

5

gen 2000 4202

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE**

N° d'ordre :

2095

**THESE**

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

par

**Bertrand JOSEPH**



**LES RETINOIDES DE SYNTHESE : UN OUTIL POUR DISSEQUER  
LES VOIES PAR LESQUELLES L'ACIDE RETINOIQUE CONTROLE  
L'EXPRESSION DE LA TRANSGLUTAMINASE DE TISSU  
ET DE L'APOPTOSE**

Soutenue en Octobre 1997 devant la commission d'Examen :

Président : **Professeur G. SPIK**

Rapporteurs : **Docteur S. MICHEL**

**Professeur M. PALLARDY**

Examineurs : **Professeur P. FORMSTECHE**

**Professeur H. HUNDERMARCK**

*A Armelle*

*A nos familles*

*« La connaissance des lacunes dans l'ignorance ».*

*Auteur : ?*



Ce travail a été réalisé au laboratoire INSERM U 459 «Signaux, récepteur et différenciation cellulaire».

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le professeur Pierre Formstecher, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je vous remercie pour les discussions que nous avons pu avoir ensemble, votre rigueur scientifique, et de m'avoir permis de réaliser cette thèse dans le laps de temps qui m'était à partie. Je vous souhaite de plus de devenir incollable en informatique.

Je voudrais remercier Monsieur le Docteur Serge Michel d'avoir accepté de juger de suite ce travail J'en profite pour remercier le CIRD Galderma qui nous a fournir les rétinoïdes de synthèse sans lesquels cette étude n'aurait pas été possible. Je suis très heureux d'avoir un rapporteur expert dans les domaines des transglutaminases et des rétinoïdes.

Que Monsieur le Professeur Marc Pallardy de l'INSERM U 461 «Récepteurs et signalisation des interleukines» soit également assuré de mes plus vifs remerciement pour l'intérêt qu'il porte à cette recherche en acceptant de la juger en tant que rapporteur. Votre regard de toxicologiste ne qu'apporter un plus pour juger une étude *in cellulo*.

Je suis reconnaissant à Madame le professeur Geneviève Spick d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Hubert Hondermarck d'accepter de juger mon travail. Je tiens d'ailleurs à vous féliciter pour votre nomination et vous remercie pour vos conseils quant à la manière d'enseigner.

Je tiens aussi à dire toutes ma reconnaissance aux Docteurs Claude Méreau Richard et Pierre Marie Danze pour avoir été mes tuteurs durant ces années. Ils faut bien au moins deux tuteurs pour que je puisse pousser à peu près droit. Je vous remercie aussi Claude, d'avoir essayer (en vain ?) de m'apprendre les subtilités de la langue de Molière.

Ma sympathie et ma reconnaissance vont aussi à toute l'équipe de biologie cellulaire et de biologie moléculaire pour son aide et sa bonne humeur et particulièrement à Pascaline, Martine et Pascal qui ont des doigts en or.

Je remercie enfin Armelle pour son soutien de tous les jours et son aide précieuse durant la rédaction de la thèse.

# TABLE DES MATIERES

**RESUME**

**PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS** 6

**ABBREVIATIONS** 7

**REVUE GENERALE :** 9

**LA TRANSGLUTAMINASE DE TISSU, UN MEMBRE DE LA FAMILLE DES  
TRANSGLUTAMINASES** 10

**A. ENZYMOLOGIE** 10

**B. CLASSIFICATION** 12

**C. STRUCTURE PRIMAIRE** 16

**D. LES DOMAINES FONCTIONNELS DES TGt** 16

I. Les domaines partagés par la famille 16

a) Le site actif contenant la Cystéine essentielle 16

b) Le site potentiel de fixation du calcium 23

II. LES DOMAINES FONCTIONNELS SPÉCIFIQUES DES TGT 25

a) Le site de fixation du GTP 25

b) Les sites dans la région N-terminale 25

1) N $\alpha$  acétylation 25

2) Fixation de la fibronectine 26

**E. ORGANISATION GÉNIQUE, LOCALISATION CHROMOSOMIQUE ET PHYLOGÉNIE** 27

**F. RÉGULATION DE LA TGT** 27

**G. DISTRIBUTION-FONCTIONS** 32

I. TRANSDUCTION DU SIGNAL 32

II. STABILISATION DE LA MATRICE EXTRA-CELLULAIRE 35

III. MODULATION D'ACTIVITÉS BIOLOGIQUES 35

IV. CIRCULATION DE MOLÉCULES 37

V. DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE 37

<b>LA RÉGULATION DE LA TRANSGLUTAMINASE DE TISSU PAR LES RÉTINOÏDES</b>	<b>38</b>
<b>A. LES RÉTINOÏDES</b>	<b>38</b>
I. DÉFINITION DES RÉTINOÏDES	38
II. EFFETS DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE	38
III. RÉTINOÏDES ET PATHOLOGIE	41
IV. MÉCANISME D'ACTION DES RÉTINOÏDES	42
a) Protéines cytoplasmiques liant les rétinoïdes	42
b) Les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque	42
1) La superfamille des récepteurs nucléaires	42
2) Domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires	44
3) Les RARs (Récepteurs de l'Acide Rétinoïque)	44
4) Les RXRs (Récepteurs du Rétinoïde X)	46
c) La transactivation	46
1) Eléments de réponse aux rétinoïdes	46
2) Rôle du RXR dans la transactivation	49
3) Modulation de la transactivation	50
4) Régulation positive	53
5) Modulation croisée	53
d) Rôle des différents récepteurs	53
e) Les rétinoïdes de synthèse, un outil	54
<b>B. LES RÉTINOÏDES RÉGULENT LA TRANSGLUTAMINASE DE TISSU</b>	<b>55</b>
I. L'ACIDE RÉTINOÏQUE INDUIT LA TRANSGLUTAMINASE DE TISSU	55
II. MODULATION DE L'INDUCTION PAR L'ACIDE RÉTINOÏQUE DE L'EXPRESSION DE LA TRANSGLUTAMINASE DE TISSU	58
a) Effet de l'AMPc	58
b) Effet des glucocorticoïdes	58
c) Effet de la 1 $\alpha$ ,25 dihydroxyvitamine D3	58
d) Effet de l' $\alpha$ -difluorométhylornithine	59
III. ELÉMENTS DE RÉPONSE AUX RÉTINOÏDES DANS LES RÉGIONS PROMOTRICES DE LA TRANSGLUTAMINASE DE TISSU	59
a) Les promoteurs de l'homme et du cochon d'Inde	59
b) Le promoteur de la souris	59
IV. DISSECTION PAR LES RÉTINOÏDES DE SYNTHÈSE DES VOIES DE CONTRÔLE DE L'EXPRESSION DE LA TRANSGLUTAMINASE DE TISSU	61

a) La voie RAR $\alpha$ des cellules de rat SPOC-1	62
b) L'étude de la lignée HL-60 et de ses sous-clones : une voie controversée	62
c) La voie PML-RAR $\alpha$ dans les cellules de leucémie aiguë à promyélocytes	62
d) La voie RAR $\gamma$ des thymocytes	63
<b>LA TRANSGLUTAMINASE DE TISSU EFFECTEUR DE L' APOPTOSE</b>	<b>63</b>
<b>A. APOPTOSE</b>	<b>63</b>
I. HISTORIQUE ET DÉFINITION	63
II. RÔLES BIOLOGIQUES DE L' APOPTOSE	64
III. DÉRÉGULATION DE L' APOPTOSE	65
IV. CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES	65
V. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES	67
a) Les inducteurs de l'apoptose	67
b) Les transducteurs	69
1) Régulation génique chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	69
2) Les gènes de la famille Bcl-2	69
3) Autres gènes impliqués dans le contrôle de l'apoptose	71
4) Rôle de la mitochondrie	71
5) Rôle de l'ATP	73
c) Les effecteurs	73
1) Les endonucléases	73
2) Les protéases	75
<b>B. TGT ET APOPTOSE</b>	<b>75</b>
I. CORRÉLATION TGT-APOPTOSE	75
II. IMPLICATION DE LA TGT DANS L' APOPTOSE	77
a) La TGT serait-elle impliquée dans la voie conduisant à la mort des cellules chez <i>C. elegans</i> ?	77
b) La modulation de l'apoptose par la TGT	77
III. RÔLE DE LA TGT DANS L' APOPTOSE	78
a) Stabilisation des membranes – formation des corps apoptotiques	78
b) La TGT rend « silencieuse » l'apoptose	78
c) Induction de l'apoptose par la TGT	78
IV. TGT SANS APOPTOSE	79
V. MORT CELLULAIRE SANS TGT	79

<b><u>RESULTATS :</u></b>	81
<b>PARTIE I : ETUDE DU MÉCANISME DE RÉGULATION PAR LES RÉTINOÏDES DE L'EXPRESSION DE LA TGT ET SA CORRÉLATION AVEC L'APOPTOSE</b>	82
<b>A. QUESTIONS POSÉES</b>	82
<b>B. APPROCHES UTILISÉES</b>	82
<b>C. RÉSULTATS</b>	82
I. EVIDENCE FOR THE INVOLVEMENT OF BOTH RETINOIC ACID RECEPTOR AND RETINOIC X RECEPTOR-DEPENDENT SIGNALING PATHWAYS IN THE INDUCTION OF TISSUE TRANSGLUTAMINASE AND APOPTOSIS IN THE HUMAN MYELOMA CELL LINE RPMI 8226	83
II. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE RT-PCR POUR L'ÉTUDE DES ARNm DE LA TGT	107
III. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES ARNm DE LA TGT PAR LES RÉTINOÏDES	114
IV. LES HOMOLOGUES DE LA TGT	117
V. EFFET DE L'ACTINOMYCINE D ET DE LA CYCLOHEXIMIDE SUR L'EXPRESSION DE LA TGT INDUITE PAR L'ARTT	118
VI. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE TGT PAR LES RÉTINOÏDES	118
VII. PKC ET PHOSPHORYLATION DANS LA RÉGULATION DE L'INDUCTION DE L'EXPRESSION DE LA TGT PAR L'ARTT	122
<b>D. CONCLUSION</b>	124
<b>PARTIE II : LE RÉTINOÏDE CD437 INDUIT UNE MORT CELLULAIRE RAPIDE, INDÉPENDANTE DE LA VOIE RAR<math>\gamma</math> ET SANS EXPRESSION DE LA TRANSGLUTAMINASE DE TISSU</b>	127
<b>A. QUESTIONS POSÉES</b>	127
<b>B. APPROCHES UTILISÉES</b>	127
<b>C. RÉSULTATS</b>	127
I. INHIBITION DE LA PROLIFÉRATION ET INDUCTION DE L'APOPTOSE PAR L'ARTT OU LE CD437 DANS LES CELLULES RPMI8226	127
II. CARACTÉRISATION DE L'APOPTOSE INDUITE PAR L'ARTT OU LE CD437	131
III. VOIE RAR $\gamma$ DÉPENDANTE OU INDÉPENDANTE DU CD437 DANS L'INDUCTION DE LA MORT CELLULAIRE	134
IV. MÉCANISME D'ACTION DU CD437	134
V. EXPRESSION DE LA TGT	140

VI. EFFET D'UN PRÉ-TRAITEMENT À L'ARTT SUR LA RÉPONSE DU CD437	140
<b>D. DISCUSSION GÉNÉRALE</b>	140
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	145
<b>COLLABORATIONS</b>	145
<b>APPENDICE TECHNIQUE</b>	146
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	165
<b>TABLE DES TABLEAUX</b>	197
<b>TABLE DES FIGURES</b>	199

## RESUME

La transglutaminase de tissu, marqueur biochimique de l'apoptose, phénomène biologique majeur à coté de la prolifération dans les processus cancéreux, est induite par l'acide rétinoïque. Le mécanisme de régulation de cet enzyme est complexe car il existe 6 récepteurs des rétinoïdes. La question qui se pose est de savoir par quels récepteurs passe le contrôle de la transglutaminase de tissu.

Le myélome multiple est une affection cancéreuse grave où l'apport des rétinoïdes ouvre des perspectives de traitement. Notre modèle, la lignée myélomateuse humaine RPMI 8226, exprime l'ensemble des ARNm des récepteurs des rétinoïdes (RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , RXR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ).

Dans ce travail, nous avons montré que les deux voies RARs et RXRs sont nécessaires à l'induction de la protéine et de l'activité enzymatique de la transglutaminase de tissu. Chaque voie est cependant capable d'induire seule partiellement les ARNm de la transglutaminase de tissu, l'induction optimale étant obtenue avec les deux voies. Nos résultats permettent aussi de proposer l'existence d'une régulation par modification post-traductionnelle de l'enzyme. Enfin, l'expression de la transglutaminase de tissu est corrélée à l'induction de l'apoptose dans les cellules RPMI 8226 au bout de 6 jours.

Nous nous sommes également intéressés au CD 437, un rétinoïde de synthèse sélectif du RAR $\gamma$ . Ce rétinoïde est capable d'induire en quelques heures la mort des cellules, indépendamment du récepteur RAR $\gamma$ . Cette mort cellulaire présente deux caractéristiques : un morphotype apoptotique cytoplasmique incomplet et une absence d'expression de la transglutaminase de tissu.

Ces résultats montrent que la TGt est régulée par les voies RARs et RXRs des rétinoïdes et que son expression serait nécessaire au déroulement complet du processus apoptotique des cellules RPMI 8226.

Ce travail, effectué dans le laboratoire de Biochimie Structurale de la faculté de Médecine de Lille, sous la direction du Professeur P. Formstecher, a fait l'objet des communications (1-8) et des publications (9-11) suivantes :

1/ Modulation du phénotype apoptotique par les rétinoïdes de synthèse et les glucocorticoïdes dans la lignée myélomateuse humaine RPMI 8226.

BELIN MT., LEFEBVRE O., JOSEPH B., MEREAU-RICHARD C., TUAL M., MASSELOT B., et FORMSTECHEP.

Colloque ULB, 30 Mai 1995, Villeneuve d'Ascq, France.

2/ Modulation de l'apoptose, de BCL2 et de WAF1/CIP1 par les rétinoïdes dans la lignée myélomateuse humaine RPMI 8226.

WOUTERS D., BELIN MT., LEFEBVRE O., JOSEPH B., MEREAU-RICHARD C., et FORMSTECHEP.

XII<sup>e</sup> Journée Jean-Claude Drefus de Génétique et de Pathologie Moléculaires, 22 Septembre 1995, Paris, France.

3/ Induction of apoptosis by retinoïds in human myeloma cells.

LEFEBVRE O., BELIN MT., MEREAU-RICHARD C., JOSEPH B., FACON T. et FORMSTECHEP.

Vth International Workshop on Multiple Myeloma, Septembre 1995, La Baule, France.

4/ Effects of RAR and RXR selective ligands on the induction of apoptosis in myeloma cells.

LEFEBVRE O., BELIN MT., MEREAU-RICHARD C., JOSEPH B., FACON T. et FORMSTECHEP.

Conférence "Retinoïds 95", October 8/11 1995, Sophia Antipolis, France.

5/ Contrôle par les rétinoïdes de l'expression de la transglutaminase tissulaire, marqueur biochimique de l'apoptose.

JOSEPH B., LEFEBVRE O., BELIN MT., MEREAU-RICHARD C., FACON T. et FORMSTECHEP.

II<sup>e</sup> Congrès d Club Hematopoïèse et Oncogénèse, 15/16 Octobre 1995, Dourdan, France.

XXIIe Forum des Jeunes Chercheurs, 2/6 Juillet 1996, Poitiers, France.

6/ Induction of apoptosis by all-trans retinoic and receptor selective synthetic retinoids in human melanoma cells.

LEFEBVRE O., BELIN MT., MEREAU-RICHARD C., JOSEPH B., FACON T. et FORMSTECHEP.

Euroconférence Apoptosis, October 21/26 1995, Cuença, Spain.

7/ Effet synergique de l'association melphan et acide rétinoïque tout-trans sur l'induction de l'apoptose dans des lignées myélomateuses humaines.

MASCHKE S., LEFEBVRE O., JOSEPH B., ZANDECKI M., RICHARD C., FACON T., FORMSTECHEP.

Congrès 1997 de la Société Française d'Hématologie, 6-7 Février 1997, Paris, France.

8/ Differential induction of apoptosis and tissue transglutaminase by Cd437, a RAR $\gamma$  selective ligand evidence for RAR $\gamma$  independant effects.

JOSEPH B., LEFEBVRE O., BELIN MT., MEREAU-RICHARD C. et FORMSTECHEP.

European Retinoid Research Group Retinoids'97 September 28- October 1 1997, Nice, France.

9/ Evidence for the involvement of both retinoic acid receptor and retinoic X receptor-dependent signaling pathways in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis in the human myeloma cell line RPMI 8226.

JOSEPH B., LEFEBVRE O., MEREAU-RICHARD C., DANZE PM., BELIN MT et FORMSTECHEP.

En révision à Blood.

Collaborations :

10/ mRNA expression of HNF-4 isoforms and of HNF-1 $\alpha$ /HNF-1 $\beta$  variants and differenciation of human cell lines that mimic highly specialized phenotypes of intestinal epithelium.

SUAUD L., JOSEPH B., FORMSTECHEP P., et LAINE B.

Biochemical and Biophysical Research communications 1997; 235: 820-825.

11/ Inhibition by Bcl-2 and E1B 19K Ad5 of apoptosis induced by HIV-1 infection.

BEN JILANI KE., GRANGETTE C., JOSEPH B., et AMEISEN JC.

Soumis à J-Virol.

