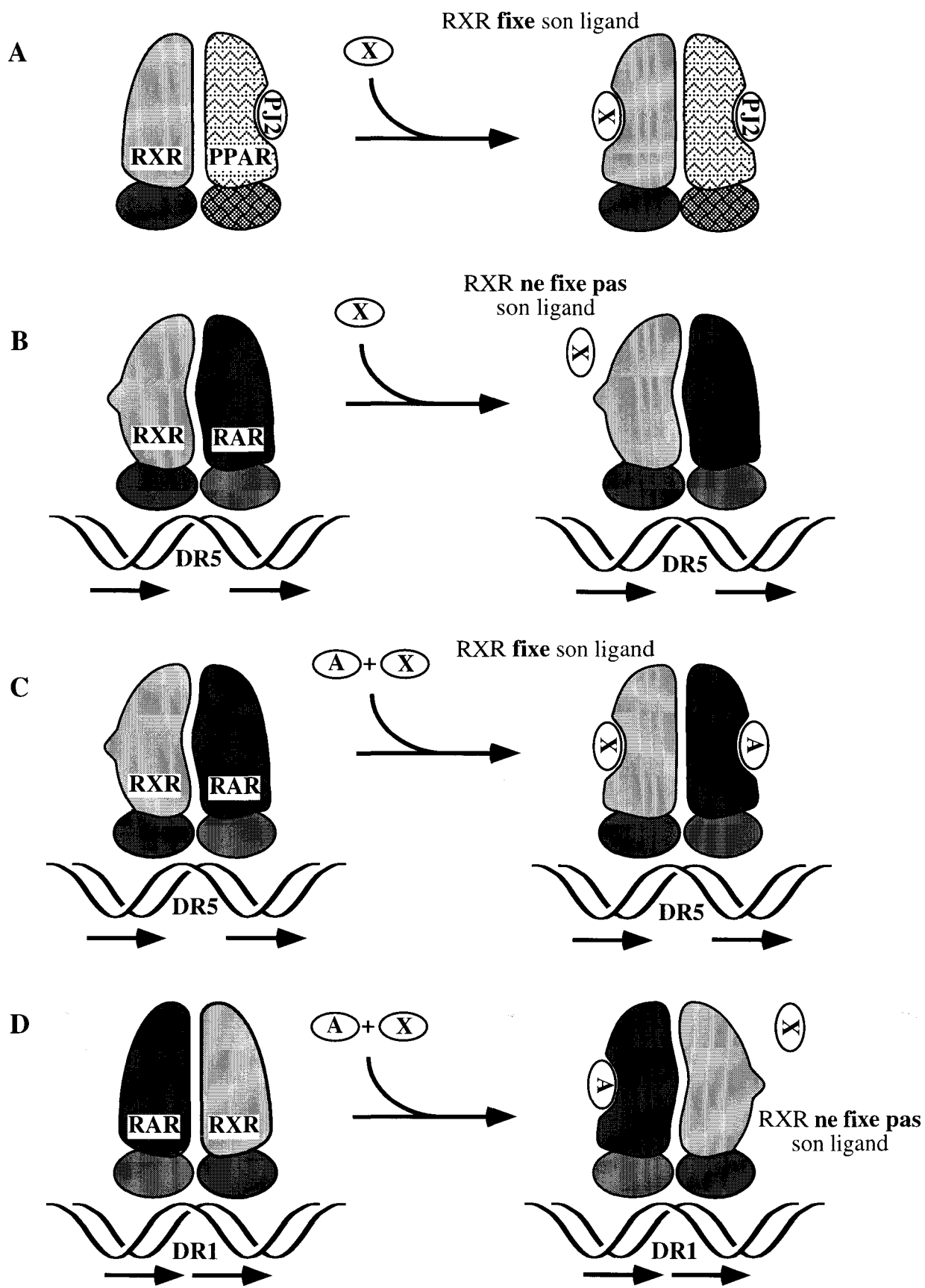
- La capacité de RXR à fixer son ligand n'est abolie que lorsque T₃R est lui-même complexé à son hormone.

En conclusion, la capacité de RXR à fixer son ligand au sein d'un hétérodimère dépend à la fois (**Fig.25**): (i), de son **partenaire** (comparer A et B); (ii) de **l'état** de son partenaire (comparer B et C) et enfin (iii) du **motif** sur lequel se fixe l'hétérodimère (comparer C et D).

On y voit RXR jouer tour à tour le rôle de:

- partenaire à qui il faut imposer le silence (RXR/T₃R).
- partenaire qu'il faut savoir faire chanter à bon escient (RXR/apo-RAR, ou RXR/holo-RAR fixés sur un motif DR5).
- partenaire libre, où "l'aide" est mutuelle et fructueuse (RXR/PPAR, RXR/VDR).
- RXR pourrait lui même imposer la loi du silence à son partenaire (RXR/RAR sur un motif DR1).
- enfin, RXR peut ne pas être qu'un partenaire, mais un récepteur à part entière, comme dans les hétérodimères RXR/NGFI-B et RXR/LXR (voir §3).

Ces différents exemples illustrent bien la diversité des effets reposant sur le phénomène d'allostérie, que ce soit dans le sens où la fixation de l'hormone entraîne la dimérisation (abordée dans le chapitre II §3.1), ou dans le sens où la dimérisation influence la capacité à fixer l'hormone.



(A) : Ligand spécifique de RAR
 (X) : Ligand spécifique de RXR

Fig.25: RXR, un partenaire influençable.

2. Effets de la fixation à l'ADN sur l'activité transcriptionnelle.

2.1 Influence du mode de fixation.

L'activité transcriptionnelle de l'hétérodimère RXR/RAR fixé sur un motif DR1 est sujette à de nombreuses controverses. Certains articles ont montré que cet hétérodimère active la transcription en réponse à RA (Hall et al., 1993; Heery et al., 1993), tandis que d'autres l'ont décrit comme un dimère inactif (Mangelsdorf et al., 1991). Sans qu'il semble possible de trancher cette question, les résultats récents de Kurokawa et coll. semblent donner crédit à l'effet silencieux de cet hétérodimère (Kurokawa et al., 1995).

En fait, dans le cas de l'hétérodimère RXR/RAR, l'activation transcriptionnelle repose sur deux événements simultanés: l'interaction avec les cofacteurs et le relarguage des corépresseurs (voir **chapitre III**).

C'est en étudiant ces deux événements contemporains de l'activation transcriptionnelle, que Kurokawa et coll. ont trouvé une différence singulière dans le comportement de l'hétérodimère RXR/RAR en fonction du motif sur lequel il est fixé: alors que sur les motifs DR1 et DR5, le ligand 9cis-RA entraîne l'interaction de l'hétérodimère avec ces deux cofacteurs p160 et p140 (Cavailles et al., 1994; Halachmi et al., 1994), la dissociation du corépresseur NCoR ne se produit que dans le cas où l'hétérodimère est fixé au motif DR5. L'hétérodimère RAR/RXR, fixé sur son motif DR1, reste lui associé avec NCoR dont l'activité répresseur domine ou inhibe l'effet activateur de p160 et de p140 (**Fig.26**). Ces auteurs ont montré que c'est la polarité de fixation de l'hétérodimère RXR/RAR sur l'élément de réponse qui détermine son comportement transcriptionnel (Kurokawa et al., 1994).

Bien que les bases structurales de cet effet restent à préciser, il est intéressant de noter que l'un des sites majeurs d'interaction de NCoR avec RAR correspond au domaine D. Or nous avons vu que cette région constitue, dans certains cas, une interface d'interaction entre les partenaires d'un dimère (voir chapitre **I §2.3**). Il est probable que ce soit cette région qui, suite à des modifications allostériques dépendantes de la polarité de fixation, dicte l'interaction de l'hétérodimère avec le corépresseur.

Ces résultats indiquent que **le mode de fixation**, par l'intermédiaire des interactions allostériques entre partenaires du dimère **est capable d'altérer l'interaction avec les cofacteurs**.

2.2 Effet de la séquence du motif de fixation.

Outre l'organisation globale de l'élément de réponse, la réponse transcriptionnelle pourrait aussi être plus directement affectée par la séquence même des sites de fixation du motif: dans une étude détaillée par mutagenèse ponctuelle, Willy et coll. ont montré que la séquence

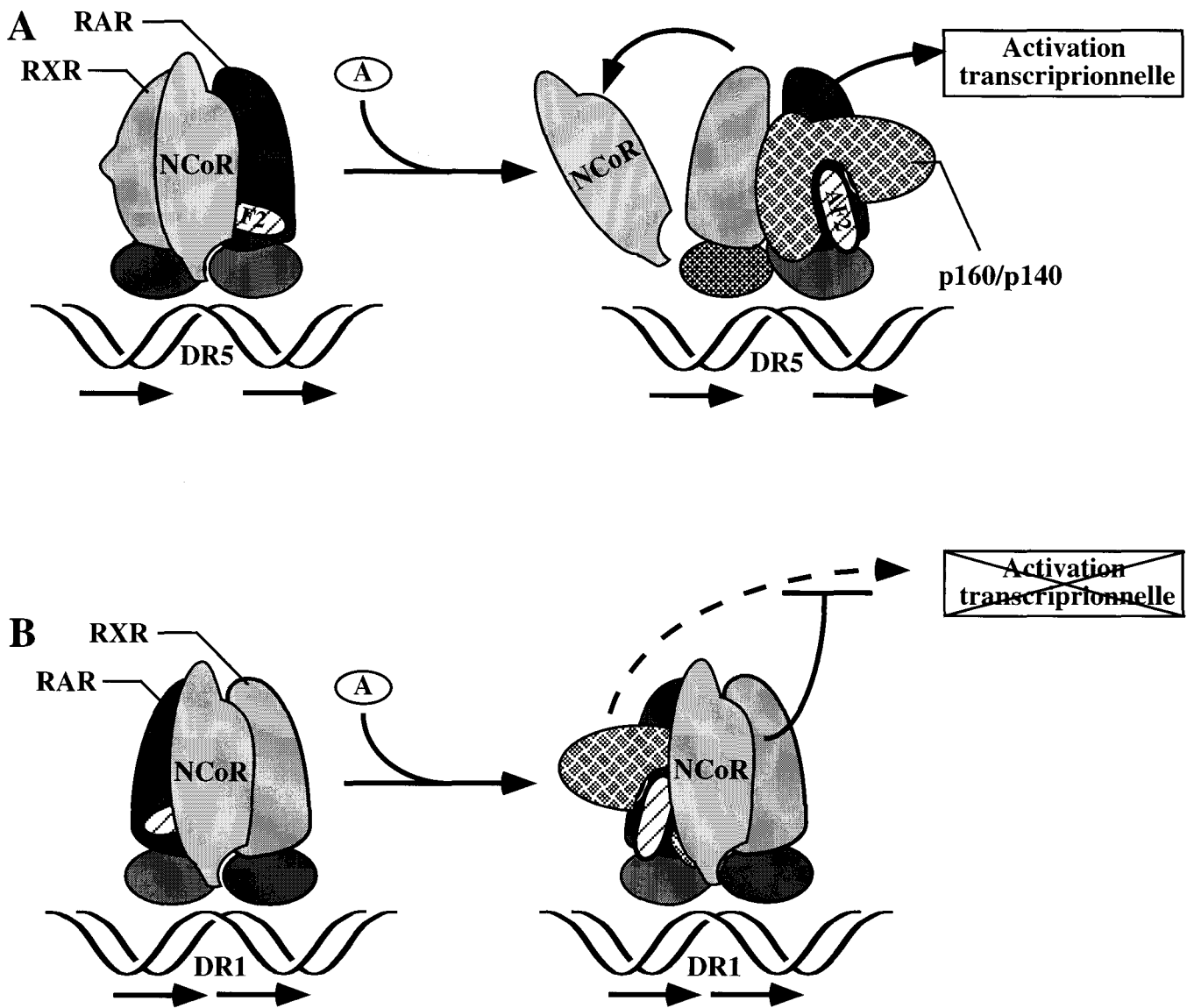


Fig.26: Influence de l'élément de réponse sur l'activation transcriptionnelle. A: Sur le motif DR5 la fixation de l'hormone induit la dissociation du corépresseur NCoR et la fixation des coactivateurs p140 et p160. **B:** Sur un DR1, l'interaction avec les coactivateurs est stimulée par l'hormone mais la dissociation de NCoR n'a pas lieu.

nucléotidique de l'élément de réponse, sans affecter l'affinité de l'hétérodimère RXR/LXR pour l'ADN, influence directement son activité transcriptionnelle (Willy et Mangelsdorf, 1997): ainsi, cet hétérodimère transactive très efficacement depuis le motif gGGTCA(aata)AGtTCA, mais transactive beaucoup moins bien depuis un motif constitué de deux sites consensus AGGTCA(aata)AGGTCA (les bases ne correspondant pas au consensus sont en minuscules, celles constituant l'espace entre les deux sites hexamériques sont entre parenthèses).

Le fait que l'amplitude de la transactivation repose sur la modification allostérique du domaine de fixation à l'ADN a été indirectement étayé grâce à deux études du groupe de K.Yamamoto: le premier travail a révélé que deux mutations ponctuelles (P493R ou S459A) introduites dans le domaine C du récepteur GR, le conduisent à inhiber la croissance des levures (Lefstin et al., 1994). Quel rapport avec notre propos? Il se trouve que cet effet inhibiteur sur la croissance cellulaire résulte de la séquestration des cofacteurs transcriptionnels de la cellule par ces récepteurs mutants. Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer cet effet:

- à cause de ses mutations, le récepteur en solution est dans une conformation qui mime celle qu'il adopte une fois fixé sur son élément de réponse, et interagit donc en permanence avec les cofacteurs.
- ces mutations conduiraient le récepteur mutant à interagir de manière constitutive et aspécifique avec l'ADN génomique de la levure, ce qui lui permet là encore d'être constitutivement en contact avec ses cofacteurs.

Notons que ces deux mutations résident dans une région du domaine C subissant d'importantes modifications allostériques lors de l'interaction avec l'ADN (Schwabe et al., 1993). La mutation du résidu Pro(493) en Arg ou de la Ser(459) en Ala conduirait donc le récepteur GR à adopter en solution une conformation similaire à celle du récepteur fixé sur son site.

La seconde étude, destinée à identifier des mutants de GR ayant perdu la capacité à réprimer la transcription depuis l'élément de réponse complexe du promoteur de la proliférine, a contribué à étayer l'hypothèse d'une relation entre reconnaissance de la séquence d'ADN et la transcription (Starr et al., 1996). Ce criblage a permis d'identifier un mutant du récepteur GR contenant la substitution du résidu Lys(461) en Ala. Les auteurs suggèrent que le résidu Lys(461) (numéroté Lys(28) dans le chapitre I §3.2), qui est impliqué dans des contacts directs et indirects avec les bases de l'héxamère, pourrait jouer le rôle de "détecteur" de la séquence de fixation et dicterait ainsi au reste du récepteur (et notamment au domaine transactivateur) la réponse transcriptionnelle à adopter.

3. Effet allostérique de la fixation de l'hormone.

Nous avons déjà vu dans le chapitre II §3.3 que l'hormone modifie la conformation du domaine E. Il semble que la fixation de l'hormone sur l'un des récepteurs d'un hétérodimère pourrait aussi affecter la conformation de son partenaire d'hétérodimérisation.

Cet aspect "transmissible" de l'effet conformationnel du ligand a été illustré dans deux études récentes. Nous avons vu dans le cas des hétérodimères RXR/NGFI-B et RXR/LXR, que RXR exerce le rôle de récepteur à l'acide 9-cis rétinoïque à part entière: il fixe son ligand et active la transcription (Willy et al., 1995). Du moins le pensait-on... En effet, dans le cas de l'hétérodimère RXR/LXR, l'activation transcriptionnelle qui résulte de la fixation de l'hormone par RXR est strictement dépendante du domaine activateur AF2 de LXR et n'est que modérément affectée par la délétion du motif AF2 de RXR (Willy et Mangelsdorf, 1997). Ce résultat suggère donc que la fixation du ligand de RXR serait capable d'induire chez son partenaire LXR, un changement de conformation de son domaine E lui permettant d'activer la transcription.

Dans une étude similaire, Schulman et coll. montrent que la protéine chimérique constituée par le domaine E de RXR couplé au domaine de fixation à l'ADN de Gal4, active la transcription en réponse au ligand spécifique de RXR appelé LG1069 mais pas à l'autre ligand LG100754 (Schulman et al., 1997). Bien que se fixant sur RXR, le ligand LG100754 n'est donc pas capable d'induire un changement conformationnel suffisant à révéler le pouvoir transactivateur de RXR (**Fig.27A et 27B**). Curieusement, lorsque cette chimère Gal4-RXR est co-exprimée avec le domaine E de RAR, le ligand LG100754 active la transcription (Schulman et al., 1997). Cette activité transcriptionnelle n'est pas affectée par des mutations touchant le domaine AF2 de RXR, suggérant ainsi que l'activation transcriptionnelle est médiée par le domaine AF2 de RAR. Parallèlement, ces auteurs ont montré que la fixation du ligand de RXR induit simultanément la dissociation du corépresseur SMRT et l'association de l'hétérodimère avec le co-activateur SRC-1 (**Fig.27**).

Notons cependant que cet effet, dénommé "effet du ligand fantôme", n'est pas pour autant une caractéristique intrinsèque du ligand: il y aurait des récepteurs "réceptifs" à cet effet, comme RAR (voir ci-dessus) ou PPAR, et d'autres qui y seraient réfractaires comme T₃R (Lala et al., 1996).

L'effet allostérique du ligand est donc au moins en partie déterminé par le partenaire de dimérisation.

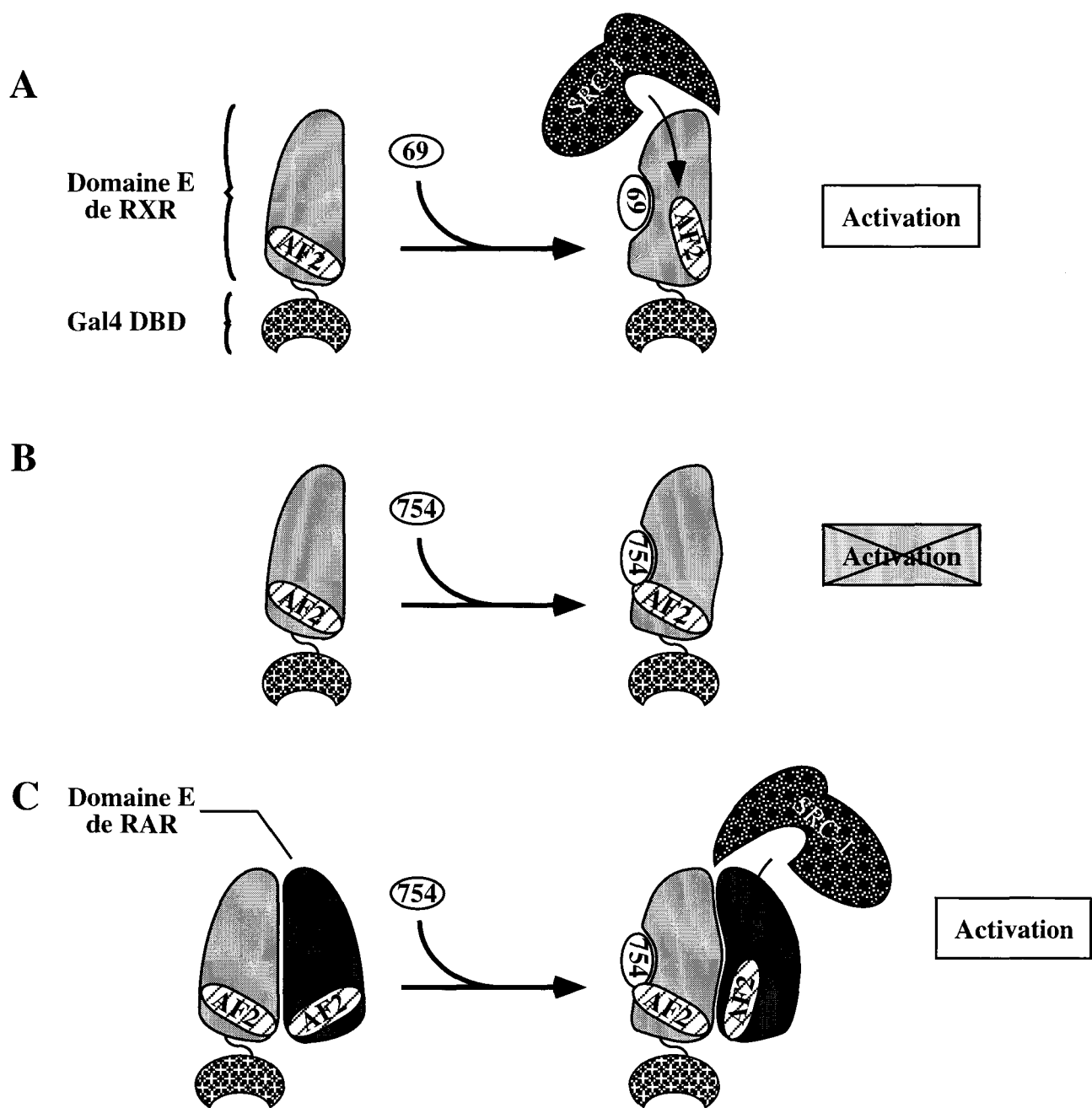


Fig.27: Effet du ligand fantôme: A et B: la fixation du ligand spécifique de RXR LG100754, contrairement à LG1069, est incapable d'activer RXR. C: en revanche, ce même ligand, en se fixant sur RXR est capable d'induire la transcription à travers le domaine AF2 de RAR.

4. Conclusions.

Ces différentes études nous ont permis de mettre en lumière le fait que les récepteurs nucléaires ne sont pas une juxtaposition de différents domaines indépendants et "indifférents" l'un à l'autre, mais sont un ensemble de structures interdépendantes et complexes. Elles nous ont en outre montré que le signal véhiculé par une hormone peut être différemment interprété en fonction du partenaire de son propre récepteur.

On peut déjà envisager que les effets allostériques que nous avons décrits ne se limitent probablement pas au contexte du dimère formé par deux récepteurs nucléaires mais pourraient se répercuter sur les protéines avec lesquelles ils interagissent.

V. PML/RAR et les leucémies promyélocyaires aiguës.

Les récepteurs nucléaires sont impliqués dans les mécanismes gouvernant l'homéostasie, le développement et la différenciation dans de nombreux organismes { voir pour revue (Beato et al., 1995; Kastner et al., 1995; Thummel, 1995) }. Par conséquent, leur altération est souvent associée à de nombreuses pathologies d'origine génétique (Chambon, 1996). Le cas de la chimère PML/RAR, impliquée dans les leucémies promyélocyaires aiguës (APL), servira dans ce chapitre à illustrer la complexité des processus conduisant au développement d'un phénotype cancéreux.

1. Généralités.

De nombreux cas de leucémies et de sarcomes sont associés à des translocations chromosomiques. Parmi ces translocations, certaines se caractérisent par la fusion de deux séquences codantes, conduisant à l'expression de protéines chimériques. Une grande majorité de ces translocations implique des protéines nucléaires, et plus particulièrement des facteurs de transcription { voir (Rabbitts, 1994) pour revue }.

Les leucémies promyélocyaires aiguës (APL) sont associées dans plus de 90% des cas avec la translocation chromosomique t(15;17)(q22;q11-21). Bien que le site de recombinaison puisse légèrement varier d'un cas à l'autre, le nouveau locus ainsi formé code une protéine chimérique appelée PML/RAR, constituée de la majeure partie amino-terminale de PML fusionnée à RAR α , délété de son domaine amino-terminal A {(deThé et al., 1991; Kakizuka et al., 1991; Pandolfi et al., 1991; Kastner et al., 1992), **Fig.28**}. A noter que dans une vaste majorité des cas, la translocation t(15;17) est la seule aberration chromosomique détectée tandis que d'autres gènes fréquemment associés aux processus tumoraux (en particulier p53 ou Ras) apparaissent normaux (Longo et al., 1993). Le produit de la translocation chromosomique t(15;17) semble donc être le principal facteur responsable des leucémies promyélocyaires aiguës.

D'un point de vue cytologique, les APL présentent trois caractéristiques principales { voir la revue (deThé, 1996) }:

- l'accumulation de "blastes" à faible prolifération intrinsèque.
- le blocage de la différenciation de la lignée myélomonocytaire.
- une très forte sensibilité au traitement par l'acide trans-rétinoïque (tRA).

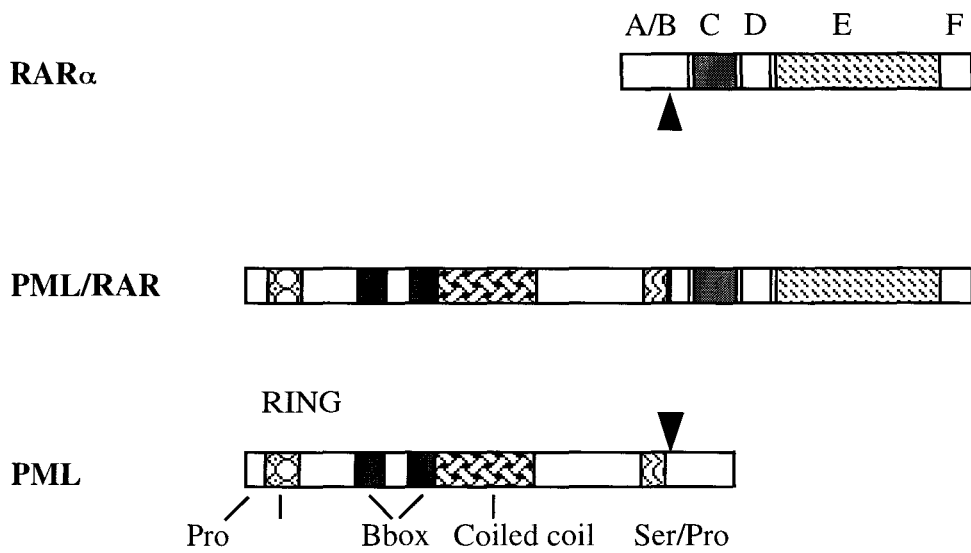


Fig.28: Structure de l'une des chimères PML/RAR. Pour RAR, les domaines sont signalés selon la nomenclature habituelle. Pour PML, Pro, Ser/Pro: Amino-acides les plus fréquents dans le domaine indiqué; RING: RING finger. Les triangles pleins inversés représentent les sites de recombinaison.

Cette sensibilité à l'acide rétinoïque est mise à profit dans le traitement des APL chez l'homme, traitement qui, en forçant les cellules cancéreuses dans leur voie de différenciation, se traduit par une rémission spectaculaire de ces leucémies {voir les revues (Breitman et al., 1981; Chomienne et al., 1996)}. Ceci suggère fortement que la chimère PML/RAR se comporte comme un inhibiteur de la différenciation myéloïde, dont l'effet est réversible par tRA.

A partir de ces quelques éléments (blocage de la différenciation associé à l'apparition d'une protéine chimérique, effet différenciateur de tRA), nous présenterons les différents mécanismes qui ont été proposés pour expliquer l'apparition du phénotype des APL, notamment:

- envers quelle protéine PML/RAR pourrait se comporter comme dominant négatif, PML ou RAR α ?
- quel pourrait être le gain de fonction acquis par cette chimère?
- par quel mécanisme moléculaire l'acide rétinoïque exerce-t-il son effet thérapeutique?

2. Effets dominants négatifs de PML/RAR.

Le rôle de "dominant négatif" a très vite été proposé comme mécanisme d'action de la chimère PML/RAR. Cette hypothèse a notamment été étayée en constatant qu'un phénotype similaire à celui des APL peut être induit par la surexpression de dominants négatifs de RAR α (Tsai et al., 1992; Tsai et Collins, 1993; Tsai et al., 1994).

En raison de sa nature chimérique, PML/RAR peut interférer soit avec la fonction normale du récepteur RAR α , soit avec celle de la protéine PML, soit encore avec les deux. Le rôle potentiel joué par tRA au cours de la différenciation myéloïde ainsi que l'effet spectaculaire de cette hormone dans le traitement de ces leucémies ont très logiquement favorisé l'hypothèse selon laquelle PML/RAR bloque la fonction de RAR α .

2.1 Interférence PML/RAR - RAR.

Contrairement à d'autres formes oncogéniques de récepteurs nucléaires {notamment v-erbA, (Zenke et al., 1988)}, la partie RAR fusionnée à PML n'a subi, en dehors de la délétion de son domaine A, aucune mutation (deThé et al., 1991; Kakizuka et al., 1991; Kastner et al., 1992). Il n'en reste pas moins possible que la fusion de RAR α à PML puisse conduire à la répression de certains gènes cibles de RAR α nécessaires à la différenciation myéloïde, ou à la stimulation inappropriée de gènes inhibant ce processus.

Plusieurs aspects de la "signalisation" de RAR α peuvent être altérés dans la chimère PML/RAR conduisant soit: (i) à l'apparition de nouvelles propriétés de régulation transcriptionnelle; (ii) à l'apparition d'un effet dominant négatif direct ou indirect résultant de la compétition pour la fixation à l'ADN ou de la compétition pour un partenaire commun.

2.1.1 PML/RAR dérégule-t-il l'expression des cibles de RAR?

a) Reconnaissance et fixation à l'ADN.

La fusion de PML à RAR α n'affecte que très marginalement les fonctions de fixation de l'hormone et de fixation à l'ADN du récepteur (Kastner et al., 1992). Ainsi, la capacité de fixation à l'ADN de PML/RAR ne se distingue de celle de RAR α que vis à vis du motif DR1, sur lequel PML/RAR se fixe très mal (Perez et al., 1993).

En revanche, bien que le registre des motifs fixés par PML/RAR soient très similaire à celui fixé par RAR α , la modalité de la fixation est singulièrement altérée:

- alors que la fixation de RAR α requiert son hétérodimérisation à RXR, PML/RAR est capable de se fixer avec haute affinité sous forme d'homodimère (Perez et al., 1993).
- la formation de cet homodimère ne repose plus sur l'interaction entre domaines E, mais passe exclusivement par l'interaction des domaines "coiled-coil" situés à l'extrémité N-terminale de PML (Perez et al., 1993; Grignani et al., 1996).
- PML/RAR reste cependant capable d'interagir avec RXR, via le domaine E. Ces différentes propriétés de dimérisation permettent à PML/RAR d'interagir avec l'ADN sous la forme d'au moins quatre complexes différents (**Fig.29**). La formation de chacun de ces complexes dépend de la quantité respective de la chimère et du partenaire RXR. Dans les complexes II, III et IV, RXR prend une part active dans la fixation à l'ADN, c'est à dire qu'il contacte effectivement l'un des sites du motif, l'autre étant fixé par le domaine C du RAR chimérique (Perez et al., 1993).

Il semble toutefois qu'*in vivo*, dans les cellules dérivées d'APL (qui expriment différentes isoformes de RXR), les homodimères PML/RAR sont minoritaires (Perez et al., 1993; Weis et al., 1994; Grignani et al., 1996).

In vivo, les propriétés de fixation de PML/RAR se distinguent donc peu de celles de RAR α .

b) Activité transcriptionnelle de PML/RAR.

La fusion de RAR α à un nouveau "domaine" constitué par PML, peut se traduire, comme cela a été suggéré pour d'autres chimères comme EWS/FLI (May et al., 1993; Bailly et al.,

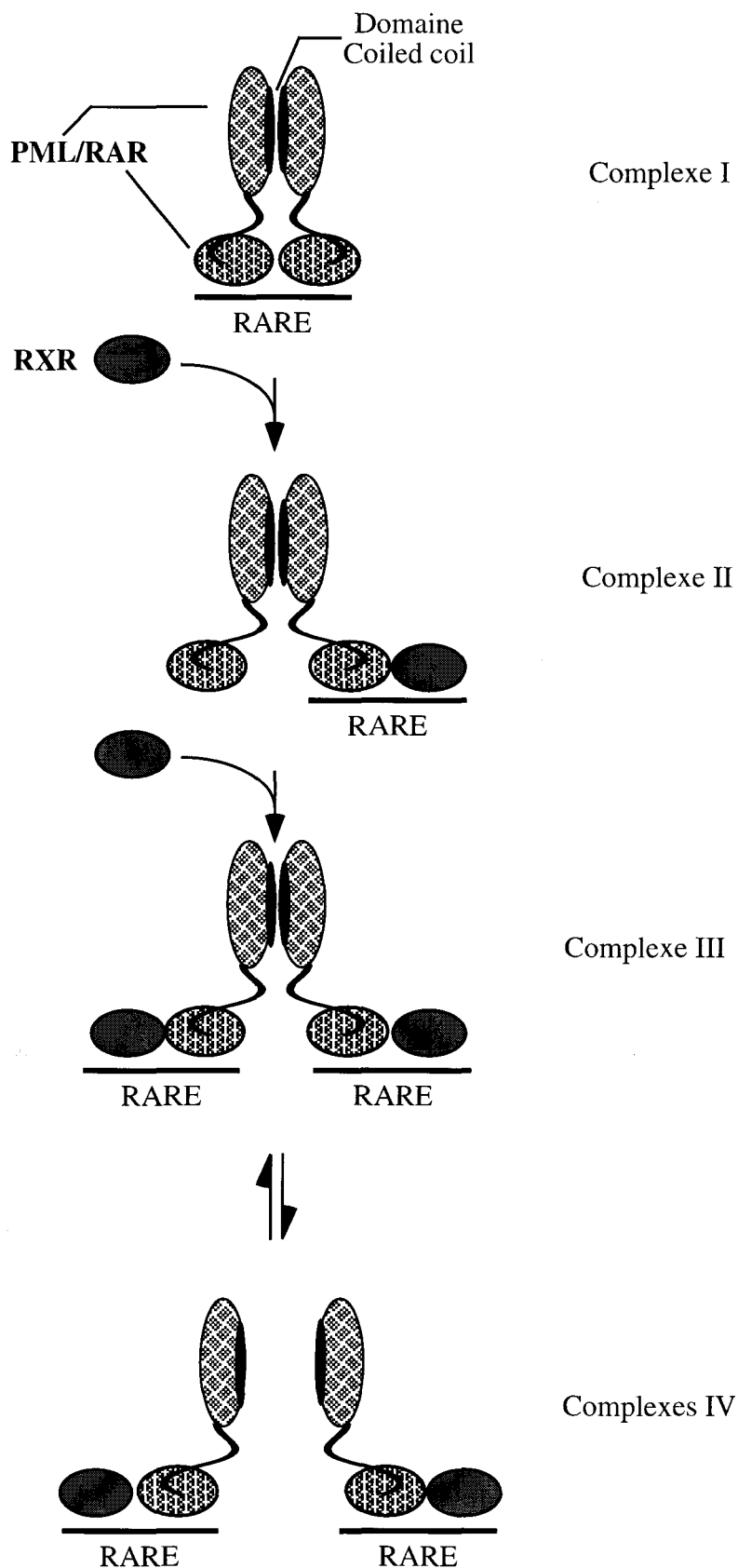


Fig.29: Représentation schématique des différents complexes PML/RAR-RXR observés *in vitro* sur un élément de réponse (RARE). Le domaine "Coiled coil" de PML/RAR, qui permet son homodimérisation, est indiqué.

1994), par une importante altération de ses caractéristiques transcriptionnelles. Pourtant, seuls quelques promoteurs répondent de manière différente à la stimulation de RAR α ou de PML/RAR par tRA. Ainsi, la transactivation médiée par PML/RAR en présence d'hormone est soit plus faible que celle de RAR α (dans le cas du promoteur mRAR α 2 par exemple), soit plus forte {comme dans le cas de mCRABPII, (Kastner et al., 1992)}. L'intensité respective de ces réponses transcriptionnelles est modérément altérée en fonction du type de cellules choisies pour ces expériences, ce qui suggère que PML/RAR et RAR α utilisent probablement les mêmes coactivateurs dans la régulation transcriptionnelle (Kastner et al., 1992).

2.1.2 PML/RAR et interférence avec RXR.

Rappelons que RXR constitue un partenaire partagé par de nombreux récepteurs, tels que RAR, TR, VDR, ainsi que par différents récepteurs orphelins {voir la revue (Mangelsdorf et al., 1995)}. Puisque PML/RAR forme des hétérodimères avec RXR, il est possible d'envisager que la chimère séquestre les protéines RXR et les rende ainsi indisponibles pour d'autres récepteurs.

Il semble par exemple que la transactivation médiée par le récepteur à la vitamine D3 (VDR) est significativement inhibée en présence de la chimère (Perez et al., 1993). L'effet inhibiteur de PML/RAR sur la fonction de VDR pourrait en partie expliquer le blocage de la différenciation des cellules APL. La vitamine D3 joue un rôle important dans la différenciation des précurseurs myéloïdes U937, cellules qui sont en revanche peu sensibles à l'acide rétinoïque (Lubbert et al., 1991; Testa et al., 1993). La différenciation de ces cellules, en réponse à la vitamine D3 et au TGF β , est en effet fortement inhibée par l'expression de PML/RAR (Grignani et al., 1993; Grignani et al., 1996).

Cependant, l'inhibition de la fonction différenciatrice de VDR par PLM/RAR reste corrélative: ces études n'ont pas démontré que l'effet de PML/RAR était directement dû à l'inhibition de VDR et ne résultait pas "simplement" du blocage d'une autre étape du processus de différenciation, indépendante de la fonction de VDR. Pour étayer un effet inhibiteur direct de PML/RAR sur VDR, il serait intéressant de déterminer si l'expression de la chimère dans ces cellules bloque l'induction de p21, un gène cible de la vitamine D3 dans la lignée U937 (Liu et al., 1996). L'expression ectopique de p21, un inhibiteur de cdk (cyclin dépendant kinase) habituellement impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire, suffit en effet à induire leur différenciation. Ceci suggère que p21 joue un rôle essentiel dans ce programme, et que sa non induction, résultant de l'inhibition fonctionnelle de VDR imposée par PML/RAR, pourrait conduire au blocage de leur différenciation.

2.1.3 PML/RAR et interférence transcriptionnelle avec AP1.

Comme nous l'avons vu au cours du chapitre sur la régulation transcriptionnelle, certains récepteurs nucléaires interfèrent avec la signalisation par le complexe AP1 (Kamei et al., 1996). Le rôle joué par le complexe AP1 dans la régulation de la prolifération cellulaire, qui est réduite dans les cellules de patients atteints d'APL (Raza et al., 1990), ainsi que le rôle inducteur du TPA (un activateur de la fonction AP1) dans la différenciation de lignées myéloïdes (Graf et al., 1992), ont donc suscité un examen attentif des interférences possibles entre PML/RAR et AP1.

Rappelons que l'interférence entre récepteurs nucléaires et AP1 résulte, au moins en partie, d'une compétition pour un médiateur transcriptionnel commun, p300 (Kamei et al., 1996): de manière simpliste, la fixation du ligand (ici tRA) entraîne la dissociation du co-répresseur (Horlein et al., 1995) et l'interaction de RAR α avec p300 (Kamei et al., 1996). La protéine p300 étant en quantité limitante dans la cellule, son interaction avec RAR α se fait au détriment du complexe AP1, dont la transactivation se trouve en conséquence diminuée (**Fig.30A, B**). A l'inverse de ces résultats, et contrairement à RAR α , PML/RAR diminue l'activité transcriptionnelle de AP1 en absence d'hormone et stimule nettement cette activité lorsque l'hormone est présente (Doucas et al., 1993).

Il est donc possible que PML/RAR, en présence d'acide rétinoïque, potentialise l'effet transactivateur de AP1 et favorise donc son effet différenciateur.

Comment peut on expliquer le comportement symétriquement opposé de PML/RAR et de RAR α vis à vis de AP1?

Notons d'abord que PML/RAR ne se comporte pas de manière "neutre" vis à vis de AP1, comme si la chimère avait perdu la capacité à "séquestrer" p300, mais bel et bien, en présence d'hormone, comme un facteur potentiateur de sa fonction transactivatrice. La fusion de PML à RAR confère donc à la chimère un gain de fonction. La transrépression de AP1 par PML/RAR en absence d'hormone ne peut pas s'expliquer par la séquestration constitutive de p300 par PML/RAR, car dans ce cas la chimère devrait activer la transcription depuis son motif RARE en absence d'hormone, ce qui n'est pas observé. En revanche, il est possible que PML/RAR interagisse directement (peut être grâce à PML) avec le complexe AP1, inhibant ainsi son association avec p300. La sur-stimulation de la réponse AP1 en présence de ligand résulterait ainsi du recrutement de p300 non pas par AP1, mais par PML/RAR (**Fig.30B, C**). Cependant, l'interaction physique entre AP1 et PML/RAR reste à démontrer.

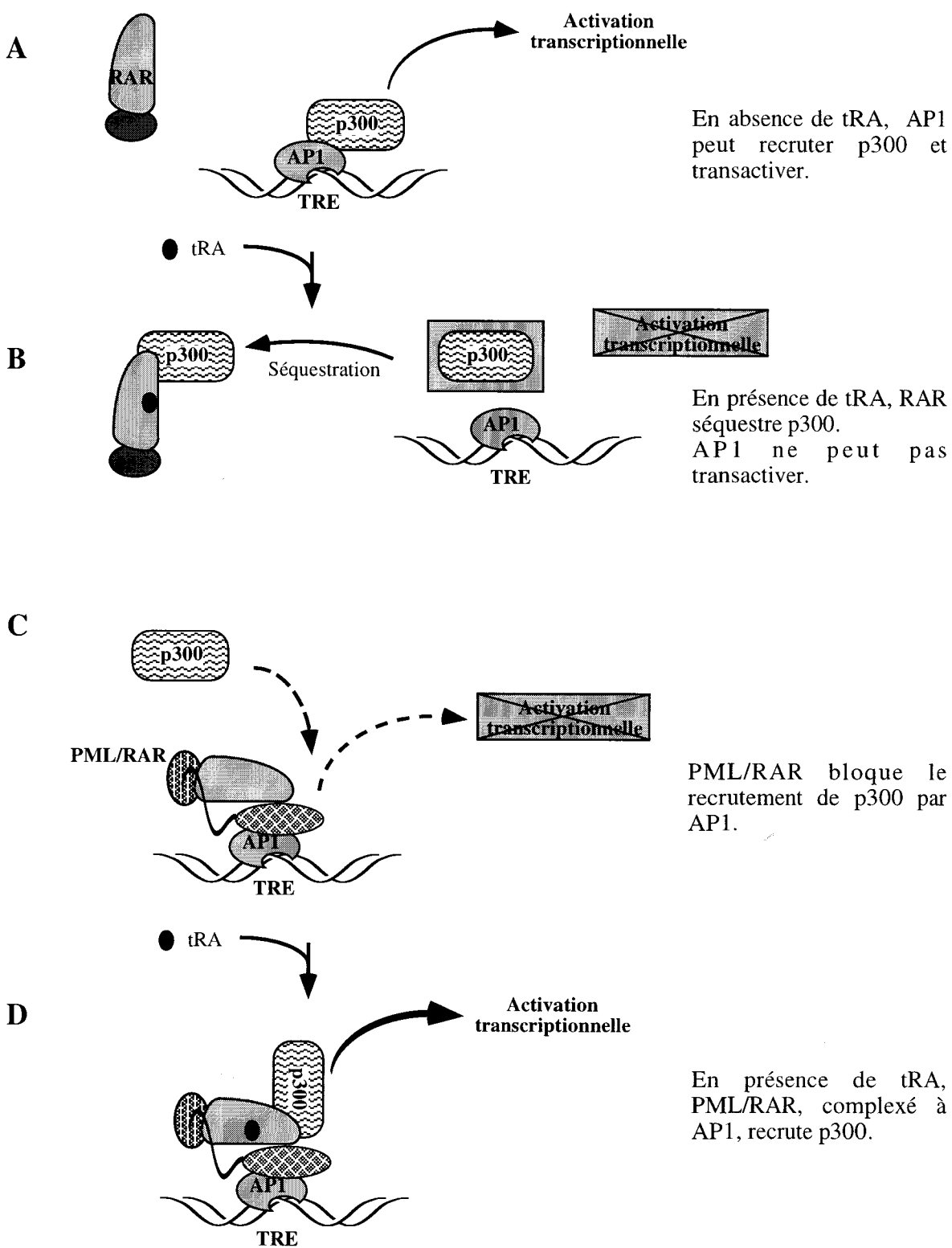


Fig.30: Modèle d'interférence transcriptionnelle entre PML/RAR et AP1.
TRE: élément de réponse à AP1.

2.1.4 Conclusions.

En dehors de l'interférence avec AP1, PML/RAR se distingue peu du récepteur RAR α normal. L'argument le plus sérieux permettant d'écarter l'hypothèse selon laquelle PML/RAR exerce son effet inhibiteur en interférant avec les cibles naturelles de RAR, repose sur le fait qu'une version de PML/RAR délétée dans sa partie amino-terminale, et dont l'activité transcriptionnelle est semblable à celle de la chimère originale, est totalement dépourvue d'effet inhibiteur sur la différenciation (Grignani et al., 1996).

Le fait que l'intégrité de la partie amino-terminale de la partie PML de la chimère (impliquée dans des interaction avec la protéine PML normale), soit nécessaire à son activité inhibitrice, suggère que PML/RAR pourrait interférer avec la fonction de la protéine PML normale.

2.2 Interférence PML/RAR - PML.

2.2.1 Que sait on de PML?

S'il était facile d'identifier et donc d'étudier les fonctions de RAR α qui pouvaient être la cible de PML/RAR (fixation à l'ADN, transactivation), il n'en va pas de même pour l'interférence entre la chimère et PML. La raison en est simple: la fonction de PML est encore largement inconnue.

a) Structure de PML.

La protéine PML contient différents motifs structuraux: sa partie amino-terminale contient trois régions riches en résidus Cys/His et une région en hélice alpha:

- la première de celles-ci constitue ce que l'on appelle un "RING finger", domaine retrouvé au sein de plusieurs protéines impliquées dans des tâches aussi différentes que le contrôle de la transcription où la réplication et la réparation de l'ADN {revue dans (Freemont, 1993)}. Néanmoins derrière l'appellation "RING finger" donnée d'après des homologies de séquences primaires, se cachent des structures tridimensionnelles très différentes voir (Borden et Freemont, 1996).
- le deuxième domaine est formé par deux régions appelées "B Box", de structure apparentée au doigt de Zinc.
- enfin, cette région amino-terminale se termine par un long domaine "Coiled-coil" dont on suppose qu'il adopte une structure en hélice alpha.

En fait, la région qui comprend ces différents domaines constitue la signature d'une nouvelle famille appelée "B Box family". De manière intrigante, bien que peut être fortuite,

quatre membres de cette famille sont directement impliqués dans une protéine de fusion (PML, TIF1/T18, et RFP), ou ont été associés, dans le cas de BRCA1 dans le cancer du sein, avec un processus de tumorigenèse. Curieusement, ces quatre protéines ont une caractéristique commune: leur localisation nucléaire ponctuée (Kikuchi et al., 1990; Weis et al., 1994; Chen et al., 1995; LeDouarin et al., 1995).

b) Localisation nucléaire de PML.

La localisation nucléaire de PML est connue de longue date. En effet, les cytologistes disposaient de nombreux séra provenant de patients atteints de diverses maladies auto-immunes. Les auto-anticorps dérivés de ces séra, révélaient en immunofluorescence, des patrons de marquages nucléaires ponctués, par opposition aux marquages diffus observés pour la plupart des autres protéines nucléaires (Ascoli et Maul, 1991). Ce n'est que plus tard que les protéines reconnues par ces auto-anticorps furent clonées et caractérisées. L'une d'entre elles était PML.

En fait, PML s'associe à une structure nucléaire particulière appelée "Nuclear Bodies" ou "PML Oncogenic Domains" (PODs), dont le nombre varie entre 10 et 20 par noyau {revue dans (Brasch et Ochs, 1992)}. D'autres protéines comme Sp100 ou NDP52 colocalisent avec PML dans ces PODs (Dyck et al., 1994; Koken et al., 1994; Weis et al., 1994). Ces structures ont gardé longtemps leur mystère, et on commence à peine aujourd'hui à avoir une idée de leur fonction.

Contrairement à la vision initiale figée où il semblait rivié aux PODs, PML semble plutôt avoir la "bougeotte": il forme une quinzaine de points en phase G1 tardive, se disperse au cours de la phase S, reforme quelques points durant la phase G2 qui se réduisent à deux ou trois "amats" périchromosomaux lors de la mitose, passe ensuite par une localisation cytoplasmique puis périnucléaire avant de se réassembler en une quinzaine de points en phase G1 (Koken et al., 1995)!

c) PML et la croissance cellulaire.

Le lien entre PML et la croissance cellulaire est relativement récent. La surexpression de PML atténue fortement la transformation de fibroblastes NIH3T3 par certains oncogènes comme neu (dont la fonction est similaire à celle du récepteur à l'EGF) mais pas par d'autres comme Ha-ras (Mu et al., 1994). Ces résultats furent ensuite élargis par Koken et coll. qui montrèrent que la surexpression de PML dans différents fibroblastes ralentit fortement leur croissance (Koken et al., 1995). De manière anecdotique, ces auteurs ont noté que la

surexpression de PML corrèle avec l'apparition de noyaux de petite taille, alors que la surexpression de PML/RAR se traduit par un élargissement du diamètre nucléaire.

d) PML, infection adénovirale et interférons.

L'intérêt porté à PML dans le contexte de l'infection adénovirale repose sur des études ultrastructurales montrant que les phases tardives de transcription et de réplication de Ad5 prennent place dans des régions distinctes du noyau, semblables à celles marquées par des anticorps dirigés contre PML, et que l'on appelle corps d'inclusion ou "viral domains", (Pombo et al., 1994).

Sans trop entrer dans les détails, on peut dire que les phases précoces de l'infection adénovirale s'accompagnent rapidement de la relocalisation de PML et de Sp100, initialement localisés dans les PODs, vers des structures indéfinies en formes de "brindilles" (Doucas et al., 1996). La relocalisation de PML dans ces structures en "brindilles" semble dépendre de la protéine codée par la séquence codante n°3 de l'unité transcriptionnelle E4 (E4-ORF3), protéine qui colocalise avec PML durant les premières phases de la réplication (Carvalho et al., 1995; Doucas et al., 1996). Pourtant, la relocalisation de PML ne semble pas nécessaire à l'infection virale puisque une autre protéine virale, E4-ORF6, peut fonctionnellement remplacer E4-ORF3 sans induire la relocalisation de PML (Carvalho et al., 1995). Dans ce cas pourtant, la relocalisation de Sp100, une autre protéine des PODs, a toujours lieu.

La relation entre l'infection virale et les PODs est aussi illustrée lors de l'infection par Herpes Simplex Virus: dans ce cas, les composants des PODs ne sont pas relocalisés mais simplement éliminés (Maul et al., 1993).

Curieusement, les interférons, caractérisés par leur effet antiprolifératif, immunomodulateur et surtout par leur activité antivirale, pourraient aussi relier PODs et infection virale. Il se trouve en effet que PML, de même que les composants des PODs en général (comme Sp100), sont fortement induits par les interférons (Guldner et al., 1992; Stadler et al., 1995). Or, les résultats de Doucas et coll. indiquent qu'il existe une corrélation forte entre l'induction des composants des PODs et la résistance à l'infection: en effet, la surexpression de PML bloque sa propre relocalisation dans les structures en "brindilles" suite à l'infection, et suffit parallèlement à inhiber la réplication virale. A noter que la surexpression de PML se traduit non seulement par une augmentation de la taille des PODs mais aussi par une augmentation de l'intensité de marquage du facteur Sp100 (Koken et al., 1994). Il semble donc que l'induction de taux élevés de PML (ou de Sp100) par des agents antiviraux comme les interférons, permette de "protéger" les PODs de la réorganisation.

Il est intéressant de noter que E1A, une autre protéine virale précoce, pourrait contribuer à bloquer l'induction des composants des PODs par les interférons: E1A, en séquestrant p300, un coactivateur nécessaire au facteur STAT2 (Signal Transducer and Activators of

Transcription) impliqué dans la voie de signalisation des interférons, bloque ainsi l'une des voies d'induction de PML (Stadler et al., 1995; Bhattacharya et al., 1996).

L'ensemble de ces résultats indique que **la destruction ou le détournement de la structure des PODs** est, plus que la simple délocalisation de PML, **une étape fréquemment associée, sinon nécessaire, à l'infection adénovirale**. Réciproquement, il semble que le **"renforcement" de la structure des PODs**, notamment par l'induction de l'expression de ses composants, **contribue à inhiber la réplication virale**.

Il serait intéressant d'étudier, dans le cadre "physiologique" de l'infection virale, si la chimère PML/RAR interfère effectivement avec la fonction de la protéine PML endogène. Si on considère que les PODs sont des structures que le virus doit "éliminer" pour permettre sa réplication, on s'attendra à ce que PML/RAR qui détruit ces structures, facilite l'infection virale. Si au contraire la destruction des PODs ne reflète que le "détournement utilitaire" de PML ou de Sp100, nécessaires par exemple à la réplication virale, alors PML/RAR, en séquestrant PML, devrait inhiber l'infection.

e) Conclusion.

On pourra retenir de ce petit catalogue, que PML est une protéine appartenant au PODs, des organelles nucléaires particuliers, dynamiques, de composition et de structure complexes.

Quant à la fonction exacte de PML, elle reste encore bien mystérieuse. Le fait que PML, et peut être plus généralement les autres composants des PODs, soient les cibles de plusieurs protéines adénovirales, tant au niveau de leur induction (qui est abolit par E1A) qu'au niveau de leur localisation (perturbée par E4-ORF3), suggère toutefois que ces facteurs jouent un rôle essentiel dans certains processus cellulaires que le virus doivent empêcher ou détourner à leur profit.

2.2.2 PML/RAR, effet sur la prolifération cellulaire et l'apoptose.

La plupart des oncogènes ont un effet soit sur la prolifération cellulaire, qu'ils stimulent {comme Myc ou Ras, voir la revue (Hunter, 1997)}, soit sur le contrôle du phénomène d'apoptose, qu'ils empêchent {comme bcl2, voir pour revue (Yang et Korsmeyer, 1996)}.

PML ayant probablement un rôle antiprolifératif ou oncosuppresseur (voir §2.2.1), il semblait possible que cette fonction soit altérée par la chimère PML/RAR. Pourtant, l'interférence de PML/RAR avec cette fonction de PML est assez peu convaincante: la coexpression de la chimère ne diminue que partiellement l'effet oncosuppresseur de PML

(Mu et al., 1994). D'autre part, PML/RAR ne semble pas avoir d'activité oncogénique intrinsèque dans un test de surexpression en fibroblastes (Grignani et al., 1993).

En revanche, la surexpression de PML/RAR dans les précurseurs myéloïdes U937 réduit significativement leur apoptose spontanée. L'effet anti-apoptotique de PML/RAR est particulièrement important dans des conditions de faible concentration en sérum, (Grignani et al., 1993). L'effet anti-apoptotique de la chimère a récemment été corroboré par une étude *in vivo*: dans un modèle animal d'APL, le traitement par l'acide rétinoïque se traduit par l'apoptose des amas de splénocytes indifférenciés (Grisolano et al., 1997).

L'ensemble de ces résultats suggère que **l'expression de PML/RAR ne se traduit pas par un désordre prolifératif, mais entraînerait plutôt une inhibition des mécanismes permettant l'apoptose des cellules.**

3. Effet différenciateur de tRA: mécanisme(s) mis en jeu?

L'effet différenciateur de l'acide rétinoïque sur les cellules APL peut être considéré sous deux angles distincts:

- tRA est un inducteur de la différenciation (rôle positif):

La chimère, en présence de tRA, se comporte alors comme un activateur "classique", soit des gènes cibles de RAR α , soit plus probablement des gènes cibles de VDR (PML/RAR transactive depuis les motifs VDRE; **Fig.31 hypothèse n°1**).

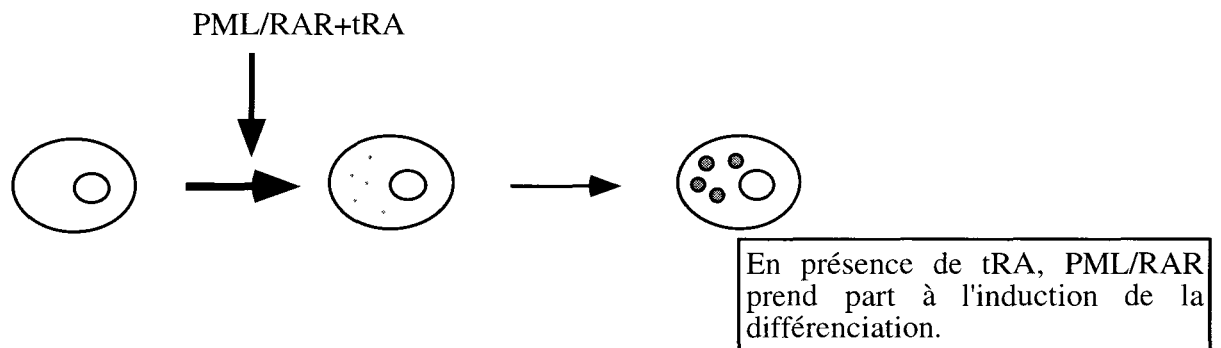
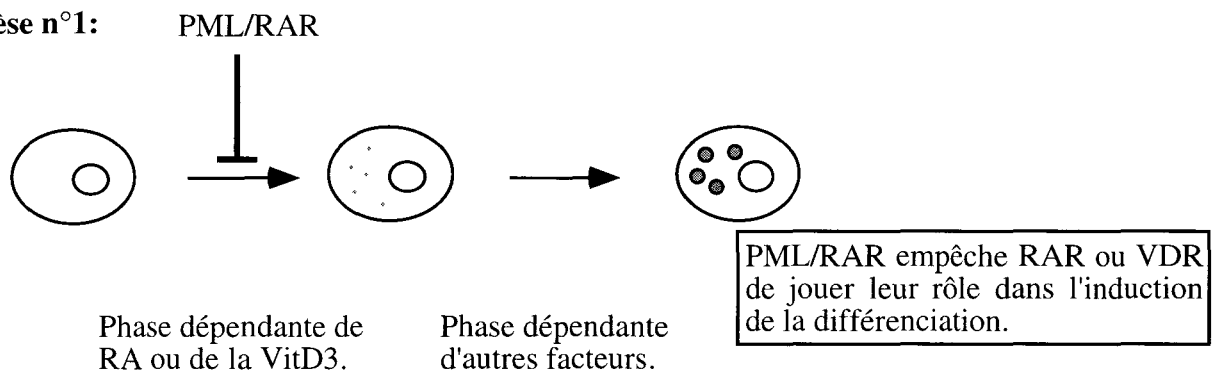
- tRA entraîne un "déblockage" de leur différenciation:

Dans ce cas, tRA lèverait un effet inhibiteur que PML/RAR exerce sur une fonction nécessaire à la poursuite du programme de différenciation, sans pour autant participer à l'induction de celui-ci (**Fig.31 hypothèse n°2**).

En fait, cette alternative repose sur deux postulats principaux:

- les cellules APL sont bloquées à un stade dépendant de l'un des inducteurs, RA ou VitD3. La chimère joue alors un rôle actif dans la poursuite du programme de différenciation induit par tRA.
- les cellules APL sont bloquées à un stade de différenciation déjà "engagé": l'acide rétinoïque débloque cet arrêt mais n'est pas, ou plus, nécessaire au programme de différenciation.

Hypothèse n°1:



Hypothèse n°2:

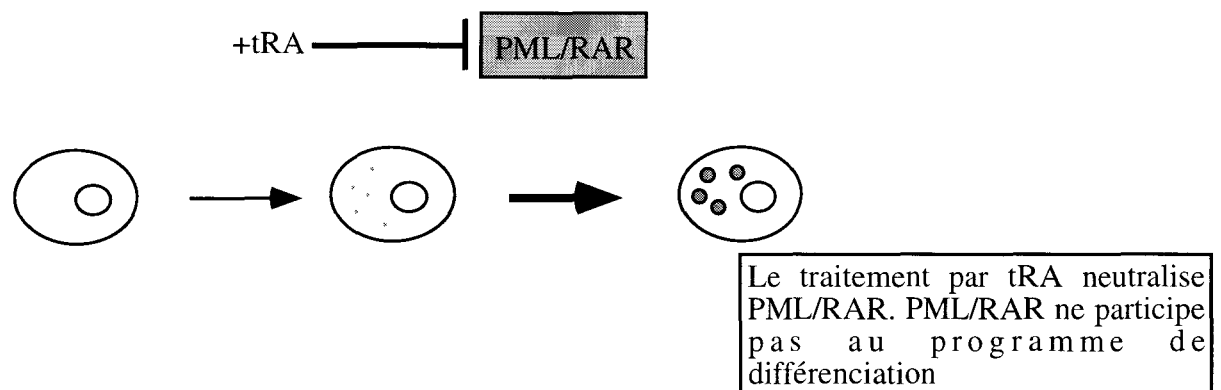
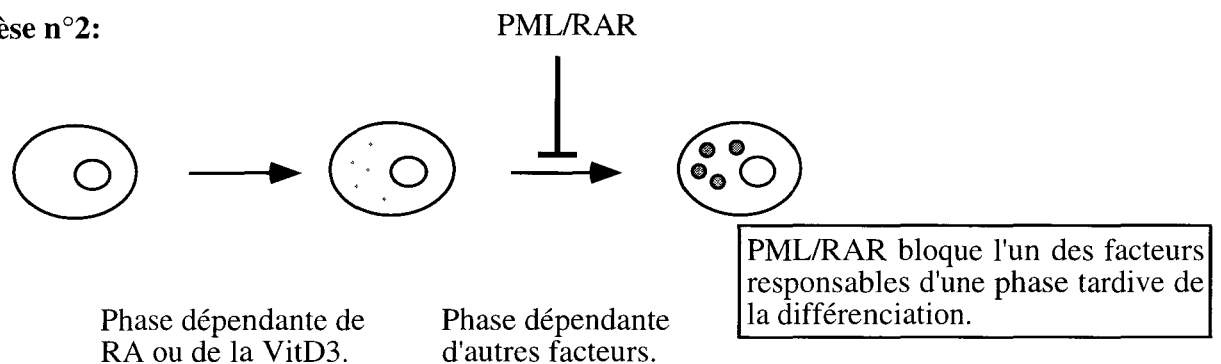


Fig.31: Deux modèles possibles expliquant l'effet inhibiteur de PML/RAR et l'effet différenciateur de tRA sur la différenciation des cellules APL.

3.1. PML/RAR, un récepteur à l'acide rétinoïque qui mime le rôle du récepteur à la vitamine D3?

Nous avons vu qu'à l'exception de l'interférence avec AP1, les caractéristiques transcriptionnelles de PML/RAR et de RAR α en réponse à l'acide rétinoïque sont très similaires. Il est donc possible que PML/RAR active les gènes normalement dépendant de RAR α . Il a même été suggéré que la chimère PML/RAR était responsable de l'induction très rapide de RAR α observée après stimulation des cellules APL par tRA (Agadir et al., 1995).

Nous avons vu que PML/RAR se fixe sur les éléments de réponses typiques de VDR {les motifs DR3 (Perez et al., 1993)}. Le traitement par tRA pourrait donc mimer, grâce à PML/RAR, les effets de la vitamine D3, et ainsi induire le programme de différenciation normalement assuré par VDR. Cet argument est clairement illustré dans le cas des précurseurs promyélocytiques U937: la différenciation de ces cellules dépend strictement de la vitamine D3, et dans une moindre mesure du TGF β . L'acide rétinoïque est dans ce cas un mauvais inducteur (Olsson et al., 1982). Or l'expression de PML/RAR dans ces cellules rend leur différenciation très sensible à l'acide rétinoïque, et lève la dépendance à la vitamine D3 (Grignani et al., 1993). PML/RAR créerait donc une dépendance artéfactuelle à l'Acide rétinoïque.

PML/RAR se comporterait donc, en absence de ligand, comme un inhibiteur de RAR ou de VDR, alors qu'**en présence de tRA, PML/RAR mimant ces deux récepteurs, jouerait un rôle actif, inducteur de la différenciation.**

3.2 PML/RAR, une version inductible par de PML?

La fusion d'un domaine de fixation de l'hormone à des protéines de fonctions très diverses {facteurs de transcription, protéines kinases, voir la revue de (Picard, 1994)} rend leur activité dépendante de la fixation du ligand. Ainsi, PML/RAR pourrait se comporter comme une version de PML inductible par l'acide rétinoïque. La fonction de PML n'étant pas connue, on a donc examiné l'effet de tRA sur sa localisation subcellulaire.

En absence de tRA, l'expression de PML/RAR induit la délocalisation de la protéine PML endogène (Dyck et al., 1994; Koken et al., 1994; Weis et al., 1994). Dans la lignée cellulaire NB4 {qui contient la translocation t(15;17)}, mais aussi dans les cellules isolées de patients atteints d'APL, la protéine PML endogène se trouve localisée dans des structures ponctuelles plus petites et mal définies d'un point de vue ultrastructural ("micropoints"). Ces nouveaux sites sont aussi intensément marqués par des anticorps spécifiques de PML/RAR, suggérant que la relocalisation de PML vers ces sites résulte d'une séquestration par la chimère. PML/RAR est en effet capable d'hétérodimériser avec PML grâce à leur domaine "Coiled-

coil" respectif. A noter que PML n'est pas le seul composant des PODs à être délocalisé par l'expression de la chimère, mais que Sp100, un autre composant des PODs, et RXR se trouvent aussi dans ces "micropoints".

Le traitement des cellules NB4 par de fortes doses de tRA induit une spectaculaire relocalisation de ces protéines dans leurs domaines naturels respectifs (les PODs pour PML et Sp100, nucléoplasmique diffus pour RXR), concomitante de leur différenciation (Dyck et al., 1994; Koken et al., 1994; Weis et al., 1994). La reformation de PODs intacts suite au traitement par tRA a aussi été observée dans les cellules tumorales de patients traités par tRA. Inversement, certains clones de NB4 résistants à l'effet différenciateur de tRA se montrent incapables de reconstituer leur PODs en réponse à tRA (Dyck et al., 1994; Koken et al., 1994; Weis et al., 1994).

Tout semble donc cohérent: la chimère induirait la délocalisation de la protéine PML endogène, mais aussi de certains autres composants des PODs (comme Sp100). L'acide rétinoïque, en induisant le "relarguage" de PML suite à un changement conformationnel de la chimère (Perez et al., 1993), conduit à la reformation des PODs, et à la relocalisation de PML dans ses structures originelles (**Fig.32**). Pourtant, deux données sont venues contredire ce modèle:

- l'interaction PML-PML/RAR n'est pas déstabilisée par tRA (Perez et al., 1993).
- enfin, l'argument le plus direct a été récemment fourni par Grignani et coll. (Grignani et al., 1996): en utilisant différents mutants de PML/RAR, ces auteurs ont montré que la délocalisation de PML n'est pas un événement nécessaire au blocage de la différenciation. En revanche, bien que ces mutants aient perdu la capacité à délocaliser PML, ils restent capables de séquestrer Sp100.

Il semble donc que, comme dans le cas de l'infection adénovirale, **le phénomène qui est important dans le blocage de la différenciation est avant tout l'intégrité des PODs. tRA (et PML/RAR) jouerait ici un rôle passif vis à vis du programme de différenciation**, permettant principalement aux protéines délocalisées par PML/RAR de retrouver leur localisation et leur fonction normales.

3.3 Restons simples!

Deux articles récents montrent que tRA induit rapidement la dégradation de la chimère PML/RAR (Raelson et al., 1996; Yoshida et al., 1996). Notons que la dégradation de PML/RAR après traitement par tRA a été observée de longue date par de nombreux auteurs {essentiellement par immunofluorescence (Kastner et al., 1992; Dyck et al., 1994; Koken et al., 1994; Weis et al., 1994; Jansen et al., 1995)}. En revanche, la dégradation de la chimère n'est pas observée dans un clone de cellules NB4 incapable de se différencier.

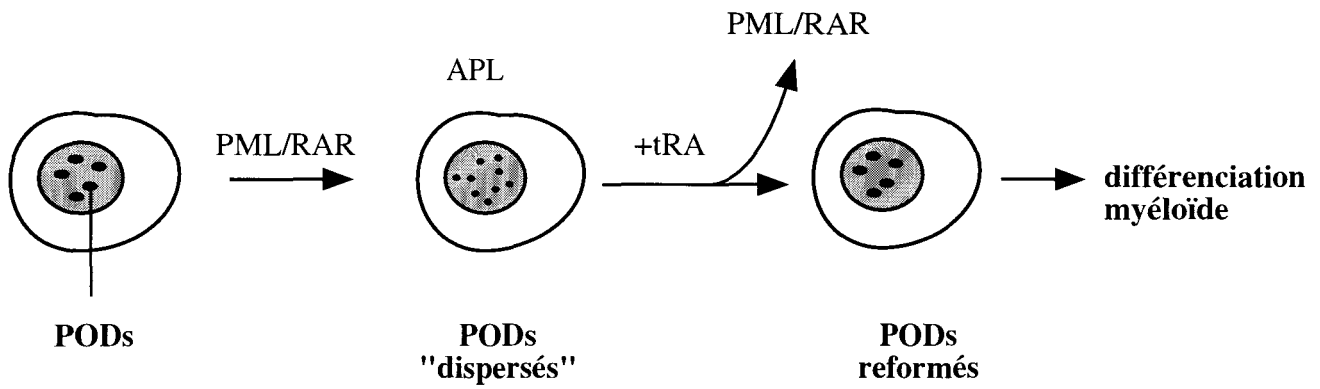


Fig.32: L'effet différenciateur de tRA sur les cellules APL corrèle avec la réorganisation des PODs. D'après Dyck et al, 1994.

Raelson et coll. suggèrent que la dégradation de PML/RAR résulte de la synthèse d'une protéase dont l'expression est spécifiquement induite par tRA (Raelson et al., 1996). Koken et coll. proposent plus simplement que le traitement par tRA induit un changement conformationnel de la chimère {décrit par (Perez et al., 1993)}, qui est "reconnue" et dégradé par une protéase déjà présente (Koken et al., 1994).

Une publication récente pourrait établir un lien intéressant entre les constituants des PODs et la dégradation des protéines: dans le processus d'infection par l'Herpes Virus de type 1 (HSV1), la protéine virale Vmw110, aussi appelée ICP0, est nécessaire aux phases précoces de l'infection (Everett et al., 1997). Comme les produits des séquences codantes E4ORF-3 et E4ORF-6 chez l'adénovirus, Vmw110 migre rapidement vers les PODs et induit la dispersion de PML et de Sp100 (Everett et al., 1997). Curieusement, Vmw110 interagit avec un composant des PODs récemment identifié, la protéine HAUSP {pour Herpesvirus-associated ubiquitin specific protease, (Everett et al., 1997)}. HAUSP, qui possède une activité de dégradation des protéines ubiquitinilées, contribue aussi à stimuler la fonction transactivatrice de Vmw110 (protéine qui possède une fonction similaire à l'activateur viral VP16). Ainsi, HAUSP, qui colocalise partiellement avec PML, est l'une des premières protéines constitutives des PODs dont la fonction est connue. S'il est évidemment trop tôt, et certainement réducteur, de conclure que les PODs sont des structures impliquées dans la dégradation des protéines, ceci permettrait de proposer un mécanisme contribuant à la dégradation de PML/RAR suite au traitement par tRA: on peut en effet imaginer que tRA, induisant un changement conformationnel de PML/RAR, permette son interaction avec l'un des partenaires "normaux" (et encore putatif) de PML, et notamment la protéine HAUSP, entraînant ainsi sa dégradation.

Ici encore, l'effet différenciateur de tRA permettrait donc d'éliminer l'un des facteurs responsables du blocage de la différenciation (PML/RAR), permettant ainsi la relocalisation de PML. Dans ce schéma extrême, **ni l'hormone, ni PML/RAR lui même ne joueraient un rôle direct dans le déroulement du programme de différenciation.**

Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'effet d'une chimère fusionnant PML au récepteur ER, sur la différenciation des cellules U937. Cette chimère devrait délocaliser PML, de manière réversible par les oestrogènes, sans pour autant interférer avec les cibles de RAR ou de VDR, non reconnues par le récepteur ER.

4. Conclusions.

Nous avons vu au cours de ce chapitre qu'il était difficile de "cerner" précisément le mécanisme d'action de PML/RAR. Plusieurs théories ont été proposées, pour expliquer l'effet de la chimère sur la différenciation et sur la transformation. Nous avons vu qu'en dehors de son comportement vis à vis de AP1, PML/RAR ne se distingue pas significativement de RAR α . En revanche, PML/RAR altère fortement la localisation sub-cellulaire de PML et des autres protéines appartenant aux PODs. Il est cependant vraisemblable que la complexité du phénotype des cellules APL, repose sur la conjonction des effets importants dont PML est la cible et sur les effets plus ténus résultant de l'interférence avec RAR.

Soulignons enfin que les fonctions d'une chimère ne se résument probablement pas à la somme des fonctions des protéines qui la compose. Ceci est illustré dans le cas de PML/RAR, où certaines fonctions, comme la fixation sur le motif DR1 par exemple, ont disparues, alors que d'autres, comme le comportement trans-activateur de AP1 par la chimère en présence de tRA, ont été gagnées.

RESULTATS

A functional Rev-erb α responsive element located in the human Rev-erb α promoter mediates a repressing activity.

Guillaume Adelmant, Agnès Bègue, Dominique Stéhelin, et Vincent Laudet.

PNAS (1996), 93, 3553-3558

Résumé :

Rev-erb α est un récepteur nucléaire orphelin, membre de la superfamille des récepteurs nucléaires d'hormone.

Durant la caractérisation des séquences régulatrices de son propre gène, nous avons identifié un site de fixation potentiel pour le récepteur Rev-erb α . Cet article est consacré à la caractérisation des propriétés de fixation de Rev-erb α sur cet élément de réponse naturel (appelé RevDR2), et à l'étude des caractéristiques transcriptionnelles de Rev-erb α médiées depuis ce motif. Nous avons montré que:

- Rev-erb α réprime la transcription du promoteur de son propre gène depuis cet élément de réponse naturel.
- que cet effet inhibiteur de la transcription repose sur un mécanisme actif, dépendant de son domaine carboxy-terminal.