# ABREVIATIONS

**ADN** : Acide DésoxyRibonucléique.

**ADNC** : Acide DésoxyRibonucléique complémentaire.

**AR** : Acide Rétinoïque.

**ARN** : Acide RiboNucléique.

**ARNm** : ARN messenger.

**ARtt** : Acide Rétinoïque tout trans.

**9-cis AR** : Acide 9-cis Rétinoïque.

**ATCA** : Acide TriChloroAcétique.

**B 4.2** : Bande 4-2 d'érythrocytes.

**CRABP** : « Cytoplasmic Retinoic Acid Binding Protein » : protéine cytoplasmique liant l'acide rétinoïque.

**CRBP** : « Cytoplasmic Retinol Binding Protein » : protéine cytoplasmique liant le rétinol.

**C<sub>T</sub>** : C terminal.

**DABCO** : 1,4-DiAzaBiCyclo (2,2,2) Octane.

**EDTA** : « Ethylene Diamine Tetraacetic Acid » : acide éthylène diamine tetraacétique.

**FXIIIa** : Facteur de coagulation XIII sous-unité a.

**HRE** : « Hormon Responsive Element » : élément de réponse aux hormones.

**kb** : kilo base.

**MOPS** : « MorpholinOPropaneSulfonic acid » : acide morpholino propane sulfonique.

**N<sub>T</sub>** : N terminal.

**pb** : paire de bases.

**PBS** : « Phosphate-Buffer Salin ».

**PCR** : « Polymerase Chain Reaction » : réaction de polymérisation en chaîne.

**qsp** : quantité suffisante pour.

**RAR** : « Retinoic Acid Receptor » : Récepteur de l'Acide Rétinoïque.

**RARE** : « Retinoic Acid Responsive Element » : Elément oligonucléotidique de Réponse des

RARs présent sur les promoteurs des gènes régulés par l'acide rétinoïque..

**RT** : « Transcriptase Reverse » : Réaction de transcription inverse.

**RXR** : « Retinoid X Receptor » : Récepteur du Rétinoïde X.

**RXRE** : « Retinoic X Responsive Element » : Élément de Réponse des RXRs.

**SDS** : « Sodium Dodecyl Sulfate ».

**SSC** : « Sodium chloride / Sodium Citrate ».

**TAE** : Tampon Tris Acide acétique EDTA.

**TBS** : « Tris Buffer Salin ».

**TGe** : Transglutaminase épidermique.

**TGk** : Transglutaminase de kératinocyte.

**TGp** : Transglutaminase de prostate.

**TGt** : Transglutaminase de tissu.

**UV** : Ultra Violet.

### Les acides aminés et leurs symboles

A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

# **REVUE GENERALE**

# La transglutaminase de tissu, un membre de la famille des transglutaminases

## A. Enzymologie

Les transglutaminases sont définies par la commission de nomenclature des enzymes comme étant des R-glutaminy-peptide : amine  $\gamma$ -glutamyl transférases (EC 2.3.2.13).

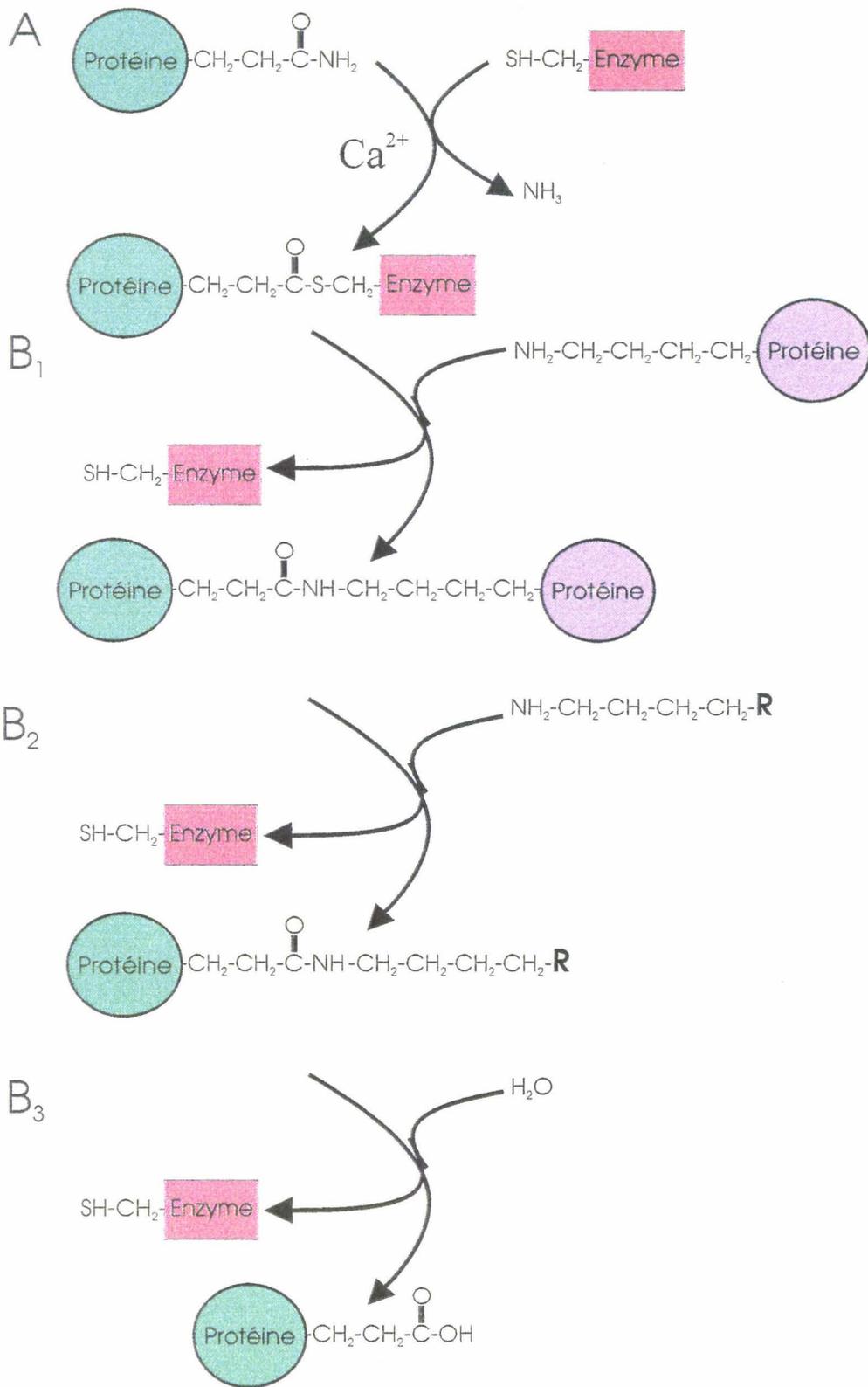
Ces enzymes catalysent le transfert d'acyle dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ) entre un groupement  $\gamma$ -carboxamide du résidu glutaminy d'un peptide et le groupement  $\epsilon$ -amine d'un résidu lysyl d'un peptide ou le groupement amine primaire d'une polyamine naturelle. Cette réaction de transfert d'acyle aboutit à la formation de liaisons covalentes isopeptidiques intra- ou inter-chaînes par l'établissement de liens  $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysine}$ ,  $\text{N,N-bis}(\gamma\text{-glutamyl})\text{polyamine}$  et autres dérivés  $\gamma$ -glutamylamine. Ce processus est généralement responsable de la formation de structures irréversibles souvent supramoléculaires et insolubles aux détergents et aux agents chaotropiques. Cependant, dans certains cas particuliers, ce processus est partiellement réversible : le Facteur XIII et la TGt possèdent une activité isopeptidase (Parameswaran *et al*, 1997). Chez la sangsue (*Hirudo medicinalis*) il existe une destabilase (endo- $\epsilon(\gamma\text{-glutaminy})\text{lysine}$  isopeptidase) capable également d'hydrolyser ces liaisons isopeptidiques (Zavalova *et al*, 1996).

Un résidu Gln sert de donneur d'acyle. Les accepteurs d'acyle sont les groupes  $\epsilon$ -amine des résidus Lys des protéines ou les amines primaires des polyamines naturelles telle que la putrescine, la spermidine ou la cadavérine (diamines).

La liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  et l'exposition de la fonction thiol de la Cys du site actif sont essentielles à l'activité de l'enzyme. La réaction se déroule en plusieurs étapes et est détaillée dans la Figure 1.

Ces liaisons isopeptidiques à l'origine de polymères protéiques sont extrêmement stables et ne peuvent être rompues qu'après dégradation totale de la ou des chaînes polypeptidiques. La modification d'une protéine par l'incorporation de polyamines affecterait probablement son activité biologique ou son "turn-over".

Les transglutaminases ont une large spécificité pour les accepteurs d'amines primaires, la Lys liée aux peptides ou les polyamines (Folk et Finlayson, 1977). Au contraire, peu de protéines contiennent les résidus Gln capables de former les intermédiaires enzyme-acyle (Gorman et Folk, 1981; Aeschlimann *et al*, 1992) car la séquence en acides aminés et la charge de ces résidus entourant la Gln et les structures secondaires locales (Folk, 1980) influencent fortement la formation de l'intermédiaire. La dénaturation ou la protéolyse d'une protéine non réactive peut la convertir en un substrat pour les transglutaminases (Folk et Finlayson, 1977). L'alignement proche de la Gln avec l'amine primaire peut promouvoir la réaction de liaison. Cette propriété est bien illustrée



**Figure 1: Réactions biologiques catalysées par les transglutaminases.**

A) Formation d'un intermédiaire enzyme-acyle à partir d'un résidu Gln.

B) Réaction de l'intermédiaire enzyme-acyle avec:

1. un résidu Lys pour former une liaison isopeptidique  $\epsilon$ ( $\gamma$ -glutamyl)lysyl.
2. une polyamine pour former une liaison ( $\gamma$ -glutamyl)polyamine.
3. l'eau pour donner un résidu Glu.

par l'alignement spontané des molécules de fibrine après la coupure du fibrinogène par la thrombine, qui induit la formation de liaisons iso-peptidiques intermoléculaires par le FXIIIa entre les chaînes  $\gamma$  de fibrines, puis la formation de multimères de chaînes  $\alpha$  de fibrine (pour revue : Greenberg *et al*, 1991).

Les transglutaminases possèdent des substrats communs et des substrats qui leur sont spécifiques, malgré la grande homologie de séquence entourant la Cys du site actif (pour revue : Greenberg *et al*, 1991).

Il existe un grand nombre d'inhibiteurs des transglutaminases comme l'iodoacétamide, la bléomycine, un dérivé de la nitrosourée, les isothiocyanates aliphatiques (Folk; 1980), la méthylamine, l'éthylamine, la dansylcadavérine, la bacitracine, le tolbutamide et le GTP, ce dernier étant caractéristique de la TGt (Dadabay *et al*, 1989).

L'activité transglutaminase est détectée dans toute une variété de tissus et de fluides corporels. On pensait à l'origine que cette activité était due à un seul enzyme transglutaminase, mais il est maintenant clair que cette activité implique une famille d'enzymes apparentés mais bien distinctes car elles diffèrent à la fois dans leur territoire d'expression, leur spécificité de substrat et leur régulation physiologique.

## **B. Classification**

La transglutaminase de tissu (TGt) appartient à une famille multigénique qui comprend à la fois des membres extra- et intra-cellulaires. On dénombre à ce jour six transglutaminases humaines dont les appellations diffèrent selon les auteurs (Tableau I). Ces enzymes diffèrent dans leur territoire d'expression, leur activation, leur régulation, leurs substrats et leurs fonctions biologiques (Tableau II) ainsi que dans les pathologies où elles sont impliquées (Tableau III). Il existe des pathologies liées à une anomalie héréditaire touchant les gènes des transglutaminases (FXIIIa : coagulopathie ; TGk : ichtyose lamellaire) et d'autres le plus souvent acquises dans les quelles l'expression de transglutaminases est modifiée.

Seule la transglutaminase de tissu est distribuée de manière ubiquitaire, en accord avec un rôle dans les fonctions de base de la cellule.

Des transglutaminases sont aussi détectées chez les Arthropodes. La transglutaminase d'hémocyte de *Limules* est apparentée au FXIIIa des Vertébrés et intervient dans la coagulation de l'hémolymphe (Tokunaga *et al*, 1993). L'Annuline de sauterelle apparentée à la TGk des Vertébrés est exprimée dans les zones de réarrangements morphologiques (Singer *et al*, 1992). Son rôle potentiel pendant le développement pourrait être la stabilisation ou la modification de la membrane et des structures subcorticales des cellules qui subissent un changement de forme morphogénétique et sont soumises à un stress mécanique.

<b>Enzyme</b>	<b>Autres appellations</b>
<b>FXIIIa</b>	Transglutaminase de plasma, Facteur stabilisant la fibrine, Facteur de Laki-Lorand, Fibrinoglycane.
<b>TGk</b>	Transglutaminase de kératinocytes, Transglutaminase particulière (TGB), Transglutaminase de type I (TG type I).
<b>TGt</b>	Transglutaminase de tissu, Transglutaminase cytosolique (TGc), Transglutaminase endothéliale, Transglutaminase d'érythrocyte, Transglutaminase de foie, Transglutaminase de type II (TG type II).
<b>TGe</b>	Transglutaminase épidermique, Transglutaminase de museau bovin, Transglutaminase de callosité, Transglutaminase de follicule du cheveu, Transglutaminase de type III (TG type III).
<b>TGp</b>	Transglutaminase de prostate, Protéine de prostate dorsale 1 (DP1), Protéine majeure sécrétoire de prostate régulée par les androgènes, Vésiculase, Transglutaminase de type IV (TG type IV).
<b>B 4.2</b>	Bande 4.2 d'érythrocytes, Protéine de membrane bande 4.2 d'érythrocyte.
<b>TGh</b>	Transglutaminase d'hémocyte, Transglutaminase de <i>Limulus</i> , Analogue invertébré du FXIII.
<b>Annuline</b>	Analogue invertébré de la transglutaminase de kératinocytes.

**Tableau I : Terminologie des transglutaminases.**

(D'après Greenberg *et al*, 1991; Aeschlimann et Paulsson, 1994; Wilhem *et al*, 1996)

	<b>Structure</b>	<b>Modifications posttraductionnelles</b>	<b>Localisation</b>	<b>Activation</b>	<b>Substrats principaux</b>	<b>Fonctions principales</b>
<b>FXIIIa</b>	hétérodimère 2 sous-unités a catalytiques 2 sous-unités b protectrices	non	intracellulaire extracellulaire soluble	protéolyse (par la thrombine)	fibrine, fibronectine, antiplasmine $\alpha_2$ , collagène, inhibiteur de type 2 de l'activateur du plasminogène	coagulation sanguine, régulation de la fibrinolyse, cicatrisation
<b>TGk</b>	monomère	phosphorylation ancrage lipidique (palmitate, myristate)	intracellulaire ancrée, soluble	libération par protéolyse (par la plasmine)	involucrine, loricrine	formation des enveloppes cornées de la peau
<b>TGt</b>	monomère	non	intracellulaire extracellulaire soluble	<b>active de novo</b>	protéines extracellulaires et intracellulaires	transduction du signal , stabilisation de la matrice extracellulaire, modulation d'activité biologique, différenciation cellulaire, apoptose
<b>TGe</b>	hétérodimère sous-unités issues d'un même précurseur	non déterminé	intracellulaire	protéolyse (par la calpaïne ?)	cystatine a, filaggrine, loricrine trichohyaline	différenciation des cellules épidermiques et des follicules du cheveu
<b>TGp</b>	homodimère	glycosylation ancrage lipidique	extracellulaire	non déterminé	protéines de vésicules séminal I et IV, spermine, spermidine	coagulation du fluide séminal ; formation du bouchon copulatoire (rat)
<b>B4.2</b>	monomère	phosphorylation ancrage lipidique (myristate)	intracellulaire ancrée	<b>inactive</b>	pas de substrat	<i>prévention de la réticulation de protéines du cytosquelette ?</i>

**Tableau II : Caractéristiques des transglutaminases humaines**

Pathologies	TG	Modulation	Substrat	Références
<b>Coagulopathies</b>	FXIIIa	absence		Board <i>et al</i> , 1992; Standen <i>et al</i> , 1993 ; Rashida <i>et al</i> , 1995
<b>Gastrointestinales</b> Maladie coeliaque Lymphome intestinal Maladie de la chaîne $\alpha$ Colites chroniques Maladie de Crohn	FXIIIa TGt	diminution		Standnicki <i>et al</i> , 1991; D'Argenio <i>et al</i> , 1992, 1995; Hudson <i>et al</i> , 1993
<b>SIDA</b>	TGt	augmentation	gp41 gp120	Mariniello <i>et al</i> , 1993; Bergamini <i>et al</i> , 1994; Amendola <i>et al</i> , 1996
<b>Ophtalmiques</b> Vieillessement du cristallin Cataracte	TGt	augmentation	cristallines	Groenen <i>et al</i> , 1994; Hidasi <i>et al</i> , 1995
<b>tétanos</b>	TGt	augmentation	synapsine I	Facchiano <i>et al</i> , 1993; Coffield <i>et al</i> , 1994; Ashton <i>et al</i> , 1995
<b>Dermatologiques</b> psoriasis Lichen plan  ichtyose lamellaire	TGk	augmentation  diminution ou absence	  loricrine, involucrine	Esmann <i>et al</i> , 1989; Schroeder <i>et al</i> , 1992 Bianchi <i>et al</i> , 1994  Hohl <i>et al</i> , 1993; Lavrijsen <i>et al</i> , 1995
<b>Neurodégénératives</b> Alzheimer   HD, SCA1, SCA3, SBMA, DRPLA	TGt	augmentation  expansion de triplet CAG (codant pour la Gln)	protéine $\tau$  protéine amyloïde $\beta$  IT15, ataxine 1, MDJ 1, RA, atrophine 1	Goebert <i>et al</i> , 1993; Dudek <i>et al</i> , 1993; Miller <i>et al</i> , 1995 Ikura <i>et al</i> , 1993; Rasmussen <i>et al</i> , 1994  Cariello <i>et al</i> , 1996; Kahlem <i>et al</i> , 1996
<b>Arthrite rhumatoïde</b>	TGt	augmentation	PLA2	Cordella-Miele <i>et al</i> , 1990; Weinberg <i>et al</i> , 1991
<b>Cancéreuses</b> foie poumons épiderme lymphocytes prostate	TG	diminution		Barnes <i>et al</i> , 1985; Hand <i>et al</i> , 1989 Birckbichler <i>et al</i> , 1981; Hand <i>et al</i> , 1987 Dadabay <i>et al</i> , 1989 Metafora <i>et al</i> , 1988 Ronjin <i>et al</i> , 1989

gp: glycoprotéine virale; HD: maladie de Huntington; SCA1: ataxie spinocérébelleuse de type I; SCA3: maladie de Machado-Joseph ou ataxie spinocérébelleuse de type III; SBMA: atrophie musculaire spino-bulbaire; DRPLA: atrophie dendato-rubro-pallidoluysienne; IT15: Huntingtine; MDJ 1: produit du gène MDJ 1; RA: récepteur androgène; PLA2: phospholipase A2.

**Tableau III : Pathologies associées aux transglutaminases.**

Des transglutaminases ont aussi été identifiées chez : *Physarum polycephalum* (Klein *et al*, 1992), les nématodes filiaires *Brugia malayi* et *Dirofilaria immitis* (Singh et Mehta, 1994; Singh *et al*, 1995), les plantes *Medicago sativa* et la graine de soja (Margosiak *et al*, 1990; Kang et Cho, 1996), le champignon *Candida albicans* (Ruiz-Herrera *et al*, 1995), la bactérie *Streptovorticillium sp* souche S8112 (Ando *et al*, 1989; Kanaji *et al*, 1993). Cependant, l'activité de l'enzyme dans les trois dernières espèces ne dépend pas du calcium. Les transglutaminases font donc partie d'une famille de protéines conservée durant l'évolution.

## C. Structure primaire

Le clonage moléculaire des différentes transglutaminases humaines: FXIIIa (Grundmann *et al*, 1986; Ichinose *et al*, 1986; Takahashi *et al*, 1986), TGk (Phillips *et al*, 1990; Kim *et al*, 1991), TGt (Gentile *et al*, 1991), TGe (Kim *et al*, 1993), TGp (Grant *et al*, 1995) et B4.2 (Korsgren *et al*, 1990) a permis la comparaison de leur structure primaire (Figure 2). L'alignement des différentes transglutaminases révèle une homologie de structure primaire globale modérée (Tableau IV; Figure 2).

Par contre, lorsque l'on compare les TGt des différentes espèces étudiées, homme (Gentile *et al*, 1991), boeuf (Nakanishi *et al*, 1991), souris (Gentile *et al*, 1991), cochon d'Inde (Ikura *et al*, 1988), poulet (Weraarchakul-Boonmark *et al*, 1992) et brème de mer *Pragus major* (poisson) (Yasueda *et al*, 1995) (Figure 3), on constate que l'homologie de séquence est supérieure à 80% chez les Mammifères. Les TGt d'Oiseaux et de Poissons présentent une homologie plus faible avec celles des Mammifères d'environ 60 et 40% respectivement (Tableau V). L'alignement de séquences inter-espèces de toutes les TGt a permis de mettre en évidence des domaines conservés spécifiques de ces TGt.

Récemment, deux homologues de la TGt humaine: TGH et TGH2 de respectivement 1,9 et 2,4 kb ont été isolées à partir de cellules d'érythroleucémie humaine HEL traitées par l'acide rétinoïque (Fraij *et al*, 1992, 1996). Les séquences de ces homologues diffèrent dans leur partie C-terminale par rapport à la TGt et proviennent de l'utilisation alternative d'exons contenant un codon stop (Figure 4).

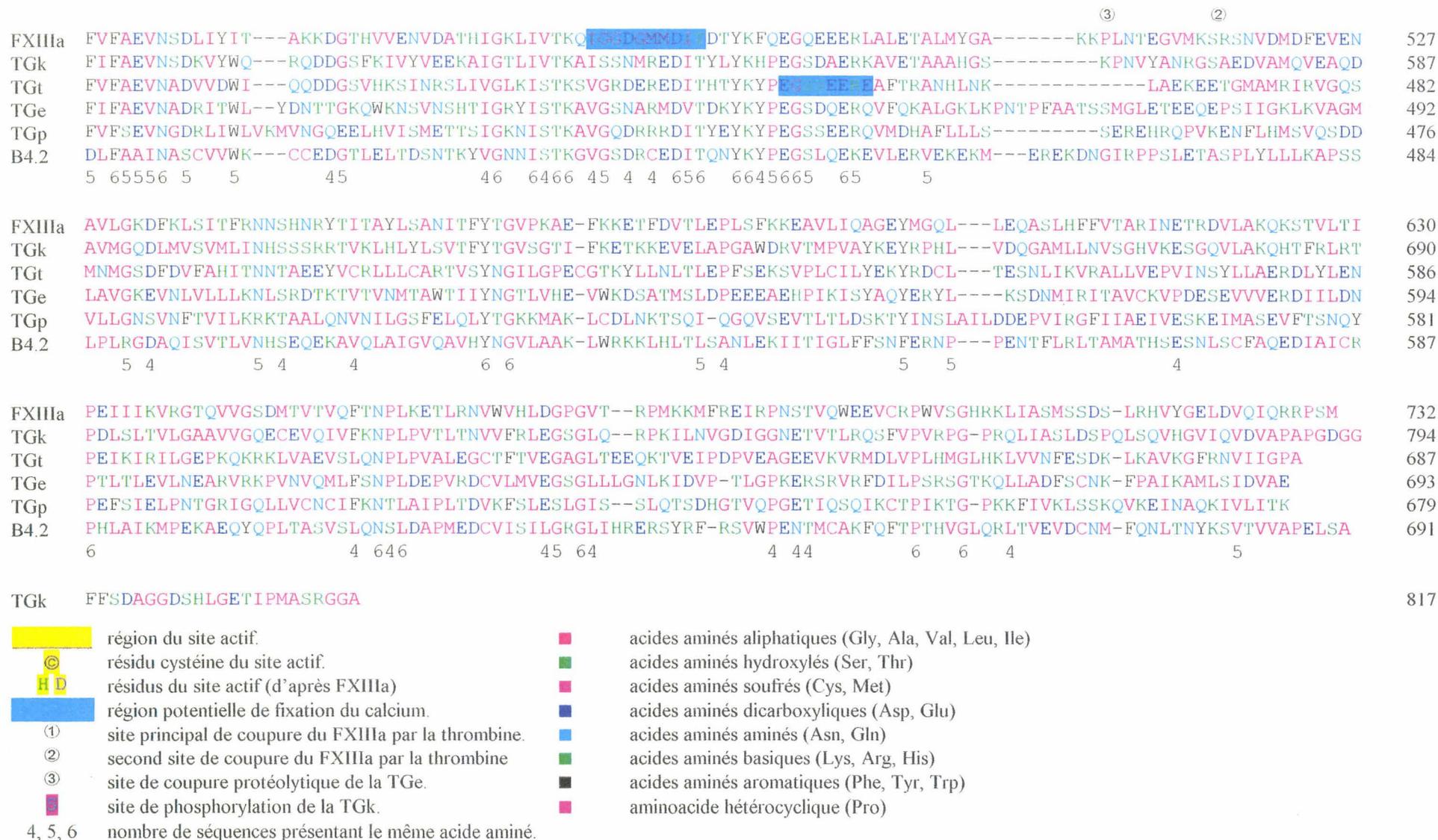
## D. Les domaines fonctionnels des TGt

### I. Les domaines partagés par la famille

#### a) Le site actif contenant la Cystéine essentielle

Une Cys est impliquée dans le mécanisme catalytique des transglutaminases. La séquence entourant cette Cys est fortement conservée dans la famille des TGt.

FXIIIa	-----MSETSRTAFGGKRAVPPNNSNAA	23
TGk	-----MMDGPRSDVGRWGGNPLQPP'T'PPEPEPEPDGRSRRGGGRSFWARCCGCCSCRNAADDDWGPEPDSRSGSSS---GTRRPG	81
	①	
FXIIIa	EDDLP'TVELQGVVPR--GVNLQE-----FLNV'TSVHLEFKERWD'TNKVDHHT'DKYENNKLIVRRGQS FYVQIDFS---RPYDPRRDLEFRVEYVIGRYPQENKGT'YI	118
TGk	RGSDS---RRPV'RGSGVNAAGDGTIREGMLVVNGVDLLSSRSQNRREHHT'DEYEYDELIVRRGQPFHMLLLLS---RTYESS-DRITLELLIGNNPEVGKGT'HV	181
TGt	-----MAEELVLERCDL---ELE'TNGRDHHT'ADLCREKLVVRRGQPFWLT'LHFEG---RNYQASVDSL'TFSVV'TGPAPSQEAGT'KA	75
TGe	-----MAALGVQSIW---QKAFNRQAHHT'DKFSSQELILRRGQNF-QVLMIMN---KGLGSN-ERLEFIDT'TGYPSESAMT'KA	72
TGp	-----MMDASKELQVLHIDFLNQDNASHHT'WEFQTSSPVFRRGQVFHLRLVLN---QPLQSY-HQLKLEFST'GPNPSIAKHT'LV	76
B4.2	-----MGQALGIKSCDF---QAARNNEEHH'TKALSSRRL'FVRRGQPF'TIILYFRAPVRAF'LPAKKVALTAQT'GEQPSKINRTQA	77
	5 6 666 5 46666 6 5 4 46 64 6	
FXIIIa	PVP-IVSELQSGKWKGAIVMREDRSV-RLSIQSSPKCIVGKFRMYAVWTPYGVLR'ISRNPET'D'TYILFNPWCEDDAVYLDNEKEREEYVLNDIGVIFYGEVNDIK	222
TGk	IIP-VGKG-GSGGWKAQVVKASGQNL-NLRVHT'SPNAIGKQF'TVRT'QSDAGEFQLPFDPRNEIYILFNPWCPGDIVYVDHEDWRQEYVLNESGRIYYGTEAQIG	284
TGt	RFP-LRDAVEEGDWT'ATVVDQDCTL-SLQLT'PANAPIGLYRLSLEA---S'TGYQSSFVLGHFILL'ENAWCPADAVYLDSEERQEYVLT'QOGFIYQGSAKFIK	176
TGe	VFP-LSNGSSGG-WSAVLQASNGN'TL-TISISSPASAPIGRYTMALQI---FSQGGISSVKLG'TFILL'FNPWLNVDSVFMGNHAEREEYVQEDAGIIFVGTNRIG	172
TGp	VLDPRTPS-DHYNWQATLQNESGKEV-TVAV'TSSPNAILGKYQLNVKT'-----GNHILKSEENILYLL'FNPWCKEDMV'EMPDEDERKEYILNDT'GCHYVGAARSIK	175
B4.2	TFP-ISS-LGDRKWSAVVEERDAQSWTISV'TPADAVIGHYSLLLQV'-----SGRKQLLLGQF'TLL'FNPWNREDAVFLKNEAQRMEYLLNQGLIYLG'TADCIQ	175
	5 4 6 5 4 5 46 4 4666564 6 6 5 46 66454 6 54 6 6	
	©	
FXIIIa	TRSWSYGQFEDGILD'TCLYVMD-----RAQMDLSGRGNPIKVS RVGSAMVNAKDDEGVLVGSWDNIYAYGVPPSAW'TGSVDILLEYSSE-NPVRYGQCWVFAGV'F	323
TGk	ERTWNSYGVQDGHGVLDAclyILD-----RRGMPYGGRGDPVNVSRVISAMVNSLDDNGVLIGNWSGDYSRG'TNPSAWVGSVEILLSYLRTG-YSVPYGQCWVFAGV'T	385
TGt	NI PWNFQGFQDGI LDI CLILLDVNPKFLKNAGRDCSRRSSPVYVGRVSGMVN'CNDDQGVLLGRWDNNGYDGVSPMSWIGSV'DILKRWNHGCQRVKY'GQCWVFAAVA	285
TGe	MIGWNFGQFEEDI LSI CLS ILDRSLNFRRDAA'TDVASRNDPKYVGRVLSAMINSNDDNGVLIGNWSG'TY'TGGRDPRSWDGSVEILKNWKKSGFSPVRY'GQCWVFAGT'L	281
TGp	CKPWNFGQFEKNVLDCCISLLT'-----ESSLKP'TDRRD'PVLVCRAMCAMSFEKQG'VLIGNWTGDYEGG'TAPYKWTGSAPILQQYYN'TK-QAVCF'GQCWVFAGIL	276
B4.2	AESWDFGQFEGDVIDLSLRLLS-----KDKQVEKWSQPVHVARVLGALLHFLKEQRVLP'TPQTQA'TQEGALLNKRRGSPVILRQWLT'GRGRPVYD'GQAWVLAAVA	276
	6446654 65 55 54 5 64 6 65 455 4 44 566 5 5 5 6 5 5 666 66 6 4665665654	
FXIIIa	NTFLRCLGI PARIV'TNYFSAHDNDANLQMDI FLEEDGNVNSKLT'KDSVWNYHCWNEAWMTRPDL'PVGFGGWQAV'DSTPQENS DGMRYCGPASVQAIK'KHGHVC'FQFDAP	430
TGk	T'TGLRCLGLATRT'V'TNFNSAHD'TD'TSL'TMDIYFDENMKPLEHLNHDSVWNEFHVW'ND'CW'MKR'PDL'PSGFDGWQV'V'AT'PQETSSGI FCCGPCS'VE'IK'NGLVYMKYDTP	492
TGt	CTVLRCLGIPT'RVV'TNYNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGEIQG-DKSEMIWNEFHCWVESW'MTRPDLQ'PGYEGWQAL'DPT'PQEKSEGT'YCCGPVPVRAI'KEGLD'STKYDAP	391
TGe	NTALRS'LGI'PSRVI'TNFNSAHD'TDRNLSVDVYYDPMGNPLD-KGSDSVWNEFHVW'NEGWFVRS'DL'GPPYGGWQV'L'DAT'PQEKRSQGV'FCCGPASVIGVREGDVQLN'FDMP	387
TGp	T'TVLRALGI'PARSV'TGFDSAHD'TERNLT'VD'TYV'NENGEKI'TSM'THDSVWNEFHVW'TDAW'MKRP-----YDGWQAV'DAT'PQEKRSQGV'FCCGPSPLT'AIKGD'I'FIVYDTR	378
B4.2	CTVLRCLGI'PARVV'T'FASAQGT'GGRLLI'DEYYNEEGLQNGEQ'RGRIWIFQ'TS'TECW'MTRPAL'PQGYDGWQ'ILL'PSAPNGGGV'LGS'CDL'V'PVRAV'KEGT'VGLT'PAVS	383
	6 6646655 6 564 66554 46 5 4 5 5 4446555 5 4 65 6545 44 666 6 5555 5 5 655 5 6 4 5 4	



**Figure 2 : Aligement des séquences des transglutaminases humaines.**

	FXIIIa	TGk	TGt	TGe	TGp	B 4.2	TGh
FXIIIa							
TGk	41,1						
TGt	37,2	36,3					
TGe	33,5	35,9	37,5				
TGp	31,3	35,4	27,1	33,7			
B 4.2	25,1	26,9	33,1	30,9	22,4		
TGh	34,1	33,9	34,3	32,8	32,8	24,6	
Annuline	34,1	34,4	35,8	31,6	32,3	26,7	33,7

**Tableau IV: Homologie stricte (exprimée en %) entre les structures primaires des transglutaminases humaines (FXIIIa, TGk, TGt, TGe, TGp) et des analogues d'invertébrés (TGh, annuline).**

Alignements réalisés avec le programme SIM d'Expasy (<http://expasy.hcuge.ch>) sur les séquences humaines FXIIIa (numéro d'accès à SWISS PROT:P00488), TGk (P22735), TGt (P21980), TGe (Q08188), TGp (P49221), de sauterelle TGh (Q05187) et de *Limulus annuline* (P52183)

TGt	humaine	bovine	souris	cochon d'Inde	poulet
humaine					
bovine	87,8				
souris	83,8	81,7			
cochon d'Inde	82,8	82,5	81		
poulet	63,4	63,1	62	62	
poisson	42,2	41,4	41	42	41,3

**Tableau V: Homologie stricte (exprimée en %) entre les structures primaires des transglutaminases de tissu chez l'homme, le boeuf, la souris, le cochon d'Inde, le poulet et le poisson.**

Alignements réalisés avec le programme SIM d'Expasy (<http://expasy.hcuge.ch>) sur les séquences de l'homme (numéro d'accès à SWISS PROT: P21980), du boeuf (P51176), de la souris (P21981), du cochon d'Inde (P08587), du poulet (Q01841) et du poisson (P52181).