Nous montrons que le RevDR2 est constitué d'une répétition de deux sites hexamériques imparfaits espacés de 2 bases, le site amont étant étendu en 5' par plusieurs nucléotides importants à la fixation de Rev-erb α . Nous révélons:

- que cet élément de réponse est constitué d'un site amont de haute affinité et d'un site aval incapable de permettre seul, la fixation monomérique de Rev-erb α .
- que ce motif permet la fixation de Rev-erb α sous forme de monomère et d'homodimère.
- enfin que l'effet répresseur de Rev-erb α ne dépend pas de son homodimérisation.

Cet article décrit donc deux caractéristiques nouvelles pour le récepteur orphelin Rev-erb α : (i): sa capacité à fixer l'ADN sous forme d'homodimère; (ii): sa fonction de répresseur transcriptionnel. Il est possible que cet élément de réponse permette l'autorégulation négative de l'expression du gène Rev-erb α .

A functional Rev-erb α responsive element located in the human Rev-erb α promoter mediates a repressing activity

(nuclear receptors/gene expression)

GUILLAUME ADELMANT, AGNÈS BÈGUE, DOMINIQUE STÉHELIN, AND VINCENT LAUDET*

Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Recherche Associé 1160, Oncologie Moléculaire, Institut Pasteur, 1 rue Calmette-59019, Lille, France

Communicated by E. E. Baulieu, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Bicetre, France, October 17, 1995

ABSTRACT Rev-erb α belongs to the nuclear receptor superfamily, which contains receptors for steroids, thyroid hormones, retinoic acid, and vitamin D, as well as “orphan” receptors. No ligand has been found for Rev-erb α to date, making it one of these orphan receptors. Similar to some other orphan receptors, Rev-erb α has been shown to bind DNA as a monomer on a specific sequence called a Rev-erb α responsive element (RevRE), but its transcriptional activity remains unclear. In this paper, we characterize a functional RevRE located in the human Rev-erb α promoter itself. We also present evidence that (i) Rev-erb α mediates transcriptional repression of its own promoter *in vitro*, (ii) this repressing effect strictly depends on the binding of Rev-erb α to its responsive element and is transferable to a heterologous promoter; and (iii) Rev-erb α binds to this responsive sequence as a homodimer.

Nuclear receptors are transcription factors that provide a direct link between an extra- or intracellular signaling molecule and the transcriptional response (1). These nuclear receptors have a structural organization based on modular domains: from the amino to the carboxyl terminus, these are the variable A/B domain important for transactivation; the highly conserved C domain involved in DNA binding and dimerization; the D domain, which is a flexible hinge; and the large and moderately conserved E domain, which carries out several functions such as ligand binding, dimerization, and ligand-dependent transcriptional regulation. In addition to receptors for known ligands, this superfamily also contains receptors for which no specific ligand has yet been found (1, 2). These “orphan” receptors could either be receptors for ligands that have yet to be discovered or receptors that actually have no ligand and act as constitutive transcription factors, which would be controlled, like NGFIB, at the expression level (3). Whereas most nuclear receptors bind DNA as homo- or heterodimers to tandem repeats of the core sequence AGGTCA (1, 4–6), an increasing number of orphan receptors (NGFIB, FTZ-F1, RZR) have been shown to bind preferentially to their response element as monomers (7–11).

The Rev-erb genes encode two highly related orphan receptors named Rev-erb α and Rev-erb β . To date, little is known about their function: Rev-erb α is expressed in numerous adult tissues and is induced during adipocyte differentiation (12). In contrast, Rev-erb β is mainly expressed during the development of the nervous system, with a striking distribution in the floor plate of the neural tube (13). It has recently been shown that both Rev-erb α and Rev-erb β bind to the Rev-erb α

responsive element RevRE; $\frac{A}{T} \frac{A}{T} \frac{A}{G} \text{NT} \frac{A}{G} \text{GGTCA}$) as a monomer (14). However, contrary to other orphan receptors for which the transcriptional activity is well established (NGFIB, FTZ-

F1, or RZR), this function remains controversial for Rev-erb α (14–18).

To gain insight into this important aspect of Rev-erb α function, we studied its transcriptional activity on the natural RevRE found in the human Rev-erb α promoter gene. In this paper, we show that through this RevRE, either placed in its natural promoter context or when transferred upstream of the simian virus 40 (SV40) promoter, both Rev-erb α and Rev-erb β exhibit transcriptional repressing activity. Furthermore, we show that Rev-erb α is able to bind to this responsive element as a homodimer.

MATERIALS AND METHODS

Primer Extension Analysis. Primer extension analysis was performed following ref. 19. Briefly, 5 μ g of total HepG2 RNA was denatured at 80°C for 3 min and annealed at 65°C to a 5'-end-labeled primer. Reverse transcription was carried out at 37°C for 45 min with 500 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (BRL). Extended fragments were resolved on a 6% denaturing gel.

Constructs. The 2-kb *EcoRI*–*Bam*HI genomic fragment was prepared from the λ E2A3 genomic phage by partial digestion and subcloned and sequenced into the pBluescript II SK (+) vector (Stratagene), giving rise to the 2-kb pBSK construct.

pRev-erb α WT was constructed as follows: a 1.46-kb *EcoRV*–*Sst* I fragment of the 2-kb pBSK construct was cloned between the *Sma* I and *Sst* I sites of the pGL2-Basic vector (Promega), giving rise to 1.46-kb pGL2. The 3' portion of the promoter, extending from nt 1430 to nt 1733 was amplified by PCR and cloned into the pGEM-T vector (Promega). The resulting construct was digested with *Sst* I and *Sal* I and was inserted between the *Sst* I and *Xho* I sites of the 1.46-kb pGL2 construct, giving rise to pRev-erb α WT. pRev-erb α Δ and pRev-erb α CCC were constructed following the same strategy except that the desired Rp mutation was introduced by internal mutated primers during the PCR.

The pRev-erb α δ 1 and pRev-erb α δ 2 vectors were constructed by PCR: promoter fragments, extending from nt 975 to nt 1733 and from nt 1038 to nt 1733, respectively, were amplified by PCR and cloned into the pCRII vector (Invitrogen). *EcoRV*–*Bam* HI fragments were prepared from these pCRII vectors and subcloned into the pGL2-Basic vector digested with *Sma* I and *Bgl* II. pRev-erb α δ 1 was constructed by replacing the *Sst* I–*Kpn* I fragment of pRev-erb α δ 1 by the *Sst* I–*Kpn* I fragment prepared from pRev-erb α Δ .

pRev-erb α WTinv was constructed by subcloning the 1.64-kb *Xho* I–*Ssp* I fragment of the 2-kb pBSK construct between the *Sma* I and *Xho* I sites of the pGL2-Basic vector. pRev-erb α δ Asp and pRev-erb α δ Ssp were derived from pRev-

Abbreviations: RevRE, Rev-erb α responsive element; SV40, simian virus 40.

The sequence reported in this paper has been deposited in the GenBank data base (accession no. X95536).

*To whom reprint requests should be addressed.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

erba δ 1 digested, respectively, with *Xho* I and *Asp*718 or with *Xho* I and *Ssp* I sites that were blunt-ended before ligation.

pWT-SV40 and p Δ -SV40 were obtained by subcloning *Sst* I-*Asp*718 fragments prepared, respectively, from pRev-erbaWT and pRev-erba Δ between the *Sst* I and *Xho* I sites of the pGL2-Promoter vector (the *Asp*718 and *Xho* I sites were blunt-ended).

pRevDR2, pRevDR2M5', and pRevDR2M3' were constructed as follows: the following oligonucleotides carrying *Bam*HI and *Bgl* II restriction sites were concatemerized (mutated nucleotides are underlined) and ligated into the *Bam*HI site of pBluescript II SK (+).

5'-GATCCGAAAAGTGTGTCCTACTGGGGCACGA-3'
(RevDR2 sense+)

5'-GATCTCGTGCCCCAGTGACACACTTTTCCG-3'
(RevDR2 sense-)

5'-GATCCGAAAAGTCCTAGCCTGGGGCACGA-3'
(RevDR2M5' sense+)

5'-GATCTCGTGCCCCAGGGCTAGGACTTTTCCG-3'
(RevDR2M5' sense-)

5'-GATCCGAAAAGTGTGTCCTACTCCTAGCCGA-3'
(RevDR2M3' sense+)

5'-GATCTCGGCTAGGAGTGACACACTTTTCCG-3'
(RevDR2M3' sense-)

The number and orientation of cloned monomers were determined by sequencing. Dimers were subcloned between the *Kpn* I-*Sst* I sites of the pGL2-Promoter vector.

pREVERB α was constructed by inserting the 2.1-kb *Eco*RI-*Bam*HI fragment from pSP65 between the *Eco*RI and *Bam*HI sites of pSG₅ (20). pREVERB α -(1-236) was constructed by replacing the *Xho* I-*Bgl* II fragment of pREVERB α with an *Xho* I-*Bgl* II PCR fragment coding for a domain from Ser-200 to Pro-236 that carried an in-frame stop codon.

pSVREVFull and pSVREV236 are pSG₅-based vectors, encoding proteins extending from Thr-2 to Glu-614 and from Thr-2 to Pro-236, respectively, fused to a peptide composed of the hemagglutinin epitope and the SV40 nuclear localization signal.

All PCR-derived constructs were sequenced.

Cell Transfection and Reporter Assays. One day before transfection, one confluent 100-mm dish of HepG2 cells was split onto two six-well plates. Plasmid DNA was transfected using Lipofectamine (BRL). The transfection medium was replaced by DMEM containing 10% fetal calf serum (BRL) 6 h after addition of the liposome-DNA complex to the cells. Cells were lysed 48 h or 72 h after transfection (as indicated), and an aliquot was assayed for luciferase activity. Cotransfected pRSVCAT allowed transfection normalization. In all cases, chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity did not vary by more than 15% from point to point within a single experiment. All transfection experiments were performed at least three times and gave similar results. Results are presented as the mean \pm SD.

Electrophoretic Mobility Shift Assay. The 73-bp WT and Δ probes were prepared from pRev-erbaWT and pRev-erba Δ digested with *Sst* I and *Asp*718. RevDR2, RevDR2M5', and RevDR2M3' oligonucleotides are described above. The probes were labeled using the Klenow fragment of DNA polymerase or polynucleotide kinase and purified on a polyacrylamide gel. Proteins were expressed using the TNT reticulocyte lysate kit (Promega). The protein-DNA interactions were carried out for 30 min at 4°C with 0.5 ng of probe (\approx 20,000 cpm) in the following buffer: 0.5% glycerol, 60 mM KCl, 1 μ g of bovine serum albumin, 30 mM Hepes (pH 7.5), 1 mM dithiothreitol, 0.1% Triton X-100, and 60 ng of poly(dI-dC). Competition assays were carried out with the following oligonucleotides: WT, 5'-CGCGTGAAAAGTGTGTCAGATCT-3' (sense +) and 5'-GATCTGACACACTTTTCA-3' (sense -); Δ , 5'-

CGCGTGAAAAGTCTAGCAGATCT-3' (sense +) and 5'-GATCTGCTAGGACTTTTCA 3' (sense -). Competition oligonucleotides were added simultaneously with the labeled probes at the indicated molar excess. Complexes were run on a 4% acrylamide gel containing 0.1% Triton X-100 for 3 h at 200 V at 4°C.

RESULTS

Characterization of the Human Rev-erba Promoter. To isolate the Rev-erba promoter, we established a restriction map of the λ E2A3 phage that contains the 5' portion of the published human Rev-erba cDNA (20-22). The 5' region of this phage contains a 740-bp *Eco*RI fragment linked 5' to a

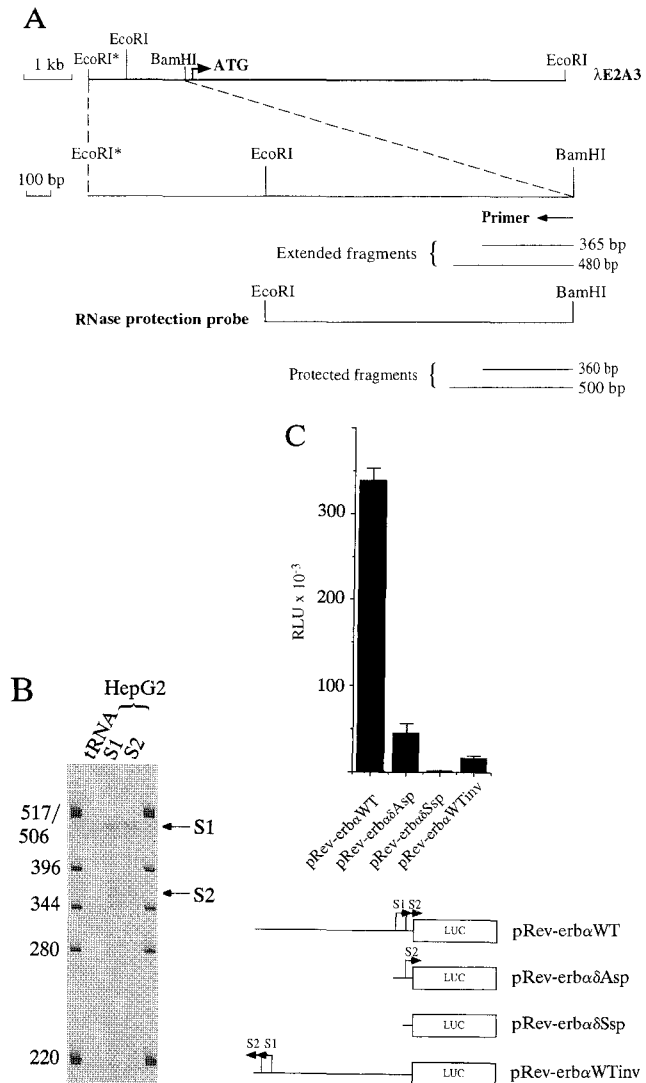


FIG. 1. Characterization of the human Rev-erba promoter. (A) Localization of the 2-kb *Eco*RI-*Bam*HI fragment within the λ E2A3 genomic phage. The primer used for primer extension and the RNase protection probe are depicted. The resulting extended fragments and protected fragments are shown. (B) Primer extension experiment. Two samples of HepG2 total RNA, as well as a yeast tRNA control, were reverse-transcribed from the primer that hybridizes to the *Bam*HI site (see A). Two extended fragments (S1 and S2) of 480 bp and 365 bp were obtained. (C) Promoter activity of the wild type (full length) and of start site deletion mutants of human Rev-erba promoter. HepG2 cells were transfected with 5 μ g of the indicated luciferase reporter constructs together with 0.25 μ g of pRSVCAT as an internal standard. The resulting luciferase activity was measured 72 h after transfection. RLU, relative light units; LUC, luciferase reporter gene.

1.26-kb *EcoRI*–*Bam*HI fragment encompassing the 5' end of the cDNA. The initiation codon is located 123 bp downstream from this *Bam*HI site (Fig. 1A). The 5' boundary of Rev-erb α exon 1 was mapped by primer extension experiments using a primer containing this *Bam*HI site (Fig. 1A). Two specific bands were reproducibly obtained with HepG2 total RNA but not with the control yeast tRNA (Fig. 1B). These two major start sites, called S1 and S2, are located 480 bp and 365 bp, respectively, 5' to the primer. The location of these start sites was confirmed by RNase protection (Fig. 1A and data not shown).

To further confirm the location of these transcription start sites, we placed the 5' part of this genomic sequence, extending from the 5'-most *EcoRI* site to nt 1733 (see Fig. 2), in front of the luciferase reporter gene to yield the pRev-erb α WT construct. When transfected into HepG2 hepatocarcinoma cells, this construct exhibited a strong luciferase activity as compared to a control construct containing this region cloned in the inverted orientation (pRev-erb α WTinv; Fig. 1C). In addition, a 5' deletion construct, pRev-erb α Δ Sp, in which the transcription start site S1 is deleted, retained a weak luciferase activity, while the pRev-erb α Δ Ssp construct, in which both S1 and S2 are deleted, was devoid of luciferase activity (Fig. 1C). The promoter was also active, although to a lesser degree, in HeLa cells (data not shown). These results demonstrate that this 2-kb genomic region functions as a promoter. This sequence harbors two putative TATA box sequences that could

be relevant to the mapped starts sites (shown as dashed line in Fig. 2). It also contains consensus binding sites for numerous transcription factors among which we noticed the presence of putative binding sites for nuclear receptors. Interestingly, two of these AGGTCA-like motifs, called Rp and Rd, contain at their 5' ends an A/T-rich sequence (see Fig. 2). According to recently reported *in vitro* experiments, such sites could represent RevREs (14).

Rev-erb α Represses the Human Rev-erb α Promoter. To investigate the role of these putative binding sites, the pRev-erb α WT promoter construct and the pRev-ERB α expression vector were cotransfected into HepG2 cells. As shown in Fig. 3A, the Rev-erb α promoter activity was markedly repressed by the Rev-erb α protein. To identify which of the two putative binding sites mediated the Rev-erb α effect, we tested two 5'-deletion mutants for their response to Rev-erb α cotransfection: pRev-erb α Δ 1, which contained both the distal (Rd) and the proximal (Rp) binding sites but lacked the 5' promoter sequence, and pRev-erb α Δ 2, which contained only the proximal binding site (Rp). As both of these deletion constructs still responded to the same extent as the wild-type promoter to pREV-ERB α cotransfection, we concluded that this repression was only mediated by the proximal binding site (Fig. 3A).

To investigate the role of the proximal Rev-erb α binding site in this regulation, we constructed two mutants of this site: one mutant (pRev-erb α Δ) is altered in the entire AGGTCA core sequence, whereas the other (pRev-erb α CCC) is only altered in the 5' A/T-rich region that has been previously shown to be important for Rev-erb α binding (13–15). As exemplified in Fig. 3B, either alteration of this proximal binding site drastically reduced Rev-erb α -mediated repression. Similar effects were also observed upon cotransfection of Rev-erb β , a close relative to Rev-erb α that exhibits the same binding specificity (Fig. 3B; refs. 13–15). As shown in Fig. 3B, a shorter mutant construct deleted of the 5'-most promoter sequence (pRev-erb α Δ 1) was not repressed by Rev-erb α , establishing that the remaining repression observed on pRev-erb α Δ was mediated through a cryptic Rev-erb α binding site located 5' to Rd. Taken together, these results demonstrate that the proximal Rev-erb α binding site of the human Rev-erb α promoter acts as a negative responsive element.

The Repressing Effect of Rev-erb α Is Transferable to a Heterologous Promoter. To test whether the Rev-erb α repression was transferable to a heterologous promoter, a 73-bp fragment of the Rev-erb α promoter encompassing the Rp site either in its wild-type (WT) or mutated (Δ) version was inserted upstream of the SV40 promoter (Fig. 2). As shown in Fig. 4, the pWT-SV40 construct was significantly repressed upon cotransfection of the Rev-erb α expression vector. Conversely, neither the control pSV40 construct nor the p Δ -SV40 construct carrying a mutated Rp site was repressed by Rev-erb α . These results, which were also obtained in rabbit kidney RK13 cells (data not shown), strongly suggest that Rev-erb α is able to repress the activity of a heterologous promoter through the Rp site.

Rev-erb α Binds the Rp Site as a Homodimer. We next investigated the binding characteristics of Rev-erb α to this promoter region. *In vitro*-synthesized Rev-erb α protein (and Rev-erb β ; data not shown) was incubated with the labeled *Sst* I–*Kpn* I promoter fragment that encompasses the Rp site, either in its wild-type (WT73bp) or mutated (Δ 73bp) version. As shown in Fig. 5A, Rev-erb α strongly bound to the WT73bp probe, whereas no binding could be observed when the Rp site was mutated (Fig. 5A). These data were confirmed by competition experiments where the resulting complex was efficiently blocked by competition with an unlabeled consensus RevRE oligonucleotide but not by its mutant version (Fig. 5A). Taken together, these binding experiment results corroborate the transactivation data (Figs. 3 and 4).

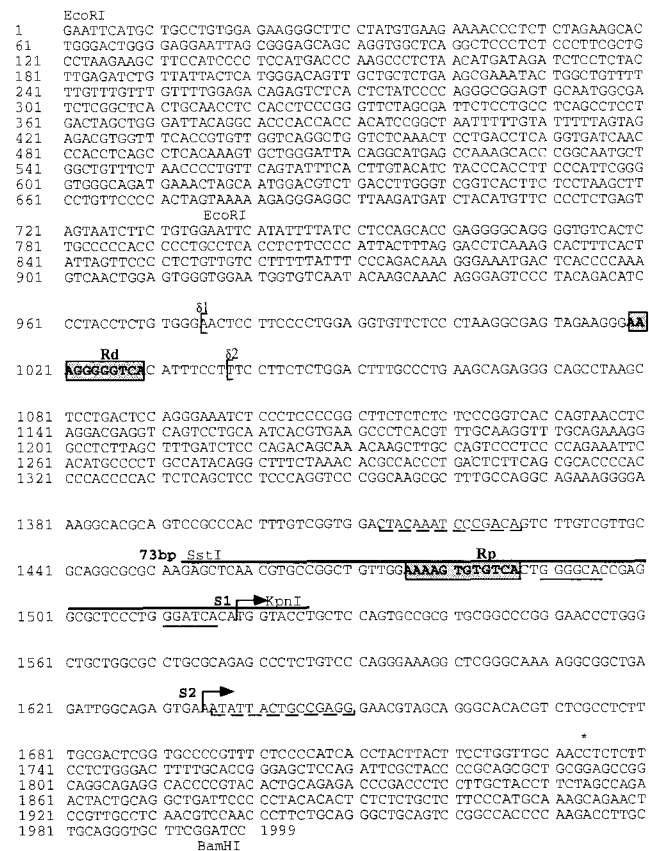


FIG. 2. Sequence of the human Rev-erb α promoter. The S1 and S2 start sites are indicated by bent arrows. The putative transcriptional initiation motifs are underlined with a dashed line. pRev-erb α WT Δ 1 and pRev-erb α WT Δ 2 5' borders are indicated by brackets. The star indicates the 3' border of all promoter constructs. Rd and Rp sites are indicated as shaded boxes. A thick line is drawn above the sequence of the 73-bp probe. The two degenerate AGGTCA sequences located downstream of the Rp site are underlined. The human Rev-erb α promoter sequence has been deposited in the GenBank data base (accession number X95536).

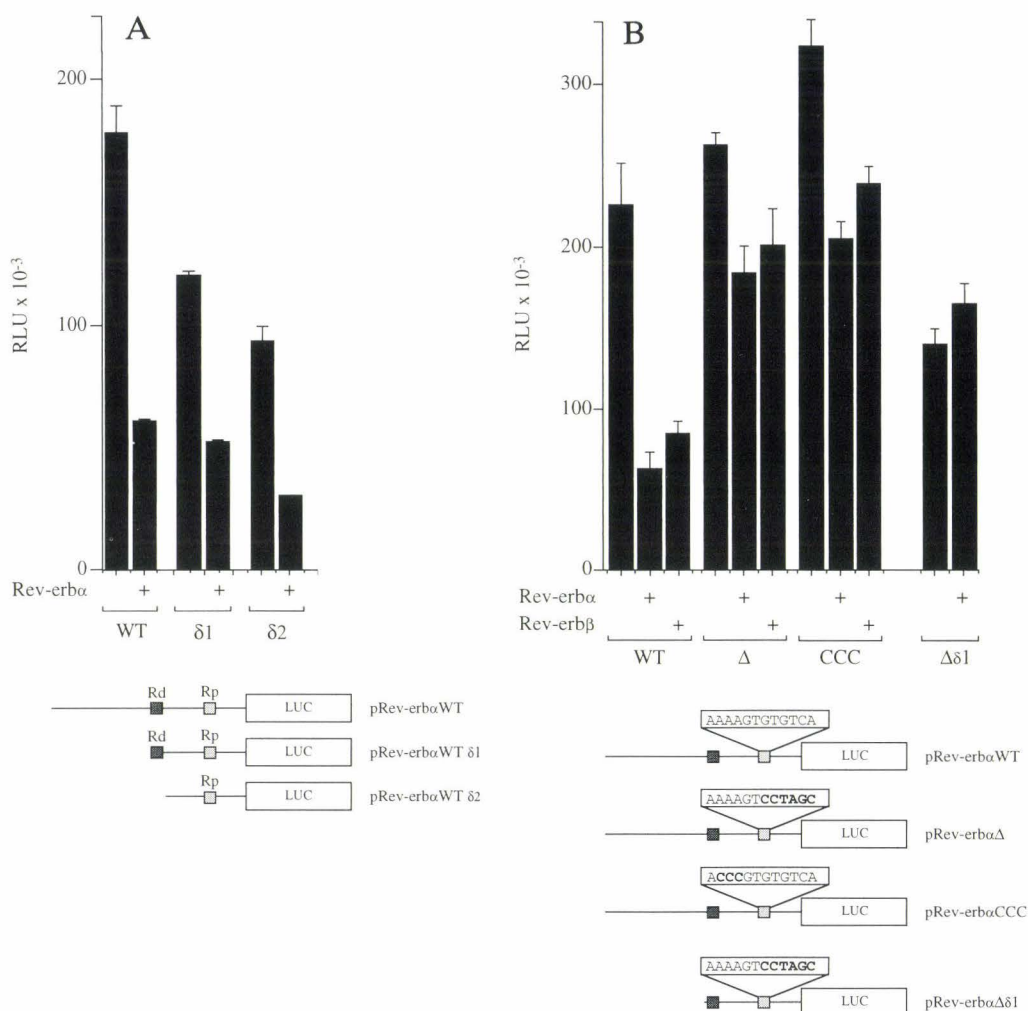


FIG. 3. (A) Determination of the functional Rev-erb α binding site. HepG2 cells were cotransfected with 1 μ g of the pSG5 or pREV-ERB α expression vectors and 4 μ g of each of the human Rev-erb α promoter constructs shown schematically below the graph. The boxes represent Rd and Rp binding sites as labeled. (B) Rev-erb α repression of the promoter constructs mutated in the Rp motif. HepG2 cells were cotransfected with 1 μ g of either pSG5, pREV-ERB α , or pREV-ERB β together with 4 μ g of the promoter constructs depicted below the graph. The Rd and Rp sites are shown as solid and shaded boxes, respectively. The mutated nucleotides of the Rp site are in boldfaced type. Luciferase activity was measured 72 h after transfection. RLU, relative light units; LUC, luciferase reporter gene.

However, a careful examination of the binding pattern of Rev-erb α on the WT73bp probe revealed the presence of a specific less intense complex of reduced mobility (arrowhead in Fig. 5A *Left*). To investigate whether this complex could correspond to a homodimer, we constructed a carboxyl-terminal truncated version of Rev-erb α , called REV-ERB α -(1-236). This truncated Rev-erb α protein lacks the entire ligand-binding E domain but still contains the A and T boxes and a portion of the hinge region D domain. As shown in Fig. 5A, when the WT73bp probe was coincubated with a mixture of the full-length and the truncated Rev-erb α protein, a new complex appeared. This complex corresponded to a dimer formed between the full-length and the truncated version of Rev-erb α protein (the same pattern was obtained with another version of Rev-erb α deleted after residue 288; data not shown). These results strongly suggest that Rev-erb α is capable of forming homodimers.

We next investigated which sequence of the 73-bp fragment was involved in the binding of the second molecule of the dimer. Two degenerate AGGTCA motifs were found within this sequence, located 2 bp and 23 bp, respectively, downstream from the Rp site (underlined in Fig. 2) both in a direct orientation relative to it. As shown in Fig. 5B, an oligonucleotide encompassing the Rp site and the AGGTCA-like motif

2 bp downstream, hereafter referred to as RevDR2, was sufficient to allow the binding of Rev-erb α as a dimer. To further investigate the respective role of these two half-site motifs on Rev-erb α binding, we used two oligonucleotides mutated either in the Rp core sequence or in the 3' motif (RevDR2M5' and RevDR2M3', respectively). Mutation of the 3' site abolished the binding of the dimer but still allowed the monomer to bind with an affinity comparable to that observed on the RevDR2 wild-type probe (Fig. 5B). Conversely, mutation of the 5' core sequence completely abolished the binding of Rev-erb α onto this probe, reminiscent of the result obtained with the Δ 73bp probe (Fig. 5A).

Rev-erb α Repressing Activity Does Not Depend on Its Homodimerization but Requires Its Carboxyl-Terminal Domain. To investigate whether homodimer formation was required for the repressing activity of Rev-erb α , two copies of either RevDR2, RevDR2M5', or RevDR2M3' oligonucleotides were cloned upstream of the SV40 early promoter. As shown in Fig. 5C, a 4-fold repression was observed upon cotransfection of pRevDR2-SV40 with the Rev-erb α expression vector. Conversely, no repression was seen when the reporter vector bore two copies of the responsive element mutated in its 5' motif (pRevDR2M5'-SV40) or when the native SV40 reporter vector was used. Interestingly, a reporter

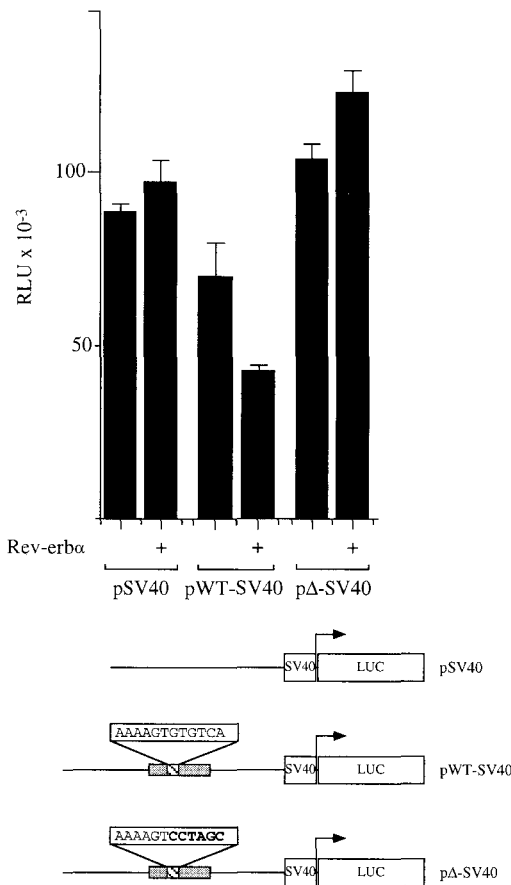


FIG. 4. Rev-erb α repression of the 73-bp *Sst* I-*Kpn* I promoter fragment placed upstream of the SV40 promoter. One microgram of the pSG₅ or pREVERB α expression vector and 4 μ g of each of the SV40 promoter constructs were cotransfected in HepG2 cells. Luciferase activity was measured 72 h after transfection. The 73-bp *Sst* I-*Kpn* I promoter fragment is shown as a stippled box. The hatched box represents the Rp site. Its mutated nucleotides are in boldfaced type. RLU, relative light units; LUC, luciferase reporter gene.

vector harboring two copies of the RevDR2M3' oligonucleotide was still repressed by Rev-erb α . These results suggest that homodimer formation is dispensable for Rev-erb α repression.

To further support the evidence that the Rev-erb α repressing activity is an intrinsic function of the protein, we tested the effect of a truncated version of Rev-erb α that binds to the RevRE but that is deleted of its carboxyl-terminal moiety (see *Materials and Methods*). As shown in Fig. 5C, this truncated version of Rev-erb α , unlike the full-length protein, was unable to repress the activity of the pRevDR2-SV40 reporter. This result indicates that transcriptional repression is an intrinsic property of Rev-erb α and that this function is carried out by its carboxyl-terminal domain.

DISCUSSION

This work reports the characterization of a functional promoter for the human Rev-erb α gene. The analysis of the human Rev-erb α gene promoter is of interest in the context of the c-erbA-1/Rev-erb α overlapping locus, which encodes two related transcription factors. We and others (19, 23) have previously shown that the c-erbA-1 promoter responds to neither c-erbA-1 nor to Rev-erb α proteins. The availability of the Rev-erb α gene promoter will help us to decipher further the functional implications of these findings and particularly to investigate the potential autoregulation that takes place at this

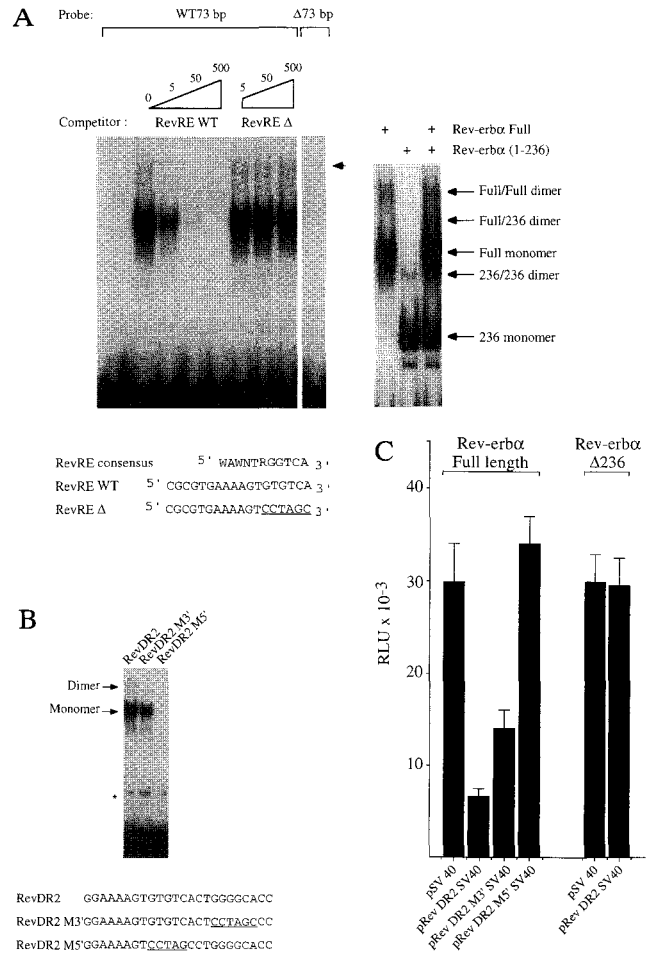


FIG. 5. (A) Rev-erb α binding to the 73-bp probe. (Left) One microliter of pSG₅ control lysate (lane at the extreme left) or pREVERB α protein was incubated with 0.5 ng of the 73-bp labeled probe in its wild-type (WT73bp) or mutated version (Δ 73bp). Competition experiments were carried out with a 5-, 50-, or 500-fold molar excess of either the synthetic RevREWT or the RevRE Δ oligonucleotides as indicated. The arrowhead indicates the homodimer. The sequences of the competitor oligonucleotides are shown below the figure (mutated nucleotides are underlined). The RevRE consensus sequence is shown for comparison (W is A or T, N is any of the four bases, and R is A or G). (Right) Rev-erb α is able to bind the WT73bp probe as a homodimer. The 73-bp probe (0.5 ng) was incubated with 4 μ l of the full-length REV-ERB α *in vitro*-translated protein, 1 μ l of REV-ERB α (1-236) *in vitro*-translated protein, or both as indicated. DNA-protein complexes are indicated at the right. The asterisk indicates an artifact that is likely to reflect the use of a downstream AUG. (B) Rev-erb α homodimer binds to the RevDR2 motif. Four microliters of the full-length REV-ERB α *in vitro*-translated protein was incubated with 0.5 ng of either RevDR2, RevDR2M3', or RevDR2M5' probes as indicated. The asterisk indicates a nonspecific complex. (C) Rev-erb α represses transcription via the 5' motif of the RevDR2. HepG2 cells were cotransfected along with 3 μ g of the pSVRev-erb α (Full length) or pSVRev-erb α (Δ 236) expression vectors and 1 μ g of the indicated reporter constructs. Luciferase activity was measured 48 h after transfection.

locus. It will also allow us to study the factors regulating its expression during various physiological processes (12).

Recent investigations about the function of Rev-erb α have shown that, similar to other orphan receptors, Rev-erb α binds as a monomer to an AGGTCA motif preceded by an A/T-rich sequence (10, 14). These authors also described Rev-erb α as a constitutive transcription factor when bound to this sequence, but others failed to reproduce this finding (15-17). While these discrepancies have been explained by the existence of an unidentified serum factor inducing Rev-erb α transcriptional

function, this hypothesis appears very unlikely since Rev-erb α lacks the crucial and strongly conserved ligand-regulated transactivating domain AF2 (24–26). As discussed in Durand *et al.* (25), it is more likely that orphan receptors lacking this AF2 domain would act as competitors for other ligand-inducible receptors. This is consistent with the recent findings that Rev-erb α passively blocks RZR α -mediated transactivation (15–17). While our study also reports that Rev-erb α mediates transcriptional repression, two lines of evidence argue for an intrinsic repressing effect of Rev-erb α . First, mutation of the Rp site did not decrease the basal activity of the Rev-erb α promoter, a consequence that would be expected if endogenous RZR α transactivated through this sequence. Second, a truncated version of Rev-erb α that still binds DNA was no longer able to repress transcription. This latter result evidenced the intrinsic repressive property of Rev-erb α . It remains to be investigated whether some elements, such as the binding site sequence or a protein partner, induce Rev-erb α to act as a passive competitor or as an “active” repressor.

Our study also reports that Rev-erb α is able to bind DNA as a homodimer. This homodimer binds an asymmetric RevDR2 element in which the upstream motif is extended with a 5' A/T-rich sequence. This asymmetric interaction between two Rev-erb α monomers bound to a direct repeat element is reminiscent of what was recently described for HNF4 bound to a DR1 (29). Nevertheless, as for the orphan receptor RZR α , Rev-erb α homodimerization does not seem as favored as in the case of retinoic acid receptor or thyroid hormone receptor homodimer formation (27). We also show that, while Rev-erb efficiently binds the isolated 5' binding site, its binding to the 3' site was abolished when the 5' sequence was mutated. Similarly, although the RevDR2 5' site is necessary and sufficient to mediate the Rev-erb α repression, the 3' motif of RevDR2 is not. The ability of Rev-erb α to dimerize is an interesting feature, but its function remains to be established.