1-Homme	-----MAGEE-----	LVLRERQD	ELETNGRDHH	TADLCREKLVVRRGQPF	FWLTLHFEGRNYQASVDS	LTFSVVTGPAPSQEAGTKARFPLRDAVEE	85
2-Bœuf	-----MAGEE-----	LVLRERQD	ELEANGRDHH	TADLCRERLVVRRGQPF	FWLTLHFEGRNYEASVDS	LTFCAVTGPDPSEEAGTKALFRLSDATEE	85
3-Souris	-----MAGEE-----	LVLRERQD	EIQANGRDHH	TADLCQEKLLVRRGQRF	FRLTLYFEGRGYQASVDS	LTFGAVTGPDPSEEAGTKARFSLSDNVEE	85
4-Cochon d'Inde	-----MAGEE-----	LVLRERQD	QLEVNGRDHRT	ADLCRERLVLRRGQPF	FWLTLHFEGRGYEA	VDTLTFAVNTGPDPSEEAGTMAREFSLSSAVEG	85
5-Poulet	MSGPGPDGTMAGEE	LVLRERQD	QCERNGREHRT	TEEMGSQQLVVRGQPF	FTITLNFAGRGYE	EGVDKLAFDVETGPCPVEITSGTRSHFTLTDCEP	94
6-Poisson	-----MASYKG-----	LVVGRSHEN	NLA-HRTREIDRER	LIVRRGQPF	FSITLQCSDSLPPKHHLELV	-----LHLGKRDEVVIEHKVQK	74

5654 6 554555 5 65546 6444445 645666656 466 5455 5 4 55 645 4555 5444465 4 5 5 4 454

1-	GDWTAIVVDQQD	---CTLSLQLTTPANAPIGLYRLSLEA	-ST-GYQSSFVLGHFILLFNAWCPADAVYLDSEERQEYVLTQQGF	FIYQGS	AKFIKNI	PWNFGQF	185
2-	GAWAAVAADQRD	---STLSLHLSTPANAPVGHYRLSLEA	-ST-GYQSSFMLGQFTLLFNSWCPADAVYLDSEERQEYVLTQQGF	FIYQGS	AKFIKNI	PWNFGQF	185
3-	GSWSASVLDQQD	---NVLSLQLCTPANAPIGLYRLSLEA	-ST-GYQSSFVLGHFILLYNAWCPADAVYLDSEERREYVLTQQGF	FIYQGS	VKFIKSV	PWNFGQF	185
4-	GTWSASAVDQQD	---STVSLLLSTPADAPIGLYRLSLEA	-ST-GYQSSFVLGHFILLYNPRCPADAVYMDSDERREYVLTQQGF	FIYQGS	AKFINGI	PWNFGQF	185
5-	GTWS-AVLQQDGA	--TLCVSLCSPSIARVGRYRLTLEA	-ST-GYQSSFHLGDFVLLFNAWHPEDAVYLKEEDERREYVLSQQGLI	YMGSRDYIT	S'PWNFGQF		194
6-	GARDKWWFNQQ	-GAQDEILLTLHSPANAVIGHYRLAVLVMSPDGHIVERADKISFHMLFNPWCRDDMVYLPDESKLQ	EYVMNEDGVI	YMGTDWY	IRSI	PWNYGQF	178

6 5 4 4655 4445 6 46546446 6664555 655655555 55 6 5646 555464665444 55466654556466465 446 46665666

©

1-	QDGI	LIDICLILLDVNPKFLKNAGRDCSRRSSPVYVGRVSGMVCNDDQ	-GVL	LGRWDN	NYGDGVS	PMSWIGSVDILRRWKNHG	CQRVKY	GQCWVFAAVACTVLR	289
2-	EEGI	LIDICLMLLDVNPFLRNAGRDCSRRSSPVYVGRVSGMVCNDDQ	-GVL	LGRWDN	YADGIS	PMSWIGSVDILRRWKRDGC	CQRVKY	GQCWVFAAVACTVLR	289
3-	QDGI	LDTCLMLLDMPKFLKNRSRDCSRRSSPIYVGRVSDMVCNDDQ	-GVL	LGRWDN	YGDGIS	PMAWIGSVDILRRWKEHG	CQQVKY	GQCWVFAAVACTVLR	289
4-	EDGI	LIDICLMLLDTPNPKFLKNAGQDCSRRSRPVYVGRVVSAMVCNDDQ	-GVL	QGRWDN	YSDGVS	PMSWIGSVDILRRWKDYGC	CQRVKY	GQCWVFAAVACTVLR	289
5-	EDEI	LAICLEMLDINPKFLRDQNLDCSRRNDPVYIGRVVSAMVCNDEDHG	VLLGRWDN	HYEDGMS	PMAWIGSVDILKRWRRLGC	QPVKY	GQCWVFAAVACTVLR	299	
6-	EDY	VMDFEVLDNSPAALKNSEMDIEHRSDPVYVGRITAMVNSNG	-DRG	VLTGRWEE	PYTDG	VAPYRWTGSVPILQQWSKAGVRPVKY	GQCWVFAAVACTVLR	282	

454555565 466 5655645 655565 656566545 66656544 6664666546 66 565 656665665564 655 666666666666666656

1-	CLG	IPTRVVTNYNSAHDQNSNLLIEYFRNEFG	EIQSD--KSEMIWNFHCWVESWMT	TRPDLQPGYEGWQALDPTPQEKSEGT	YCCGPVPVRAIKEGDLSTKYDAPFV	393
2-	CLG	IPTRVVTNYNSAHDQNSNLLIEYFRNEFG	EIQSD--KSEMIWNFHCWVESWMT	TRPDLQPGYEGWQALDPTPQEKSEGT	YCCGPVPVRAIKEGDLSTKYDAPFV	393
3-	CLG	IPTRVVTNYNSAHDQNSNLLIEYFRNEFG	ELETN--KSEMIWNFHCWVESWMT	TRPDLQPGYEGWQALDPTPQEKSEGT	YCCGPVSVRAIKEGDLSTKYDAPFV	393
4-	CLG	IPTRVVTNFNSAHDQNSNLLIEYFRNESGE	IEGN--KSEMIWNFHCWVESWMT	RPDLQPGYEGWQALDPTPQEKSEGT	YCCGPVPVRAIKEGHLNVKYDAPFV	393
5-	CLG	VPSRVVTNYNSAHDNTGNLVIDRYLSETGME	ERR--STDMIWNFHCWVECWMT	RPDLQPGYEGWQALDPTPQEKSEGT	YCCGPVPVRAIKEGDLQVQYDIPFV	403
6-	CLG	IPTRPITNFASAHDVDGNLSVDFLLNERLES	LDSRQRSDSSWNFHCWVESWMSREDL	PEGNDGWQVLDPTPQELSDGEFC	CCGPCPVAAIKEGNLGVKYDAPFV	388

666565655664566664546645444456 55 454556666666656656566 565466656666666565645666645646666646 5665666

1- FAEVNADVVDWIRQDDG:SVHKSINRSLIVGLKISTKSVGRDEKEDI T-HTYKYPTPTSEEAFTRANHLNK--LAEK----EETGMAMRIRVQSMNMGSDFD 490  
 2- FAEVNADVVDWIRQDDG:SLHKSINRSLVVGGLKISTKCVGRDDKEDI T-HSYKYPTPTPEEAFTRANHLNK--LVNK----EETGVAMRIRVGEGMNRGCDFD 490  
 3- FAEVNADVVDWIRQDEG:SVLKWNNRSLIVGQKISTKSVGRDDKEDI T-HTYKYPTPTPEEAFTRANHLNK--LAEK----EETGVAMRIRVGYE-HGNDFD 489  
 4- FAEVNADVVDWIRQKDG:SLRKSINH-LVVGGLKISTKSVGRDEKEDI T-HTYKYPTPTSEEAFVTRANHLNK--LATKEEAQEETGVAMRIRVQNMSTMGSDFD 493  
 5- FAEVNADVVDWIRQKDG:SLRKSINH-LVVGGLKISTKSVGRDSDKEDI T-HTYKYPTPTSEEAFVTRANHLNK--LATKEEAQEETGVAMRIRVQNMSTMGSDFD 499  
 6- FAEVNADTIYWIVQKDGQRRKITEDEH:SVGKNISTKSVYGNHREDVTLH-YKYPTPTSEEAFVTRANHLNK--LATKEEAQEETGVAMRIRVQNMSTMGSDFD 483  
 666666655 66 6 564 64 4 44 66 4666665655 66656 646666666 4666 5 645445 5 44 5646 4555544 6 666

1- VFAHITNNTAEEYVCRLLLCA RTVSYNGILGPECGTKYLLNLTLEPFSEKSVPLCILEKYRDCLTESNLIKVRALLVEPVINSYLLAERDLYLENPEIKIRILG 595  
 2- VFAHITNSTPEEHTRGRLLLCA RTVSYNGILGPECGTKDLLSLSEPYSEKSIPLRILYKCYDCLTESNLIKVRGLLIEPAANSYLLAERDIYLENPEIKIRILG 595  
 3- VFAHIGNDTSETRRECRLLLCA RTVSYNGVLPPECGTED-INLTLDPYSENSIPLRILYKCYDCLTESNLIKVRGLLIEPAANSYLLAERDLYVENPEIKIRVLG 593  
 4- IFAYITNGTAESHCEQLLLCA RTVSYNGVLPVCSFNDDLNLTDLPFSENSIPLRILYKCYDCLTESNLIKVRGLLIEPAANSYVLAERDIYLENPEIKIRVLG 598  
 5- VFAFISNDTDRERECLRRLCAR TASYNGEVGPQCGFKDLLNLSLQPHMEQSVPLRILYEQYGNLTQDNMIKVVALLTEYETGDSVVAIRDVYIQNPEIKIRILG 604  
 6- VIVEVKNEGGGRDAHAQLTMLAMAVTYSNLRREGECQRKTISVTVPAHKAHKEVM-RLHYDDYVRCVSEHHILIRVKALLDAPGENGPIMTVANIPLSTPELLVQVPG 587  
 555 5 6 5 4 44645565455665 4554644444444 5 5 45 5 554556546 445554556564 66 55 544 45455 5445665555 56

1- EPKQRRKLVAEVS LQNPLPVALEGCTFTVEGAGLT EEQKIVEIPDPVEAGEEVKVRMDLVPLHMGLHKL VVNFE SDKLKAVKGFERNV IIGPA 687  
 2- EPKQNRKLVAEIS LQNPLTVALSGCTFTVEGAGLIEEQKIVDVPDPVEAGEEVKVRVDLLPLYVGRHKL VVNFE SDRLKAVKGFERNV IIGPS 687  
 3- EPKQNRKLVAEVS LKNPLSDPLYDCIFFTVEGAGLTKEQKSV EVDVVPAGDLVKARVDLSP T DIGLHKL VVNFE CDKLSVKGYRNV IIGPA 685  
 4- EPKQNRKLVAEVS LKNPLPVPLLGCIFFFTVEGAGLT KDQKSV EVDVVPAGEQAKVRVDLLPTEVGLHKL VVNFE CDKLVKAVKGFERNV IIGPA 689  
 5- EPMQERKLVAEIRLVNPLAEPLNNCIFVVEGAGLT EGQRIEELEDVPEPQAEAKFRMEFVPRQAGLHKL MVD FE SDKLTGVKGYRNV I IAPLPK 697  
 6- KAVVWEPLTAYVSFTNPLPVPLKGGVFTEGAGLLSATQIH-VNGAVAPSGKVSVKLSFSPMR TGVRKLLVDFDS DR LKDVKGVT TVVVHKKYRSLITGLHTD 695  
 5545 556565455 666 446 45 655655554 54 444 556444 4545 44 6 6 5664646446465 666 5565445

	région du site actif.		acides aminés aliphatiques (Gly, Ala, Val, Leu, Ile)
	résidu cystéine du site actif.		acides aminés hydroxylés (Ser, Thr)
	résidus du site actif (d'après FXIIIa)		acides aminés soufrés (Cys, Met)
	région potentielle de fixation du calcium.		acides aminés dicarboxyliques (Asp, Glu)
	région potentielle de fixation de la fibronectine		acides aminés aminés (Asn, Gln)
	site Nα acétylation		acides aminés basiques (Lys, Arg, His)
			acides aminés aromatiques (Phe, Tyr, Trp)
			aminoacide hétérocyclique (Pro)

4, 5, 6 nombre de séquences présentant le même acide aminé.

Figure 3 : Alignement des séquences des transglutaminases de tissu.

A

	ARNm	Acides aminés	masse calculée	masse moléculaire mesurée	références
TGt	4 kb	687	77,3 kDa	82 kDa	Gentile <i>et al</i> , 1991
TGH	1,9 kb	548	61,7 kDa	63 kDa	Fraji <i>et al</i> , 1992
TGH2	2,4 kb	349	38,7 kDa	37 kDa	Fraji <i>et al</i> , 1996

B



C

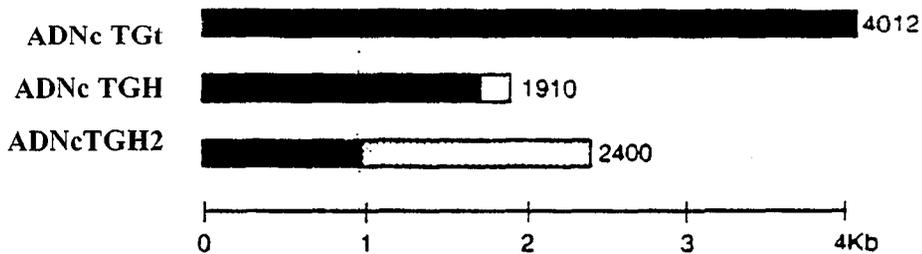


Figure 4 : Les transglutaminases de tissu homologues

A Caractéristiques moléculaires.

B Organisation génomique du gène de la transglutaminase de tissu.

C ADNc.

(D'après Fraij *et al*, 1992, 1996)

Cette séquence consensus des transglutaminases est la suivante (PROSITE numéro d'accès: PODC00473):

[GT]-Q-[CA]-W-V-xx-[GSA]-[IVT]-x-x-T-x-[LMSC]-R-[CSA]-[LV]-G

Sur ces 18 résidus, 10 sont strictement identiques lorsque l'on compare les 6 transglutaminases humaines (55% d'homologie stricte). L'homologie atteint les 100% entre les TGt d'espèces différentes.

Des expériences de mutations ponctuelles, Cys314Ala dans le FXIIIa humain (Hettasch et Greenberg, 1994), Cys277Ser dans la TGt humaine ou son traitement à l'iodoacétamide, réactif dirigé contre les résidus Cys (Lee *et al*, 1993), provoquent une perte de l'activité transglutaminase. La Cys du site actif est donc essentielle à l'activité catalytique.

La protéine B4.2 d'érythrocyte possède une Ala en lieu et place de la Cys du site actif. Elle ne possède pas d'activité catalytique de liaison. Rinsinger et Cohen (1992) ont, par mutagenèse dirigée, substitué cette Ala par une Cys dans le site actif de la B4.2 mais ce mutant ne possède toujours pas d'activité transglutaminase, ce qui suggère l'implication d'autres résidus différents de cette Cys dans le mécanisme réactionnel.

Hettasch et Greenberg (1994) par mutagenèse dirigée des résidus 310 à 317 (Arg-Tyr-Gly-Gln-Cys-Trp-Val-Phe) entourant la Cys314 du FXIIIa, ont montré que les chaînes latérales des acides aminés entourant le résidu Cys sont nécessaires à une expression optimale de l'activité enzymatique.

La structure tridimensionnelle aux rayons X du FXIIIa (Yee *et al*, 1994) suggère que les résidus Asp396 et His373 peuvent être importants dans la réaction catalytique (Figure 5). Leur rôle dans l'activité de liaison transglutaminase a été démontré par des expériences de mutation dirigée. Ces résidus pourraient stabiliser l'intermédiaire thioester formé pendant la catalyse. L'examen des séquences des transglutaminases révèle que ces résidus se trouvent dans des régions conservées des enzymes. Dans la B4.2, le remplacement de l'His pourrait expliquer le manque d'activité du mutant (Ala298Cys) de Rinsinger et Cohen (1992). Ces résidus ou ces régions conservés sont probablement des déterminants critiques pour l'activité catalytique des transglutaminases.

#### **b) Le site potentiel de fixation du calcium**

Les transglutaminases, bien que dépendant du Ca<sup>2+</sup> pour leur activité, ne présentent pas dans leur séquence de motif de liaison typique du Ca<sup>2+</sup>, tel que les structures "EF Hand" retrouvées dans des protéines comme la calmoduline (PROSITE numéro d'accès : PDOC00018).

Les sites de fixation du Ca<sup>2+</sup> des transglutaminases sont de faible affinité. Les régions riches en résidus chargés négativement représenteraient les sites de liaison potentiels du Ca<sup>2+</sup> dans les transglutaminases (Nakanishi *et al*, 1991; Ikura *et al*, 1988, 1995). Il existe une région riche en résidus Glu (E) (EGSxxERE) conservée dans les séquences des transglutaminases.

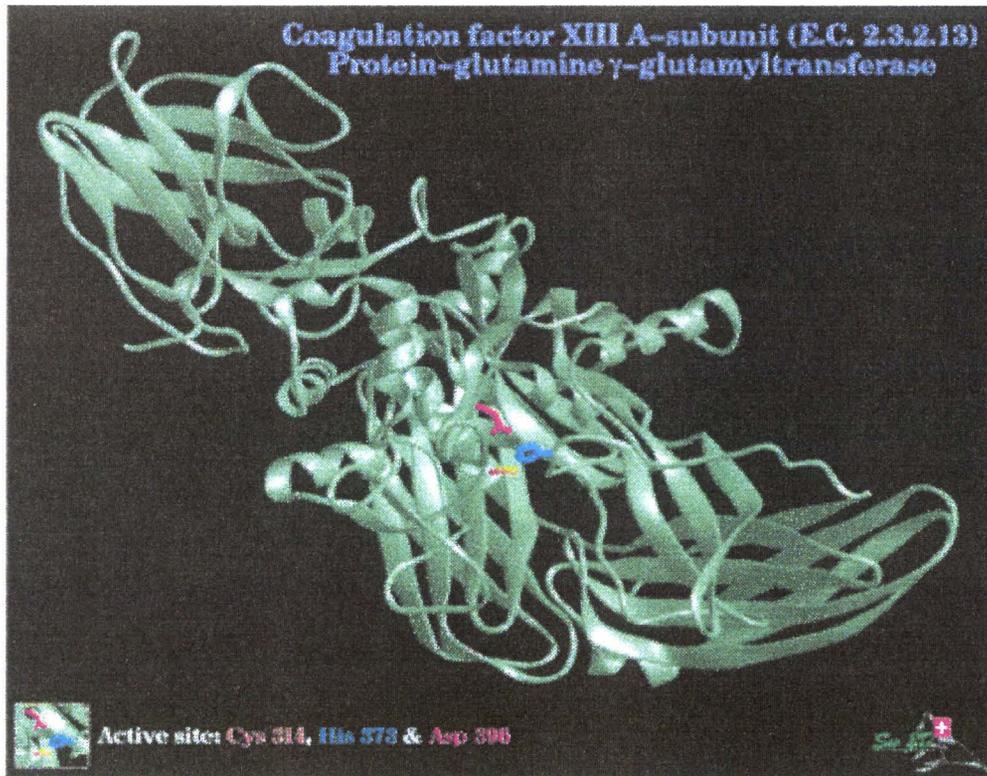


Figure 5: Structure tridimensionnelle aux rayons X du FXIIIa.

(d'après Yee *et al*, 1994 et SWISS PROT)

Un second site de fixation potentiel du  $\text{Ca}^{2+}$  a été localisé dans la TGt du cochon d'Inde (résidus 468-473). Il correspond à une insertion de 4 acides aminés (EEAQ) non retrouvés dans les autres espèces. Ikura (1988) suggère que ce second site pourrait contribuer aux propriétés de fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  de la TGt du cochon d'Inde. Les enzymes humaine et murine ont des cinétiques d'activation par le  $\text{Ca}^{2+}$  similaires à celle de l'enzyme du cochon d'Inde, mais ne contiennent pas ce second site de fixation du  $\text{Ca}^{2+}$ . Il est donc peu probable que ce second site contribue aux propriétés fonctionnelles de l'enzyme.

## **II. Les domaines fonctionnels spécifiques des TGt**

### **a) Le site de fixation du GTP**

La TGt est une protéine qui fixe le GTP (Achyuthan et Greenberg, 1987; Lee *et al*, 1989; Fesus *et al*, 1989), ce qui a permis sa purification par chromatographie d'affinité GTP. Elle possède une activité GTPase (Lee *et al*, 1989, 1993; Nakoaka *et al*, 1994). L'activité transglutaminase est quant à elle inhibée par la fixation du GTP (Bergamini *et al*, 1987; Fesus *et al*, 1989; Lee *et al*, 1989; Greenberg *et al*, 1991; Nakaoka *et al*, 1994).

Cependant la comparaison des séquences des TGt avec celles des protéines fixant le GTP (Gentile *et al*, 1991; Takeuchi *et al*, 1992), ne montre pas de séquence consensus de fixation du GTP (Tanabe *et al*, 1985)(PROSITE numéro d'accès : PODC00017).

La Cys essentielle à l'activité transglutaminase n'influence pas l'activité GTPase comme le montrent un traitement à l'iodoacétamide, réactif dirigé contre les résidus Cys, ou la mutagenèse dirigée Cys277Ser de la TGt humaine (Lee *et al*, 1993).

La TGt lie le GTP avec une stoechiométrie de 1:1, ce qui laisse supposer qu'elle ne possède qu'un seul site de fixation du GTP (Achyuthan et Greenberg, 1987 ; Bergamini et Signorini, 1993).

Trois peptides correspondant à des séquences riches en Gly de la TGt du cochon d'Inde ont été synthétisés (520-544, 345-367 et 45-69). Tous ces peptides ont la capacité de lier le GTP, le peptide 1 étant le meilleur pour protéger l'activité transglutaminase d'une inhibition par le GTP (Takeuchi *et al*, 1992). Des expériences de délétions montrent que le site de fixation du GTP se situerait dans la région C-terminale (Hwang *et al*, 1995).

### **b) Les sites dans la région N-terminale**

#### **1) N $\alpha$ acétylation**

La séquence N-terminale de l'enzyme est bloquée par suppression de la Met initiatrice et acétylation subséquente du pénultième résidu Ala (Ikura *et al*, 1989). Pour la TGt de poulet, où il y a

addition de 8 acides aminés en N-terminal par rapport aux autres TGt, cette acétylation aurait lieu sur la Gly (Weraachakul-Boonmark *et al*, 1992). Chez les Eucaryotes, la suppression de la Met initiatrice s'accompagne souvent de l'acétylation du résidu adjacent Ser, Ala ou Gly qui devient alors le résidu N-terminal de la protéine (Boissel *et al*, 1985). La séquence C-terminale ne subit quant à elle pas de modification (Ikura *et al*, 1989). Le groupe N $\alpha$ -acétyle n'influence pas l'activité catalytique de l'enzyme, puisqu'une TGt recombinante de cochon d'Inde et d'homme qui ne possède pas cette N $\alpha$ -acétylation se comporte comme la TGt naturelle (Ikura *et al*, 1990; Lee *et al*, 1993). Une fonction différente pourrait lui être attribuée. En effet, il a été suggéré que la N $\alpha$ -acétylation serait un signal de sécrétion alternative des protéines (Muesch *et al*, 1990). Il existe des preuves en faveur d'une externalisation de la TGt dans toute une variété de tissus (Aeschlimann et Paulsson, 1991; Barsigian *et al*, 1991; Aeschlimann *et al*, 1993; Kojima *et al*, 1993). Il est probable que cela se produise via un mécanisme sécrétoire alternatif.

## 2) Fixation de la fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine impliquée dans l'adhésion cellulaire, l'organisation tissulaire et la cicatrisation. La fixation de façon covalente de la fibronectine par la TGt est une réaction physiologiquement importante.

Cependant, la fibronectine peut servir de transporteur spécifique pour la TGt libérée accidentellement des érythrocytes ou d'autres cellules du plasma (Lorand *et al*, 1988), avec une stoechiométrie de 2 : 1 pour la fixation non covalente de la TGt à la fibronectine (Turner et Lorand, 1989; Le Mosy *et al*, 1992).

Cette fixation se produit en absence de Ca<sup>2+</sup>, ce qui suggère l'implication d'un domaine différent du domaine catalytique de la TGt (Turner et Lorand, 1989; Jeong *et al*, 1995).

La fibronectine possède des domaines de fixation de la TGt dans sa région N-terminale à proximité de domaines de fixation du collagène (Turner et Lorand, 1989; Le Mosy *et al*, 1992; Radek *et al*, 1993). Il a été montré dans la TGt du cochon d'Inde que les résidus N-terminaux 1 à 7 sont importants pour la fixation de la fibronectine (Jeong *et al*, 1995).

La séquence (Met-Ala-Glu-Glu-Leu-Val-Leu-Glu-Cys-Asp-Leu) positionnée dans la région N-terminale des TGt présente une remarquable homologie entre les TGt d'homme, de souris, du cochon d'Inde et de poulet (Weraachakul-Boonmark *et al*, 1992). Cette séquence a été proposée pour caractériser la classe des TGt se liant à la fibronectine avec une forte affinité (Lorand *et al*, 1988). Cependant, la séquence correspondante dans la TGt de poisson présente une homologie faible avec la séquence proposée, puisque seuls les résidus Met-Ala en N-terminal sont conservés (Yasueda *et al*, 1995).

## E. Organisation génique, localisation chromosomique et phylogénie

L'organisation génique des transglutaminases permet de distinguer deux groupes de gènes : un premier groupe contenant 15 exons (FXIIIa et TGk) et un second 13 exons (TGe et B4.2) (Tableau VI). Les exons en 5' du groupe 1 et en 3' des deux groupes sont non codants. Le core de l'enzyme débute à l'exon II ou I et se termine à l'exon XIV ou XII, respectivement pour les groupes 1 et 2. L'introduction de fonction(s) spécialisée(s) se fait par apposition en 5' du core de l'enzyme d'exons codant pour des fonctions telles que la susceptibilité à l'acylation, l'activation par la thrombine,.... D'autre part, chaque fonction est codée par un exon distinct, *e.g.* le site actif dans l'exon VII pour le groupe 1 ou VI pour le groupe 2. Les exons X et XI du groupe 1 sont fusionnés en un seul exon IX dans le groupe 2.

Malgré des données partielles concernant le gène de la TGt, on sait qu'il est très probablement organisé en 13 exons. La totalité de la séquence 5' non traduite, le site d'initiation de la traduction et les quatre premiers codons sont dans l'exon I (Lu *et al.*, 1995). La structure minimaliste du gène de la TGt suggère que c'est l'enzyme la plus simple de la famille. Ceci est en accord avec la distribution ubiquitaire de la TGt dans l'organisme.

Le génome humain ne contient qu'une seule copie de chaque gène localisé sur des chromosomes différents, à l'exception des gènes de la TGt et de la TGe tous deux en 20q11 (Tableau VII). Les gènes se seraient dispersés dans le génome humain après duplication d'un gène ancestral (Figure 6). L'arbre phylogénique réalisé d'après les données portant sur la structure primaires et l'organisation génique révèle deux lignées évolutives. Les gènes des Arthropodes (TGk et Annuline) se retrouvent dans la branche des gènes de Vertébrés (FXIIIa et TGk) auxquels ils sont apparentés (pour revue : Aeschlimann et Paulsson, 1994).

## F. Régulation de la TGt

L'expression de la TGt peut être modulée par les molécules signaux, les cations bivalents, les nucléotides ou la méthylation (Tableau VIII). La régulation par les rétinoïdes sera abordée plus loin.

Les molécules signaux comprennent des facteurs de croissance, des agents pharmacologiques, des hormones, des dérivés des vitamines,.... Les régions promotrices des TGt du cochon d'Inde (Suto *et al.*, 1993), de la souris (Nagy *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1996) et de l'homme (Lu *et al.*, 1995) sont identifiées (Figure 7). Ces régions contiennent, hormis les boîtes TATA et CAAT, les motifs suivants : Sp-1, IL-6-RE, AP1, AP2, NF1, GRE (Figure 7). Notons que la TGk est régulée de façon inverse à la TGt, c'est à dire négativement par les rétinoïdes et positivement par les esters de phorbol et que la TGp est induite par les androgènes (pour revue : Aeschlimann et Paulsson, 1994).

L'activation de la TGt requiert la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$ . La spécificité de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  semble forte car seul le  $\text{Sr}^{2+}$  peut aussi activer l'enzyme. Les autres cations bivalents sont soit inactifs, soit

Exons Introns	FXIIIa	TGk	Exons Introns	B 4.2	TGt	TGe	Particularités
<b>I</b>	63 pb	89 pb					région non codante
<i>I</i>		733 pb					
<b>II</b>	148 pb	321 pb	<b>I</b>	variable	82 pb		FXIIIa: peptide d'activation par la thrombine TGk: peptide responsable de l'ancrage membranaire B4.2: épissage alternatif (B4.2L et B4.2) site d'initiation de la transcription
<i>II</i>		150 pb	<i>I</i>	6490 pb	6100 pb		
<b>III</b>	189 pb	189 pb	<b>II</b>	186 pb	180 pb		début du corps principal des TGases
<i>III</i>		997 pb	<i>II</i>	900 pb	2600 pb		
<b>IV</b>	252 pb	249 pb	<b>III</b>	234 pb	242 pb		B4.2: épissage alternatif (forme courte)
<i>IV</i>		0,4 kb	<i>III</i>				
<b>V</b>	119 pb	119 pb	<b>IV</b>	119 pb			
<i>V</i>		0,2 kb	<i>IV</i>				
<b>VI</b>	108 pb	108 pb	<b>V</b>	105 pb			FXIIIa: site de fixation du Ca <sup>2+</sup>
<i>VI</i>		0,5 kb	<i>V</i>				
<b>VII</b>	175 pb	175 pb	<b>VI</b>	178 pb			cystéine site actif
<i>VII</i>		0,5 kb	<i>VI</i>				
<b>VIII</b>	139 pb	139 pb	<b>VII</b>	139 pb			
<i>VIII</i>		0,15 kb	<i>VII</i>				
<b>IX</b>	104 pb	104 pb	<b>VIII</b>	104 pb			
<i>IX</i>		2,5 kb	<i>VIII</i>				
<b>X</b>	89 pb	89 pb					
<i>X</i>		0,5 kb	<b>IX</b>	243 pb			
<b>XI</b>	154 pb	154 pb					site de fixation du Ca <sup>2+</sup>
<i>XI</i>		0,15 kb	<i>IX</i>				
<b>XII</b>	288 pb	282 pb	<b>X</b>	300 pb			FXIIIa: 2 <sup>nd</sup> site de coupure par la thrombine
<i>XII</i>		0,2 kb	<i>X</i>				
<b>XIII</b>	191 pb	161 pb	<b>XI</b>	161 pb			
<i>XIII</i>		0,4 kb	<i>XI</i>				
<b>XIV</b>	137 pb	137 pb	<b>XII</b>	134pb			fin du corps principal des TGases
<i>XIV</i>		4,2 kb	<i>XII</i>				
<b>XV</b>	1688 pb	403 pb	<b>XIII</b>				région non codante

<b>Taille</b>	>160 kb	14,3 kb	20 kb	42,8 kb
<b>exons</b>	15	15	13	13

**Tableau VI: Structure des gènes des transglutaminases.**

D'après Ichinose *et al*, 1988 (FXIII), Phillips *et al*, 1992; Yamanishi *et al*, 1992 (TGk), Kim *et al*, 1994 (TGe), Korsgren et Cohen, 1991, (B4.2), 1994 (B4.2 murine), Lu *et al*, 1995 (TGt).

Gène	Localisation chromosomique	références
FXIIIa	6p25-p24	Board <i>et al</i> , 1988; Weisberg <i>et al</i> , 1987 ; Lozier <i>et al</i> , 1992
TGk	14q11.2	Phillips <i>et al</i> , 1992; Kim <i>et al</i> , 1992
TGt	20q11.2	Wang <i>et al</i> , 1994; Gentile <i>et al</i> , 1994
TGe	20q11.1	Wang <i>et al</i> , 1994
TGp	3p21.33-p22	Gentile <i>et al</i> , 1995; Dubbink <i>et al</i> , 1996
B 4.2	15q15	Najfeld <i>et al</i> , 1992; Singer <i>et al</i> , 1992

Tableau VII : Localisation chromosomique des transglutaminases humaines.

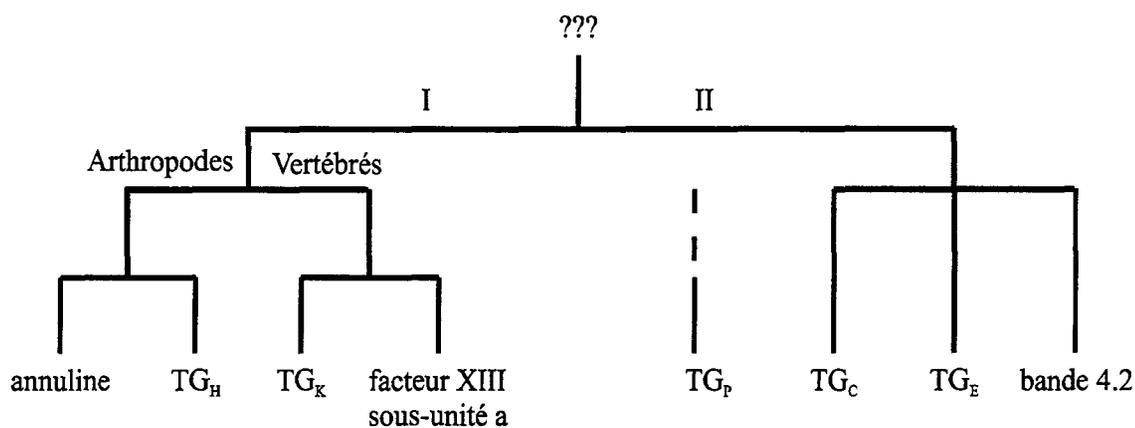
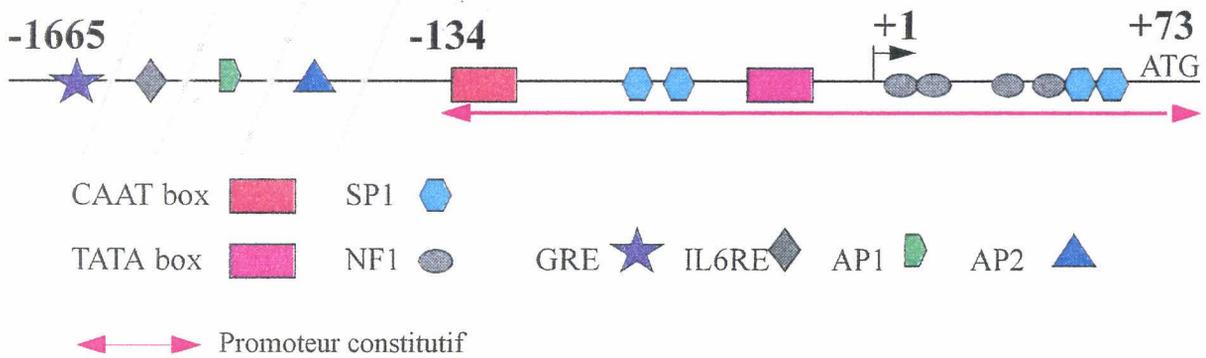


Figure 6: Arbre phylogénique des transglutaminases.

<b>Inducteurs</b>	<b>Neutres</b>	<b>Inhibiteurs</b>
<b>Molécules signaux</b>		
IL-6, TGFβ1, EGF, vitamine D3, acide rétinoïque, butyrate de sodium		Ethanol, Ester de phorbol
<b>Cations bivalents</b>		
Ca <sup>2+</sup> , Sr <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup>
<b>Nucléotides</b>		
	GMP, GMPc	GTP>GDP>>ATP, CTP
<b>Méthylation de l'ADN</b>		
hypométhylation		hyperméthylation

**Tableau VIII : Liste partielle des modulateurs de l'expression de la transglutaminase de tissu.**



**Figure 7 : régions promotrices de la transglutaminase de tissu humaine.**  
 (D'après Lu *et al*, 1995)

répressifs par suite de l'oxydation des groupements SH libres en pont disulfure *e.g.* le  $\text{Cu}^{2+}$  ou par inhibition compétitive *e.g.* le  $\text{Zn}^{2+}$ . Le rapport  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{Zn}^{2+}]$  pourrait réguler l'activité enzymatique dans la cellule (pour revue : Aeschlimann et Paulsson, 1994).