The ability to form homodimers sheds new light on the diversification of the binding capacities of nuclear receptors during evolution (10). Based on the description of an increasing number of nonevolutionarily linked orphan receptors that are able to bind DNA exclusively as monomers, some authors have hypothesized that the ancestral nuclear orphan receptor bound DNA as a monomer (28). The fact that Rev-erbs as well as RZR α s (27) are able to homodimerize allows us to consider that binding as monomers was gained independently by some orphan receptors during evolution (10). These orphan receptors have not necessarily lost their ability to efficiently homo- or heterodimerize, as is the case for RZR and Rev-erb α .

We gratefully acknowledge P. Martin and O. Albagli for advice and constructive criticism and J. H. Chen, P. A. Defossez, J. Coll, and R. Pierce for critical reading of the manuscript. G.A. is recipient of a grant from the French Ministère de la Recherche et de l'Espace. We thank IPL, CNRS, ARC, and GREG for financial support.

- Parker, M. G. (1991) *Nuclear Hormone Receptors: Molecular Mechanisms, Cellular Functions, Clinical Abnormalities* (Academic, London).
- Laudet, V., Hänni, C., Coll, J., Catzeflis, F. & Stéhelin, D. (1992) *EMBO J.* **11**, 1003–1013.
- Milbrandt, J. (1988) *Neuron* **1**, 183–188.
- Zechel, C., Shen, X. Q., Chambon, P. & Gronemeyer, H. (1994) *EMBO J.* **13**, 1414–1424.
- Zechel, C., Shen, X. Q., Chen, J. Y., Chen, Z. P., Chambon, P. & Gronemeyer, H. (1994) *EMBO J.* **13**, 1425–1433.
- Laudet, V. & Stéhelin, D. (1992) *Curr. Biol.* **2**, 293–295.
- Wilson, T. E., Fahrner, T. J., Johnston, M. & Milbrandt, T. J. (1991) *Science* **252**, 1296–1300.
- Ellinger-Ziegelbauer, H., Hiji, A. K., Laudet, V., Keller, H., Wahli, W. & Dreyer, C. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2786–2797.
- Giguère, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R. M. & Otulakowski, G. (1994) *Genes Dev.* **8**, 538–553.
- Laudet, V. & Adelmant, G. (1995) *Curr. Biol.* **5**, 124–127.
- Wilson, T. E., Padgett, K. A., Johnston, M. & Milbrandt, J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9186–9190.
- Chawla, A. & Lazar, M. A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 16265–16269.
- Bonnelye, E., Vanacker, J. M., Desbiens, X., Bègue, A., Stéhelin, D. & Laudet, V. (1994) *Cell Growth Differ.* **5**, 1357–1365.
- Harding, H. P. & Lazar, M. A. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3113–3121.
- Dumas, B., Harding, H. P., Choi, H. S., Lehmann, K. A., Chung, M., Lazar, M. A. & Moore, D. D. (1994) *Mol. Endocrinol.* **8**, 996–1005.
- Forman, B. M., Chen, J., Blumberg, B., Kliewer, S. A., Henshaw, R., Ong, E. S. & Evans, R. M. (1994) *Mol. Endocrinol.* **8**, 1253–1260.
- Retnakaran, R., Flock, G. & Giguère, V. (1994) *Mol. Endocrinol.* **8**, 1234–1244.
- Spanjaard, R. A., Nguyen, V. P. & Chin, W. W. (1994) *Mol. Endocrinol.* **8**, 286–295.
- Laudet, V., Vanacker, J. M., Adelmant, G., Bègue, A. & Stéhelin, D. (1993) *Oncogene* **8**, 975–982.
- Miyajima, N., Horiuchi, R., Shibuya, Y., Fukushima, S. I., Matsubara, K. I., Toyoshima, K. & Yamamoto, T. (1989) *Cell* **57**, 31–39.
- Laudet, V., Bègue, A., Henry-Duthoit, C., Joubel, A., Martin, P., Stéhelin, D. & Saule, S. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 1105–1112.
- Lazar, M. A., Hodin, R. A., Darling, D. S. & Chin, W. W. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1128–1136.
- Lazar, J., Desvergne, B., Zimmerman, E. C., Zimmer, M. A. & Nikodem, V. M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 20352–20359.
- Barettino, D., Vivanco Ruiz, M. D. M. & Stunnenberg, H. G. (1994) *EMBO J.* **13**, 3039–3049.
- Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R. & Chambon, P. (1994) *EMBO J.* **13**, 5370–5382.
- Danielian, P. S., White, R., Lees, J. A. & Parker, M. G. (1992) *EMBO J.* **11**, 1025–1033.
- Carlberg, C., Hoof van Huijsduijnen, R., Staple, J. K., Delamarer, J. F. & Becker-André, M. (1994) *Mol. Endocrinol.* **8**, 757–770.
- Woronicz, J. D., Calnan, B., Ngo, V. & Winoto, A. (1994) *Nature (London)* **367**, 277–281.
- Jiang, G., Nepomuceno, L., Hopkins, K. & Sladek, F. (1995) *Mol. Cell Biol.* **15**, 5131–5143.

Discussion I

1. Propriétés de fixation à l'ADN de Rev-erbA α .

1.1 Motifs de fixation à l'ADN.

Rev-erbA α est l'un des membres du sous-ensemble des récepteurs orphelins qui se fixent à l'ADN sous forme de monomère (Harding et Lazar, 1993). Ce sous ensemble compte maintenant une dizaine de récepteurs comme NGFI-B, SF1, ROR α 1 et Rev-erbA β pour ne citer que quelques protéines qui nous serviront d'exemple (Lala et al., 1992; Wilson et al., 1992; Bonnelye et al., 1994; Dumas et al., 1994; Giguère et al., 1994).

Rev-erbA α partage avec tous ces facteurs la caractéristique de se fixer à une version singulière de l'hexamère canonique PuGGTCA, étendu en 5' par quatre bases spécifiques. Ce motif, appelé RevRE, a la séquence consensus $A/T A A/T NTPuGGTCA$.

Lorsque l'on compare le motif de fixation de Rev-erbA α à ceux sur lesquels se fixent NGFI-B, SF1, ROR α et Rev-erbA β , on distingue à priori peu de différence (**Fig.33**): ces motifs sont globalement riches en bases A et T en amont de l'hexamère. Seuls ROR α , Rev-erbA β et SF1 comportent une base C en position (-2). On pourra retenir de ceci que les motifs de chacun de ces récepteurs sont partiellement "chevauchants": on s'attendra par exemple à ce que Rev-erbA α se fixe sur tous RORE mais qu'à l'inverse, ROR α 1 ne se fixe que sur certains RevRE contenant une base "C" en position (-2).

Nous avons vu dans le chapitre I que la fixation monomérique impose aux récepteurs deux contraintes spécifiques:

- la reconnaissance des bases additionnelles situées en amont du motif hexamérique.
- l'acquisition de la stabilité d'interaction avec l'ADN sous forme de monomère.

Comme nous l'avons souligné, ces deux fonctions sont portées par la boîte T/A, un domaine situé en aval de la fin du domaine C. La séquence de la boîte T/A est assez bien conservée entre les différents récepteurs se fixant sous forme de monomère, mais diverge fortement pour un récepteur a priori exclusivement dimérique comme RXR α (**Fig.34**).

Certains récepteurs orphelins monomériques, pour lesquels la fixation est donc indépendante de RXR ou d'un ligand, illustrent assez bien l'absence de relation simple entre le motif protéique d'interaction (ici la boîte T/A) et la séquence ADN reconnue: alors que Rev-erbA α et Rev-erbA β possèdent la même boîte T/A, ces deux récepteurs apparentés ont des

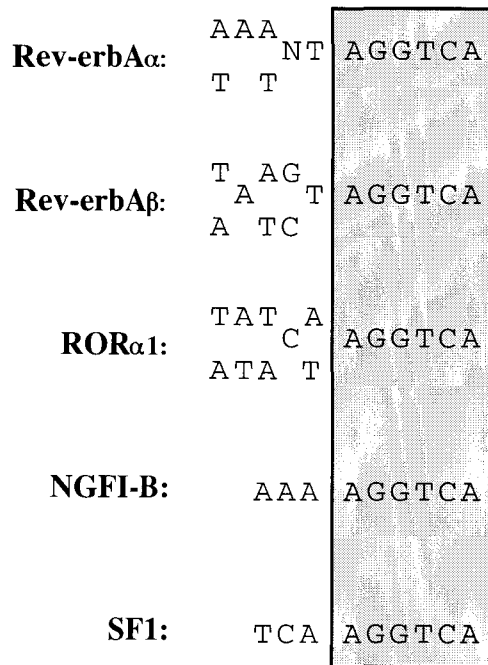


Fig.33: Éléments de réponse de plusieurs récepteurs nucléaires orphelins monomériques . Le motif hexamérique consensus est encadré.

spécificités de fixation subtilement différentes (**Fig.34**). Il est possible que cette différence de spécificité entre les isoformes α et β de Rev-erb repose, comme dans le cas de ROR α 1 et ROR α 2, sur le domaine amino-terminal A/B {voir chapitre I§2.3.6, (Giguère et al., 1994).

1.2 Rev-erbA α et l'homodimérisation.

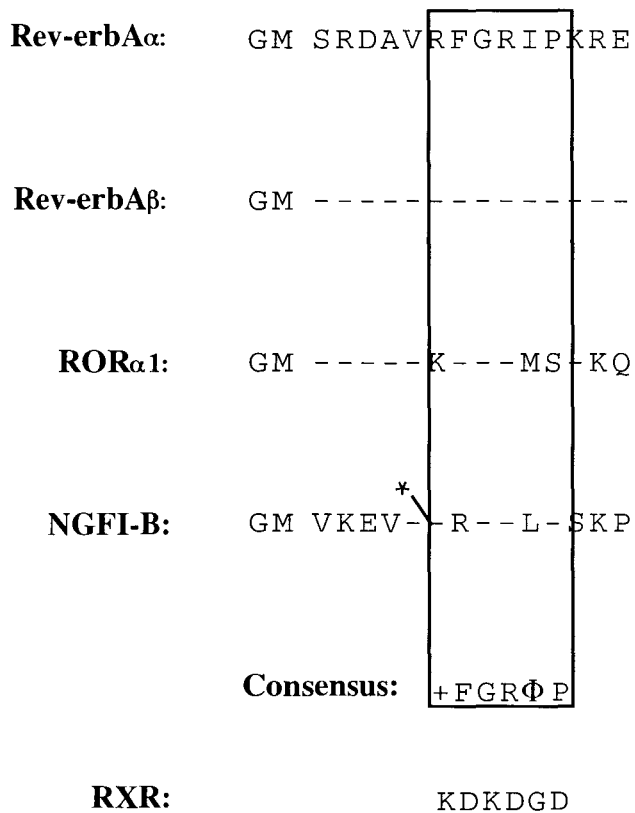
Rev-erbA α fut d'abord décrit comme un récepteur se fixant à l'ADN sous forme de monomère (Harding et Lazar, 1993). Nos résultats confirment cette propriété, et révèlent que Rev-erbA α a aussi la capacité à se fixer sous forme d'homodimère à un motif constitué d'une répétition directe de deux sites, appelé RevDR2. Dans nos conditions expérimentales, cette interaction dimérique est toutefois minoritaire, un point sur lequel nos résultats divergent de ceux de Harding et coll. (Harding et Lazar, 1995). Cette différence pourrait tenir à la nature de l'élément de réponse utilisé. Si dans les deux cas il s'agit d'un élément de réponse de type RevDR2, le motif utilisé par Harding et coll. comporte deux sites hexamériques AGGTCA parfaits, alors que celui utilisé dans notre étude, un motif naturel provenant du promoteur du gène Rev-erbA α , est constitué de sites amont et aval dégénérés (gtGTCA et gGGgCA respectivement). Nous avons d'ailleurs observé que Rev est capable de se fixer sous forme monomérique sur le site 5' du motif (lorsque le site 3' du RevDR2 est muté), mais que la réciproque n'est pas vraie. Ce motif RevDR2 naturel est donc composé d'un site de haute affinité (le site 5') et d'un site à basse affinité (en 3'). Il est donc possible que ces caractéristiques ne permettent pas à Rev-erbA α de se fixer sous forme homodimérique de manière optimale.

La fixation de Rev-erbA α sur un site RevDR2 parfait est coopérative (Harding et Lazar, 1995). Cependant, à de faibles quantités de protéines, Rev-erbA α se fixe préférentiellement sur un motif monomérique plutôt que sur un motif dimérique (voir la fig. 6A dans Harding et al.; 1995). On peut aussi imaginer que le mode de fixation de Rev-erbA α (sous forme monomérique ou homodimérique) dépende donc de son niveau d'expression dans la cellule. Nous verrons que cette hypothèse pourrait avoir des répercussions intéressantes sur les propriétés transcriptionnelles de Rev-erbA α .

2. Propriétés transcriptionnelles de Rev-erbA α .

2.1 Rev-erbA α est un répresseur transcriptionnel.

Dans la discussion d'un article de 1994, Durand et coll. ont remarqué que de nombreux récepteurs orphelins ont un motif AF2 qui diverge sensiblement du consensus établi par Baretino et coll. (Baretino et al., 1994; Durand et al., 1994). Ces divergences portent essentiellement sur le résidu Glu(401), substitué par un résidu Asn dans le cas de COUP-TF



*: insertion du peptide RTDSLKG

Fig.34: Comparaison des boîtes T/A de différents récepteurs orphelins monomériques. La boîte T/A de RXR est indiquée à titre de comparaison. GM sont les deux derniers résidus du domaine C. Les tirets indiquent les AAc conservés.

et de ARP-1. Dans le cas de Rev-erbA α , c'est le motif AF2 entier qui est absent de la protéine (Fig.35). L'absence de ce motif activateur suggérait que Rev-erbA α , comme COUP-TF, pouvait se comporter comme inhibiteur de l'activation médiée par d'autres récepteurs nucléaires, en déplaçant ces derniers de leur élément de réponse. Ce mécanisme "passif", reposant sur la compétition pour un site de fixation commun, a notamment été étayé par Forman et coll. (Forman et al., 1994): l'expression de Rev-erbA α inhibe en effet l'activation transcriptionnelle médiée par ROR α depuis son élément de réponse par un tel mécanisme.

Nos résultats, ainsi que ceux de Harding et coll. ont confirmé l'absence d'activité transcriptionnelle de Rev-erbA α . En outre, nos travaux respectifs ont montré que Rev-erbA α est aussi capable de réprimer l'activité basale d'un promoteur par un mécanisme "actif" (Harding et Lazar, 1995; Adelmant et al., 1996). Plusieurs résultats étayaient cette conclusion:

- la fusion du domaine D et E de Rev-erbA α au domaine de fixation à l'ADN de Gal4 confère à ce dernier la capacité à réprimer la transcription (Harding et Lazar, 1995).
- la protéine Rev-erbA α entière médie un effet répresseur via le motif RevRE naturel du promoteur de son propre gène (Adelmant et al., 1996).
- le domaine C isolé, pourtant capable de se fixer sur les éléments de réponse à ROR α , n'a aucun effet répresseur dans ces conditions (Harding et Lazar, 1995; Adelmant et al., 1996).

Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que Rev-erbA α , en plus de sa capacité à inhiber "passivement" la transcription médiée par ROR α , peut aussi se comporter comme un répresseur transcriptionnel actif.

Nous avons vu dans l'introduction que seuls les récepteurs RAR et T3R, en absence de leur ligand, et v-erbA de manière constitutive, ont un effet répresseur sur la transcription. Cet effet transcriptionnel est médié grâce à leur interaction avec les corépresseurs NCoR et SMRT (Chen et Evans, 1995; Horlein et al., 1995; Kurokawa et al., 1995).

Des résultats récents de Zamir et coll. montrent que Rev-erbA α interagit en solution avec ces deux corépresseurs (Zamir et al., 1996; Zamir et al., 1997). Curieusement, seule l'interaction avec NCoR est préservée une fois Rev-erbA α fixé sur son motif RevDR2. Cette "sélectivité" de Rev-erbA α pour NCoR a été corrélée *in vivo*, car seule la surexpression de ce corépresseur (et non de SMRT) stimule l'effet répresseur de Rev-erbA α . Ce résultat contraste notamment avec le récepteur T3R dont la répression est potentialisée indifféremment par les deux corépresseur (Zamir et al., 1997). Il reste possible que dans d'autres conditions (en fonction du type d'élément de réponse par exemple), SMRT puisse être impliqué dans la médiation de l'effet répresseur de Rev-erbA α .

Comme dans le cas de v-erbA, Rev-erbA α réprime la transcription de manière constitutive. Cette propriété est partagée par un mutant de T3R, délété de son domaine AF2 mais qui a

AF2 "core"

cTR α	MIGACHASRFLHMKVECPTLFPPLFLF E VFEDQEV *
hRAR α	SISAKGAERVITLKMEIPGSMFPPLIQ E MLENSEGL >
hER	HMSNKGMEHLYSMKCKNVVPLY-DLLL E M LDAHRLH >
Rev-erbA α	TLNNMHSEKLLSFR *
Consensus	$\phi\phi$ XE $\phi\phi$

Fig.35: Comparaison de l'extrémité amino-terminale du domaine E de Rev-erbA α à celle d'autres récepteurs. * indique la fin de la séquence codante, > son prolongement.

gardé sa capacité à fixer l'hormone (Baniahmad et al., 1995; Schulman et al., 1996). Ceci suggère que AF2 est nécessaire au relarguage du corépresseur. Curieusement, l'effet répresseur de ce mutant de T3R est plus fort que l'effet du récepteur normal en absence de son ligand. X et Evans suggèrent que ce résultat traduit le fait qu'en absence d'hormone, T3R interagit majoritairement avec son corépresseur mais interagit toujours, bien que plus faiblement, avec ses coactivateurs (via AF2), ce qui atténue en conséquence l'effet répresseur de SMRT. La fixation de l'hormone renverserait cet équilibre. En revanche, pour le mutant de T3R, le relarguage du corépresseur est impossible puisque le domaine AF2 est absent. Ceci explique le caractère constitutif de l'effet répresseur. De plus, en raison de l'absence de AF2, l'effet répresseur de SMRT ne peut être pondéré par les coactivateurs, dont la fixation est impossible, expliquant ainsi le caractère plus prononcé de la répression.

Il est très probable que cet effet "super-répresseur" soit aussi partagé par Rev-erbA α et de v-erbA.

2.2 Homodimérisation et répression.

Zamir et coll. ont montré que la répression transcriptionnelle médiée par Rev-erbA α nécessite son homodimérisation (Zamir et al., 1996). Ces résultats sont étayés par des expériences *in vitro* révélant que seul Rev-erbA α fixé sur un motif dimérique peut interagir avec NCoR (Zamir et al., 1997). La spécificité de NCoR pour les dimères de Rev-erbA α ne semble pas reposer sur un changement de conformation suite à l'homodimérisation du récepteur. Il s'agirait plus simplement de fournir à NCoR deux surfaces d'interaction proches l'une de l'autre pour permettre la formation d'un complexe stable. Ces auteurs suggèrent donc que les propriétés transcriptionnelles de Rev-erbA α pourraient varier en fonction de son niveau d'expression (Zamir et al., 1997).

Nos résultats divergent cependant sur ce point, puisque nous avons montré que Rev-erbA α peut réprimer depuis un motif RevRE monomérique. Il serait intéressant de déterminer si la répression transcriptionnelle que nous avons observée dans nos conditions, est médiée par NCoR, ce qui suggérerai que dans certains cas l'interaction NCoR/monomère est possible, ou si cet effet est médié par d'autre(s) corépresseur(s), comme SMRT par exemple.

3. Conclusions.

L'ensemble des résultats présentés ici démontrent que Rev-erbA α est un répresseur transcriptionnel constitutif. D'autres données suggèrent que Rev-erbA α se comporte effectivement comme répresseur *in vivo*. Ainsi, au cours de la myogenèse, le taux d'expression de Rev-erbA α diminue fortement, ce qui, entre autres hypothèses, pouvait

indiquer que l'expression de Rev-erbA α est incompatible avec la différenciation musculaire (Downes et al., 1995). Cette hypothèse est cohérente avec le fait que sa surexpression dans les myoblastes C2C12 abolit leur capacité à se différencier (Downes et al., 1995; Burke et al., 1996). Bien qu'il soit difficile de démontrer *in vivo* que cet effet d'inhibition repose sur sa fonction de répresseur transcriptionnel, plusieurs arguments étayent cette hypothèse: l'expression de Rev-erbA α bloque l'induction des ARNm de la myogénine et réduit le taux des transcrits du gène MyoD (Downes et al., 1995). Inversement, la surexpression d'une version de Rev-erbA α délétée de son domaine E (qui porte la fonction de répression), favorise leur différenciation, probablement en déplaçant la protéine Rev-erbA α endogène des sites de fixation à partir desquels elle réprime la transcription (Burke et al., 1996).

Enfin pour terminer, il est prudent de garder à l'esprit que certaines protéines comme ou Kruppel ont la capacité d'activer ou de réprimer la transcription en fonction du contexte dans lesquels ils se trouvent (Sauer et Jackle, 1991). Un seul article a jusqu'à présent décrit une fonction activatrice pour Rev-erbA α (Harding et Lazar, 1993). Il sera nécessaire de confirmer ce résultat et de préciser, le cas échéant, les modalités fonctionnelles de cette propriété.

The human TLS-CHOP oncoprotein directly blocks C/EBP β -driven adipogenesis.

Guillaume Adelmant, Jeff D.Gilbert and Svend O.Freytag.

Soumis.

Résumé :

TLS-CHOP est une protéine de fusion résultant de la translocation chromosomique t(12;16), spécifique des liposarcomes myxoïdes.

Les liposarcomes myxoïdes sont des tumeurs du tissu adipeux principalement caractérisées par leur phénotype très indifférencié. Le fait que la translocation chromosomique t(12;16) implique le gène CHOP, qui code un membre de la famille des facteurs de transcription C/EBP, impliqués dans la différenciation adipocytaire, nous a conduit à étudier l'interférence éventuelle de cet oncogène chimérique avec ce programme de différenciation.

Dans un système cellulaire dont l'adipogenèse est gouvernée par le facteur de transcription C/EBP β , nous montrons:

- que la co-expression de TLS-CHOP inhibe très fortement la différenciation adipocytaire médiée par C/EBP β .
- que TLS-CHOP, par un mécanisme reposant sur la "séquestration" de C/EBP β , inhibe les propriétés transactivatrices de ce facteur.
- que l'expression de TLS-CHOP corrèle avec l'absence d'expression du récepteur nucléaire PPAR γ 2, l'un des facteurs adipogéniques "tardifs", normalement induit par C/EBP β .
- enfin, que le blocage de la différenciation induit par TLS-CHOP peut être surmonté par l'expression ectopique de PPAR γ 2.

Nous proposons donc que l'inactivation fonctionnelle de C/EBP β par TLS-CHOP, se traduit par un blocage des phases précoces de l'adipogenèse, et que ce blocage pourrait être l'un des mécanismes participant à l'acquisition du phénotype tumoral.

**Human TLS-CHOP oncoprotein prevents adipocyte differentiation by directly interfering
with C/EBP β function**

Guillaume Adelmant[#], Jeff D. Gilbert, and Svend O. Freytag*

Departments of Molecular Biology and Radiation Oncology
Henry Ford Health Science Center
Detroit, MI 48202-4689

Running title: TLS-CHOP blocks C/EBP β -driven adipogenesis.

Keywords: TLS-CHOP, C/EBP, differentiation, fusion oncoproteins, cancer.

*corresponding author address:

Molecular Biology Research

Henry Ford Health System

One Ford Place, Wing 5D

Detroit, MI 48202-4689

phone (313) 876-1951

FAX (313) 876-1950

[#]present address:

Unite d'Oncologie Moléculaire

Institut Pasteur de Lille

59019 Lille

France

Human TLS-CHOP is a fusion oncoprotein found specifically in a malignant tumor of adipose tissue and results from a t(12;16) translocation that fuses the amino terminal part of TLS to the entire coding region of CHOP. Being that CHOP is a member of the C/EBP transcription factor family, proteins which comprise part of the adipocyte differentiation machinery, we examined whether TLS-CHOP blocked adipocyte differentiation by directly interfering with C/EBP function. Using a single step retroviral infection protocol, either wild-type or mutant TLS-CHOP were co-expressed along with C/EBP β in naïve NIH3T3 cells and their ability to inhibit C/EBP β -driven adipogenesis was determined. TLS-CHOP was extremely effective at blocking adipocyte differentiation when expressed at a level comparable to that observed in human myxoid liposarcoma. This effect of TLS-CHOP required a functional leucine zipper domain and correlated with its ability to heterodimerize with C/EBP β and inhibit C/EBP β DNA binding and transactivation activity *in situ*. By contrast, the TLS-CHOP basic region was dispensable, making it unlikely that the inhibitory effect of TLS-CHOP is attributable to unscheduled gene expression resulting from TLS-CHOP's putative transactivation activity. Another adipogenic transcription factor, PPAR γ 2, was able to rescue TLS-CHOP-inhibited cells, indicating that TLS-CHOP does not interfere with other requisite events of the adipocyte differentiation program. Together, the results demonstrate that TLS-CHOP blocks adipocyte differentiation by directly preventing C/EBP β from binding to and transactivating its target genes. Moreover, they provide strong support for the thesis that a blockade to normal differentiation is an important aspect of the cancer process.

Introduction

Adipogenesis is a process in which an undifferentiated mesenchymal cell capable of proliferation matures into a post mitotic, fat-laden adipocyte. This differentiation process results in dramatic changes in gene expression and a spectacular alteration in cell morphology. The early phase of adipocyte differentiation is accompanied by the induction of transcription factors that promote cell cycle withdrawal and activation of cell-specific genes, two key aspects of terminal cell differentiation.

CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α), a basic-leucine zipper protein (bZIP), is among the transcription factors that are induced prior to the onset of morphological differentiation. C/EBP α was the first regulatory protein demonstrated to play a central role in promotion of the adipogenic program. We (Freytag and Geddes 1992; Freytag *et al.* 1994) and others (Umek *et al.* 1991; Samuelsson *et al.* 1991; Lin and Lane 1992) demonstrated that C/EBP α was both necessary and sufficient to promote adipogenesis in fibroblastic cells such as NIH3T3 and 3T3-L1. These observations, coupled with the fact that mice deficient in C/EBP α completely lack mature white or brown adipose tissue (Wang *et al.* 1995), demonstrate unequivocally the pivotal role of this transcription factor in adipogenesis. Following the same approach, several other transcription factors, including another member of the C/EBP family, C/EBP β (Yeh *et al.* 1995; Wu *et al.* 1995), and PPAR γ 2, a member of the nuclear hormone receptor superfamily (Tontonoz *et al.* 1994; Forman *et al.* 1995), proved capable of converting NIH3T3 cells into morphologically and biochemically differentiated adipocytes. It is now clear that all of the aforementioned transcription factors play an important and sequential role in the adipocyte differentiation process. In the 3T3-L1 preadipocyte model, induction of C/EBP β and C/EBP δ are the earliest events to occur upon treatment with differentiation inducers (Yeh *et al.* 1995). These factors, in conjunction with adipogenic hormones, induce the expression of PPAR γ 2 (Wu *et al.* 1995). The next event, which coincides with cell cycle withdrawal and commitment to the adipocyte differentiation program, is the induction of C/EBP α . The presence of C/EBP and PPAR binding sites in the C/EBP α promoter suggest that its expression may be regulated by C/EBP β and PPAR γ 2 (Christy *et al.* 1991).

In addition to transcription factors that induce and maintain the mature adipocyte phenotype, there are also factors that negatively regulate adipogenesis. Interestingly, one of these negative regulators, CHOP, a stress and DNA-damage induced transcription factor, is a member of the C/EBP family (Ron and Habener 1992; Fornace *et al.* 1989; Carlson *et al.* 1993). Unlike other C/EBPs that can bind sequence-specific DNA as homodimers, CHOP homodimers cannot bind sequence-specific DNA due to a non-consensual sequence in its basic region. However, CHOP is able to bind weakly to a restricted subset of high affinity C/EBP binding sites (GCAAT)

when complexed as a heterodimer with other C/EBP proteins, such as C/EBP β (Ubeda *et al.* 1996). Although CHOP participates in the stress signal in response to metabolic injuries, its downstream effectors are yet to be described.

Interestingly, an oncogenic variant of CHOP, called TLS-CHOP, is found specifically in myxoid liposarcoma, a malignant tumor of adipose tissue. TLS-CHOP results from a t(12;16) chromosomal translocation that fuses the amino-terminal part of TLS to the entire coding sequence of CHOP (Croizat *et al.* 1993; Rabbits *et al.* 1993). Recently, a second chromosomal translocation specific for myxoid liposarcoma was also found to involve CHOP (EWS-CHOP; Panagopoulos *et al.* 1996). That two fusion oncoproteins involving CHOP are consistently (in over 90% of cases) and specifically associated with myxoid liposarcoma raises the possibility they are perturbing C/EBP function and causing a blockade in adipocyte differentiation. Although a previous study demonstrated that induction of endogenous CHOP by glucose deprivation inhibited 3T3-L1 adipogenesis (Batchvarova *et al.* 1995), the underlying mechanism of this inhibition is unclear. CHOP-expressing cells failed to induce normal levels of C/EBP α and C/EBP β , two factors which are required to drive the 3T3-L1 adipogenic program. Thus, it is not possible to discern from that study whether the failure of CHOP-expressing cells to differentiate was attributable to inhibition of C/EBP function by CHOP or a lack of required C/EBP α and C/EBP β expression. Moreover, the effect of TLS-CHOP, the oncogenic form of CHOP, on adipocyte differentiation remains unexplored.

In the present study we investigate whether TLS-CHOP can inhibit C/EBP β -driven adipogenesis. Three lines of evidence make C/EBP β the likely molecular target of TLS-CHOP in myxoid liposarcoma; (i) C/EBP β protein is expressed in myxoid liposarcoma cells whereas C/EBP α is not (Croizat *et al.* 1993; unpublished observations); (ii) C/EBP β is induced early in the adipogenic pathway and is likely to trigger many of the downstream events (Yeh *et al.* 1995; Wu *et al.* 1995) and (iii) C/EBP β is the preferred heterodimerizing partner of TLS-CHOP (Ron and Habener 1992). We demonstrate here that TLS-CHOP completely blocks C/EBP β -driven adipogenesis by directly interfering with the normal function of the C/EBP β protein. The results support the thesis that a blockade to normal differentiation is important in the development of the cancer phenotype.

Results

TLS-CHOP inhibits C/EBP β -driven NIH3T3 adipogenesis

To determine whether TLS-CHOP could inhibit C/EBP β function in adipogenesis, we developed a system where both the inducer of differentiation (C/EBP β) and the potential inhibitor (TLS-CHOP) could be co-expressed simultaneously in naive NIH3T3 cells. This was accomplished through the use of triple gene retroviral vectors in which the C/EBP β and TLS-CHOP proteins are produced from the same bicistronic mRNA driven by the proviral LTR, and expression of the selectable marker gene (neo) is driven by an internal (SV40) promoter (Fig. 1). This approach has several conceptual and technical advantages: (i) unlike the 3T3-L1 system, the differentiation of NIH3T3 cells is completely dependent on the introduction of an exogenous transcription factor(s) making it possible to express the factor constitutively, (ii) use of the triple gene vectors eliminates the need to perform sequential infections and selections thereby avoiding the generation of clonal cell lines which vary widely in their ability to differentiate, (iii) co-translation of the C/EBP β and TLS-CHOP proteins from the same bicistronic mRNA greatly increases the likelihood that they will be expressed stoichiometrically within the same cell. To obtain insight into which structural domains of TLS-CHOP are required for its inhibitory effect, two mutants were generated. TLS-CHOP/BR contains three site-directed mutations in its basic region (Arg⁴⁰⁷->Gly, Lys⁴¹⁰->Gly, Arg⁴¹²->Asn). These three basic amino acids were selected for mutagenesis because they were previously shown to be critical for C/EBP α DNA binding activity (Landschulz *et al.* 1989). TLS-CHOP/LZ contains five Leu to Gly conversions in the leucine zipper (positions 427, 434, 441, 452, 459) and was constructed to investigate the requirement of the heterodimerization domain. A retroviral vector encoding the normal CHOP protein was also generated to serve as a positive control. All six vectors were introduced into naive NIH3T3 cells by retroviral infection and pooled cell lines representing several thousand G418-resistant clones were generated following a brief selection in G418. Cell pools were examined for protein expression and their ability to undergo adipogenesis.

As shown in Figure 2A, the five cell pools infected with the vectors encoding C/EBP β either alone or in conjunction with CHOP, TLS-CHOP and the TLS-CHOP mutants, express the same amount of the 36 kDa C/EBP β (LAP) protein (lanes 2-6). This amount is significantly higher than the endogenous level of C/EBP β found in NIH3T3 cells infected with the control vector (lane 1). Importantly, the level of C/EBP β protein expressed in the NIH3T3 pools (lanes 2-6) is identical to that observed in 3T3-L1 adipoblasts on day 2 of differentiation (lane 8), whereas its level of expression in cells infected with the control vector (lane 1) is similar to that of undifferentiated 3T3-L1 cells (lane 7). Similarly, the level of CHOP expression in cells stably infected with the C/EBP β -CHOP retrovirus (Fig. 2B, lane 3) is comparable to that observed in

3T3-L1 cells grown in low glucose for 2 days (lane 8). Likewise, TLS-CHOP and its two mutants are expressed at a roughly equal level (lanes 4-6), which is slightly greater than that observed in the 402/91 myxoid liposarcoma cell line (lane 9). These results demonstrate that in this model system, the expression of C/EBP β , CHOP and TLS-CHOP closely mimics the normal or pathological conditions occurring in adipose tissue.

NIH3T3 cells expressing exogenous C/EBP β can be induced to differentiate in a manner very similar to 3T3-L1 cells (Yeh *et al.* 1995; Wu *et al.* 1995). To determine the adipogenic potential of the various cell pools, confluent cell monolayers were treated with adipogenic hormones for two days and the extent of differentiation was scored at day ten. As expected, the differentiation of NIH3T3 cells was completely dependent on ectopic expression of C/EBP β (Fig. 3A top, compare Φ - Φ to C/EBP β - Φ). Under these conditions, C/EBP β was able to convert essentially 100% of the cell monolayer into mature, fat-laden adipocytes. Co-expression of CHOP (C/EBP β -CHOP) strongly inhibited C/EBP β -driven adipogenesis as only a low percentage of the cells acquired small fat droplets. Similarly, TLS-CHOP abolished C/EBP β -driven adipogenesis and proved to be slightly, but consistently, better than CHOP. The extent of differentiation of TLS-CHOP-expressing cells (C/EBP β -TLS-CHOP) was essentially identical to that of cells infected with the parental vector (Φ - Φ). Importantly, this inhibitory effect of TLS-CHOP was not attributable to its transforming activity as only a minute percentage ($\ll 1\%$) of cells co-expressing C/EBP β and TLS-CHOP showed signs of morphological transformation (fusiform morphology or foci formation). On the contrary, the vast majority of these cells displayed a morphology which was indistinguishable from that of control cells. Surprisingly, the TLS-CHOP basic region mutant (C/EBP β -TLS-CHOP/BR) blocked adipogenic conversion by C/EBP β as effectively as CHOP. By contrast, TLS-CHOP bearing point mutations in its heterodimerizing domain (C/EBP β -TLS-CHOP/LZ) had no effect on C/EBP β -driven differentiation.

These morphological observations were corroborated by examining the expression of aP2, a late differentiation marker. As shown in Figure 3B (bottom), expression of aP2 was strongly induced upon differentiation of the C/EBP β - Φ and C/EBP β -TLS-CHOP/LZ cell pools. By contrast, there was little or no induction of aP2 in those pools that failed to differentiate morphologically. Importantly, the failure of the CHOP-, TLS-CHOP- and TLS-CHOP/BR-expressing cell pools to differentiate can not be attributed to reduced expression of the transcription factor driving the adipogenic program as C/EBP β was expressed equally among these cell pools (see Fig. 2A).

Because the leucine zipper domain of TLS-CHOP was required for its ability to inhibit C/EBP β -driven adipogenesis, we examined whether this effect of TLS-CHOP correlated with its ability to heterodimerize with C/EBP β *in situ*. Both TLS-CHOP (Fig. 4, lane 4) and its basic

region mutant (lane 5) could be co-immunoprecipitated from nuclear extracts with C/EBP β -specific antibodies, indicating that these proteins were stably complexed with C/EBP β . As expected, mutation of the leucine zipper domain of TLS-CHOP (lane 6) abolished its ability to heterodimerize with C/EBP β . Thus, the ability of TLS-CHOP to inhibit C/EBP β -driven adipogenesis requires its leucine zipper domain and correlates with its ability to form a stable heterodimer with C/EBP β *in situ*.