La régulation de l'activité par les guanosine nucléotides est un trait caractéristique des TGt (Achyuthan et Greenberg, 1987). Le GTP et le GDP se lient réversiblement à l'enzyme et inhibent sa fonction catalytique avec des  $\text{IC}_{50}$  de respectivement 100 et 400  $\mu\text{M}$ . Au contraire, le GMP et le GMPc ne présentent aucun effet inhibiteur. D'autres molécules comme l'ATP et le CTP inhibent l'activité transglutaminase mais à des concentrations 1000 fois plus élevées. Les concentrations locales en GTP et en  $\text{Ca}^{2+}$  réguleraient l'activité de l'enzyme *in vivo* (pour revue : Aeschlimann et Paulsson, 1994).

Les études sur la méthylation du promoteur de la TGt des cellules humaines normales et néoplasiques montrent que le promoteur est méthylé *in vivo* et l'hypométhylation du promoteur est corrélée avec une expression constitutive du gène (Lu et Davies, 1997). La déméthylation du promoteur *in vivo* par traitement des cellules à la 5-azacytidine augmente l'expression de la transglutaminase. L'hyperméthylation du promoteur *in vivo* supprime son activité. Ces études suggèrent que l'alternance dans la méthylation de l'ADN pourrait être un des mécanismes régulant l'expression tissu-spécifique du gène de la TGt.

## **G. Distribution-Fonctions**

La TGt est un enzyme ubiquitaire que l'on détecte dans une grande variété de cellules et de tissus normaux ou néoplasiques (Tableau IX). On a caractérisé la TGt dans les tissus suivants : foie, poumon, coeur, rein, testicule, rate, cristallin, tissu squelettique, thymus, ganglion sympathique (Slife *et al*, 1985 ; Aeschlimann *et al*, 1993, Ando *et al*, 1996, Szondy *et al*, 1997). Mais sa fonction physiologique reste incertaine. Plusieurs fonctions ont été proposées, outre son implication dans l'apoptose que nous développerons plus loin. Elles prennent place dans des compartiments cellulaires différents et requièrent la présence de la TGt à la fois dans l'espace extracellulaire et dans le cytosol.

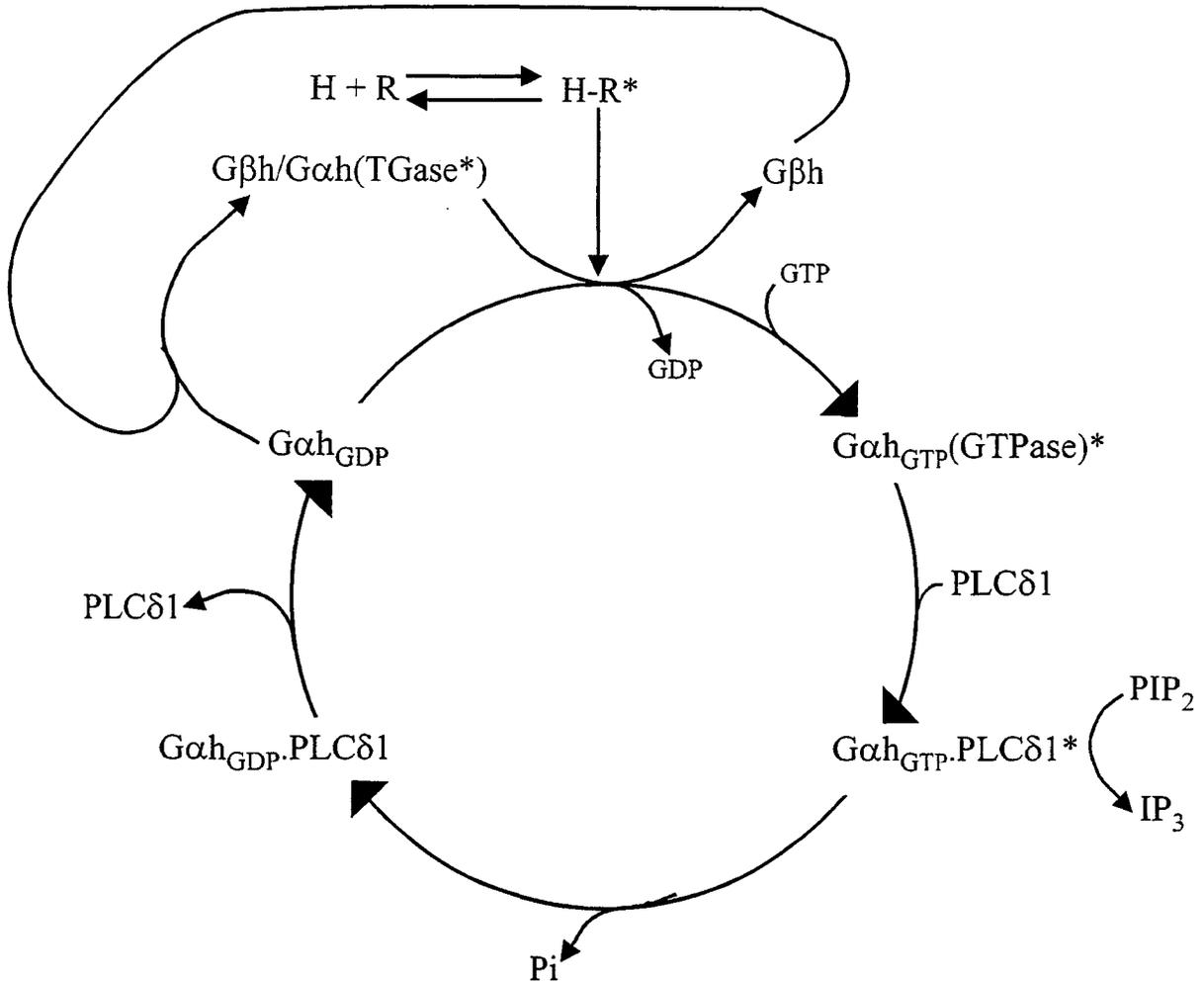
### **I. Transduction du signal**

La TGt (ou G $\alpha$ h) va permettre la transduction du signal induit par les récepteurs activés par les hormones. Le mécanisme d'action est représenté dans la Figure 8. Cette transduction du signal passe par l'inhibition de l'activité transglutaminase de l'enzyme au profit de son activité GTPase qui va activer en cascade la PLC $\delta$ 1, puis la voie des phosphoinositides. Cette voie de signalisation est régulée par le rapport GTP/GDP. La protéine G $\beta$ h provoque quant à elle la bascule de la voie de signalisation vers l'activité transglutaminase. Les résidus Val665 à Lys672 en position C $\text{T}$  sont critiques pour la reconnaissance et la stimulation de la PLC (Hwang *et al*, 1995).

Lignée cellulaire	Origine	Espèce	Références
HEL	érythroleucémie	homme	Suedhoff <i>et al</i> , 1990
K562	érythroleucémie	homme	Suedhoff <i>et al</i> , 1990
SK-N-BE	neuroblastome	homme	Piacentini <i>et al</i> , 1991, 1992 Melino <i>et al</i> , 1988, 1994
WI-38	fibroblastes de poumon	homme embryon	birckbichler <i>et al</i> , 1977, 1983
CHO	fibroblastes d'ovaire	hamster chinois	Milhaud <i>et al</i> , 1980
NRK	fibroblastes de rein	rat	Davies <i>et al</i> , 1980
NIH 3T3	fibroblastes	souris embryon	Cai <i>et al</i> , 1991
Balb-C 3T3	fibroblaste		Gentile <i>et al</i> , 1992
	érythrocytes		Lorand <i>et al</i> , 1976
	érythrocytes	poulet	Weraarchakul-Boonmark <i>et al</i> , 1992
	macrophages alvéolaire *	souris	Tanaka <i>et al</i> , 1991
	macrophages péritonéaux*	souris	Murtaugh <i>et al</i> , 1983 Moore <i>et al</i> , 1984 Chiocca <i>et al</i> , 1988, 1989 Gentile <i>et al</i> , 1991
	cellules endothéliales	homme	Gentile <i>et al</i> , 1991
	cellules épidermiques ou kératinocytes	souris	Yuspa <i>et al</i> , 1982 Litchi <i>et al</i> , 1985, 1988 Rice <i>et al</i> , 1977, 1979
	cellules épidermiques ou kératinocytes	homme	Rubin <i>et al</i> , 1986
	cellules T*	homme	Amendola <i>et al</i> , 1994
	lymphocytes	homme	Novogrodsky, 1978
	hépatocytes*	rat	Piacentini <i>et al</i> , 1991, 1992 Fesus <i>et al</i> , 1991, 1989
McA-RH7777*	hepatome	rat	Fukuda <i>et al</i> , 1993
HepG2*	hepatoblastome	homme	Suto <i>et al</i> , 1993
Hela-TV	adénocarcinome du col utérin	homme	Piacentini <i>et al</i> , 1991
THP-1			Mehta <i>et al</i> , 1986
HL-60	leucémie aigüe myéloblastique et promyélocytaire	homme	Mehta <i>et al</i> , 1996 Nagy <i>et al</i> , 1996, 1995
2C5	cellules épithéliales de trachée	rat	Denning <i>et al</i> , 1991
	mastocytes		Fesus <i>et al</i> , 1985
	cellules endothéliales* ou non	boeuf	Nara <i>et al</i> , 1989 Nakanishi <i>et al</i> , 1991
	cellules hypophysaires sécrétant de l'ACTH	homme	Kitahara <i>et al</i> , 1987
SPOC 1*	cellules épithéliale trachéobronchiale	rat	Zhang <i>et al</i> , 1995
EDE16-1*	cellules épithéliales ectocervicales	homme	Rorke <i>et al</i> , 1995
	fibrosarcome	hamster	Alaoui <i>et al</i> , 1992
NHEK	kératinocytes	homme	George <i>et al</i> , 1990
	chondrocytes	lapin	Borge <i>et al</i> , 1996 Demignot <i>et al</i> , 1995
CaCo2	adénocarcinome de colon		Mc Cormack <i>et al</i> , 1996

\*cellules induites

**Tableau IX : Distribution de la transglutaminase de tissu dans les lignées cellulaires**



**H** hormone/ agoniste  $\alpha 1$   
**R** récepteur/ récepteur adrénergique  $\alpha 1$   
 \* forme active  
**GTP** Guanosine triphosphate  
**GDP** Guanosine diphosphate  
**PLC $\delta 1$**  phospholipase C delta 1  
**G $\alpha h$**  sous unité  $\alpha$  (transglutaminase de tissu) de la protéine G homologue (Gh)  
**G $\beta h$**  sous unité  $\beta$  de la Gh  
**TGase** activité transglutaminase  
**GTPase** activité d'hydrolyse du GTP  
**PIP $_2$**  phosphatidyl inositol diphosphate  
**IP $_3$**  Inositol triphosphate  
**Pi** phosphate inorganique

**Figure 8: Modèle pour la régulation des fonctions de signalisation et de liaison de la TGt/G $\alpha h$  par les récepteurs activés par les hormones**

(Adaptée à partir de Nakoaka *et al*, 1994 avec les données de Baek *et al*, 1996 et Feng *et al*, 1996).

## II. Stabilisation de la matrice extra-cellulaire

Il existe une activité TGt dans l'espace extra-cellulaire (Aeschlimann et Paulsson, 1994; Aeschlimann *et al*, 1995). Dans ce compartiment, la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  est suffisamment élevée pour activer l'enzyme. Les facteurs inhibiteurs comme le GTP ou le  $\text{Zn}^{2+}$  y sont largement absents.

On a pu montré qu'un nombre important de protéines extra-cellulaires pouvait servir de substrats glutaminyls spécifique vis à vis de la TGt (Tableau X). Il n'est toutefois pas clair si toutes ces protéines sont réticulées *in vivo* par la TGt.

Cependant, la TGt est souvent colocalisée dans l'espace extra-cellulaire avec le complexe laminine-nidogène et avec la fibronectine (Aeschlimann *et al*, 1991).

De plus une implication du fibrinogène et de la fibronectine à la surface des hépatocytes et des cellules endothéliales dans la matrice périnucléaire a été démontrée (Barsigian *et al*, 1988, 1990, 1991; Martinez *et al*, 1989; Mitkevich *et al*, 1996; Tyrrel *et al*, 1988; Kinsella et Wight, 1990). La TGt lie également les complexes laminine-nidogène dans les membranes basales (Aeschlimann *et al*, 1991, 1992). Elle intervient dans la calcification des cartilages, dans la formation des osenchondraux et la maturation du cartilage de la trachée (Aeschlimann *et al*, 1993; Hohenadl *et al*, 1995; Borge *et al*, 1996). Cette matrice est altérée dans les inflammations, ou lors de la vieillesse menant à l'arthrite ou à l'arthrose. Elle jouerait un rôle dans les événements apparentés à la cicatrisation et la réparation des tissus, telle que la formation de matrices fortement insolubles présentes dans le foie des cirrhotiques (Zatloukal *et al*, 1992). On a montré que la TGt se lie à la MEC avec une forte affinité après cicatrisation des blessures (Bowness *et al*, 1988; Upchurch *et al*, 1991; Wang *et al*, 1993).

## III. Modulation d'activités biologiques

La TGt convertit par dimérisation la cytokine IL-2 en un facteur cytotoxique pour les oligodendrocytes dans les processus de régénération neuronale (Eitan et Schwartz, 1993).

La TGt régule la conversion par la plasmine du TGF $\beta$  latent en TGF $\beta$  actif (Kojima *et al*, 1993), probablement en augmentant l'activité de la plasmine par des molécules réticulées appartenant à la classe des inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (Jessen *et al*, 1993, 1994; Kojima *et al*, 1993) et en liant la protéine de fixation du TGF $\beta$  latent, qui inhibe le TGF $\beta$  (Nunes *et al*, 1997).

La TGt catalyse l'incorporation de polyamines et la formation de liens intramoléculaires dans la phospholipase A2 (PLA2) ce qui augmente son activité (Cordella-Mièle *et al*, 1990, 1993). De façon similaire, elle module l'aspartyl protéase du VIH, un enzyme essentiel pour la maturation du virus, par l'incorporation de polyamines (Beninati *et al*, 1992).

La TGt participe aussi aux modifications covalentes des apolipoprotéines (Coccuzzi *et al*, 1990) et des lipoprotéines (Borth *et al*, 1991).

Substrats	Références
fibrin(ogène)	Achyuthan <i>et al</i> , 1988 ; Shainoff <i>et al</i> , 1991
fibronectine	Fesus <i>et al</i> , 1986 ; Upchurch <i>et al</i> , 1987 ; Tyrrel <i>et al</i> , 1988 ; Le Mosy <i>et al</i> , 1992 ; ; Bendixen <i>et al</i> , 1993 ; Martinez <i>et al</i> , 1994
vitronectine	Sane <i>et al</i> , 1988, 1990 ; Skorstengaard <i>et al</i> , 1990
nidogène-entactine	Aeschlimann <i>et al</i> , 1991, 1992
procollagène de type III	Bowness <i>et al</i> , 1987 ; Aeschlimann <i>et al</i> , 1993
collagène de type I	Juprelle-Soret <i>et al</i> , 1988
collagène de type II	Aeschlimann <i>et al</i> , 1993
collagène de type VII	Raghunath <i>et al</i> , 1996
ostéonectine/BM40/SPARC	Aeschlimann <i>et al</i> , 1993, 1995
ostéopontine/SPP-1	Prince <i>et al</i> , 1991
galectine 3	Mehul <i>et al</i> , 1995

**Tableau X : Protéines de la matrice extra-cellulaire servant de substrats *in vitro* à la transglutaminase de tissu.**

La TGt lie l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI2), qui empêche ainsi la fibrinolyse (Jessen *et al*, 1993, 1994). La TGt aurait pour rôle de localiser l'activité en liant la PAI2 aux structures des membranes extra-cellulaires.

#### **IV. Circulation de molécules**

La TGt intervient dans certains mécanismes de circulation de molécules comme l'endocytose par les récepteurs des hormones protéiques et polypeptidiques (Davies *et al*, 1980, 1984; Levitzki *et al*, 1980). Elle joue également un rôle dans la sécrétion de l'insuline des cellules pancréatiques  $\beta$  stimulées par le glucose (Sener *et al*, 1985; Bungay *et al*, 1986) en participant à la machinerie contrôlant l'accès des granules de sécrétion au site d'exocytose ou le transport de vésicules d'endocytose (Ando *et al*, 1989).

#### **V. Différenciation cellulaire**

La TGt serait impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Birckbichler *et al*, 1977, 1981; Birckbichler et Patterson, 1978; Nara *et al*, 1992), l'expression de la TGt laissant les cellules dans un état non prolifératif.

La TGt joue aussi un rôle dans la capacité des cellules tumorales à métastaser (Barnes *et al*, 1985; Delcros *et al*, 1986; Knight *et al*, 1991; Birckbichler *et al*, 1976). Il existe une corrélation inverse entre l'expression de la TGt et la capacité à métastaser. Une TGt non fonctionnelle a été décrite dans les tumeurs (Knight *et al*, 1991). De plus, la lignée cellulaire de neuroblastome humain SK-N-BE(2), transfectée par l'ADNc complet de la TGt est incapable d'induire le développement de tumeurs lorsqu'elles sont xénotransplantées dans une souris SCID (Piacentini *et al*, 1996).

L'induction de la TGt est corrélée avec les changements morphologiques survenant dans plusieurs lignées cellulaires (Paye *et al*, 1986; Byrd et Litchi, 1987; Nara *et al*, 1989; Gentile *et al*, 1992) et est impliquée dans la différenciation de certaines cellules (Moore *et al*, 1984; Byrd et Litchi, 1987; Uhl *et al*, 1987; Suedhoff *et al*, 1990; Seiving *et al*, 1991; Volberg *et al*, 1992).

La TGt augmente l'adhésion aux substrats des cellules comme les fibroblastes et les chondrocytes (Cai *et al*, 1991; Gentile *et al*, 1992; Borge *et al*, 1996).

Ainsi la TGt induit la différenciation des monocytes en macrophages (Schroff *et al*, 1981; Leu *et al*, 1982; Kannagi *et al*, 1982; Murtaugh *et al*, 1983, 1984). Cette activation des macrophages est corrélée à une augmentation des capacités de phagocytose par les récepteurs Fc (Schroff *et al*, 1981; Leu *et al*, 1982; Fesus *et al*, 1981).

# La régulation de la transglutaminase de tissu par les rétinoïdes

Avant de voir la régulation de l'expression de la TGt par les rétinoïdes, nous consacrerons un chapitre aux rétinoïdes (fonctions et mécanisme d'action).

## A. Les rétinoïdes

### I. Définition des rétinoïdes

Les rétinoïdes naturels sont des dérivés de la Vitamine A (ou rétinol). Les principales sources de Vit A sont les esters de rétinol d'origine animale et les  $\beta$  caroténoïdes (pro-Vit A) d'origine végétale. Cette substance et/ou ces dérivés sont impliqués dans de nombreux effets biologiques (reproduction, croissance, mécanisme de la vision, régulation du système immunitaire) (Van Pelt et Rooij, 1991; Ross et Hanmerling, 1994). Le rétinol tout-trans est métabolisé via des réactions d'oxydations et d'isomérisations en plusieurs métabolites actifs dont le Rétinaldéhyde (Ral), l'Acide Rétinoïque *tout-trans* (ARtt) et le 9-*cis* Acide Rétinoïque (9*cis*AR). L'AR peut agir de façon paracrine, en passant directement de la circulation sanguine à l'intérieur de la cellule ou autocrine, au niveau cytoplasmique, où une alcool-déshydrogénase et une déshydrogénase/réductase des chaînes courtes catalysent l'interconversion réversible du rétinol en rétinol, qui est lui-même transformé irréversiblement en acide rétinoïque *tout-trans* par une rétinol-déshydrogénase ou par le cytochrome P450. L'aldéhyde déshydrogénase est régulée en retour négativement par l'AR (pour revues : Duester, 1996 ; Napoli, 1996) (figure 9). Le mécanisme de la synthèse de l'isomère 9-*cis* AR n'est pas encore élucidé. L'action d'une isomérase sur l'ARtt est l'hypothèse la plus souvent retenue (Levin *et al.*, 1992 ; Heyman *et al.*, 1992).

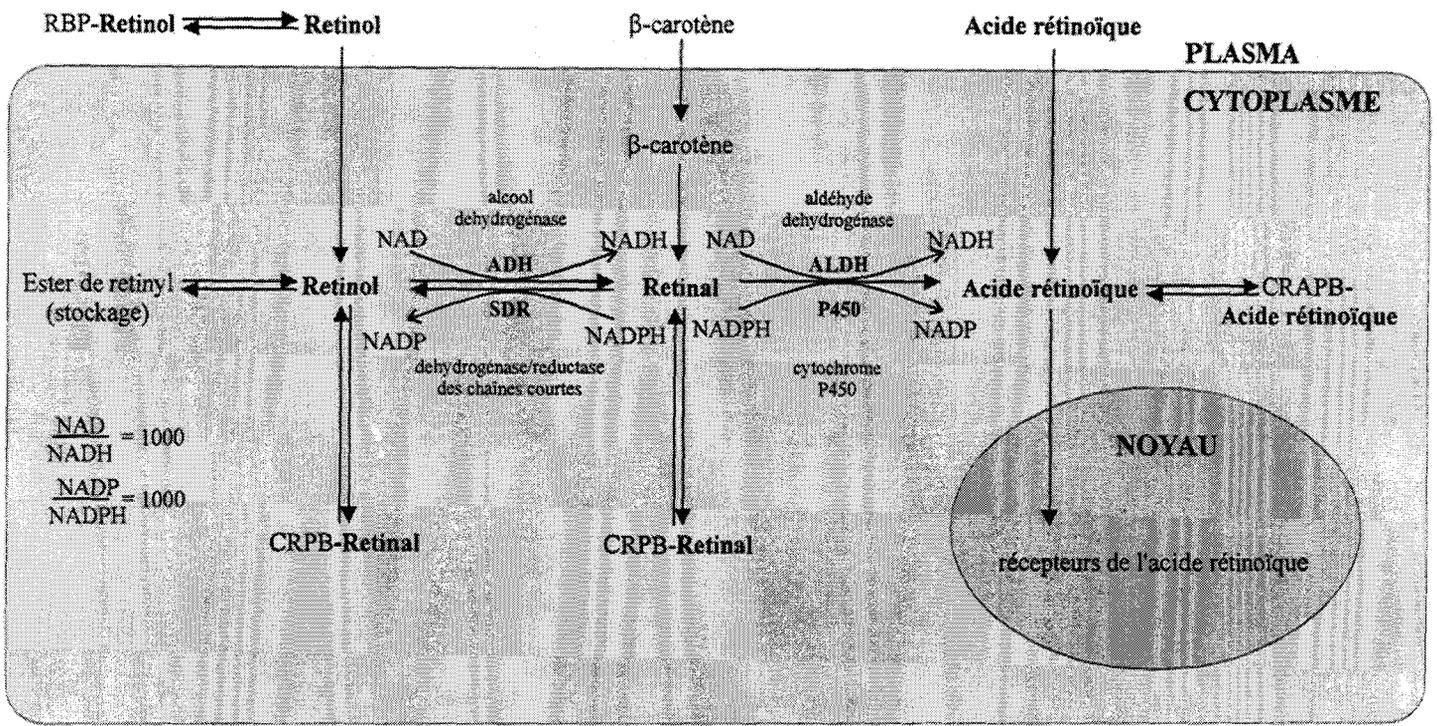
La structure des rétinoïdes est globalement hydrophobe. Ce sont des hydrocarbures polyisopréniques comprenant cinq doubles liaisons conjuguées. On distingue trois parties dans cette structure : (figure 10)

- une extrémité cyclique terminale hydrophobe.
- une chaîne polyénique.
- une extrémité polaire (CH<sub>2</sub>OH : Rétinol, CHO : Rétinaldéhyde, COOH : Acide Rétinoïque).

### II. Effets de l'acide rétinoïque

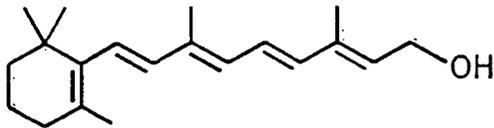
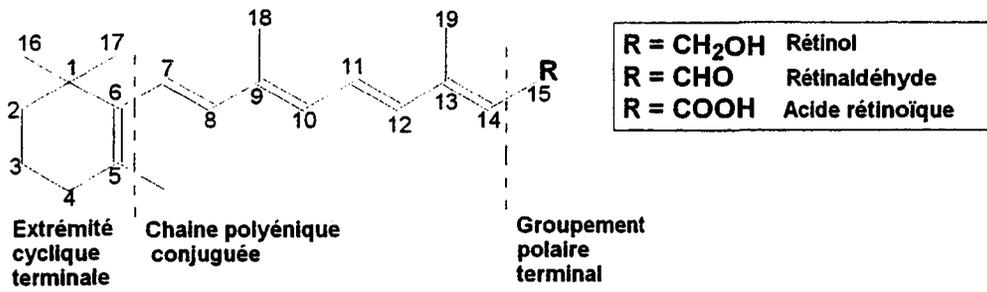
L'AR présente des effets pléiotropiques. Il se montre capable de réguler l'embryogenèse, la morphogenèse (Slack, 1987; Brockes, 1991; Riddle *et al.*, 1993), la croissance, la différenciation et l'apoptose dans différents types cellulaires (De Luca *et al.*, 1991 ; pour revue : Gudas, 1994).

Les rétinoïdes ont un effet de régulation de la prolifération cellulaire, mais leur rôle majeur réside dans une activité de différenciation cellulaire et tissulaire. Les effets de ces rétinoïdes peuvent

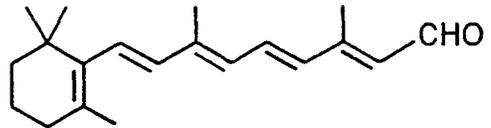


RBP : protéine du sérum fixant le rétinol  
 CRPB : protéine cellulaire fixant le rétinol  
 CRABP : protéine cellulaire fixant l'acide rétinoïque

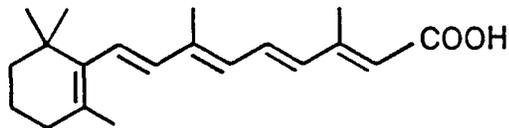
**Figure 9 : Mécanisme de la synthèse de l'acide rétinoïque et stockage des rétinoïdes**  
 (D'après Duester, 1996)



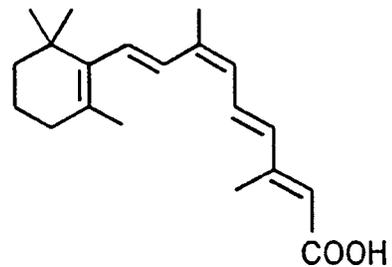
Rétinol  
Vitamine A



Rétinal



Acide tout-trans Rétinoïque  
(t-RA)



Acide 9-cis Rétinoïque  
(9-cis RA)

Figure 10 : Structure des rétinolides et principaux rétinolides naturels.

être disséqués en étudiant des lignées cellulaires en culture, telles que les cellules de leucémie humaine myéloblastiques et promyélocyaires HL-60 (Breitman *et al*, 1980) qui se différencient en granulocytes sous l'effet de la l'ARtt. La différenciation cellulaire se caractérise par différents phénomènes : une réduction de la prolifération cellulaire, un accroissement de la capacité d'adhésion des cellules, une baisse des propriétés invasives, l'expression de marqueurs génétiques spécifiques d'un type cellulaire... Ces phénomènes sont en fait le résultat d'une altération de l'expression de nombreux éléments de la machinerie cellulaire comme les hormones peptidiques, les facteurs de croissance, certains enzymes, les facteurs de transcriptions ou des protéines de structure (pour revue : Gudas *et al*, 1994).

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

### **III.Rétinoïdes et pathologie**

Les effets différenciateurs des rétinoïdes ont jusqu'à présent deux champs d'application médicale : les affections cutanées et le cancer.

Les rétinoïdes ont un effet sur le maintien des épithélia. Ils réduisent notamment les phénomènes de kératinisation de la peau. Cet effet est mis à profit dans le traitement de diverses pathologies de la peau, telles le psoriasis, les formes d'acné sévère, diverses hyperkératoses et le traitement du vieillissement cutané lié à l'exposition solaire (pour revue : Gollnick, 1996). Rappelons par ailleurs que l'AR régule négativement l'expression de la transglutaminase de kératinocytes, qui intervient dans la différenciation terminale des kératinocytes et dont l'expression est dérégulée dans ces pathologies.

L'utilisation potentielle des rétinoïdes dans la chimioprévention et le traitement du cancer soulève actuellement un intérêt considérable (pour revue : Lotan, 1994, 1996 ; Cornic *et al*, 1994). Après le succès spectaculaire obtenu dans le traitement de la leucémie à promyélocytes (pour revue : Chomienne *et al*, 1996), un nombre croissant de tumeurs et d'hémopathies bénéficie en effet d'essais de traitement par les rétinoïdes. Ils ont aussi donné des résultats prometteurs dans le traitement de lésions cutanées pré-malignes, de trouble épithéliaux hyperprolifératifs (Lotan, 1994). Les rétinoïdes peuvent agir sur les cellules tumorales en inhibant leur prolifération et surtout en provoquant leur différenciation (Sporn et Roberts, 1983 ; Pfahl *et al*, 1994). Certaines études ont montré que l'effet différenciateur de l'AR sur les cellules de leucémie humaine HL-60, de neuroblastome SK-N-BE ou d'adénocarcinome HeLa, s'accompagne d'un phénomène d'induction de l'apoptose (Martin *et al*, 1990 ; Piacentini *et al*, 1991).

Les rétinoïdes soulèvent un grand intérêt dans le domaine du myélome depuis qu'il a été rapporté que l'AR s'opposait à l'action de L'IL-6, facteur de croissance et de prolifération tumorale majeur de la maladie (Klein et Bataille, 1991), dont il diminuerait le taux de récepteurs membranaires (Sidell *et al*, 1991). Des essais thérapeutiques utilisant l'AR seul ou en association avec l'interféron $\alpha$  ont déjà débuté. Ces données justifient le choix du modèle du myélome dans notre étude.

#### **IV.Mécanisme d'action des rétinoïdes**

Les rétinoïdes interagissent avec des protéines cytoplasmiques (CRABPs et CRBPs) et des récepteurs nucléaires (RARs et RXRs). Ces derniers reconnaissent spécifiquement des séquences d'ADN, les éléments de réponse aux rétinoïdes (RAREs ou RXREs), localisés dans les régions promotrices des gènes régulés par les rétinoïdes. La spécificité de reconnaissance des éléments de réponse dépend de leur dimérisation. En effet les récepteurs sont capables «d'homodimériser» (RXR-RXR) ou «d'hétérodimériser» (RAR-RXR) (Figure 11).

##### **a) Protéines cytoplasmiques liant les rétinoïdes**

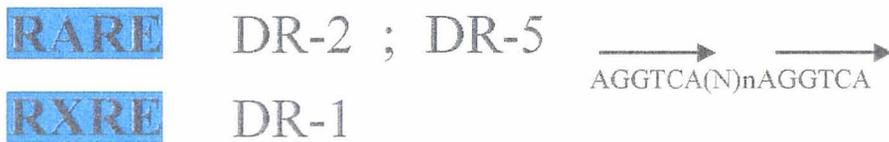
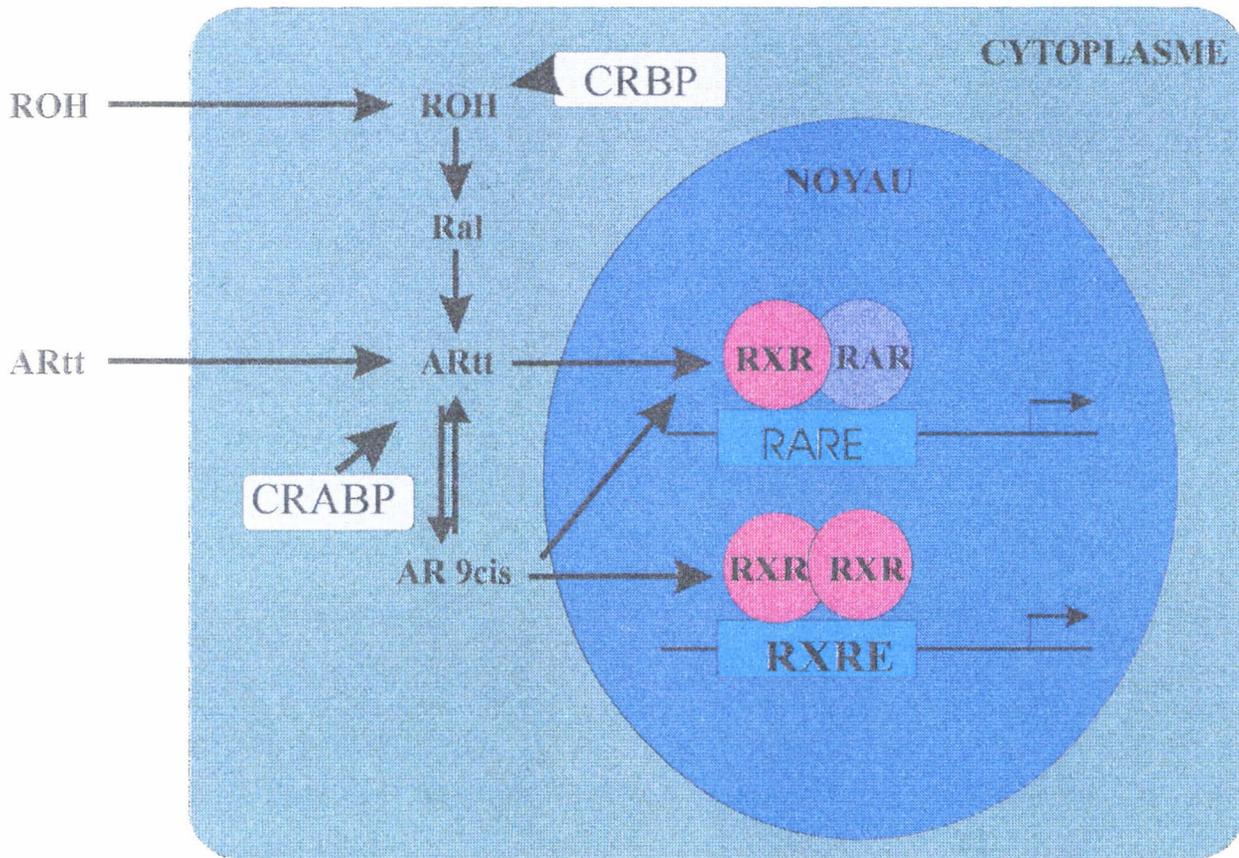
La nature hydrophobe des rétinoïdes limite leur solubilité et donc leur diffusion en milieu aqueux. Le rétinol et l'acide rétinoïque sont pris en charge dans les cellules cibles par des protéines navettes spécifiques, les CRBP de type I et II (Cytoplasmic Retinol Binding Protein) et les CRABP de type I et II (Cytoplasmic Retinoic Acid Binding Protein) respectivement. Leur rôle n'est pas encore clairement établi. Elles pourraient servir de réserves intracellulaires pour le rétinol et l'AR. Les CRABPs interviendraient aussi dans le métabolisme de l'AR et dans sa translocation nucléaire (revue : Duester, 1996 ; Napoli, 1996). Il est intéressant de noter que l'AR régule l'expression de la CRBPI et de la CRABPII. Cependant ces protéines ne sont pas indispensables, puisque des lignées cellulaires qui en sont dépourvues répondent parfaitement à l'AR (Jetten *et al*, 1987) (ex : HL 60), et des souris knock-out pour le gène de la CRABP ne présentent pas de syndrome apparent (Lampron *et al*, 1995). De plus, un certain nombre de rétinoïdes de synthèses très actifs ne se lient pas aux CRABPs.