Ectopic expression of PPAR γ 2 can rescue TLS-CHOP-inhibited cells

The data presented thus far are consistent with a mechanism in which TLS-CHOP inhibits C/EBP-driven adipogenesis by directly interfering with C/EBP β function. However, they do not rule out the possibility that TLS-CHOP may block other requisite events which are independent of C/EBP β function. To address this possibility, we examined whether ectopic expression of PPAR γ 2, another adipogenic transcription factor (Tontonoz *et al.* 1994; Forman *et al.* 1995), could rescue TLS-CHOP-inhibited cells from their differentiation block. If PPAR γ 2 was able to rescue such cells, the results would demonstrate directly that TLS-CHOP-inhibited cells are capable of adipogenesis, suggesting that TLS-CHOP does not interfere with other C/EBP β -independent events. NIH3T3 pools expressing Φ - Φ and C/EBP β -TLS-CHOP were infected with a control retrovirus (WZLhygro) and one encoding PPAR γ 2 (WZLhygroPPAR γ 2). Following a brief selection in hygromycin B, cells were pooled and examined for expression of PPAR γ 2 and their ability to differentiate into adipocytes. Immunofluorescence studies demonstrated that ~80% of cells infected with WZLhygroPPAR γ 2 expressed PPAR γ 2 in the nucleus (Fig. 5A). By contrast, cells infected with the control virus (not shown) and uninfected C/EBP β -TLS-CHOP cells (see Fig. 8 right, below) did not express PPAR γ 2. Results of the differentiation assays demonstrated clearly that PPAR γ 2 was able to rescue TLS-CHOP-inhibited cells from their differentiation block (Fig. 5B). Following treatment with the PPAR γ 2 activator pioglitazone (Forman *et al.* 1995), C/EBP β -TLS-CHOP cells expressing PPAR γ 2 differentiated as well as PPAR γ 2-expressing control (Φ - Φ) cells. The results indicate that TLS-CHOP does not block C/EBP β -driven adipogenesis by interfering with other requisite C/EBP β -independent events.

TLS-CHOP blocks C/EBP β function by preventing its binding to target DNA sequences

To gain a better understanding of how TLS-CHOP inhibits C/EBP β function, we examined the possibility that TLS-CHOP blocks C/EBP β from binding to its DNA target sites. In a first test, the amount of C/EBP β DNA binding activity in each NIH3T3 pool was determined by the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using the aP2 binding site (Christy *et al.* 1989). Ectopic expression of C/EBP β resulted in an increase in the amount of complex formed between C/EBP β and the aP2 probe (Fig. 6A, compare lane 2 to lane 8). The presence of C/EBP β in this

complex is demonstrated by the fact that an anti-C/EBP β antibody could completely “supershift” this complex (lane 11). Although the five cell pools overexpressing C/EBP β contain the same amount of C/EBP β protein in the nucleus (Fig. 2A), the C/EBP β DNA binding activity in cells co-expressing CHOP (lane 14), TLS-CHOP (lane 20) or TLS-CHOP/BR (lane 26) was significantly reduced relative to C/EBP β - Φ cells (lane 8). By contrast, C/EBP β DNA binding activity was unaffected in cells co-expressing TLS-CHOP/LZ (lane 32).

The C/EBP β -CHOP heterodimer was recently shown to bind a subset of high affinity C/EBP sites (AAATGCAATCCCC, SAAB4 site; Ubeda *et al.* 1996). Thus, the same nuclear extracts were examined for C/EBP β DNA binding activity using the SAAB4 probe. The results were essentially the same as for the aP2 probe (Fig. 6B). Cells co-expressing CHOP (lane 14), TLS-CHOP (lane 20) or TLS-CHOP/BR proteins (lanes 26) showed reduced C/EBP β DNA binding activity relative to cells expressing only C/EBP β (lane 8) or those co-expressing TLS-CHOP/LZ (lane 32). An additional, relatively minor complex was observed below the C/EBP β -C/EBP β homodimer complex in cells co-expressing C/EBP β and CHOP (lanes 14 and 15). This complex is the C/EBP β -CHOP heterodimer, as it is eliminated by both anti-C/EBP β and anti-CHOP antibodies (lanes 17 and 18, respectively). It is noteworthy that no additional complexes were observed with extracts co-expressing C/EBP β and TLS-CHOP (or TLS-CHOP/BR), suggesting that unlike the C/EBP β -CHOP heterodimer, the C/EBP β -TLS-CHOP heterodimer can not bind to the SAAB4 sequence. However, we can not rule out the possibility that such complexes may be “masked” by the C/EBP β -C/EBP β homodimer complex.

This issue was examined further by measuring C/EBP β transactivation activity in the different NIH3T3 pools. For this purpose, each cell pool was transfected with a CAT reporter gene driven by a C/EBP-responsive promoter containing a trimerized aP2 binding site. A modest (4-fold), but consistent, increase in CAT reporter gene activity was observed in cells overexpressing C/EBP β (C/EBP β - Φ) relative to control (Φ - Φ) cells (Fig. 7, compare lanes 1 and 2). Importantly, TLS-CHOP completely abolished C/EBP β transactivation activity as cells co-expressing C/EBP β and TLS-CHOP showed the same level of CAT activity as cells expressing the parental vector (compare lane 4 to lane 1). As expected, TLS-CHOP mutated in its leucine zipper had no effect on C/EBP β transactivation activity (compare lane 6 to lane 2). CHOP (lane 3) and TLS-CHOP/BR (lane 5) were less effective than wild-type TLS-CHOP (lane 4) at inhibiting C/EBP β transactivation activity demonstrating that these results qualitatively paralleled those of the differentiation assays (Figs. 3A and 3B).

TLS-CHOP blocks induction of the adipogenic transcription factor PPAR γ 2

Two indirect lines of evidence suggest that the PPAR γ 2 gene is a downstream target of C/EBP β . Conditional expression of C/EBP β results in the induction of PPAR γ 2 mRNA (Wu *et*

al. 1995) and the mouse PPAR γ 2 promoter contains potential C/EBP binding sites (Zhu *et al.* 1995). Because PPAR γ 2 is an important component of the adipocyte differentiation machinery, we examined whether TLS-CHOP blocked the induction of PPAR γ 2 in C/EBP β -expressing cells following treatment with differentiation inducers. Cells expressing C/EBP β either alone (C/EBP β - Φ) or with TLS-CHOP (C/EBP β -TLS-CHOP) were grown to confluence, treated with differentiation inducers and examined for expression of PPAR γ 2 by immunofluorescence 2 days later. As expected, cells expressing C/EBP β alone showed clear evidence of PPAR γ 2 expression in the nucleus (Fig. 8, left). By contrast, cells co-expressing C/EBP β and TLS-CHOP (right) exhibited only background immunofluorescence that was evenly distributed over the entire cell. This uniform background immunofluorescence was similar to that observed with C/EBP β - Φ cells prior to treatment with differentiation inducers (not shown). Only an occasional C/EBP β -TLS-CHOP cell showed weak nuclear expression of PPAR γ 2 following treatment with differentiation inducers (Fig. 8, right). Together, the results demonstrate that TLS-CHOP effectively blocks C/EBP β function, induction of PPAR γ 2, and development of the mature adipocyte phenotype.

Discussion

Using a differentiation model that closely mimics physiological conditions and where the expression of C/EBP β is constitutive and sufficient to drive the adipogenic program, we demonstrate here that TLS-CHOP functions as a potent inhibitor of C/EBP β -driven adipogenesis. Unlike the 3T3-L1 system where a battery of transcription factors, including at least three C/EBP family members, cooperate to trigger the onset of differentiation, the simple model system described here allowed us to demonstrate that TLS-CHOP blocks adipocyte differentiation by directly interfering with C/EBP β function. Although CHOP was shown to inhibit the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes (Batchvarova *et al.* 1995), the mechanism underlying this inhibition is unclear as CHOP-expressing cells failed to induce normal levels of C/EBP α and C/EBP β , two factors which are required for 3T3-L1 adipogenesis. Thus, it is not possible to discern from that study whether the failure of CHOP-expressing to differentiate was attributable solely to an inhibition of C/EBP function by CHOP or a lack of required C/EBP expression (or both). By contrast, we have demonstrated here that TLS-CHOP inhibits C/EBP β function and blocks adipocyte differentiation under conditions where expression of C/EBP β is both constitutive and sufficient to drive the adipogenic program in cooperation with differentiation inducers.

Based on the result that three key mutations in the TLS-CHOP basic region have little effect on its anti-adipogenic activity, and unlike for CHOP (Ubeda *et al.* 1996; Fig. 6B), there is no evidence that the C/EBP β -TLS-CHOP heterodimer can bind sequence-specific DNA, we conclude it is unlikely that the inhibitory effect of TLS-CHOP is attributable to unscheduled gene expression that prevents adipocyte differentiation. The fact that ectopic expression of PPAR γ 2 can rescue TLS-CHOP-inhibited cells strongly supports this conclusion. Nor can the inhibitory effect of TLS-CHOP be attributed to its weak oncogenic activity (Zinszner *et al.* 1994), as the vast majority of C/EBP β -TLS-CHOP-expressing cells showed no signs of morphological transformation. On the contrary, our results indicate that the ability of TLS-CHOP to inhibit adipocyte differentiation is mediated largely through its ability to heterodimerize with and inhibit the function of C/EBP β . As shown here, this interaction inhibits C/EBP β DNA binding resulting in a decrease in its transactivation ability. Our results with the TLS-CHOP basic region mutant are somewhat at odds with the results of Ron and colleagues (Batchvarova *et al.* 1995) who reported that the basic region of CHOP was required for its ability to inhibit 3T3-L1 adipogenesis. We believe the most likely explanation for this discrepancy is that the CHOP basic region mutant used in that study was poorly expressed relative to wild-type CHOP (see Fig. 3B, Batchvarova *et al.* 1995). By contrast, the TLS-CHOP basic region mutant used here is expressed equally well relative to wild-type TLS-CHOP and heterodimerizes equally well with C/EBP β . Unfortunately, because there is no evidence that TLS-CHOP homodimers or

heterodimers can bind sequence-specific DNA, we could not demonstrate that the introduced mutations had the expected effect on TLS-CHOP's presumed DNA binding activity. However, given that the three basic amino acids altered are critical for C/EBP α DNA binding activity it is likely that if TLS-CHOP is capable of binding sequence-specific DNA, this mutant of TLS-CHOP would lack this activity.

Nevertheless, it is intriguing that the basic region mutant was slightly less effective than wild-type TLS-CHOP at inhibiting adipogenesis (but as good as CHOP, which is able to bind DNA), suggesting that the basic region does make, at best, a minor contribution to the anti-adipogenic effect of TLS-CHOP. The same conclusion can be reached for the TLS region by comparing the anti-adipogenic effect of TLS-CHOP to CHOP. Because the TLS region has been shown to function as a potent transcriptional activation domain when fused to a Gal4 DNA binding domain (Zinszner *et al.* 1994), and CHOP (but not TLS-CHOP) can bind, *albeit* weakly, to high affinity C/EBP binding sites (GCAAT) when complexed with C/EBP β (Ubeda *et al.* 1996; Fig. 6A), it is possible that TLS-CHOP possesses true transactivation activity. Nonetheless, the results of the differentiation assays demonstrate clearly that this putative activity, which has not been demonstrated yet for authentic TLS-CHOP, is not responsible for TLS-CHOP's inhibitory effect on adipogenesis. Moreover, we have been unable to demonstrate that co-expression of C/EBP β and TLS-CHOP can transactivate a promoter containing the high affinity (SAAB4) C/EBP binding sites (unpublished observations). Taken together, the results presented here indicate that the anti-adipogenic effect of TLS-CHOP is attributable largely, if not entirely, to its ability to directly block C/EBP β function.

The finding that TLS-CHOP, the product of a chromosomal translocation found only in a malignancy of adipose tissue, involves a member of the C/EBP family makes much sense in light of the pivotal role of the C/EBP transcription factors in adipocyte differentiation. C/EBP α was the first transcription factor shown to play a critical role in adipogenesis. Results from four laboratories have shown that C/EBP α is both sufficient (Freytag and Geddes 1992; Freytag *et al.* 1994; Lin *et al.* 1994) and necessary (Samuelsson *et al.* 1993; Lin *et al.* 1994; Wang *et al.* 1995) for adipogenesis *in vitro* and *in vivo*. C/EBP β and C/EBP δ , two proteins closely related to C/EBP α , and PPAR γ 2, a transcription factor belonging to the nuclear hormone receptor superfamily, are also important factors in the adipogenic pathway (Yeh *et al.* 1995; Wu *et al.* 1995; Tontonoz *et al.* 1994; Forman *et al.* 1995). The apparent redundancy of these transcription factors was initially somewhat puzzling, however, their respective roles in adipocyte differentiation are becoming clearer. In 3T3-L1 model system, induction of C/EBP β is one of the first events to occur following treatment with adipogenic hormones (Yeh *et al.* 1995). Expression of C/EBP β , in collaboration with C/EBP δ , generates a second wave of transcriptional activation that leads to the induction of PPAR γ 2 (Wu *et al.* 1995). Although it is not known

whether the induction of PPAR γ 2 expression is a direct effect of C/EBP β , the presence of C/EBP binding sites in the PPAR γ 2 promoter makes it likely that PPAR(is a downstream effector of C/EBP β . The regulation of C/EBP α expression is more complex and subject to both positive and negative control. The presence of PPAR and C/EBP binding sites in the C/EBP α promoter (Christy *et al.* 1991), coupled with the fact that C/EBP β (LAP) can transactivate this promoter in transfection assays (our unpublished results), suggests that induction of C/EBP α results from a cooperation between C/EBP β and PPAR γ 2. Whereas the induction of C/EBP β and PPAR γ 2 occur early (by 24 h) and at least one day prior to any signs of morphological differentiation, the induction of C/EBP α (by 48 h) coincides precisely with cell cycle withdrawal and commitment to the adipocyte differentiation program (Christy *et al.* 1989; Freytag and Geddes 1992). These observations, coupled with the facts that C/EBP α is the only adipogenic transcription factor demonstrated to inhibit cell growth (Umek *et al.* 1991; Freytag and Geddes 1992; Freytag *et al.* 1994; Timchenko *et al.* 1996) and is required for adipogenesis both *in vitro* and *in vivo* (Samuelsson *et al.* 1991; Lin and Lane 1992; Wang *et al.* 1995), make it likely that induction of C/EBP α is the critical event which commits adipoblasts to the differentiation program. However, the fact that C/EBP β , but not C/EBP α , is expressed in myxoid liposarcoma suggests that TLS-CHOP is blocking differentiation of this lineage at a point prior to induction of C/EBP α , making C/EBP β the likely target. Given that PPAR γ 2 and C/EBP α are likely downstream targets of C/EBP β , inhibition of C/EBP β function by TLS-CHOP would prevent their induction and commitment to the adipocyte differentiation pathway.

Although the studies described here are directly relevant to the genesis of myxoid liposarcoma, we believe they may have even broader significance. TLS-CHOP belongs to a growing family of fusion oncoproteins resulting from chromosomal translocations (see Rabbits 1994 for a review). That most of these fusion proteins are specific for a given type of cancer suggests they are impinging on a mechanism which is specific for that particular cell lineage (e.g. differentiation machinery, cell-specific signal transduction pathway) and not some general proliferation mechanism (cell cycle machinery). Although incomplete differentiation is a hallmark characteristic of the cancer cell, there is little *direct* proof that the inability to differentiate normally is in fact important in the cancer process. Indeed, because of the well known reciprocal relationship between proliferation and differentiation, it was often argued that the inability of a cancer cell to differentiate completely was simply an indirect consequence of uncontrolled proliferation. Cancer cells can not irreversibly exit the cell cycle, which is required for terminal differentiation. This argument has been very difficult to challenge as it is buttressed by the fact that many of the genes known to be mutated in human cancer play a role in the regulation of cell proliferation. The discovery of oncoproteins such as TLS-CHOP and others (e.g. PML-RAR"), whose molecular targets are integral components of the cell differentiation machinery, however, significantly weakens this argument, at least for those cancers that involve

them. On the contrary, the fact that these oncoproteins directly target and inhibit the cell differentiation machinery argues strongly that a blockade in differentiation is important, but clearly not sufficient, for development of the malignant phenotype. Indeed, it is likely that the other component of the TLS-CHOP fusion oncoprotein (i.e. TLS) provides an important function required for malignant transformation *in vivo*, such as a continuous growth signal to differentiation-arrested cells.

There are now dozens of examples of human malignancies that express fusion oncoproteins (Rabbitts 1994). However, by in large, the molecular mechanism by which these fusion proteins exert their oncogenic effect is still poorly understood. Acute promyelocytic leukemia (APL), which expresses the PML-RAR" fusion oncoprotein, has served as a paradigm for a number of reasons: (i) the biochemical function of one component (RAR") of the fusion protein is known (Giguere *et al.* 1987; Petkovich *et al.* 1987), (ii) the role of retinoic acid and its receptor (RAR") in myelocytic differentiation is well established (Collins *et al.* 1990), (iii) ectopic expression of PML-RAR" in human myeloid precursor cells *in vitro* recapitulates the critical features of promyelocytic leukemia *in vivo* (Grignani *et al.* 1993), and remarkably (iv) all *trans*-retinoic acid can override the differentiation block *in vivo* and cause remission of the disease (Warrell *et al.* 1991). Nevertheless, in spite of this knowledge, the molecular mechanism by which PML-RAR" blocks myeloid differentiation and promotes leukemogenesis is unclear. One model proposes that PML-RAR" blocks RAR-dependent transcriptional activation via a dominant negative mechanism and *trans*-retinoic acid is able to alleviate this block (de The *et al.* 1991). A second model postulates that PML-RAR" disrupts normal PML function, which is presently unknown but presumed to be necessary for myeloid differentiation, and the presence of the RAR" ligand binding domain is able to conditionally restore PML function in combination with retinoic acid (Kakizuka *et al.* 1991; Dyck *et al.* 1994; Weis *et al.* 1994). Indeed, it is possible that both mechanisms may be operative in APL (Grignani *et al.* 1993). By contrast, the molecular mechanism by which TLS-CHOP blocks adipocyte differentiation is very clear. As demonstrated here, TLS-CHOP directly binds to and inhibits the function of a transcription factor (C/EBP β) that is a central component of the adipocyte differentiation machinery. Thus, in some respects, our understanding of the molecular pathogenesis of myxoid liposarcoma is somewhat clearer than APL. Future studies of TLS-CHOP should shed light on the function of the TLS domain and how it contributes to malignant transformation.

Materials and Methods

Retroviral and plasmid constructs

The parental vector, pLN(Φ - Φ), was derived from pLXSN (Miller and Rosman 1989). The encephalomyocarditis virus IRES sequence from pWZLneo (Freitag *et al.* 1994) was introduced into pLXSN as an *EcoRI*-*BamHI* fragment following PCR amplification. The mouse C/EBP β coding sequence was amplified by PCR from pMEX-CRP2 (Williams *et al.* 1991) and cloned into the *EcoRI* restriction site of pLN(Φ - Φ) to generate pLN(C/EBP β - Φ). pLN(C/EBP β -CHOP) and pLN(C/EBP β -TLS-CHOP) were constructed by insertion of PCR-amplified human CHOP and TLS-CHOP coding sequences into the *BamHI* site of pLN(C/EBP β - Φ), respectively. Human TLS-CHOP coding sequences were obtained by PCR amplification of a 402/91 myxoid liposarcoma (Croizat *et al.* 1993; obtained from P. Aman) 8ZAP (Stratagene) cDNA library. The two TLS-CHOP mutants versions were engineered by PCR-mediated mutagenesis. Mutated regions were verified by DNA sequencing. TLS-CHOP/BR was found to carry a Glu to Gly mutation at amino acid 386. To generate pWZLhygroPPAR γ 2, the mouse PPAR γ 2 coding sequence was PCR-amplified from pBluescript-PPAR γ 2 (Tontonoz *et al.* 1994; obtained from B. Spiegelman) and blunt-end ligated into pWZLhygro between the *BamHI* and *EcoRI* sites. pWZLhygro is identical to pWZLneo (Freitag *et al.* 1994) except that it contains the hygromycin-resistance gene in place of the neomycin-resistance gene.

p(aP2)₃TATA-CAT was created by cloning the double-stranded oligonucleotide (5'-AGCTTTTCTCAACTTTGGAGCTCTTTTCTCAACTTTGGGTACCTTTTCTCAACTTTGG-3') into *HindIII*-*BamHI* digested TATA-CAT (Stein *et al.* 1993).

Cell culture and gene transfection

Retroviruses were produced by transient transfection of the Bosc 23 ecotropic packaging cell line (Pear *et al.* 1993). Cells (5×10^6 , 60 mm diameter dish) were transfected by the calcium phosphate precipitation method using 10 μ g of plasmid DNA. Viral supernatants were harvested 48 h later and filtered through a 0.45 micron filter syringe.

NIH3T3 cells (ATCC) were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% calf serum (growth medium). NIH3T3 cells (3×10^5 , 60 mm diameter dish) were infected with a similar titer of the different retroviruses one day after plating. Viruses were left in contact with the cells for 6 h in growth medium containing 4 μ g/ml polybrene. Two days later, infected cells were detached by trypsinization and seeded into four dishes (100 mm diameter) containing growth medium supplemented with 500 μ g/ml G418 (GIBCO/BRL). After selection for one week, G418-resistant cells were pooled and subcultured for subsequent

experiments. NIH3T3 pools infected with WZLhygro and WZLhygroPPAR γ 2 were treated in exactly the same manner except cells were selected in growth medium containing 400 μ g/ml hygromycin B for 7 days.

To test for differentiation ability, each pool was seeded at 3×10^5 cells per dish (60 mm diameter) and treated three days later (confluence) with differentiation medium consisting of DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 1 μ M dexamethasone, 0.5 mM methylisobutylxanthine, and 10 μ g/ml insulin. After 48 h of treatment, the medium was changed and cells were maintained thereafter in the same medium but containing only insulin. Seven days later, cells were either fixed with 3.7% formaldehyde and stained with Oil Red O or processed for whole cell protein analysis. NIH3T3 pools expressing PPAR γ 2 were induced to differentiate with 5 μ M pioglitazone as previously described (Forman *et al.* 1995).

To test for C/EBP β transactivation, each cell pool (3×10^5 , 60 mm diameter dish) was co-transfected with 2.5 μ g of a chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene and 0.5 μ g of pCMV luciferase using lipofection (GIBCO/BRL). Twenty four hours later, cells were lysed in reporter lysis buffer (Promega) and equal amounts of transfection efficiency-corrected cell extracts were assayed for CAT activity.

Western blot analysis and co-immunoprecipitation

Nuclear extracts were prepared from actively dividing cell cultures. Briefly, cells were washed twice with ice cold phosphate buffered saline (PBS), collected by centrifugation and the cell pellet was resuspended in 500 μ l Nonidet P-40 (NP-40) lysis buffer (10 mM Tris pH 7.4, 6.6 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5% NP-40, 500 μ M PMSF). After a 15 min incubation on ice, the suspension was homogenized and cell debris removed by centrifugation. The crude nuclei were washed in 500 μ l of the same buffer, collected by microcentrifugation, lysed in Laemmli sample buffer and boiled for 10 min. The same protocol was used to prepare nuclear extracts from 3T3-L1 and 402/91 cells. Proteins were resolved by SDS-polyacrylamide (12%) gel electrophoresis and specific proteins were detected by Western blotting using the enhanced chemiluminescence system (Amersham).

For co-immunoprecipitation studies, nuclei were prepared as described above except the nuclear proteins were extracted from crude nuclei in high salt buffer [20 mM HEPES pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% (vol/vol) Triton X-100] for 30 min on ice. The NaCl concentration was adjusted to 150 mM with the same buffer lacking NaCl and proteins were immunoprecipitated for 2 h at room temperature with 5 μ l of anti C/EBP β (D298, Santa Cruz) and 20 μ l of protein A-Sepharose (Pharmacia). Pellets were washed sequentially with PBS containing

0.1% Triton X-100, PBS containing 500 mM NaCl, and PBS. Immunoprecipitated proteins were boiled for 10 min in Laemmli sample buffer and processed for Western analysis as described above.

PPAR γ 2 Immunofluorescence

Cells (10^5) were plated on glass chamber slides and allowed to grow to confluence. Cells were either left untreated or treated with differentiation inducers as described above. Cells were fixed in 3.7% (vol/vol) formalin, permeabilized with methanol, and incubated with a polyclonal rabbit anti-PPAR γ 2 antibody (PA3-821, Affinity Bioreagents Inc.) followed by FITC-conjugated donkey anti-rabbit IgG secondary antibody (both 1:200 dilution in PBS with 3% bovine serum albumin) for 1 h at 37°C. Samples were examined and photographed using an Olympus BX40 fluorescent microscope.

Electrophoretic mobility shift assays

Nuclear extracts were prepared exactly as described elsewhere (Shreiber *et al.* 1989). Nuclear extracts prepared from the different pools were first analyzed by Western blotting to normalize for LAP expression. Twenty micrograms (20 μ g) of nuclear extract were incubated in C/EBP DNA binding buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM dithiothreitol, 50 mM KCl, 10% (vol/vol) glycerol, 25 μ g/ml poly d(I-C); Cao *et al.* 1991) on ice for 30 min in the presence of either 100 ng unlabelled competitor DNA, 100 ng anti-C/EBP β (C19, Santa Cruz) or anti-CHOP antibody (R20, Santa Cruz) prior to the addition of the [32 P]-labeled DNA probes. Nucleoprotein complexes were resolved in a 6% non-denaturing polyacrylamide gel prepared in 0.5 X TBE. The following [32 P]-labeled, double-stranded oligonucleotides were used as probes in DNA-binding reactions: aP2, 5'-agcttgTTTCTCAACTTTGa-3'; SAAB4: 5'-agcttgAAATGCAATCGCCa-3'.

Acknowledgments

We thank B. Spiegelman for providing the PPAR γ 2 cDNA, D. Lane for the aP2 antibody, and K. Rogulski for comments on the manuscript. This work was supported by a grant from the NIH (CA62295). We gratefully acknowledge D. Stéhelin and BioMérieux for financial support. G. Adelmant was supported by a fellowship from the French Research Ministry.

References

- Batchvarova, N., X. Wang, and D. Ron. 1995. Inhibition of adipogenesis by the stress-induced protein CHOP (GADD153). *EMBO J.* **14**: 4654-4661.
- Cao, Z., R. Umek, and S. McKnight. 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes & Dev.* **5**: 1538-1552.
- Carlson, S., T. Fawcett, J. Bartlett, M. Bernier, N. Holbrook. 1993. Regulation of the C/EBP-related gene, GADD153, by glucose deprivation. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 4736-4744.
- Christy, R., V. Yang, J. Ntambi, D. Geiman, W. Landschulz, A. Friedman, Y. Nakabeppu, T. Kelly, and M. D. Lane. 1989. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes. *Genes & Dev.* **3**: 1323-1335.
- Christy, R., K. Kaestner, D. Geiman, and M. D. Lane. 1991. CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2593-2597.
- Collins, S., K. Robertson, L. Mueller. 1990. Retinoic acid induced granulocytic differentiation of HL60 myeloid leukemia cells is mediated directly through the retinoic acid receptor (RAR α). *Mol. Cell. Biol.* **10**: 2154-2161.
- Crozat, A., P. Aman, N. Mandahl, D. Ron. 1993. Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. *Nature* **363**: 640-644.
- Descombes, P. and U. Schibler. 1991. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* **67**: 569-579.

- de The, H., C. Lavau, A. Marchio, C. Chomienne, L. Degos, and A. Dejean. 1991. The PML-RAR" fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* **66**: 675-684.
- Dyck, J., G. Maul, W. Miller, J. Chen, A. Kakizuka, and R. Evans. 1994. A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* **76**:333-343.
- Forman, B., P. Tontonoz, J. Chen, R. Brun, B. Spiegelman, R. Evans. 1995. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR(. *Cell* **83**: 803-812.
- Freytag, S. and T. Geddes. 1992. Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBP α . *Science* **256**: 379-382.
- Freytag, S., D. Paielli, and J. Gilbert. 1994. Ectopic expression of the CCAAT/enhancer binding protein " promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes & Dev.* **14**: 1654-1663.
- Giguere, V., E. Ong, P. Segui, and R. Evans. 1987. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* **330**: 624-629.
- Kakizuka, A., W. Miller, K. Umesono, R. Warrell, S. Frankel, V. Murty, E. Dmitrovsky, and R. Evans. 1991. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR" with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* **66**: 663-674.
- Landschulz, W., P. Johnson, and S. McKnight. 1989. The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science* **243**: 1681-1688.
- Lin, F. and M. D. Lane. 1992. Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Genes & Dev.* **6**: 533-544.
- Miller, A.D. and G. Rosman. 1989. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *BioTechniques* **7**: 980-990.
- Panagopoulos, I., M. Hoglund, F. Mertens, N. Mandahl, F. Mittelman, and P. Aman. 1996. Fusion of the EWS and CHOP genes in myxoid liposarcoma. *Oncogene* **12**: 489-494.
- Pear, W., G. Nolan, M. Scott, and D. Baltimore. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8392-8296.

- Petkovich, M., N. Brand, A. Krust, and P. Chambon. 1987. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* **330**: 444-450.
- Rabbitts, T., A. Forster, R. Larson, P. Nathan. 1993. Fusion of the dominant negative transcription regulator *CHOP* with a novel gene *FUS* by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. *Nature Genet.* **4**: 175-180.
- Rabbitts, T. 1994. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* **372**: 143-149.
- Ron, D. and J. Habener. 1992. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes & Dev.* **6**: 439-453.
- Samuelsson, L., K. Stromberg, K. Vikman, G. Bjursell, and S. Enerback. 1991. The CCAAT/enhancer binding protein and its role in adipocyte differentiation: evidence for direct involvement in terminal adipocyte development. *EMBO J.* **10**: 3787-3793.
- Schreiber, E., P. Matthias, M. Muller, and W. Schaffner. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with mini-extracts prepared from a small number of cells. *Nuc. Acids Res.* **17**:6419-6430.
- Stein, B., and A. Baldwin. 1993. Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF6B. *Mol. Cell Biol.* **13**: 7191-7198.
- Timchenko, N., M. Wilde, M. Nakanishi, J. Smith, and G. Darlington. 1996. CCAAT/enhancer-binding protein " (C/EBP α) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/Cip-1/Sdi-1) protein. *Genes & Dev.* **10**: 804-815.
- Tontonoz, P., E. Hu, and B. Spiegelman. 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **79**: 1147-1156.
- Ubeda, M., X. Wang, H. Zinzner, I. Wu, J. Habener, and D. Ron. 1996. Stress-induced binding of the transcription factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 1479-1489.
- Umek, R., A. Friedman, and S. McKnight. 1991. CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science* **251**: 288-292.

- Wang, N., M. Finegold, A. Bradley, C. Ou, S. Abdelsayed, M. Wilde, L. Taylor, D. Wilson, G. Darlington. 1995. Impaired energy homeostasis in C/EBP α knockout mice. *Science* **269**: 1108-1112.
- Wang Z., Y. Xie, N. Bucher, and S. Farmer. 1995. Conditional ectopic expression of C/EBP β in NIH3T3 cells induces PPAR α and stimulates adipogenesis. *Genes & Dev.* **9**: 2350-2363.
- Wang, X., and D. Ron. 1996. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP kinase. *Science* **272**: 1347-1349.
- Weis, K., S. Rambaud, C. Lavau, J. Jansen, T. Carvalho, M. Carmo-Fonseca, A. Lamond, and A. Dejean. 1994. Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR" in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell* **76**:345-356.
- Williams, S., C. Cantwell, and P. Johnson. 1991. A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro. *Genes & Dev.* **5**: 1553-1567.
- Yeh, W. Z. Cao, M. Classon, and S. McKnight. 1995. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes & Dev.* **9**: 168-181.
- Zhu, Y., C. Qi, J. Korenberg, X-N Chen, D. Noya, M. Rao, J. Reddy. 1995. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor (mPPAR α) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR α isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7921-7925.
- Zinszner, H., R. Albalat, and D. Ron. 1994. A novel effector domain from the RNA-binding protein TLS or EWS is required for oncogenic transformation by CHOP. *Genes & Dev.* **8**: 2513-2526.

Figure Legends

Figure 1. Schematic diagram of retroviral vectors. The solid rectangles represent the Moloney murine leukemia virus (MoMuLV) long terminal repeats (LTR). IRES, internal ribosome entry site of the encephalomyocarditis virus; SV40, SV40 early promoter; Neo, neomycin resistance gene. The precise location of the point mutations in the two TLS-CHOP mutants are indicated at the bottom.

Figure 2. Western blot analysis of G418-resistant NIH3T3 pools. (A) Western blot showing expression of C/EBP β . Lanes 1-6, NIH3T3 pools expressing the six retroviral vectors (Φ - Φ , C/EBP β - Φ , C/EBP β -CHOP, C/EBP β -TLS-CHOP, C/EBP β -TLS-CHOP/BR and C/EBP β -TLS-CHOP/LZ, respectively); lane 7, undifferentiated 3T3-L1 cells on day 0 (confluence); lane 8, 3T3-L1 cells on day 2 of the differentiation program. The 36 kDa (LAP) and 20 kDa (LIP) C/EBP β proteins are indicated. The 20 kDa C/EBP β (LIP) protein is a translation product from an internal methionine codon (Descombes and Schibler, 1991). (B) Western blot showing expression of CHOP and TLS-CHOP. Lanes 1-6 as in (A); lane 7, 3T3-L1 cells on day 0; lane 8, 3T3-L1 cells on day 2 following addition of adipogenic hormones in low glucose medium; lane 9, 402/91 human myxoid liposarcoma cells. The positions of the 75 kDa TLS-CHOP (and mutants) and 29 kDa CHOP proteins are indicated. Each lane was loaded with an equal amount of nuclear protein.

Figure 3. Results of differentiation assays. (*Top*) The six NIH3T3 pools were induced to differentiate as described in Material and Methods. Monolayers were fixed and stained with Oil Red O, which stains for lipid, after 7 days. (*Bottom*) Western blot analysis demonstrating expression of aP2. Each lane was loaded with an equal amount of cellular protein.

Figure 4. Co-immunoprecipitation of C/EBP β and the TLS-CHOP proteins. C/EBP β complexes were precipitated from crude nuclei with anti-C/EBP β antibodies and immunoprecipitates were analyzed for the various CHOP proteins by Western blotting. Lanes 1-6, NIH3T3 pools expressing the six retroviral vectors (Φ - Φ , C/EBP β - Φ , C/EBP β -CHOP, C/EBP β -TLS-CHOP, C/EBP β -TLS-CHOP/BR and C/EBP β -TLS-CHOP/LZ, respectively). The positions of the 75 kDa TLS-CHOP (wild-type and mutants) and 29 kDa CHOP proteins are indicated.

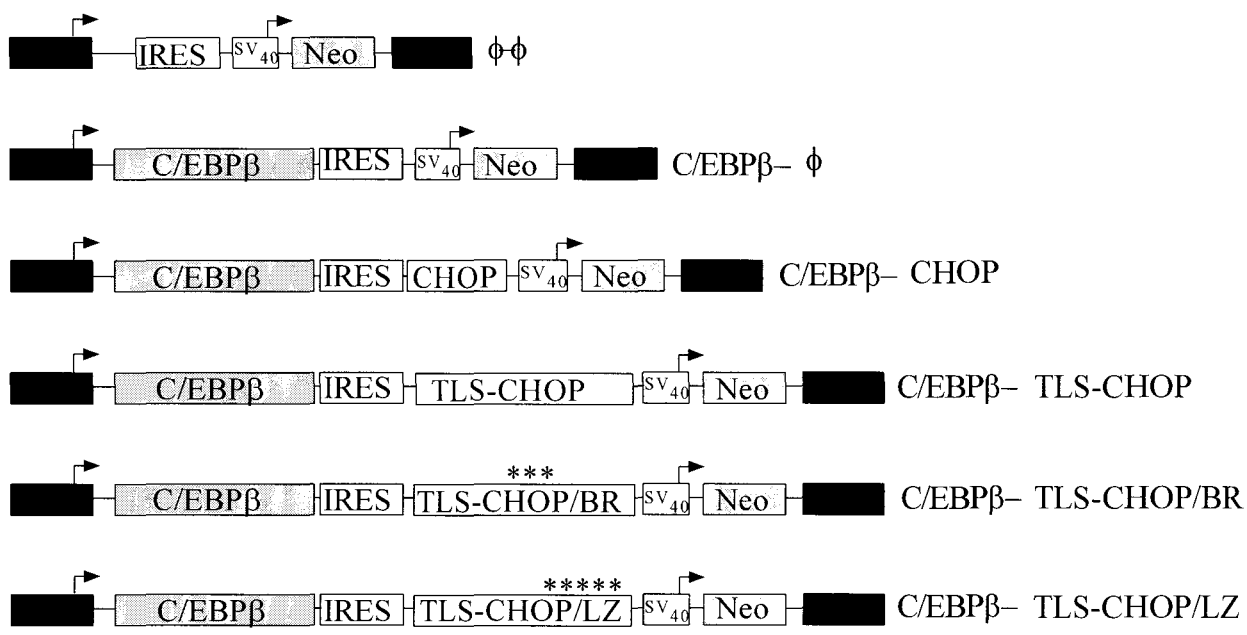
Figure 5. PPAR γ 2 can rescue TLS-CHOP-inhibited NIH3T3 cells. (A) Immunofluorescence of C/EBP β -TLS-CHOP cells stably infected with WZLhygroPPAR γ 2 demonstrating expression of PPAR γ 2 in the nucleus. (B) Φ - Φ and C/EBP β -TLS-CHOP cell pools infected with the parental WZLhygro retroviral vector (no PPAR γ 2) or WZLhygroPPAR γ 2 (PPAR γ 2) were

examined for their ability to differentiate in the presence of 5 :M pioglitazone. Cell monolayers were fixed and stained with Oil Red O 8 days later.

Figure 6. C/EBP β DNA-binding activity in NIH3T3 pools. (A) Electrophoretic mobility shift assays using the aP2 probe. Φ - Φ (lanes 1-6), C/EBP β - Φ (lanes 7-12), C/EBP β -CHOP (lanes 13-18), C/EBP β -TLS-CHOP (lanes 19-24), C/EBP β -TLS-CHOP/BR (lanes 25-30), C/EBP β -TLS-CHOP/LZ (lanes 31-36). No nuclear extract (lanes 1, 7, 13, 19, 25, 31); nuclear extract with no additions (lanes 2, 8, 14, 20, 26, 32); addition of nonspecific (Sp1 binding site) competitor DNA (lanes 3, 9, 15, 21, 27, 33); addition of specific (aP2 binding site) competitor DNA (lanes 4, 10, 16, 22, 28, 34); addition of anti-C/EBP β antibodies (lanes 5, 11, 17, 23, 29, 35); addition of anti-CHOP antibodies (lanes 6, 12, 18, 24, 30, 36). The positions of the C/EBP β -C/EBP β homodimer, supershifted complexes and free aP2 probe are indicated. (B) Electrophoretic mobility shift assays using the SAAB4 probe. Lanes are exactly as in A, except the specific competitor was unlabeled SAAB4 DNA. The positions of the C/EBP β -C/EBP β homodimer, C/EBP β -CHOP heterodimer, and free SAAB4 probe are indicated.

Figure 7. C/EBP β transactivation activity in NIH 3T3 pools. NIH3T3 pools were transfected with p(aP2)₃TATA-CAT as described in Materials and Methods. Twenty four hours later, cells were harvested and assayed for CAT activity. Lanes 1-6: Φ - Φ , C/EBP β - Φ , C/EBP β -CHOP, C/EBP β -TLS-CHOP, C/EBP β -TLS-CHOP/BR and C/EBP β -CHOP/LZ, respectively. An equal amount of each cell extract, after correcting for transfection efficiency, was assayed.

Figure 8. TLS-CHOP-inhibited cells fail to induce PPAR γ 2. Confluent cell monolayers expressing either C/EBP β alone (C/EBP β - Φ , left) or co-expressing C/EBP β and TLS-CHOP (C/EBP β -TLS-CHOP, right) were treated with differentiation inducers for 2 days and examined for expression of PPAR γ 2 by immunofluorescence. Cells on the right were intentionally overexposed to show the uniform background immunofluorescence and lack of nuclear staining. Cells were photographed at a magnification of 500 X.



Basic region mutant

Leucine zipper mutant

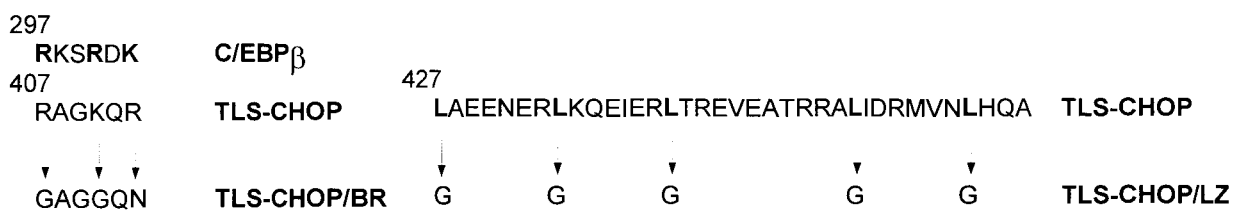


Figure 1

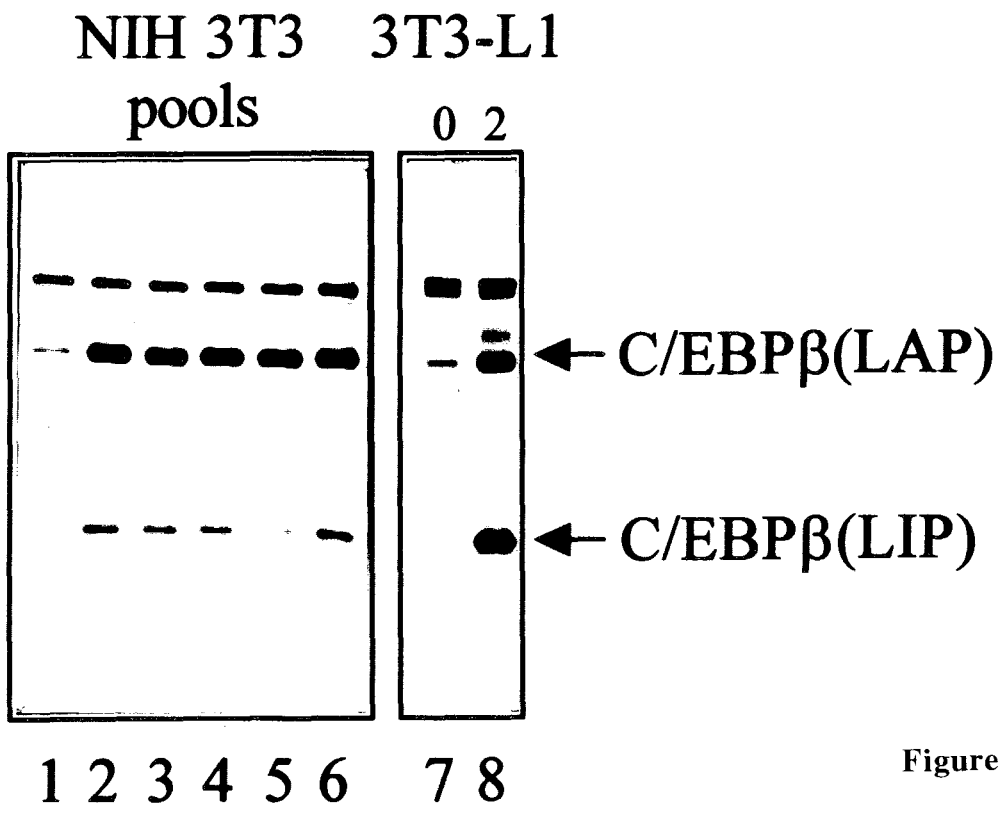


Figure 2A

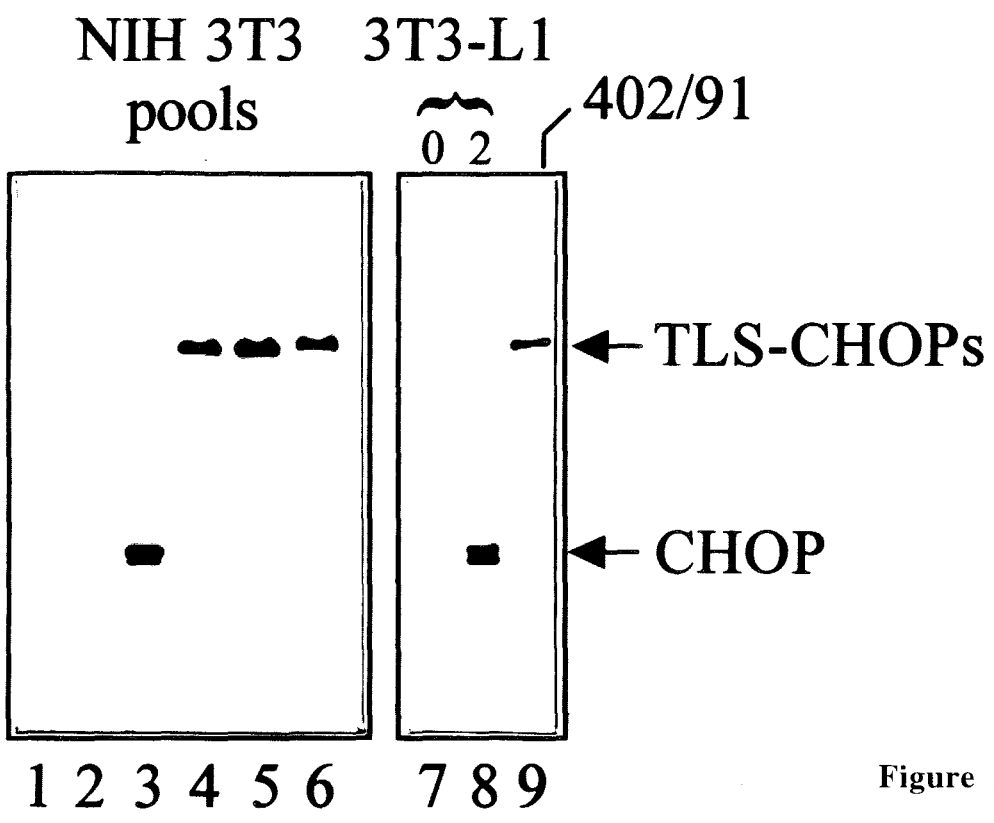


Figure 2B

Figure 3A

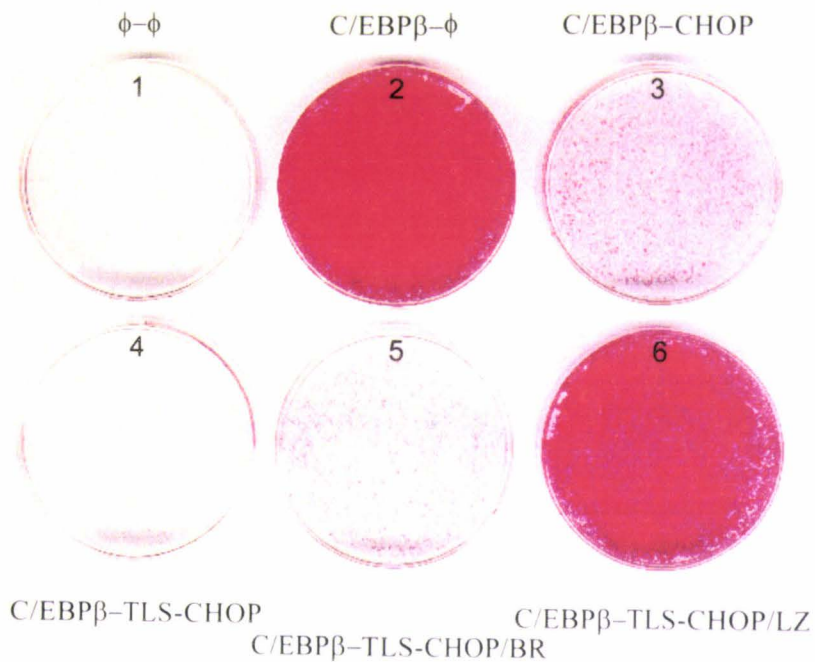


Figure 3B

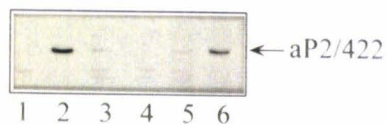
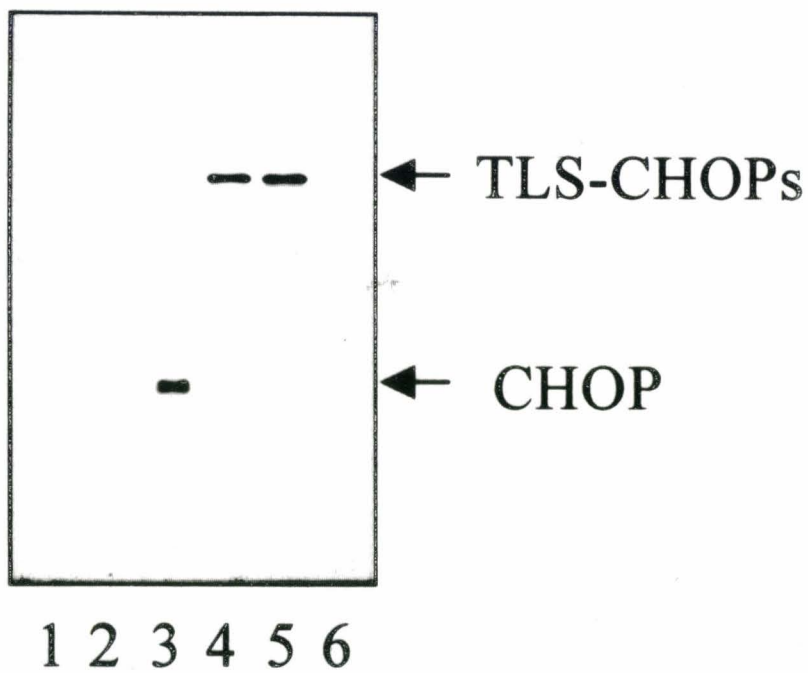


Figure 4



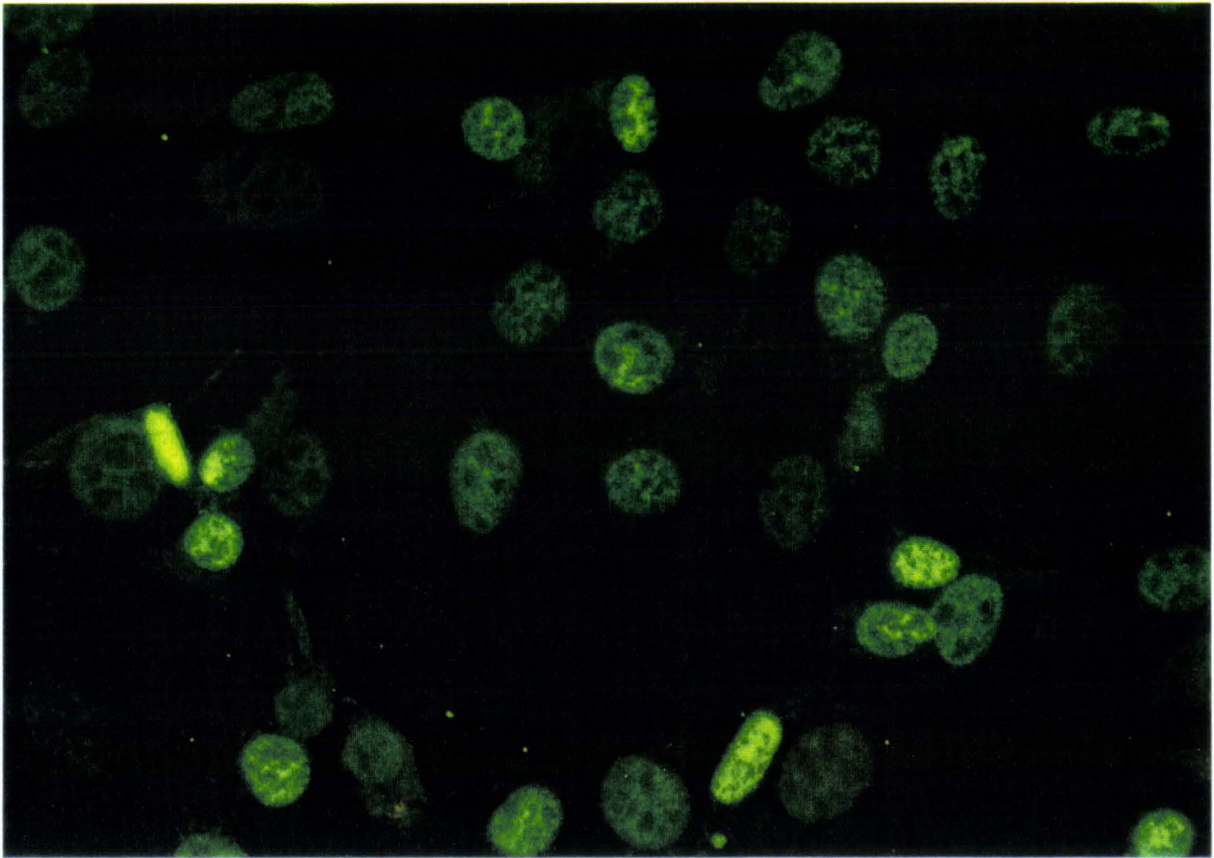


Figure 5A

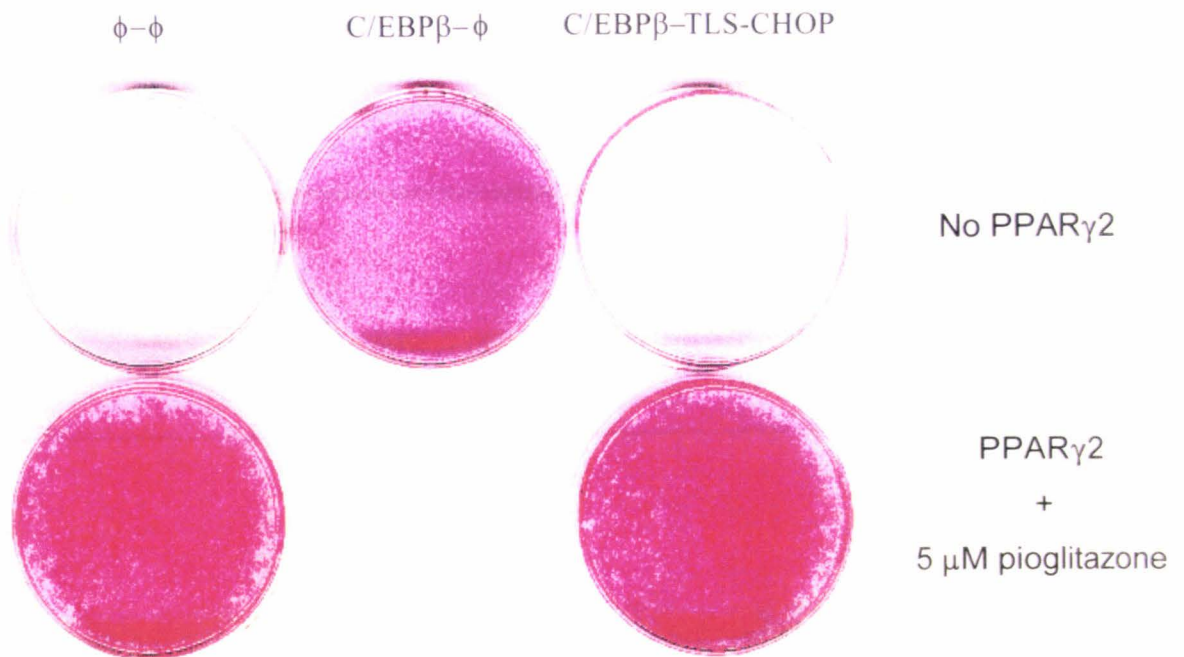


Figure 5B

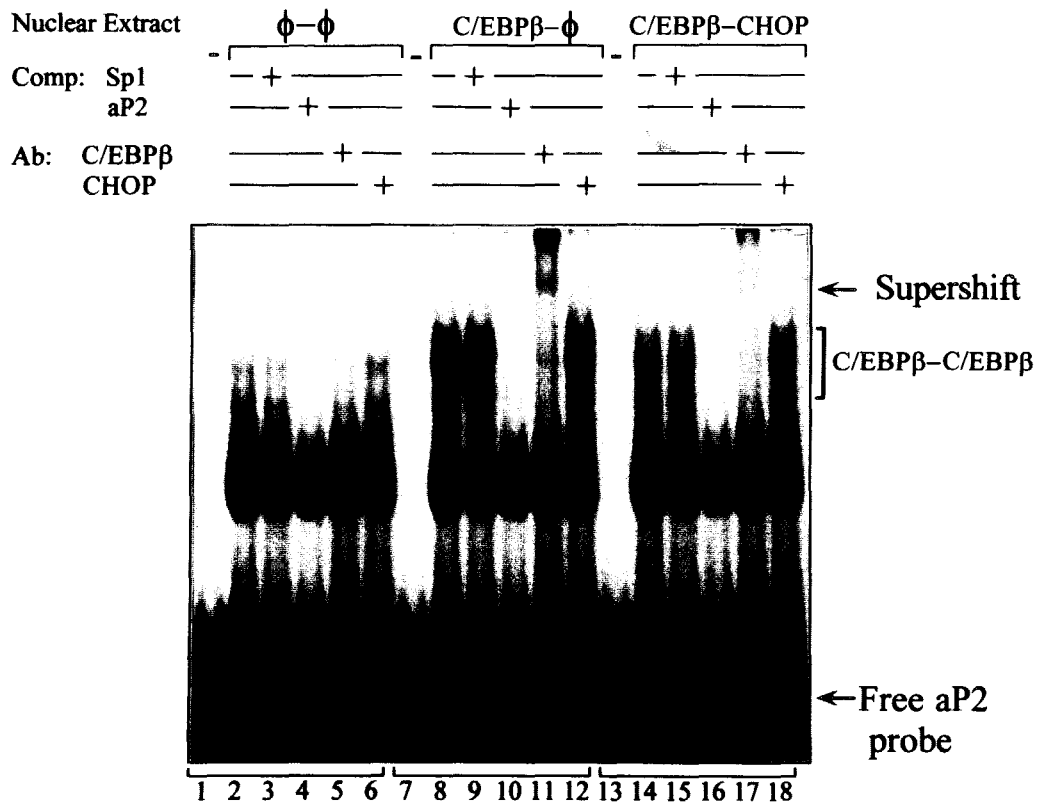
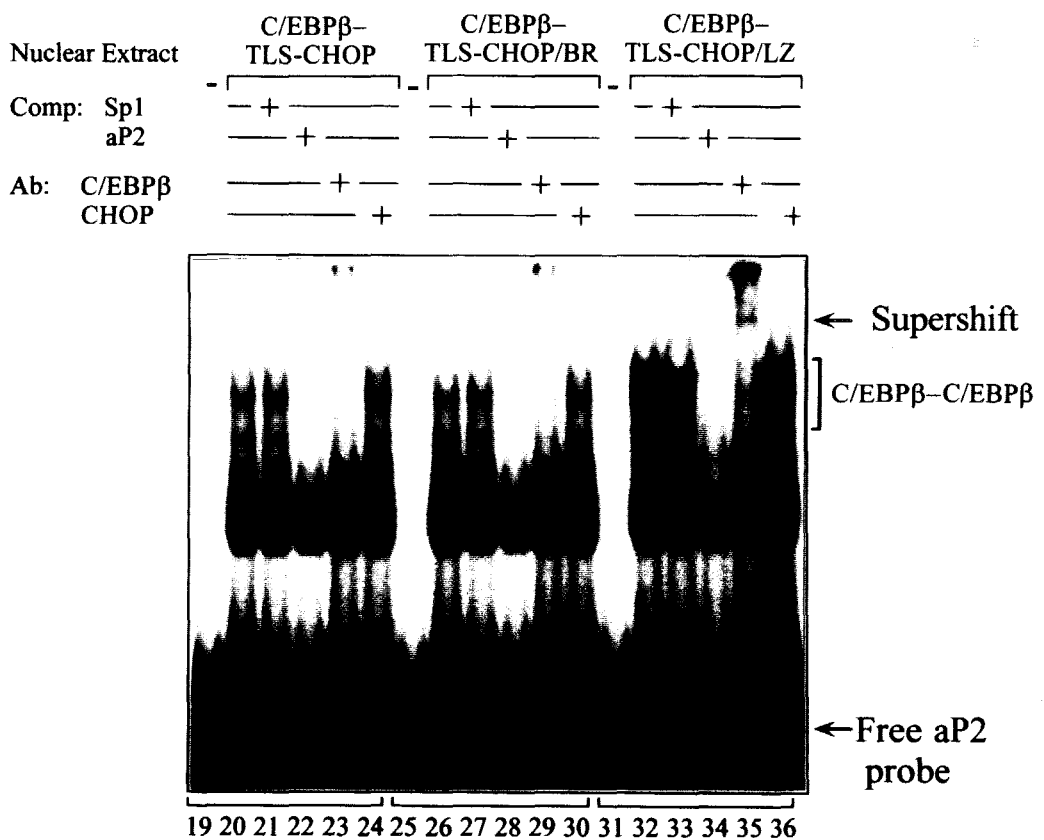


Figure 6A



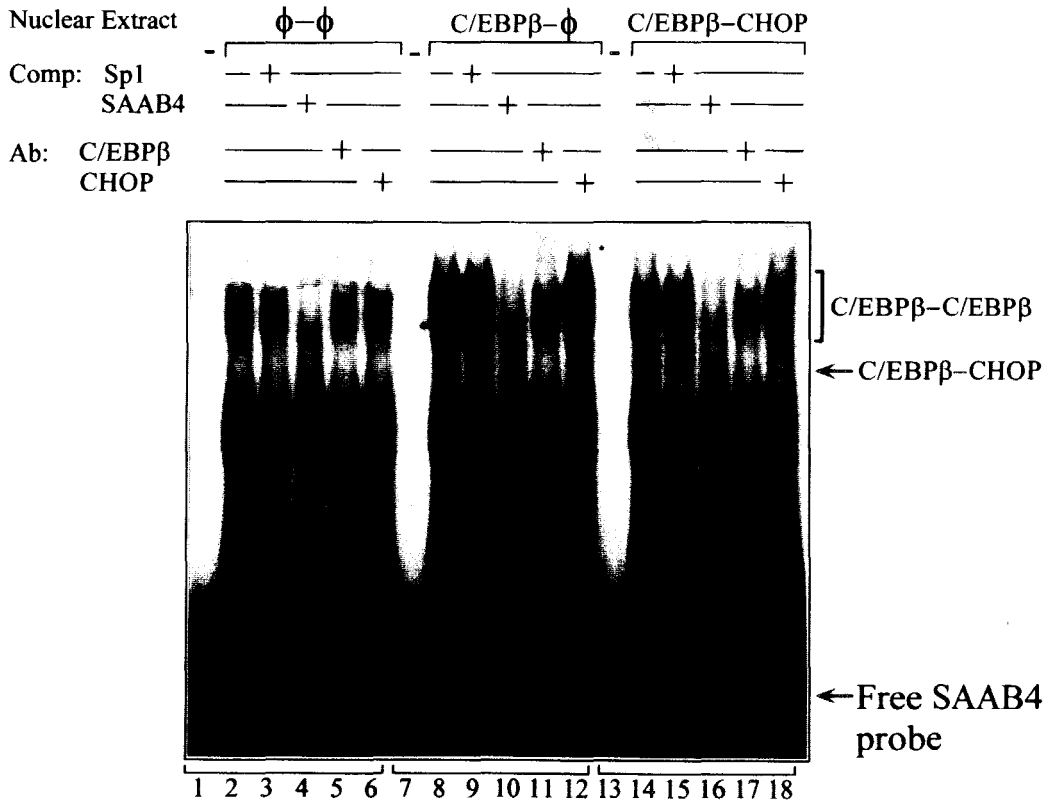
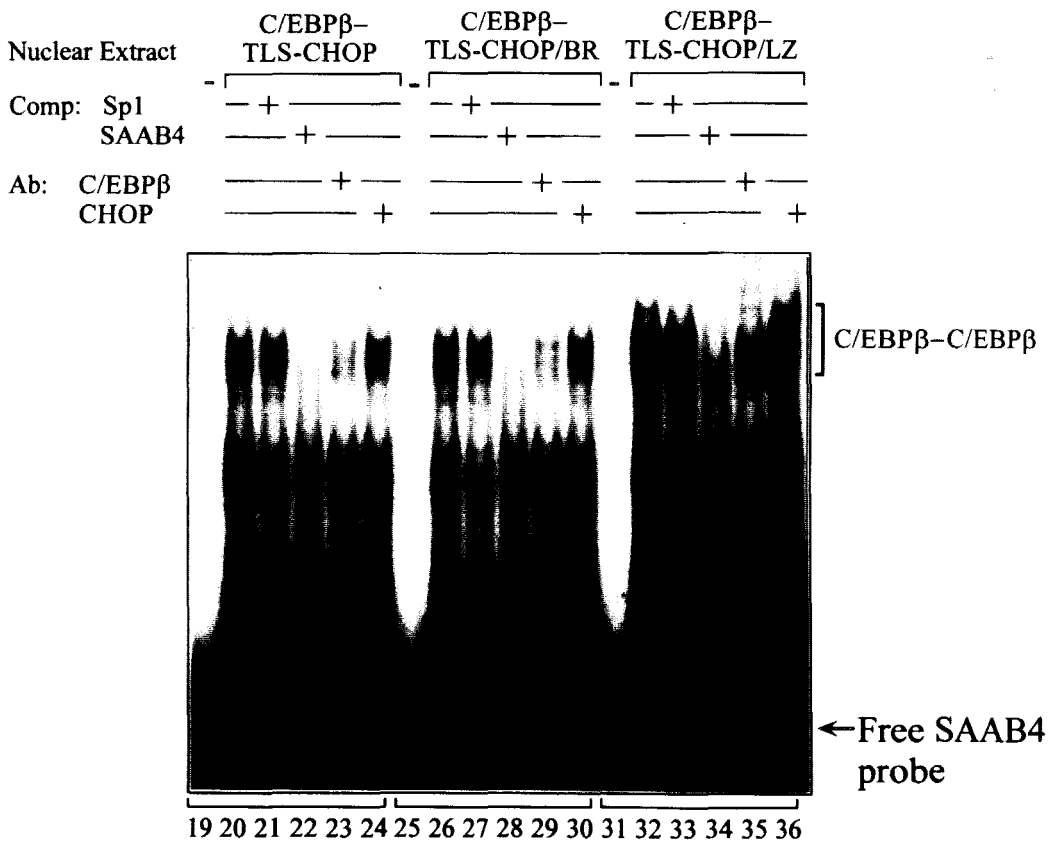
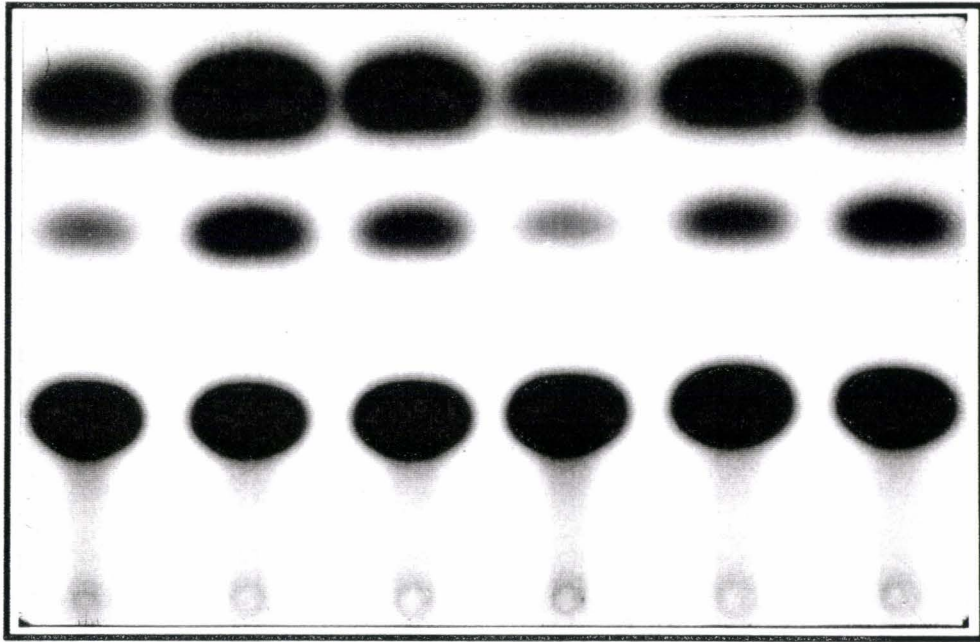


Figure 6B





1 2 3 4 5 6

Figure 7

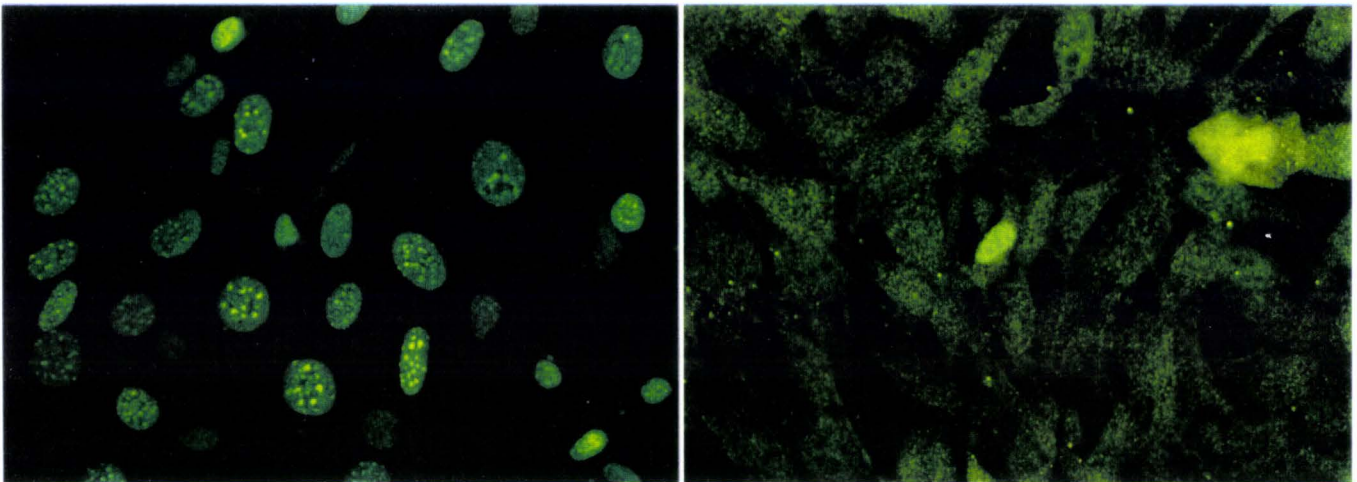


Figure 8

Discussion II

1. TLS-CHOP, une protéine de fusion spécifique des liposarcomes myxoïdes.

Les protéines TLS et EWS, de structure et de fonction très proches, sont impliquées dans un nombre croissant de translocations chromosomiques et sont généralement fusionnées à la partie amino-terminale (comprenant notamment le domaine d'interaction avec l'ADN) de divers facteurs de transcription. Ces facteurs de transcription appartiennent à des familles très diverses, parmi lesquels on compte plusieurs membres de la famille *ets*, le facteur de transcription à doigt de zinc WT1, le facteur de transcription à motif "Leucine zipper" ATF1, et le récepteur orphelin TEC ... pour n'en citer que quelques uns (Delattre et al., 1992; Zucman et al., 1993; Ladanyi et Gerald, 1994; Labelle et al., 1995).

La structure commune de ces différents produits de translocation suggère que la partie amino-terminale (constituée par TLS ou EWS) joue un rôle important dans l'activité transformante de ces oncogènes, tandis que la partie "facteur de transcription" carboxy-terminale "détermine", dans une certaine mesure, le phénotype cancéreux. Cette hypothèse a notamment été étayée par les travaux de Zinszner et coll. (Zinszner et al., 1994).

Les liposarcomes myxoïdes sont associés, dans environ 90% des cas, à la translocation t(12;16)(q13;p11) (Aman et al., 1992; Crozat et al., 1993). Cette translocation conduit à l'expression d'une protéine de fusion, TLS-CHOP, contenant la partie amino-terminale de TLS, fusionnée à la totalité de la séquence codante de CHOP. Dans une minorité de cas, les liposarcomes myxoïdes sont associés à la translocation t(12;22)(q13;q12), qui conduit à l'expression de EWS-CHOP {**Fig.36**, (Panagopoulos et al., 1996)}.

TLS-CHOP se distingue des autres protéines de fusion oncogéniques par plusieurs aspects:

- CHOP n'est pas un facteur de transcription "classique": sa fixation à l'ADN requiert son hétérodimérisation avec un autre facteur de transcription apparenté, C/EBP β (Ubeda et al., 1996).
- TLS-CHOP ne se fixe apparemment pas à l'ADN, en tous cas sur les sites classiques reconnus par les homodimères C/EBP et les hétérodimères C/EBP-CHOP (Adelmant et al., submitted). De plus, aucun effet transactivateur de la chimère n'a jusqu'à ce jour été décrit.
- TLS-CHOP interagit fortement et semble-t-il constitutivement avec des protéines de la famille C/EBP (Ron et Habener, 1992), impliquées dans différentes étapes de la différenciation adipocytaire (Freytag et al., 1994; Wu et al., 1995; Yeh et al., 1995).

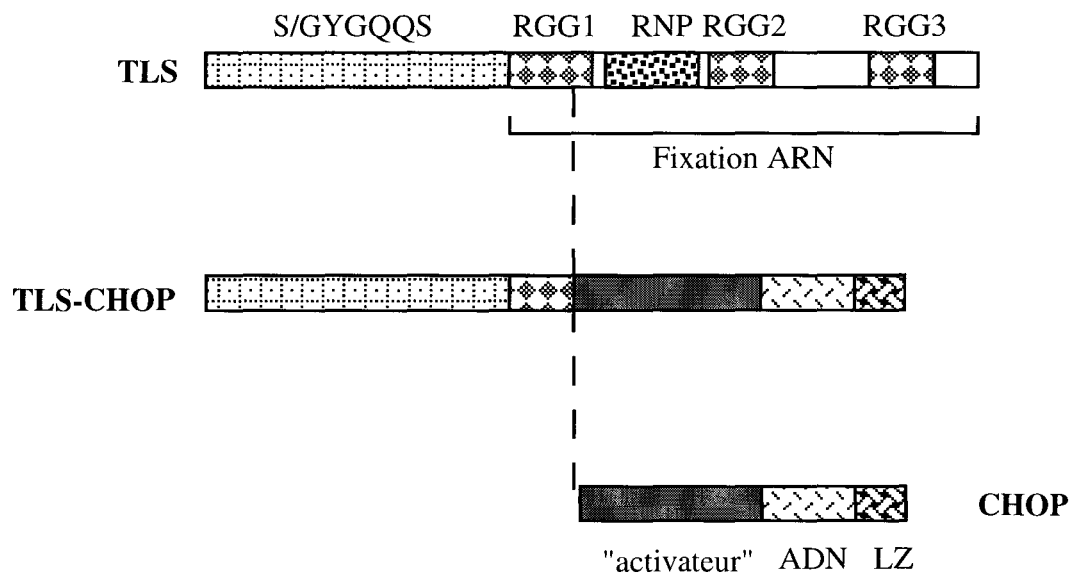


Fig.36: Schéma de la protéine de fusion TLS-CHOP. S/GYQQS: domaine contenant de nombreuses répétitions des résidus Ser, Gly, Tyr, Gln. RGG: répétitions des résidus Gly. "activateur": domaine d'activation transcriptionnelle. ADN: domaine putatif de fixation à l'ADN. LZ: Leucine Zipper.

En raison des caractéristiques "atypiques" de sa partie "facteur de transcription" (CHOP), l'étude de la chimère TLS-CHOP pourrait paraître anecdotique. Pour ces mêmes raisons, TLS-CHOP nous conduit à délaissier l'aspect "facteur-de-transcription-qui-a-mal-tourné" pour nous tourner vers d'autres mécanismes qui pourraient expliquer son caractère oncogénique. Nous essayerons notamment de proposer quelques hypothèses quant aux rôles que pourraient jouer la partie amino-terminale des chimères dans le processus de transformation.

2. TLS-CHOP, un inhibiteur de l'adipogenèse.

2.1. Etude comparée TLS-CHOP / PML/RAR.

De façon très similaire aux leucémies promyélocyaires aiguës (APL), les liposarcomes myxoïdes (MLS) se caractérisent par des cellules tumorales au phénotype indifférencié, peu proliférantes. En dépit de leur différence d'origine évidente (leucémie et sarcome), le blocage du programme de différenciation semble être central dans ces deux types de cancers. Les liposarcomes myxoïdes se distinguent toutefois des APL par leur caractère très agressif et leur faible sensibilité aux chimiothérapies (Chang et al., 1989).

Nous avons vu que le mécanisme par lequel PML/RAR interfère avec la différenciation myéloïde n'est pas clairement identifié (voir chapitre **V §2 et 3**). En revanche, le mécanisme par lequel TLS-CHOP inhibe la différenciation adipocytaire semble plus clair: cette inhibition résulte, au moins en partie, de l'inactivation de C/EBP β , un facteur de transcription gouvernant les phases précoces de l'adipogenèse (Wu et al., 1995; Yeh et al., 1995): suite à sa séquestration par TLS-CHOP, C/EBP β ne peut activer ses cibles et notamment PPAR γ 2, l'un des facteurs impliqués dans les phases ultérieures du programme de différenciation (Tontonoz et al., 1994). Ce schéma est notamment étayé par l'expérience qui montre que l'expression ectopique de PPAR γ 2 permet aux cellules de surmonter le blocage de différenciation dû à l'inactivation de C/EBP β . Ceci suggère fortement que l'inhibition médiée par TLS-CHOP repose principalement et sur l'interférence avec C/EBP β (**Fig.37**). Nous ne pouvons toutefois totalement écarter l'hypothèse que TLS-CHOP puisse aussi altérer d'autres fonctions cellulaires nécessaires à la différenciation adipocytaire, et que PPAR γ 2 ne "force" simplement cette différenciation

2.2. Un peu d'autocritique.

D'abord, n'oublions pas qu'à plusieurs reprises, le mécanisme d'action de PML/RAR avait semblé aussi clair. La prudence s'impose donc. De plus, la simplicité apparente du mécanisme

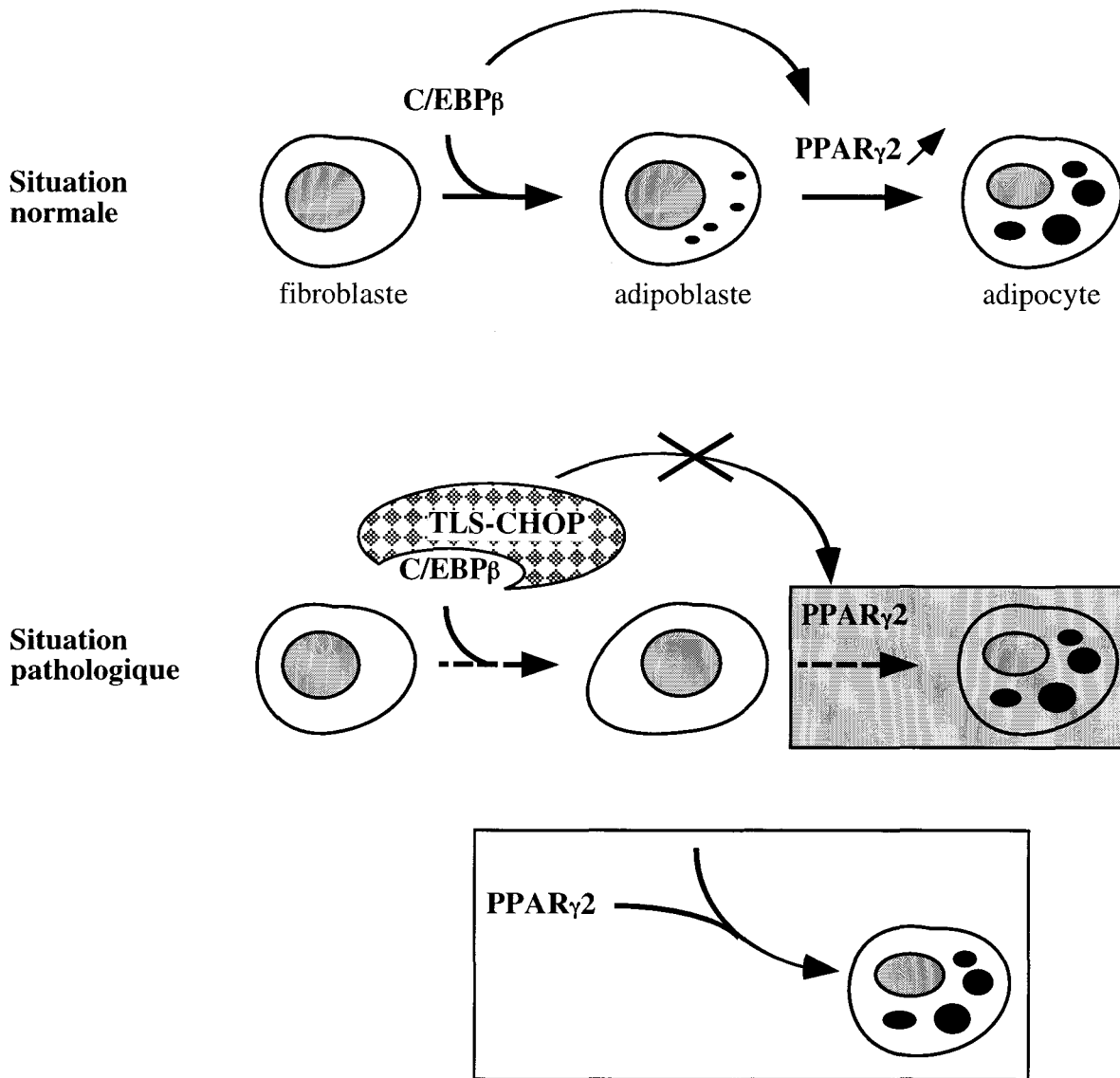


Fig.37: Modélisation du mécanisme d'inhibition de la différenciation adipocytaire par TLS-CHOP. L'encadré inférieur indique que l'expression ectopique de PPAR $\gamma 2$ lève l'inhibition imposée par TLS-CHOP.

impliqué dans cette inhibition reflète essentiellement la simplicité du modèle de différenciation initial dont on connaît bien les principaux inducteurs. Enfin, nous n'avons abordé qu'un des aspects pouvant conduire à l'apparition des liposarcomes myxoïdes: le blocage du programme de différenciation adipocytaire. Si, de manière similaire aux APL, ce blocage s'avère central au développement de ce type de liposarcomes, il n'est probablement pas suffisant à l'acquisition de la malignité.

D'où vient pourrait venir l'effet oncogénique de TLS-CHOP? Tournons nous vers TLS.

3. Hypothèses sur les bases de l'effet oncogénique de TLS-CHOP

Il semble d'emblée que TLS-CHOP est un oncogène peu puissant *in vitro*: comparés à d'autres oncogènes, il transforme faiblement les fibroblastes NIH3T3 (d'un point de vue morphologique), et ne transforme ni les myoblastes C2C12 ni les préadipocytes 3T3L1 (Adelmant et Freytag, observations non publiées). En revanche *in vivo*, des cellules NIH3T3 exprimant TLS-CHOP se montrent très tumorigènes (Zinszner et al., 1994).

Comme nous venons de le suggérer, il est peu probable que cet effet oncogénique ne résulte que de l'inhibition du processus de différenciation. Plusieurs mécanismes pourraient en revanche contribuer au caractère transformant de TLS-CHOP.

3.1. Interférence TLS-CHOP / C/EBP: d'une pierre deux coups?

C/EBP β est bien connu pour sa fonction classique de facteur de transcription impliqué dans des processus de différenciation tels que la différenciation adipocytaire (Yeh et al., 1995) ou myéloïde (Muller et al., 1995). Plus récemment, il est apparu que C/EBP β est le partenaire d'un autre membre de la famille C/EBP: CHOP. Bien que la fonction de ce dernier soit encore imprécise, CHOP semble clairement associé au stress cellulaire, qu'il soit d'origine métabolique, ou "oxydative" (Fornace et al., 1989; Wang et al., 1996).

Dans l'adipogenèse, l'expression de CHOP, suite au traitement des préadipocytes 3T3L1 par de faibles concentrations, en glucose, bloque l'induction de C/EBP β et empêche en conséquence "l'enclenchement" du processus de différenciation (Batchvarova et al., 1995).

L'expression de CHOP dans les cellules myéloïdes conduit en revanche à leur apoptose (Matsumoto et al., 1996). Dans ce dernier cas, cette fonction ne dépend pas de son domaine de fixation putatif à l'ADN, mais requiert strictement son motif d'hétérodimérisation. Ceci suggère fortement que cette activité apoptotique repose sur la formation d'un hétérodimère avec un membre de la famille C/EBP, probablement C/EBP β .

TLS-CHOP, en inactivant C/EBP β par séquestration, pourrait donc bloquer deux processus cellulaires différents:

- la différenciation adipocytaire, par inactivation fonctionnelle directe de C/EBP β .
- le processus d'apoptose, médié par CHOP, par un mécanisme indirect reposant sur la séquestration de C/EBP β , nécessaire à cette réponse. Ce dernier point reste toutefois à démontrer expérimentalement.

Notons que l'effet inhibiteur de TLS-CHOP sur la réponse apoptotique pourrait expliquer la très faible sensibilité des liposarcomes au traitement par chimiothérapie: en effet, CHOP, sous forme de dimère avec un membre de la famille C/EBP, est impliqué dans la réponse apoptotique suite au traitement par des molécules comme le Paclitaxel, proches de celles utilisées en chimiothérapie (Friedman, 1996; Gately et Howell, 1996). On peut donc imaginer que TLS-CHOP, en séquestrant C/EBP β prive CHOP de son partenaire et bloque ainsi le processus d'apoptose normalement induit par la chimiothérapie. Rappelons qu'une telle combinaison - inhibition de différenciation/inhibition de l'apoptose - a déjà été suggérée dans le cas de PML/RAR voir chapitre V §2.2.2).

3.2. TLS-CHOP et l'activation transcriptionnelle.

Les régions de TLS et de EWS impliquées dans les chimères, se comportent comme des activateurs transcriptionnels puissants. La fusion de ces domaines aux motifs de fixation à l'ADN des protéines fli, erg, etc... peut donc conduire à la formation de "super-transactivateurs", et donc à la dérégulation des gènes cibles habituels de ces protéines. Ce modèle est en particulier étayé par les résultats de May et coll. qui montrent que le domaine de fixation à l'ADN de la chimère EWS-Fli est nécessaire à son pouvoir transformant *in vitro* (May et al., 1993). Cependant, certaines données expérimentales ont montré l'absence de corrélation directe entre la "puissance" transactivatrice de la chimère et son pouvoir transformant (Zinszner et al., 1994; Immanuel et al., 1995; Lessnick et al., 1995).

La chimère TLS-CHOP se singularise des autres chimères vis à vis de ce mécanisme: CHOP n'est pas capable, en tant que tel, de procurer à la chimère la capacité de fixer l'ADN. L'hypothèse d'une dérégulation transcriptionnelle directe, par fixation de la chimère sur l'ADN, semble donc écartée. Cette conclusion est étayée par les travaux d'Immanuel et coll. qui ont montré que la fusion de CHOP à SARF (l'homologue de TLS chez la drosophile également appelé Cabeza) conduit à une protéine de fusion très transformante bien que SARF soit dépourvu d'activité transcriptionnelle {en fusion avec le domaine de fixation à l'ADN de Gal4 (Immanuel et al., 1995; Stolow et Haynes, 1995)}. Parallèlement, la fusion de CHOP à l'activateur viral VP16 n'est que faiblement oncogénique *in vitro* et *in vivo* (Zinszner et al., 1994).

En conclusion, et sans exclure que la dérégulation transcriptionnelle de certains gènes cibles soit responsable de l'activité transformante des autres chimères de la famille, il semble peu probable que ce mécanisme joue un rôle dans l'effet transformant de TLS-CHOP.

Cet effet pourrait en revanche reposer sur d'autres propriétés communes à TLS et de EWS.

3.3. Interférence TLS/CHOP / TLS.

A l'instar de PML, la fonction de TLS est mal connue. Quelques hypothèses ont toutefois été proposées.

3.3.1 TLS et la maturation des ARN messagers.

TLS contient plusieurs motifs de fixation à l'ARN appelés RNPc ou RRM (RNA recognition motif). Par l'intermédiaire de ses différents motifs RRM, TLS se fixe à divers types d'ARN, tels que les ARNm ou les homopolymères polyG (Zinszner et al., 1994).

Plusieurs indices rattachent TLS à la maturation des ARNm: premièrement, TLS est l'homologue de hnRNP-P2, une protéine faisant partie des complexes hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) impliqués dans la maturation des "hnRNA" (Calvio et al., 1995). Curieusement, TLS partage aussi 95% d'identité de séquence (en AAC) avec une protéine de 69kDa impliquée dans un autre aspect de la maturation des ARN: cette protéine est associée avec le corps protéique "Sm" constituant de base de différents complexes "snRNP" (small nuclearRNP) participant à l'épissage des ARN messagers (Hackl et Luhrmann, 1996). Il est intéressant de noter que cette protéine, bien qu'elle contienne des motifs de fixation à l'ARN homologues à ceux de TLS, interagit avec le corps "Sm", mais n'interagit pas avec les ARNsn eux mêmes. Ceci suggère que TLS-CHOP, qui ne contient pas les motifs RRM, pourrait quand même, grâce à d'autres domaines, interférer avec la fonction des corps "Sm" dans le processus de maturation des ARNm.

Il est intéressant de remarquer que TLS s'associe de manière transitoire à des structures proches du nucléole, probablement impliquées dans la maturation de certains transcrits de l'ARN polymérase II (Zinszner et al., 1997). L'association de TLS à ces structures dépend de son domaine amino-terminal, à l'exclusion donc de ses motifs de fixation à l'ARN.

Il est donc possible que la chimère TLS-CHOP interfère avec la fonction de ces structures. Bien qu'il ne semble pas exister d'exemples d'effets oncogéniques reposant sur une interférence avec le processus de maturation des ARN, cette hypothèse présente toutefois plusieurs avantages quant à l'explication du pouvoir transformant:

- elle suggère un mécanisme commun aux fusions impliquant TLS et son proche cousin EWS.
- elle ne fait pas appel au pouvoir transactivateur des chimères comportant TLS ou EWS.
- elle ne requiert pas non plus la fixation à l'ADN, ce dont, rappelons le, la chimère TLS-CHOP semble incapable.

3.3.2 TLS et les TAFs.

TLS est homologue à TAF_{II}68, un constituant du complexe TFIID qui contient TBP (TATA-box binding protein; (Bertolotti et al., 1996). Contrairement à des constituants ancillaires (comme TAF_{II}100), TLS et TAF_{II}68 ne sont associés qu'à une sous population spécifique des complexes TFIID. Le fait que TLS soit un constituant du complexe TFIID pourrait expliquer son puissant effet activateur lorsqu'il est recruté à proximité de séquences d'initiation de la transcription via le site de fixation à l'ADN de Gal4 (Zinszner et al., 1994).

Rappelons toutefois que dans un test similaire, SARF, homologue de TLS chez la drosophile, n'active pas la transcription. Il serait donc surprenant que la fonction transformante commune à ces deux protéines repose sur une fonction qu'elles ne partagent pas (le recrutement du complexe d'initiation de la transcription). Bertolotti et coll. suggèrent que TLS, comme TAF_{II}68, pourrait avoir un rôle dans une étape ultérieure de la synthèse des ARNm telle que l'élongation. On ne sait pas si SARF partage cette propriété, mais les résultats d'Immanuel ont montré que SARF est associé aux zones fortement transcrites des chromosomes chez la drosophile, localisation qui est compatible avec un rôle de SARF dans des phases contemporaines de la synthèse et de la maturation des ARNm (Immanuel et al., 1995).

4. Conclusions.

Notre travail nous a permis de montrer qu'en dehors de toute activité transformante, la chimère TLS-CHOP interfère sévèrement avec la différenciation adipocytaire. La spécificité de cette fonction inhibitrice semble reposer principalement sur la capacité de TLS-CHOP à séquestrer C/EBP β dans un complexe transcriptionnellement inactif. Ceci expliquerait, au moins partiellement, le caractère indifférencié des liposarcomes mixoïdes.

Les bases fonctionnelle du pouvoir transformant de TLS-CHOP, restent cependant obscures. Nous avons l'habitude de considérer que les chimères TLS-CHOP, EWS-FLI (etc...) sont des versions altérées de facteurs de transcription. Cependant, le rôle de "super-activateur transcriptionnel" ne permet pas d'expliquer de manière satisfaisante, leur effet oncogénique, notamment dans le cas de TLS-CHOP. Nous avons donc suggéré que ces

protéines chimères pourraient être des versions altérées de TLS ou de EWS. Plusieurs données suggèrent que les protéines TLS et EWS normales sont impliquées dans diverses étapes de la synthèse et de la maturation des ARN messagers. Il sera donc intéressant d'étudier si l'effet oncogénique des protéines chimériques impliquant TLS ou EWS pourrait reposer, au moins en partie, sur une interférence ou une perturbation de ces fonctions.

CONCLUSION

Nous avons essayé de présenter une vue d'ensemble sur les trois fonctions essentielles des récepteurs nucléaires, la fixation à l'ADN, la fixation de l'hormone et enfin la régulation transcriptionnelle.

Nous avons d'abord vu que la spécificité de la reconnaissance de l'ADN est, dans une certaine mesure, adaptable. Cette "adaptabilité" repose essentiellement sur la flexibilité des interactions entre les amino-acides du domaine C et les bases du site de fixation, illustrée par les données de structures tridimensionnelles. De plus, nous avons vu que les propriétés de fixation à l'ADN sont fortement modifiées en fonction du partenaire de dimérisation d'un récepteur. Ceci contribue à diversifier les éléments de réponse d'un récepteur et donc à accroître l'éventail des gènes qu'il peut réguler. Nous avons notamment illustré ce propos dans le cas du récepteur VDR.

En revanche, la fixation de l'hormone, est hautement discriminante: une hormone se fixe sur un récepteur et sur un seul. Nous avons toutefois souligné que la capacité à fixer une hormone n'est pas une propriété uniquement dictée par le récepteur, mais est, encore une fois modulée par le partenaire d'hétérodimérisation. Ceci a notamment été illustré dans le cas de RXR.

Enfin, nous avons vu que les récepteurs nucléaires modulent la transcription via de multiples cofacteurs. Il est possible que cette diversité permette aux récepteurs de s'adapter au contexte, ou lui permette d'exécuter des effets transcriptionnels différents.

Il apparaît donc qu'aucune de ces trois fonctions ne repose sur les caractéristiques intrinsèques à un seul domaine mais résulte des nombreuses interactions intra et inter moléculaires. Chaque domaine posséderait ainsi, non pas une fonction unique et "rigide", mais un ensemble de capacités "latentes", qui seraient mises à profit en fonction du contexte.

Dans le cas de protéines de fusion, il est probable que ces interactions inter et intra moléculaires soient en partie perdues et remplacées par d'autres, révélant ainsi dans chaque partie de la chimère, des propriétés inédites. C'est précisément cet aspect qui est, et qui restera, le plus difficile à étudier.

REFERENCES

- **Adelmant, G., Bègue, A., Stéhelin, D. et Laudet, V.** (1996). A functional Rev-erb alpha responsive element located in the human Rev-erb alpha promoter mediates a repressing activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93: 3553-8.
- **Adelmant, G., Gilbert, J. D. et Freytag, S. O.** (submitted). TLS-CHOP inhibits C/EBP beta-driven adipocyte differentiation. **soumis**.
- **Agadir, A., Cornic, M., Jerome, M., Menot, M. L., Cambier, N., Gaub, M. P., Gourmel, B., Lefebvre, P., Degos, L. et Chomienne, C.** (1995). Characterization of nuclear retinoic acid binding activity in sensitive leukemic cell lines: cell specific uptake of ATRA and RAR alpha protein modulation. **Biochem Biophys Res Commun**, 213: 112-22.
- **Akiyama, K., Yokota, K., Kagawa, S., Shimbara, N., DeMartino, G. N., Slaughter, C. A., Noda, C. et Tanaka, K.** (1995). cDNA cloning of a new putative ATPase subunit p45 of the human 26S proteasome, a homolog of yeast transcriptional factor Sug1p. **Febs Lett**, 363: 151-6.
- **Allan, G. F., Leng, X., Tsai, S. Y., Weigel, N. L., Edwards, D. P., Tsai, M. J. et O'Malley, B. W.** (1992). Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation. **J Biol Chem**, 267: 19513-20.
- **Alland, L., Muhle, R., Hou, H. J., Potes, J., Chin, L., Schreiber, A. N. et DePinho, R. A.** (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. **Nature**, 387: 49-55.
- **Aman, P., Ron, D., Mandahl, N., Fioretos, T., Heim, S., Arheden, K., Willen, H., Rydholm, A. et Mitelman, F.** (1992). Rearrangement of the transcription factor gene CHOP in myxoid liposarcomas with t(12;16)(q13;p11). **Genes Chromosomes Cancer**, 5: 278-85.
- **Ascoli, C. A. et Maul, G. G.** (1991). Identification of a novel nuclear domain. **J Cell Biol**, 112: 785-95.
- **Bailly, R. A., Bosselut, R., Zucman, J., Cormier, F., Delattre, O., Roussel, M., Thomas, G. et Ghysdael, J.** (1994). DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. **Mol Cell Biol**, 14: 3230-41.
- **Baniahmad, A., Ha, I., Reinberg, D., Tsai, S., Tsai, M. J. et 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 U S A**, 90: 8832-6.
- **Baniahmad, A., Kohne, A. C. et Renkawitz, R.** (1992). A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor. **Embo J**, 11: 1015-23.
- **Baniahmad, A., Leng, X., Burris, T. P., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. et O'Malley, B. W.** (1995a). The tau 4 activation domain of the thyroid hormone receptor is required for release of a putative corepressor(s) necessary for transcriptional silencing. **Mol Cell Biol**, 15: 76-86.
- **Baniahmad, A., Steiner, C., Kohne, A. C. et Renkawitz, R.** (1990). Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. **Cell**, 61: 505-14.

- **Baniahmad, C., Nawaz, Z., Baniahmad, A., Gleeson, M. A., Tsai, M. J. et O'Malley, B. W.** (1995b). Enhancement of human estrogen receptor activity by SPT6: a potential coactivator. **Mol Endocrinol**, 9: 34-43.
- **Barettino, D., Vivanco, R. M. et Stunnenberg, H. G.** (1994). Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. **Embo J**, 13: 3039-49.
- **Barettino, D., Vivanco, R. M. et Stunnenberg, H. G.** (1994). Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. **Embo J**, 13: 3039-49.
- **Batchvarova, N., Wang, X. Z. et Ron, D.** (1995). Inhibition of adipogenesis by the stress-induced protein CHOP (Gadd153). **Embo J**, 14: 4654-61.
- **Beato, M., Chalepakis, G., Schauer, M. et Slater, E. P.** (1989). DNA regulatory elements for steroid hormones. **J Steroid Biochem**, 32: 737-47.
- **Beato, M., Herrlich, P. et Schutz, G.** (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. **Cell**, 83: 851-7.
- **Bertolotti, A., Lutz, Y., Heard, D. J., Chambon, P. et Tora, L.** (1996). hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II. **Embo J**, 15: 5022-31.
- **Bhattacharya, S., Eckner, R., Grossman, S., Oldread, E., Arany, Z., D'Andrea, A. et Livingston, D. M.** (1996). Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon- alpha. **Nature**, 383: 344-7.
- **Bonnelye, E., Vanacker, J. M., Desbiens, X., Begue, A., Stehelin, D. et Laudet, V.** (1994). Rev-erb beta, a new member of the nuclear receptor superfamily, is expressed in the nervous system during chicken development. **Cell Growth Differ**, 5: 1357-65.
- **Borden, K. L. et Freemont, P. S.** (1996). The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. **Curr Opin Struct Biol**, 6: 395-401.
- **Bortvin, A. et Winston, F.** (1996). Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. **Science**, 272: 1473-6.
- **Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. et Moras, D.** (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha [see comments]. **Nature**, 375: 377-82.
- **Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. et Moras, D.** (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha [see comments]. **Nature**, 375: 377-82.
- **Brasch, K. et Ochs, R. L.** (1992). Nuclear bodies (NBs): a newly "rediscovered" organelle. **Exp Cell Res**, 202: 211-23.
- **Breitman, T. R., Collins, S. J. et Keene, B. R.** (1981). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid. **Blood**, 57: 1000-4.

- **Bresnick, E. H., Dalman, F. C., Sanchez, E. R. et Pratt, W. B.** (1989). Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor. **J Biol Chem**, 264: 4992-7.
- **Brugge, J. S.** (1986). Interaction of the Rous sarcoma virus protein pp60src with the cellular proteins pp50 and pp90. **Curr Top Microbiol Immunol**, 123: 1-22.
- **Burke, L., Downes, M., Carozzi, A., Giguere, V. et Muscat, G. E.** (1996). Transcriptional repression by the orphan steroid receptor RVR/Rev-erb beta is dependent on the signature motif and helix 5 in the E region: functional evidence for a biological role of RVR in myogenesis. **Nucleic Acids Res**, 24: 3481-9.
- **Calvio, C., Neubauer, G., Mann, M. et Lamond, A. I.** (1995). Identification of hnRNP P2 as TLS/FUS using electrospray mass spectrometry. **Rna**, 1: 724-33.
- **Cancela, M. L. et Price, P. A.** (1992). Retinoic acid induces matrix Gla protein gene expression in human cells. **Endocrinology**, 130: 102-8.
- **Carlberg, C., Bendik, I., Wyss, A., Meier, E., Sturzenbecker, L. J., Grippo, J. F. et Hunziker, W.** (1993). Two nuclear signalling pathways for vitamin D. **Nature**, 361: 657-60.
- **Carvalho, T., Seeler, J. S., Ohman, K., Jordan, P., Pettersson, U., Akusjarvi, G., Carmo, F. M. et Dejean, A.** (1995). Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. **J Cell Biol**, 131: 45-56.
- **Catelli, M. G., Binart, N., Jung, T. I., Renoir, J. M., Baulieu, E. E., Feramisco, J. R. et Welch, W. J.** (1985). The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein. **Embo J**, 4: 3131-5.
- **Cavaillès, V., Dauvois, S., Danielian, P. S. et Parker, M. G.** (1994). Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 91: 10009-13.
- **Cavaillès, V., Dauvois, S., Danielian, P. S. et Parker, M. G.** (1994). - **Cavaillès, V., Dauvois, S., L'Horset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P. J. et Parker, M. G.** (1995). Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. **Embo J**, 14: 3741-51.
- **Chakravarti, D., LaMorte, V. J., Nelson, M. C., Nakajima, T., Schulman, I. G., Juguilon, H., Montminy, M. et Evans, R. M.** (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling [see comments]. **Nature**, 383: 99-103.
- **Chambon, P.** (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. **Faseb J**, 10: 940-54.
- **Chang, H. R., Hajdu, S. I., Collin, C. et Brennan, M. F.** (1989). The prognostic value of histologic subtypes in primary extremity liposarcoma. **Cancer**, 64: 1514-1520.
- **Chen, J. D. et Evans, R. M.** (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors [see comments]. **Nature**, 377: 454-7.
- **Chen, Y., Chen, C. F., Riley, D. J., Allred, D. C., Chen, P. L., Von, H. D., Osborne, C. K. et Lee, W. H.** (1995). Aberrant subcellular localization of BRCA1 in breast cancer. **Science**, 270: 789-91.

- **Chen, Z. P., Shemshedini, L., Durand, B., Noy, N., Chambon, P. et Gronemeyer, H.** (1994). Pure and functionally homogeneous recombinant retinoid X receptor. **J Biol Chem**, 269: 25770-6.
- **Cheskis, B. et Freedman, L. P.** (1994). Ligand modulates the conversion of DNA-bound vitamin D3 receptor (VDR) homodimers into VDR-retinoid X receptor heterodimers. **Mol Cell Biol**, 14: 3329-38.
- **Chomienne, C., Fenaux, P. et Degos, L.** (1996). Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia. **Faseb J**, 10: 1025-30.
- **Choy, B. et Green, M. R.** (1993). Eukaryotic activators function during multiple steps of preinitiation complex assembly. **Nature**, 366: 531-6.
- **Cote, J., Quinn, J., Workman, J. L. et Peterson, C. L.** (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. **Science**, 265: 53-60.
- **Crozat, A., Aman, P., Mandahl, N. et Ron, D.** (1993). Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. **Nature**, 363: 640-4.
- **Czar, M. J., Owens, G. J., Yem, A. W., Leach, K. L., Deibel, M. J., Welsh, M. J. et Pratt, W. B.** (1994). The hsp56 immunophilin component of untransformed steroid receptor complexes is localized both to microtubules in the cytoplasm and to the same nonrandom regions within the nucleus as the steroid receptor. **Mol Endocrinol**, 8: 1731-41.
- **Dalman, F. C., Koenig, R. J., Perdew, G. H., Massa, E. et Pratt, W. B.** (1990). In contrast to the glucocorticoid receptor, the thyroid hormone receptor is translated in the DNA binding state and is not associated with hsp90. **J Biol Chem**, 265: 3615-8.
- **Damm, K., Thompson, C. C. et Evans, R. M.** (1989). Protein encoded by v-erbA functions as a thyroid-hormone receptor antagonist. **Nature**, 339: 593-7.
- **Danielian, P. S., White, R., Lees, J. A. et Parker, M. G.** (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors [published erratum appears in EMBO J 1992 Jun;11(6):2366]. **Embo J**, 11: 1025-33.
- **Danielsen, M., Hinck, L. et Ringold, G. M.** (1989). Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor. **Cell**, 57: 1131-8.
- **Day, R. N. et Maurer, R. A.** (1989). Thyroid hormone-responsive elements of the prolactin gene: evidence for both positive and negative regulation. **Mol Endocrinol**, 3: 931-8.
- **Delattre, O., Zucman, J., Plougastel, B., Desmaze, C., Melot, T., Peter, M., Kovar, H., Joubert, I., de, J. P., Rouleau, G. et al.** (1992). Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. **Nature**, 359: 162-5.
- **DeMartino, G. N., Proske, R. J., Moomaw, C. R., Strong, A. A., Song, X., Hisamatsu, H., Tanaka, K. et Slaughter, C. A.** (1996). Identification, purification, and characterization of a PA700-dependent activator of the proteasome. **J Biol Chem**, 271: 3112-8.
- **deThé, H.** (1996). Altered retinoic acid receptors. **Faseb J**, 10: 955-60.

- **deThé, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L. et Dejean, A.** (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. **Cell**, 66: 675-84.
- **deThe, H., Vivanco, R. M., Tiollais, P., Stunnenberg, H. et Dejean, A.** (1990). Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. **Nature**, 343: 177-80.
- **Doucas, V., Brockes, J. P., Yaniv, M., de, T. H. et Dejean, A.** (1993). The PML-retinoic acid receptor alpha translocation converts the receptor from an inhibitor to a retinoic acid-dependent activator of transcription factor AP-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90: 9345-9.
- **Doucas, V., Ishov, A. M., Romo, A., Juguilon, H., Weitzman, M. D., Evans, R. M. et Maul, G. G.** (1996). Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. **Genes Dev**, 10: 196-207.
- **Downes, M., Carozzi, A. J. et Muscat, G. E.** (1995). Constitutive expression of the orphan receptor, Rev-erbA alpha, inhibits muscle differentiation and abrogates the expression of the myoD gene family. **Mol Endocrinol**, 9: 1666-78.
- **Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. et Wahli, W.** (1992). Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. **Cell**, 68: 879-87.
- **Duester, G., Shean, M. L., McBride, M. S. et Stewart, M. J.** (1991). Retinoic acid response element in the human alcohol dehydrogenase gene ADH3: implications for regulation of retinoic acid synthesis. **Mol Cell Biol**, 11: 1638-46.
- **Dumas, B., Harding, H. P., Choi, H. S., Lehmann, K. A., Chung, M., Lazar, M. A. et Moore, D. D.** (1994). A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily closely related to Rev-Erb. **Mol Endocrinol**, 8: 996-1005.
- **Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R. et 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: 5370-82.
- **Dyck, J. A., Maul, G. G., Miller, W. J., Chen, J. D., Kakizuka, A. et Evans, R. M.** (1994). A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. **Cell**, 76: 333-43.
- **Elgin, S. C.** (1996). Heterochromatin and gene regulation in Drosophila. **Curr Opin Genet Dev**, 6: 193-202.
- **Evans, R. M.** (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, 240: 889-95.
- **Everett, R. D., Meredith, M., Orr, A., Cross, A., Katoria, M. et Parkinson, J.** (1997). A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. **Embo J**, 16: 566-77.
- **Felsenfeld, G.** (1996). Chromatin unfolds. **Cell**, 86: 13-9.
- **Fondell, J. D., Roy, A. L. et Roeder, R. G.** (1993). Unliganded thyroid hormone receptor inhibits formation of a functional preinitiation complex: implications for active repression. **Genes Dev**, 7: 1400-10.

- **Forman, B. M. et Samuels, H. H.** (1990). Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: the regulatory zipper model. **Mol Endocrinol**, 4: 1293-301.
- **Forman, B. M., Chen, J., Blumberg, B., Kliewer, S. A., Henshaw, R., Ong, E. S. et Evans, R. M.** (1994). Cross-talk among ROR alpha 1 and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors. **Mol Endocrinol**, 8: 1253-61.
- **Forman, B. M., Umesono, K., Chen, J. et Evans, R. M.** (1995). Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. **Cell**, 81: 541-50.
- **Forman, B. M., Umesono, K., Chen, J. et Evans, R. M.** (1995). Unique - **Fornace, A. J., Nebert, D. W., Hollander, M. C., Luethy, J. D., Papathanasiou, M., Fargnoli, J. et Holbrook, N. J.** (1989). Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA- damaging agents. **Mol Cell Biol**, 9: 4196-203.
- **Fraser, R. A., Rossignol, M., Heard, D. J., Egly, J. M. et Chambon, P.** (1997). SUG1, a putative transcriptional mediator and subunit of the PA700 proteasome regulatory complex, is a DNA helicase. **J Biol Chem**, 272: 7122-6.
- **Freemont, P. S.** (1993). The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. **Ann N Y Acad Sci**, 684: 174-92.
- **Freytag, S. O., Paielli, D. L. et Gilbert, J. D.** (1994). **Genes Dev**, 1654-63.
- **Friedman, A. D.** (1996). GADD153/CHOP, a DNA damage-inducible protein, reduced CAAT/enhancer binding protein activities and increased apoptosis in 32D c13 myeloid cells. **Cancer Res**, 56: 3250-6.
- **Gately, D. P. et Howell, S. B.** (1996). Paclitaxel activation of the GADD153 promoter through a cellular injury response element containing an essential Sp1 binding site. **J Biol Chem**, 271: 20588-93.
- **Gewirth, D. T. et Sigler, P. B.** (1995). The basis for half-site specificity explored through a non-cognate steroid receptor-DNA complex. **Nat Struct Biol**, 2: 386-94.
- **Ghislain, M., Udvardy, A. et Mann, C.** (1993). *S. cerevisiae* 26S protease mutants arrest cell division in G2/metaphase. **Nature**, 366: 358-62.
- **Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P. et Evans, R. M.** (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. **Nature**, 330: 624-9.
- **Giguère, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R. M. et Otulakowski, G.** (1994). Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. **Genes Dev**, 8: 538-53.
- **Glass, C. K.** (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. **Endocr Rev**, 15: 391-407.
- **Gottesman, S., Wickner, S. et Maurizi, M. R.** (1997). Protein quality control: triage by chaperones and proteases. **Genes Dev**, 11: 815-23.
- **Graf, T., McNagny, K., Brady, G. et Frampton, J.** (1992). Chicken "erythroid" cells transformed by the Gag-Myb-Ets-encoding E26 leukemia virus are multipotent. **Cell**, 70: 201-13.

- Grignani, F., Ferrucci, P. F., Testa, U., Talamo, G., Fagioli, M., Alcalay, M., Mencarelli, A., Grignani, F., Peschle, C., Nicoletti, I. et al. (1993). The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR alpha fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. **Cell**, 74: 423-31.
- Grignani, F., Testa, U., Rogaia, D., Ferrucci, P. F., Samoggia, P., Pinto, A., Aldinucci, D., Gelmetti, V., Fagioli, M., Alcalay, M., Seeler, J., Grignani, F., Nicoletti, I., Peschle, C. et Pelicci, P. G. (1996). Effects on differentiation by the promyelocytic leukemia PML/RARalpha protein depend on the fusion of the PML protein dimerization and RARalpha DNA binding domains. **Embo J**, 15: 4949-58.
- Grisolano, J. L., Wesselschmidt, R. L., Pelicci, P. G. et Ley, T. J. (1997). Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences. **Blood**, 89: 376-87.
- Gronemeyer, H. (1991). Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. **Annu Rev Genet**, 25: 89-123.
- Gronemeyer, H. et Laudet, V. (1995). Transcription factors 3: nuclear receptors. **Protein Profile**, 2: 1173-308.
- Guldner, H. H., Szostecki, C., Grotzinger, T. et Will, H. (1992). IFN enhance expression of Sp100, an autoantigen in primary biliary cirrhosis. **J Immunol**, 149: 4067-73.
- Hackl, W. et Luhrmann, R. (1996). Molecular cloning and subcellular localisation of the snRNP-associated protein 69KD, a structural homologue of the proto-oncoproteins TLS and EWS with RNA and DNA-binding properties. **J Mol Biol**, 264: 843-51.
- Halachmi, S., Marden, E., Martin, G., MacKay, H., Abbondanza, C. et Brown, M. (1994). Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. **Science**, 264: 1455-8.
- Hall, B. L., Smit, M. Z. et Privalsky, M. L. (1993). Reconstitution of retinoid X receptor function and combinatorial regulation of other nuclear hormone receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90: 6929-33.
- Harding, H. P. et Lazar, M. A. (1993). The orphan receptor Rev-ErbA alpha activates transcription via a novel response element. **Mol Cell Biol**, 13: 3113-21.
- Harding, H. P. et Lazar, M. A. (1995). The monomer-binding orphan receptor Rev-Erb represses transcription as a dimer on a novel direct repeat [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1995 Nov;15(11):6479]. **Mol Cell Biol**, 15: 4791-802.
- Heery, D. M., Zacharewski, T., Pierrat, B., Gronemeyer, H., Chambon, P. et Losson, R. (1993). Efficient transactivation by retinoic acid receptors in yeast requires retinoid X receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90: 4281-5.
- Heinzl, T., Lavinsky, R. M., Mullen, T. M., Soderstrom, M., Laherty, C. D., Torchia, J., Yang, W. M., Brard, G., Ngo, S. D., Davie, J. R., Seto, E., Eisenman, R. N., Rose, D. W., Glass, C. K. et Rosenfeld, M. G. (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression [see comments]. **Nature**, 387: 43-8.
- Hochstrasser, M. (1995). Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. **Curr Opin Cell Biol**, 7: 215-23.

- **Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K. et al.** (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor [see comments]. **Nature**, 377: 397-404.
- **Huang, Q., Alvares, K., Chu, R., Bradfield, C. A. et Reddy, J. K.** (1994). Association of peroxisome proliferator-activated receptor and Hsp72. **J Biol Chem**, 269: 8493-7.
- **Hunter, T.** (1997). Oncoprotein networks. **Cell**, 88: 333-46.
- **Immanuel, D., Zinszner, H. et Ron, D.** (1995). Association of SARFH (sarcoma-associated RNA-binding fly homolog) with regions of chromatin transcribed by RNA polymerase II. **Mol Cell Biol**, 15: 4562-71.
- **Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., Chambon, P. et Tora, L.** (1994). Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. **Cell**, 79: 107-17.
- **Janknecht, R. et Hunter, T.** (1996). Transcription. A growing coactivator network [news; comment]. **Nature**, 383: 22-3.
- **Jansen, J. H., Mahfoudi, A., Rambaud, S., Lavau, C., Wahli, W. et Dejean, A.** (1995). Multimeric complexes of the PML-retinoic acid receptor alpha fusion protein in acute promyelocytic leukemia cells and interference with retinoid and peroxisome-proliferator signaling pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92: 7401-5.
- **Johnson, A. D.** (1995). The price of repression. **Cell**, 81: 655-8.
- **Joyeux, A., Cavailles, V., Balaguer, P. et Nicolas, J. C.** (1997). RIP 140 enhances nuclear receptor-dependent transcription in vivo in yeast [In Process Citation]. **Mol Endocrinol**, 11: 193-202.
- **Kakizuka, A., Miller, W. J., Umesono, K., Warrell, R. J., Frankel, S. R., Murty, V. V., Dmitrovsky, E. et Evans, R. M.** (1991). Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. **Cell**, 66: 663-74.
- **Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K. et Rosenfeld, M. G.** (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. **Cell**, 85: 403-14.
- **Kastner, P., Mark, M. et Chambon, P.** (1995). Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? **Cell**, 83: 859-69.
- **Kastner, P., Perez, A., Lutz, Y., Rochette, E. C., Gaub, M. P., Durand, B., Lanotte, M., Berger, R. et Chambon, P.** (1992). Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. **Embo J**, 11: 629-42.
- **Katz, R. W. et Koenig, R. J.** (1993). Nonbiased identification of DNA sequences that bind thyroid hormone receptor alpha 1 with high affinity. **J Biol Chem**, 268: 19392-7.
- **Katz, R. W. et Koenig, R. J.** (1994). Specificity and mechanism of thyroid hormone induction from an octamer response element. **J Biol Chem**, 269: 18915-20.

- **Kikuchi, T., Takahashi, M., Ueda, R., Ohba, M., Seito, T., Hiai, H., Nakashima, I. et Takahashi, T.** (1990). Nuclear localization of antigens detected by a monoclonal antibody against a synthetic peptide of rfp finger protein. **Hybridoma**, 9: 189-200.
- **Kim, Y. J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M. H. et Kornberg, R. D.** (1994). A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. **Cell**, 77: 599-608.
- **Kimura, Y., Yahara, I. et Lindquist, S.** (1995). Role of the protein chaperone YDJ1 in establishing Hsp90-mediated signal transduction pathways [see comments]. **Science**, 268: 1362-5.
- **Kingston, R. E., Bunker, C. A. et Imbalzano, A. N.** (1996). Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. **Genes Dev**, 905-920.
- **Kliwer, S. A., Lenhard, J. M., Willson, T. M., Patel, I., Morris, D. C. et Lehmann, J. M.** (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. **Cell**, 83: 813-9.
- **Kliwer, S. A., Umesono, K., Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A. et Evans, R. M.** (1992). Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 89: 1448-52.
- **Kliwer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A. et Evans, R. M.** (1992). Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. **Nature**, 358: 771-4.
- **Koken, M. H., Linares, C. G., Quignon, F., Viron, A., Chelbi, A. M., Sobczak, T. J., Juhlin, L., Degos, L., Calvo, F. et de, T. H.** (1995). The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. **Oncogene**, 10: 1315-24.
- **Koken, M. H., Puvion, D. F., Guillemin, M. C., Viron, A., Linares, C. G., Stuurman, N., de, J. L., Szosteki, C., Calvo, F., Chomienne, C. et et, a. l.** (1994). The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid- reversible fashion. **Embo J**, 13: 1073-83.
- **Kruger, W., Peterson, C. L., Sil, A., Coburn, C., Arents, G., Moundrianakis, E. N. et Herskowitz, I.** (1995). Amino acid substitution in the structured domains of histones H3 and H4 partially relieve the requirement of the yeast SWI/SNF complex for transcription. **Genes Dev**, 2770-2779.
- **Kurokawa, R., DiRenzo, J., Boehm, M., Sugarman, J., Gloss, B., Rosenfeld, M. G., Heyman, R. A. et Glass, C. K.** (1994). Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. **Nature**, 371: 528-31.
- **Kurokawa, R., DiRenzo, J., Boehm, M., Sugarman, J., Gloss, B., - Kurokawa, R., Soderstrom, M., Horlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M. G. et Glass, C. K.** (1995). Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor [see comments]. **Nature**, 377: 451-4.
- **Kurokawa, R., Soderstrom, M., Horlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M. G. et Glass, C. K.** (1995). Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor [see comments]. **Nature**, 377: 451-4.

- Kurokawa, R., Yu, V. C., Naar, A., Kyakumoto, S., Han, Z., Silverman, S., Rosenfeld, M. G. et 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 Dev**, 7: 1423-35.
- L'Horset, F., Dauvois, S., Heery, D. M., Cavailles, V. et Parker, M. G. (1996). RIP-140 interacts with multiple nuclear receptors by means of two distinct sites. **Mol Cell Biol**, 16: 6029-36.
- Labelle, Y., Zucman, J., Stenman, G., Kindblom, L. G., Knight, J., Turc, C. C., Dockhorn, D. B., Mandahl, N., Desmaze, C., Peter, M. et al. (1995). Oncogenic conversion of a novel orphan nuclear receptor by chromosome translocation. **Hum Mol Genet**, 4: 2219-26.
- Ladanyi, M. et Gerald, W. (1994). Fusion of the EWS and WT1 genes in the desmoplastic small round cell tumor. **Cancer Res**, 54: 2837-40.
- Lala, D. S., Mukherjee, R., Schulman, I. G., Koch, S. S., Dardashti, L. J., Nadzan, A. M., Croston, G. E., Evans, R. M. et Heyman, R. A. (1996). Activation of specific RXR heterodimers by an antagonist of RXR homodimers. **Nature**, 383: 450-3.
- Lala, D. S., Rice, D. A. et Parker, K. L. (1992). Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. **Mol Endocrinol**, 6: 1249-58.
- Laudet, V. et Adelmant, G. (1995). Nuclear receptors. Lonesome orphans. **Curr Biol**, 5: 124-7.
- Laudet, V., Hanni, C., Coll, J., Catzeflis, F. et Stehelin, D. (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. **Embo J**, 11: 1003-13.
- Le Douarin, B., Nielsen, A. L., Garnier, J. M., Ichinose, H., Jeanmougin, F., Losson, R. et Chambon, P. (1996). A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. **Embo J**, 15: 6701-15.
- LeDouarin, B., Zechel, C., Garnier, J. M., Lutz, Y., Tora, L., Pierrat, P., Heery, D., Gronemeyer, H., Chambon, P. et 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: 2020-33.
- Lee, J. W., Choi, H. S., Gyuris, J., Brent, R. et Moore, D. D. (1995). Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. **Mol Endocrinol**, 9: 243-54.
- Lefstin, J. A., Thomas, J. R. et Yamamoto, K. R. (1994). Influence of a steroid receptor DNA-binding domain on transcriptional regulatory functions. **Genes Dev**, 8: 2842-56.
- Lehmann, J. M., Zhang, X. K. et Pfahl, M. (1992). RAR gamma 2 expression is regulated through a retinoic acid response element embedded in Sp1 sites. **Mol Cell Biol**, 12: 2976-85.
- Leng, X., Blanco, J., Tsai, S. Y., Ozato, K., O'Malley, B. W. et Tsai, M. J. (1995). Mouse retinoid X receptor contains a separable ligand-binding and transactivation domain in its E region. **Mol Cell Biol**, 15: 255-63.

- Lessnick, S. L., Braun, B. S., Denny, C. T. et May, W. A. (1995). Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene. **Oncogene**, 10: 423-31.
- Li, Q. et Wrangé, O. (1995). Accessibility of a glucocorticoid response element in a nucleosome depends on its rotational positioning. **Mol Cell Biol**, 15: 4375-84.
- Liu, M., Lee, M. H., Cohen, M., Bommakanti, M. et Freedman, L. P. (1996). Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. **Genes Dev**, 10: 142-53.
- Liu, Z. G., Smith, S. W., McLaughlin, K. A., Schwartz, L. M. et Osborne, B. A. (1994). Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. **Nature**, 367: 281-4.
- Longo, L., Trecca, D., Biondi, A., Lo, C. F., Grignani, F., Maiolo, A. T., Pelicci, P. G. et Neri, A. (1993). Frequency of RAS and p53 mutations in acute promyelocytic leukemias. **Leuk Lymphoma**, 11: 405-10.
- Lubbert, M., Herrmann, F. et Koeffler, H. P. (1991). Expression and regulation of myeloid-specific genes in normal and leukemic myeloid cells. **Blood**, 77: 909-24.
- Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R. et Sigler, P. B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA [see comments]. **Nature**, 352: 497-505.
- Machuca, I., Esslemont, G., Fairclough, L. et Tata, J. R. (1995). Analysis of structure and expression of the *Xenopus* thyroid hormone receptor-beta gene to explain its autoinduction. **Mol Endocrinol**, 9: 96-107.
- Mader, S., Leroy, P., Chen, J. Y. et Chambon, P. (1993). Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors. **J Biol Chem**, 268: 591-600.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, 83: 835-9.
- Mangelsdorf, D. J., Umesono, K., Kliewer, S. A., Borgmeyer, U., Ong, E. S. et Evans, R. M. (1991). A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. **Cell**, 66: 555-61.
- Margolin, J. F., Friedman, J. R., Meyer, W. K., Vissing, H., Thiesen, H. J. et Rauscher, F. r. (1994). Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 91: 4509-13.
- Matsumoto, M., Minami, M., Takeda, K., Sakao, Y. et Akira, S. (1996). Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells. **Febs Lett**, 395: 143-7.
- Maul, G. G., Guldner, H. H. et Spivack, J. G. (1993). Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0). **J Gen Virol**, 2679-90.
- May, M., Mengus, G., Lavigne, A. C., Chambon, P. et Davidson, I. (1996). Human TAF(II28) promotes transcriptional stimulation by activation function 2 of the retinoid X receptors. **Embo J**, 15: 3093-104.

- May, W. A., Gishizky, M. L., Lessnick, S. L., Lunsford, L. B., Lewis, B. C., Delattre, O., Zucman, J., Thomas, G. et Denny, C. T. (1993). Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90: 5752-6.
- May, W. A., Lessnick, S. L., Braun, B. S., Klemsz, M., Lewis, B. C., Lunsford, L. B., Hromas, R. et Denny, C. T. (1993). The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. **Mol Cell Biol**, 13: 7393-8.
- Metzger, S., Halaas, J. L., Breslow, J. L. et Sladek, F. M. (1993). Orphan receptor HNF-4 and bZip protein C/EBP alpha bind to overlapping regions of the apolipoprotein B gene promoter and synergistically activate transcription. **J Biol Chem**, 268: 16831-8.
- Miyamoto, T., Suzuki, S. et 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: 224-31.
- Mu, Z. M., Chin, K. V., Liu, J. H., Lozano, G. et Chang, K. S. (1994). PML, a growth suppressor disrupted in acute promyelocytic leukemia. **Mol Cell Biol**, 14: 6858-67.
- Muchardt, C., Reyes, J. C., Bourachot, B., Leguoy, E. et Yaniv, M. (1996). The hbrm and BRG-1 proteins, components of the human SNF/SWI complex, are phosphorylated and excluded from the condensed chromosomes during mitosis. **Embo J**, 15: 3394-402.
- Muchardt, C. et Yaniv, M. (1993). A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. **Embo J**, 12: 4279-90.
- Muller, C., Kowenz, L. E., Grieser, A. S., Graf, T. et Leutz, A. (1995). NF-M (chicken C/EBP beta) induces eosinophilic differentiation and apoptosis in a hematopoietic progenitor cell line. **Embo J**, 14: 6127-35.
- Naar, A. M., Boutin, J. M., Lipkin, S. M., Yu, V. C., Holloway, J. M., Glass, C. K. et Rosenfeld, M. G. (1991). The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. **Cell**, 65: 1267-79.
- Nagpal, S., Saunders, M., Kastner, P., Durand, B., Nakshatri, H. et Chambon, P. (1992). Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. **Cell**, 70: 1007-19.
- Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H. et Chambon, P. (1993). RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. **Embo J**, 12: 2349-60.
- Nagy, L., Kao, H. Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L. et Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. **Cell**, 89: 373-80.
- Nakshatri, H. et Chambon, P. (1994). The directly repeated RG(G/T)TCA motifs of the rat and mouse cellular retinol-binding protein II genes are promiscuous binding sites for RAR, RXR, HNF-4, and ARP-1 homo- and heterodimers. **J Biol Chem**, 269: 890-902.

- **Neigeborn, L., Schwartzberg, P., Reid, R. et Carlson, M.** (1986). Null mutations in the SNF3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* cause a different phenotype than do previously isolated missense mutations. **Mol Cell Biol**, 6: 3569-74.
- **Noda, M., Vogel, R. L., Craig, A. M., Prahl, J., DeLuca, H. F. et Denhardt, D. T.** (1990). Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (SPP-1 or osteopontin) gene expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 87: 9995-9.
- **Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H. et Nakatani, Y.** (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. **Cell**, 87: 953-9.
- **Olsson, I. L., Breitman, T. R. et Gallo, R. C.** (1982). Priming of human myeloid leukemic cell lines HL-60 and U-937 with retinoic acid for differentiation effects of cyclic adenosine 3':5'- monophosphate-inducing agents and a T-lymphocyte-derived differentiation factor. **Cancer Res**, 42: 3928-33.
- **Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. et O'Malley, B. W.** (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. **Science**, 270: 1354-7.
- **Panagopoulos, I., Hoglund, M., Mertens, F., Mandahl, N., Mitelman, F. et Aman, P.** (1996). Fusion of the EWS and CHOP genes in myxoid liposarcoma. **Oncogene**, 12: 489-94.
- **Pandolfi, P. P., Grignani, F., Alcalay, M., Mencarelli, A., Biondi, A., LoCoco, F., Grignani, F. et Pelicci, P. G.** (1991). Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR alpha cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties. **Oncogene**, 6: 1285-92.
- **Park, H. Y., Davidson, D., Raaka, B. M. et Samuels, H. H.** (1993). The herpes simplex virus thymidine kinase gene promoter contains a novel thyroid hormone response element. **Mol Endocrinol**, 7: 319-30.
- **Pazin, M. J. et Kadonaga, J. T.** (1997a). SWI2/SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein-DNA interactions? **Cell**, 88: 737-40.
- **Pazin, M. J. et Kadonaga, J. T.** (1997b). What's up and down with histone deacetylation and transcription? **Cell**, 89: 325-8.
- **Perez, A., Kastner, P., Sethi, S., Lutz, Y., Reibel, C. et Chambon, P.** (1993). PMLRAR homodimers: distinct DNA binding properties and heteromeric interactions with RXR. **Embo J**, 12: 3171-82.
- **Perlmann, T. et Jansson, L.** (1995). A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. **Genes Dev**, 9: 769-82.
- **Perlmann, T., Rangarajan, P. N., Umesono, K. et Evans, R. M.** (1993). Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. **Genes Dev**, 7: 1411-22.
- **Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A. et Chambon, P.** (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. **Nature**, 330: 444-50.
- **Picard, D.** (1994). Regulation of protein function through expression of chimaeric proteins. **Curr Opin Biotechnol**, 5: 511-5.

- Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M. J., Fortin, M. G., Lindquist, S. et Yamamoto, K. R. (1990). Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. **Nature**, 348: 166-8.
- Pombo, A., Ferreira, J., Bridge, E. et Carmo, F. M. (1994). Adenovirus replication and transcription sites are spatially separated in the nucleus of infected cells. **Embo J**, 13: 5075-85.
- Pratt, W. B. (1987). Transformation of glucocorticoid and progesterone receptors to the DNA-binding state. **J Cell Biochem**, 35: 51-68.
- Pratt, W. B. (1993). The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. **J Biol Chem**, 268: 21455-8.
- Pratt, W. B., Jolly, D. J., Pratt, D. V., Hollenberg, S. M., Giguere, V., Cadepond, F. M., Schweizer, G. G., Catelli, M. G., Evans, R. M. et Baulieu, E. E. (1988). A region in the steroid binding domain determines formation of the non-DNA-binding, 9 S glucocorticoid receptor complex. **J Biol Chem**, 263: 267-73.
- Privalsky, M. L., Boucher, P., Koning, A. et Judelson, C. (1988). Genetic dissection of functional domains within the avian erythroblastosis virus v-erbA oncogene. **Mol Cell Biol**, 8: 4510-7.
- Ptashne, M. et Gann, A. (1997). Transcriptional activation by recruitment. **Nature**, 386: 569-77.
- Rabbitts, T. H. (1994). Chromosomal translocations in human cancer. **Nature**, 372: 143-9.
- Raelson, J. V., Nervi, C., Rosenauer, A., Benedetti, L., Monczak, Y., Pearson, M., Pelicci, P. G. et Miller, W. J. (1996). The PML/RAR alpha oncoprotein is a direct molecular target of retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. **Blood**, 88: 2826-32.
- Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R. M. et Sigler, P. B. (1995). Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats [see comments]. **Nature**, 375: 203-11.
- Raza, A., Preisler, H. D., Day, R., Yasin, Z., White, M., Lykins, J., Kukla, C., Barcos, M., Bennett, J., Browman, G. et et, a. I. (1990). Direct relationship between remission duration in acute myeloid leukemia and cell cycle kinetics: a leukemia intergroup study. **Blood**, 76: 2191-7.
- Renaud, J. P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H. et Moras, D. (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. **Nature**, 378: 681-9.
- Renoir, J. M., Radanyi, C., Faber, L. E. et Baulieu, E. E. (1990). The non-DNA-binding heterooligomeric form of mammalian steroid hormone receptors contains a hsp90-bound 59-kilodalton protein. **J Biol Chem**, 265: 10740-5.
- Roeder, R. G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. **Trends Biochem Sci**, 21: 327-35.
- Ron, D. et Habener, J. F. (1992). CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. **Genes Dev**, 6: 439-53.

- **Ruff, V. A., Yem, A. W., Munns, P. L., Adams, L. D., Reardon, I. M., Deibel, M. J. et Leach, K. L.** (1992). Tissue distribution and cellular localization of hsp56, an FK506- binding protein. Characterization using a highly specific polyclonal antibody. **J Biol Chem**, 267: 21285-8.
- **Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B. M. et Grunstein, M.** (1996). HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93: 14503-8.
- **Rutherford, S. L. et Zuker, C. S.** (1994). Protein folding and the regulation of signaling pathways. **Cell**, 79: 1129-32.
- **Sanchez, E. R., Hirst, M., Scherrer, L. C., Tang, H. Y., Welsh, M. J., Harmon, J. M., Simons, S. J., Ringold, G. M. et Pratt, W. B.** (1990). Hormone-free mouse glucocorticoid receptors overexpressed in Chinese hamster ovary cells are localized to the nucleus and are associated with both hsp70 and hsp90. **J Biol Chem**, 265: 20123-30.
- **Sanchez, E. R., Toft, D. O., Schlesinger, M. J. et Pratt, W. B.** (1985). Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein. **J Biol Chem**, 260: 12398-401.
- **Sande, S. et Privalsky, M. L.** (1996). Identification of TRACs (T3 receptor-associating cofactors), a family of cofactors that associate with, and modulate the activity of, nuclear hormone receptors. **Mol Endocrinol**, 10: 813-25.
- **Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H. et Vennstrom, B.** (1986). The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. **Nature**, 324: 635-40.
- **Sauer, F. et Jackle, H.** (1991). Concentration-dependent transcriptional activation or repression by Kruppel from a single binding site. **Nature**, 353: 563-6.
- **Scherrer, L. C., Picard, D., Massa, E., Harmon, J. M., Simons, S. J., Yamamoto, K. R. et Pratt, W. B.** (1993). Evidence that the hormone binding domain of steroid receptors confers hormonal control on chimeric proteins by determining their hormone-regulated binding to heat-shock protein 90. **Biochemistry**, 32: 5381-6.
- **Schulman, I. G., Chakravarti, D., Juguilon, H., Romo, A. et 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 U S A**, 92: 8288-92.
- **Schulman, I. G., Juguilon, H. et Evans, R. M.** (1996). Activation and repression by nuclear hormone receptors: hormone modulates an equilibrium between active and repressive states. **Mol Cell Biol**, 16: 3807-13.
- **Schulman, I. G., Li, C., Schwabe, J. W. et Evans, R. M.** (1997). The phantom ligand effect: allosteric control of transcription by the retinoid X receptor. **Genes Dev**, 11: 299-308.
- **Schwabe, J. W., Chapman, L. et Rhodes, D.** (1995). The oestrogen receptor recognizes an imperfectly palindromic response element through an alternative side-chain conformation. **Structure**, 3: 201-13.

- Schwabe, J. W., Chapman, L., Finch, J. T. et 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: 567-78.
- Smith, W. C., Nakshatri, H., Leroy, P., Rees, J. et Chambon, P. (1991). A retinoic acid response element is present in the mouse cellular retinol binding protein I (mCRBPI) promoter. **Embo J**, 10: 2223-30.
- Stadler, M., Chelbi, A. M., Koken, M. H., Venturini, L., Lee, C., Saib, A., Quignon, F., Pelicano, L., Guillemain, M. C., Schindler, C. et et, a. I. (1995). Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. **Oncogene**, 11: 2565-73.
- Starr, D. B., Matsui, W., Thomas, J. R. et Yamamoto, K. R. (1996). Intracellular receptors use a common mechanism to interpret signaling information at response elements. **Genes Dev**, 10: 1271-83.
- Stolow, D. T. et Haynes, S. R. (1995). Cabeza, a Drosophila gene encoding a novel RNA binding protein, shares homology with EWS and TLS, two genes involved in human sarcoma formation. **Nucleic Acids Res**, 23: 835-43.
- Strähle, U., Boshart, M., Klock, G., Stewart, F. et Schutz, G. (1989). Glucocorticoid- and progesterone-specific effects are determined by differential expression of the respective hormone receptors. **Nature**, 339: 629-32.
- Suzuki, S., Miyamoto, T., Opsahl, A., Sakurai, A. et DeGroot, L. J. (1994). Two thyroid hormone response elements are present in the promoter of human thyroid hormone receptor beta 1. **Mol Endocrinol**, 8: 305-14.
- Swaffield, J. C., Bromberg, J. F. et Johnston, S. A. (1992). Alterations in a yeast protein resembling HIV Tat-binding protein relieve requirement for an acidic activation domain in GAL4. **Nature**, 360: 768.
- Swaffield, J. C., Melcher, K. et 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.
- Tansey, W. P. et Herr, W. (1997). TAFs: guilt by association? **Cell**, 88: 729-32.
- Tasset, D., Tora, L., Fromental, C., Scheer, E. et Chambon, P. (1990). Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms. **Cell**, 62: 1177-87.
- Taunton, J., Hassig, C. A. et Schreiber, S. L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p [see comments]. **Science**, 272: 408-11.
- Testa, U., Masciulli, R., Tritarelli, E., Pustorino, R., Mariani, G., Martucci, R., Barberi, T., Camagna, A., Valtieri, M. et Peschle, C. (1993). Transforming growth factor-beta potentiates vitamin D3-induced terminal monocytic differentiation of human leukemic cell lines. **J Immunol**, 150: 2418-30.
- Thummel, C. S. (1995). From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of Drosophila nuclear receptor superfamily members. **Cell**, 83: 871-7.
- Tini, M., Otulakowski, G., Breitman, M. L., Tsui, L. C. et Giguere, V. (1993). An everted repeat mediates retinoic acid induction of the gamma F- crystallin gene: evidence of a direct role for retinoids in lens development. **Genes Dev**, 7: 295-307.

- **Tjian, R. et Maniatis, T.** (1994). Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. **Cell**, 77: 5-8.
- **Toft, D. et Gorski, J.** (1966). A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 55: 1574-81.
- **Tontonoz, P., Hu, E. et Spiegelman, B. M.** (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid- activated transcription factor. **Cell**, 79: 1147-1156.
- **Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E. et Chambon, P.** (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. **Cell**, 59: 477-87.
- **Tsai, S. et Collins, S. J.** (1993). A dominant negative retinoic acid receptor blocks neutrophil differentiation at the promyelocyte stage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90: 7153-7.
- **Tsai, S., Bartelmez, S., Heyman, R., Damm, K., Evans, R. et Collins, S. J.** (1992). A mutated retinoic acid receptor-alpha exhibiting dominant-negative activity alters the lineage development of a multipotent hematopoietic cell line. **Genes Dev**, 6: 2258-69.
- **Tsai, S., Bartelmez, S., Sitnicka, E. et Collins, S.** (1994). Lymphohematopoietic progenitors immortalized by a retroviral vector harboring a dominant-negative retinoic acid receptor can recapitulate lymphoid, myeloid, and erythroid development. **Genes Dev**, 8: 2831-41.
- **Ubeda, M., Wang, X. Z., Zinszner, H., Wu, I., Habener, J. F. et Ron, D.** (1996). Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. **Mol Cell Biol**, 16: 1479-89.
- **Ueda, H., Sun, G. C., Murata, T. et Hirose, S.** (1992). A novel DNA-binding motif abuts the zinc finger domain of insect nuclear hormone receptor FTZ-F1 and mouse embryonal long terminal repeat-binding protein. **Mol Cell Biol**, 12: 5667-72.
- **Umesono, K. et Evans, R. M.** (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. **Cell**, 57: 1139-46.
- **Umesono, K., Giguere, V., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. et Evans, R. M.** (1988). Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. **Nature**, 336: 262-5.
- **Umesono, K., Murakami, K. K., Thompson, C. C. et Evans, R. M.** (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. **Cell**, 65: 1255-66.
- **Valcarcel, R., Holz, H., Jimenez, C. G., Baretino, D. et Stunnenberg, H. G.** (1994). Retinoid-dependent in vitro transcription mediated by the RXR/RAR heterodimer. **Genes Dev**, 8: 3068-79.
- **Voegel, J. J., Heine, M. J., Zechel, C., Chambon, P. et Gronemeyer, H.** (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. **Embo J**, 15: 3667-75.
- **vom Baur, E., Zechel, C., Heery, D., Heine, M. J., Garnier, J. M., Vivat, V., Le, D. B., Gronemeyer, H., Chambon, P. et 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: 110-24.

- **Wagner, R. L., Apriletti, J. W., McGrath, M. E., West, B. L., Baxter, J. D. et Fletterick, R. J.** (1995). A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. **Nature**, 378: 690-7.
- **Wagner, R. L., Apriletti, J. W., McGrath, M. E., West, B. L., Baxter, J. D. et Fletterick, R. J.** (1995). A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. **Nature**, 378: 690-7.
- **Wang, X. Z., Lawson, B., Brewer, J. W., Zinszner, H., Sanjay, A., Mi, L. J., Boorstein, R., Kreibich, G., Hendershot, L. M. et Ron, D.** (1996). Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). **Mol Cell Biol**, 16: 4273-80.
- **Weis, K., Rambaud, S., Lavau, C., Jansen, J., Carvalho, T., Carmo, F. M., Lamond, A. et Dejean, A.** (1994). Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. **Cell**, 76: 345-56.
- **Wickner, S., Gottesman, S., Skowyra, D., Hoskins, J., McKenney, K. et Maurizi, M. R.** (1994). A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 91: 12218-22.
- **Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R. et Jakob, U.** (1992). Hsp90 chaperones protein folding in vitro. **Nature**, 358: 169-70.
- **Williams, G. T. et Lau, L. F.** (1993). Activation of the inducible orphan receptor gene *nur77* by serum growth factors: dissociation of immediate-early and delayed-early responses. **Mol Cell Biol**, 13: 6124-36.
- **Willy, P. J. et Mangelsdorf, D. J.** (1997). Unique requirements for retinoid-dependant transcriptional activation by the orphan receptor LXR. **Genes Dev**, 289-98.
- **Willy, P. J., Umesono, K., Ong, E. S., Evans, R. M., Heyman, R. A. et Mangelsdorf, D. J.** (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. **Genes Dev**, 9: 1033-45.
- **Wilson, C. J., Chao, D. M., Imbalzano, A. N., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E. et Young, R. A.** (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. **Cell**, 84: 235-44.
- **Wilson, T. E., Fahrner, T. J. et Milbrandt, J.** (1993). The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. **Mol Cell Biol**, 13: 5794-804.
- **Wilson, T. E., Paulsen, R. E., Padgett, K. A. et Milbrandt, J.** (1992). Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. **Science**, 256: 107-10.
- **Winston, F. et Carlson, M.** (1992). Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. **Trends Genet**, 8: 387-91.
- **Witzgall, R., O'Leary, E., Leaf, A., Onaldi, D. et Bonventre, J. V.** (1994). The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 91: 4514-8.
- **Wolffe, A. P. et Pruss, D.** (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. **Cell**, 84: 817-9.

- **Wong, J., Shi, Y. B. et Wolffe, A. P.** (1995). A role for nucleosome assembly in both silencing and activation of the *Xenopus* TR beta A gene by the thyroid hormone receptor. **Genes Dev**, 9: 2696-711.
- **Woronicz, J. D., Calnan, B., Ngo, V. et Winoto, A.** (1994). Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T- cell hybridomas. **Nature**, 367: 277-81.
- **Wu, Z., Xie, Y., Bucher, N. L. et Farmer, S. R.** (1995). Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. **Genes Dev**, 9: 2350-2363.
- **Wurtz, J. M., Bourguet, W., Renaud, J. P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D. et Gronemeyer, H.** (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. **Nat Struct Biol**, 3: 206.
- **Yang, E. et Korsmeyer, S. J.** (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. **Blood**, 88: 386-401.
- **Yao, T. P., Forman, B. M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J. D., McKeown, M., Cherbas, P. et Evans, R. M.** (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. **Nature**, 366: 476-9.
- **Yeh, W. C., Cao, Z., Classon, M. et McKnight, S. L.** (1995). Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. **Genes Dev**, 9: 168-181.
- **Yoshida, H., Kitamura, K., Tanaka, K., Omura, S., Miyazaki, T., Hachiya, T., Ohno, R. et Naoe, T.** (1996). Accelerated degradation of PML-retinoic acid receptor alpha (PML-RARA) oncoprotein by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: possible role of the proteasome pathway. **Cancer Res**, 56: 2945-8.
- **Yoshinaga, S. K., Peterson, C. L., Herskowitz, I. et Yamamoto, K. R.** (1992). Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. **Science**, 258: 1598-604.
- **Zamir, I., Harding, H. P., Atkins, G. B., Horlein, A., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. et Lazar, M. A.** (1996). A nuclear hormone receptor corepressor mediates transcriptional silencing by receptors with distinct repression domains. **Mol Cell Biol**, 16: 5458-65.
- **Zamir, I., Zhang, J. et Lazar, M. A.** (1997). Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors. **Genes Dev**, 11: 835-46.
- **Zechel, C., Shen, X. Q., Chambon, P. et 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: 1414-24.
- **Zechel, C., Shen, X. Q., Chen, J. Y., Chen, Z. P., Chambon, P. et 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: 1425-33.
- **Zenke, M., Kahn, P., Disela, C., Vennstrom, B., Leutz, A., Keegan, K., Hayman, M. J., Choi, H. R., Yew, N., Engel, J. D. et et, a. I.** (1988). v-erbA specifically suppresses transcription of the avian erythrocyte anion transporter (band 3) gene. **Cell**, 52: 107-19.

- **Zenke, M., Munoz, A., Sap, J., Vennstrom, B. et Beug, H.** (1990). v-erbA oncogene activation entails the loss of hormone-dependent regulator activity of c-erbA. **Cell**, 61: 1035-49.
- **Zhang, X. K., Lehmann, J., Hoffmann, B., Dawson, M. I., Cameron, J., Graupner, G., Hermann, T., Tran, P. et Pfahl, M.** (1992). Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid. **Nature**, 358: 587-91.
- **Zhang, X. K., Salbert, G., Lee, M. O. et Pfahl, M.** (1994). Mutations that alter ligand-induced switches and dimerization activities in the retinoid X receptor. **Mol Cell Biol**, 14: 4311-23.
- **Zhou, Q. et Berk, A. J.** (1995). The yeast TATA-binding protein (TBP) core domain assembles with human TBP-associated factors into a functional TFIID complex. **Mol Cell Biol**, 15: 534-9.
- **Zinszner, H., Albalat, R. et Ron, D.** (1994). A novel effector domain from the RNA-binding protein TLS or EWS is required for oncogenic transformation by CHOP. **Genes Dev**, 8: 2513-26.
- **Zinszner, H., Immanuel, D., Yin, Y., Liang, F. X. et Ron, D.** (1997). A topogenic role for the oncogenic N-terminus of TLS: nucleolar localization when transcription is inhibited. **Oncogene**, 14: 451-61.
- **Zucman, J., Delattre, O., Desmaze, C., Epstein, A. L., Stenman, G., Speleman, F., Fletchers, C. D., Aurias, A. et Thomas, G.** (1993). EWS and ATF-1 gene fusion induced by t(12;22) translocation in malignant melanoma of soft parts. **Nat Genet**, 4: 341-5.