##### **b) Les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque**

Une fois dans le noyau, l'AR se lie à des récepteurs nucléaires spécifiques : les RARs. L'isomère 9cis AR se lie aux RARs et à une seconde classe de récepteurs, les RXRs.

###### **1) La superfamille des récepteurs nucléaires**

Les récepteurs nucléaires constituent une superfamille de facteurs de transcription dont l'activité est régulée par un ligand (Wahli et Martinez, 1991). Cette superfamille englobe les récepteurs des hormones stéroïdes, thyroïdes, de la Vitamine D et de l'acide rétinoïque, ainsi qu'un



**figure 11 :** Mécanisme moléculaire d'action des acides 9 cis et tout-trans rétinolique  
 ROH : Rétinol ; Ral : Rétinal ;  
 AR : Acide Rétinoïque tout-trans (tt) ou 9 cis  
 (D'après Mangelsdorf *et al*,1994)

nombre croissant de récepteurs dit orphelins, pour lesquels aucun ligand n'a encore été identifié (Laudet *et al*, 1992).

## 2) Domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires

L'unité de la famille est définie par la conservation de la même organisation structurale et fonctionnelle par tous ces récepteurs qui présentent le même mécanisme général d'action (Figure 12). Les RARs et les RXRs, ainsi que tous les autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, sont des facteurs de transcription ligand-dépendants. Ils portent donc dans leur séquence protéique les motifs structuraux responsables de cette dualité de fonction. Les récepteurs se composent de 6 domaines appelés A / B / C / D / E / F (pour revue : Evans, 1988 ; Chambon, 1996 ; Gronemeyer et Laudet, 1996). Deux d'entre eux nous intéressent particulièrement pour notre étude : le domaine C ou DBD (DNA Binding Domain) responsable de l'interaction avec l'ADN, et le domaine E ou LBD (Ligand Binding Domain) impliqué dans la liaison du ligand. Ces domaines C et E sont reliés par le domaine D qui semble contribuer à la fois à la liaison de l'ADN et à celle du ligand, mais produirait également une certaine flexibilité entre les deux domaines.

Le domaine N-terminal transactivateur A/B est de taille et de séquence très variable selon les récepteurs. Le domaine C est très fortement conservé dans toute la famille des récepteurs nucléaires. A l'inverse le domaine E est de séquence beaucoup plus variable, ce qui s'explique par la diversité des ligands. Ce domaine porte une fonction transactivatrice AF-2 régulée par le ligand tandis que l'activité transactivatrice AF-1 des domaines A/B serait plutôt indépendante du ligand selon le récepteur considéré. Un élément essentiel de la régulation de cette activité de liaison à l'ADN est la capacité de nombreux récepteurs nucléaires à former des homo ou hétérodimères. Cette dimérisation fait intervenir les domaines C et E. Une séquence signal de transfert nucléaire a été identifiée dans le domaine D. Le domaine F ne semble pas porter de fonction connue. Il n'est d'ailleurs pas présent parmi tous les récepteurs.

## 3) Les RARs (Récepteurs de l'Acide Rétinoïque)

C'est en 1987 que deux équipes (Giguere *et al*, 1987 ; Petkovitch *et al*, 1987) isolent simultanément l'ADNc d'un nouveau membre de la famille des récepteurs nucléaires : le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR). Deux autres isoformes du RAR ( $\beta$  et  $\gamma$ ) sont ultérieurement identifiées grâce à leur forte homologie de séquence avec le premier (RAR $\alpha$ ) (de Thé *et al*, 1987 ; Zelent *et al*, 1989). Ces isoformes présentent 97% d'homologie de séquence dans leur domaine C et 82% dans leur domaine E (figure 13). La diversité se trouve encore augmentée par l'existence de deux promoteurs pour chaque gène, donnant naissance à deux transcrits alternatifs. Ces transcrits génèrent des isoformes avec une extrémité N<sub>T</sub> différente. De plus, plusieurs variants provenant d'épissages

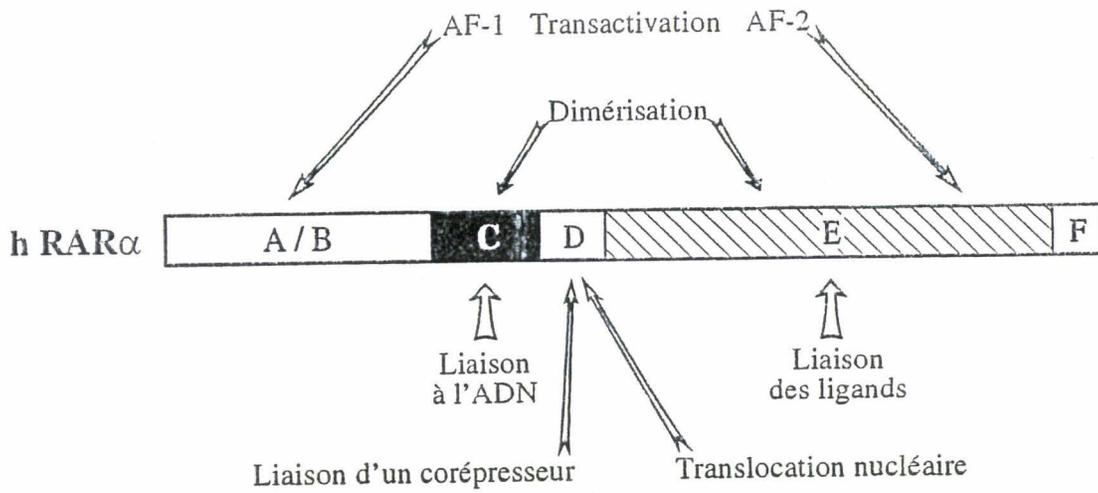


Figure12: Domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires.

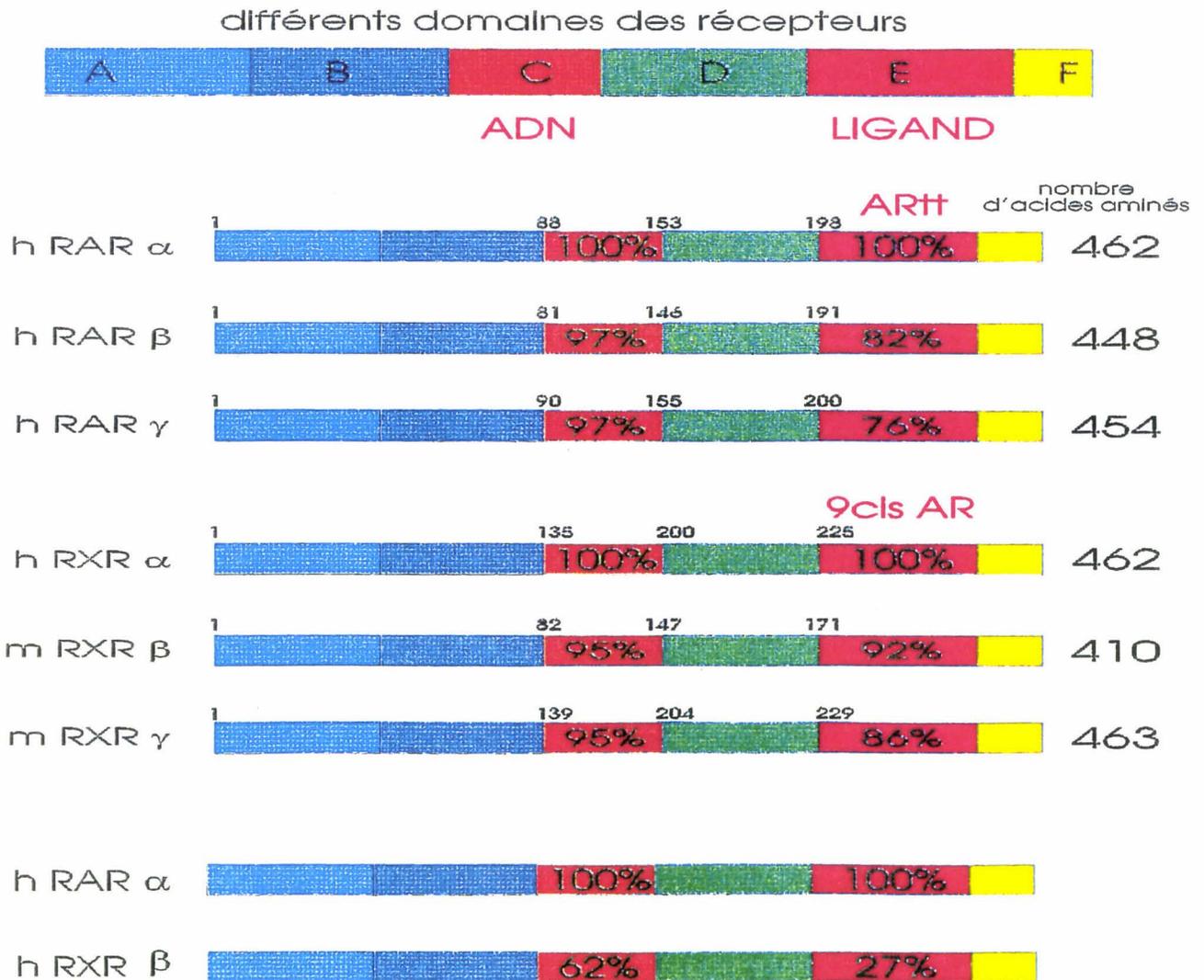


Figure13: Homologie de séquence entre les différentes formes de RAR et de RXR.

h : humain ; m : murin  
 (D'après Mangelsdorf *et al*, 1994 ; Pemrick *et al*, 1994)

alternatifs ont été caractérisés. On dénombre chez l'homme 2 RAR $\alpha$ , 4 RAR $\beta$  et 2 RAR $\gamma$  (Tableau XI).

#### 4) Les RXRs (Récepteurs du Rétinoïde X)

Un second type de récepteur des rétinoïdes, le RXR, a été initialement identifié par sa capacité à être activé par l'ARtt (Mangelsdorf *et al*, 1990). Cependant l'incapacité de l'ARtt tritié à se lier avec une bonne affinité au RXR a conduit à poursuivre la recherche de son ligand naturel : le rétinoïde X. Cette recherche a abouti à la découverte du 9cis AR, un stéréoisomère de l'ARtt, comme ligand du RXR (Heyman *et al*, 1992 ; Levin *et al*, 1992). Le 9cis AR est aussi capable d'activer les RARs. D'autres isoformes du RXR ont par la suite été identifiées (RXR  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) (Mangelsdorf *et al*, 1992).

Il existe entre les différentes isoformes des RXRs 95% d'homologie de séquence dans leur domaine C et 86% dans leur domaine E. Cependant il n'y a plus que 62% d'homologie de séquence au niveau du domaine C entre les RARs et les RXRs et 27% au niveau du domaine E, ce qui corrobore l'existence de ligands qui leur sont propres (Figure 13). Tout comme les RARs, les RXRs comportent des isoformes : 2 RXR $\alpha$ , 2 RXR $\beta$  et 2 RXR $\gamma$  (Tableau XI).

Les récepteurs de l'acide rétinoïque se caractérisent donc par une exceptionnelle diversité. Il existe suffisamment de différences dans le domaine E de liaison du ligand entre les isoformes des RARs ou entre celles des RXRs pour concevoir la synthèse de ligands spécifiques d'une classe ou d'une sous-classe.

#### c) La transactivation

La fonction ultime des RARs et/ou RXRs est d'activer la transcription du gène cible contrôlé par le RARE ou le RXRE sur lequel ils se fixent.

##### 1) Eléments de réponse aux rétinoïdes

Après liaison du ligand à son récepteur, le complexe formé va réguler la transcription de gènes cibles en se fixant à des séquences spécifiques d'ADN appelées Elément de Réponse Hormonal HRE (Hormon Responsive Element). Cette interaction se fera sous la forme d'un homodimère ou d'un hétérodimère. Les éléments de réponse sont constitués de séquences nucléotidiques consensus 5'PuG(G/A)(T/A)CA, disposées en palindrome, en répétition directe ou en élément complexe. Dans la plupart des cas les éléments de réponse aux RARs et aux RXRs sont des Répétitions Directes (DR), et c'est l'espacement en nombre de nucléotides entre les deux séquences répétées qui définit le type d'élément de réponse : RARE ou RXRE. De cet espacement entre les DR, la règle du 1,2,3,4,5 a été tirée (Umesono *et al*, 1993). Bien qu'elle ne soit pas absolue elle se définit ainsi : un RARE se compose d'un DR2 ou d'un DR5 tandis qu'un RXRE se compose lui d'un DR1. Un DR3 et DR4 définissent respectivement un élément de réponse pour les récepteurs de la Vitamine D (VDR) et de

Gène	Isoformes majeures	localisation chromosomique	Ligand
RAR $\alpha$	$\alpha 1, \alpha 2$	17q21.1	Acide rétinoïque <i>tout-trans</i> et 9 <i>cis</i>
RAR $\beta$	$\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4$	3p24	
RAR $\gamma$	$\gamma 1, \gamma 2$	12q13	
RXR $\alpha$	$\alpha 1, \alpha 2$	9q34.3	Acide rétinoïque 9 <i>cis</i>
RXR $\beta$	$\beta 1, \beta 2$	6p21.3	
RXR $\gamma$	$\gamma 1, \gamma 2$	1q22-q23	

**Tableau XI: Récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) et du rétinoïde X (RXR).**

(D'après Chambon, 1996)

## Répétitions directes (DR)

<b>RARE (DR5)</b>	$\xrightarrow{\text{AGGTCAnnnnnnAGGTCA}}$
	$\xrightarrow{5n}$
hRAR $\beta$ 2	AGGGTTCACCGAAAGTTCACT
mCP-H	GCAGGTCACTGACAGGGCATA
hADH3	AGGGGTCAATTCAGAGTTCAGT
mHox-1.6	CAGGTTCACCGAAAGTTCAG
<b>RARE (DR2)</b>	$\xrightarrow{\text{AGGTCAnnAGGTCA}}$
	$\xrightarrow{2n}$
mCRBPI	GTAGGTCAAAGGTTCAGA
mCRABPII	CCAGTTCACCAGGTTCAGG
<b>RXRE (DR1)</b>	$\xrightarrow{\text{AGGTCAnAGGTCA}}$
	$\xrightarrow{1}$
rCRBPII	ACAGGTTCACAGGTTCACAGGTTCAGTTCATT
hApoAI	GCAGGGCAAGGGTCAAG
cOVAL	TGGTGTCAAAGGTCAAA

## Palindromes

TRE pal	$\xleftarrow{\text{TCAGGTCA}} \text{TCAGGTCA} \xrightarrow{\text{TGACCTGA}}$
xVitA2	$\xleftarrow{\text{TCAGGTCA}} \text{TCAGGTCA} \xrightarrow{\text{CAGTGTGACCTGA}}$

## Palindromes inversés

<b>RARE (ER8)</b>	$\xleftarrow{\text{TGACCTn}} \text{TGACCTn} \xrightarrow{\text{AGGTCA}}$
	$\xrightarrow{8n}$
$\gamma$ F-Crystalline	$\xleftarrow{\text{AGTGACCCTTT}} \text{AGTGACCCTTT} \xrightarrow{\text{TAACCAGGTCA}} \text{TAACCAGGTCA} \xrightarrow{\text{TGA}}$

## HREs Complexes

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

**Figure 14:** Exemples d'éléments de réponse parmi les différents types de RARE et RXRE.

(pour références : Mangelsdorf *et al*, 1994)

CP-H : complement factor H, ADH3 : alcool déshydrogénase 3, ApoAI : apolipoprotéine AI, OVAL : ovalbumine, Vit A2 : vitellogénine A2, MCAD : medium chain acyl-CoA deshydrogénase, GH : growth hormone, LamB1 : laminine B1.

h : homme, m : souris, r : rat, c : poulet, x : xenope.

l'hormone thyroïdienne (TR). Un RARE fixe un hétérodimère RAR(en 5')-RXR(en 3') et un RXRE fixe un homodimère RXR-RXR. Le motif RARE de type DR5 est plus répandu que le type DR2 et sa transactivation par l'AR est plus efficace (Figure 14).

Les RAREs existent aussi sous forme de palindrome inversé ou non. Un troisième groupe de RAREs possède des configurations dites complexes constituées de demi-sites qui sont souvent dégénérés à partir de la séquence consensus AGGTCA et dont l'orientation se fait au hasard. Ces HREs apparaissent permissifs pour certains types de récepteurs hormonaux et présentent une faible affinité pour les RARs (Figure 14).

Les RXRE sont plus homogènes. Ils sont exclusivement des éléments de type DR1. Les hétérodimères RXR-RAR sont aussi capables de se lier à un élément de type DR1, mais ils adoptent une conformation particulière, avec le RXR sur le demi-site en aval, qui rend ces complexes inactifs (Kurokawa *et al*, 1994).

## 2) Rôle du RXR dans la transactivation

### *Homodimère RXR-RXR*

Le 9cis AR favorise la formation d'homodimères RXR-RXR (Zhang *et al*, 1992) qui se lient avec une forte affinité aux RXREs de type DR1, présents dans le promoteur de gènes tel que la CRBPII ou l'Apoptotéine A1.

### *Hétérodimère RAR-RXR*

Deux théories s'opposent :

#### (i) RXR partenaire silencieux

Dans les hétérodimères RAR-RXR, le RXR a été décrit comme un partenaire silencieux essentiel pour la fixation de l'hétérodimère à l'ADN, mais incapable de fixer son propre ligand et ne participant pas à l'activité transcriptionnelle. Celle-ci serait déclenchée par la fixation du ligand du partenaire de RXR dans l'hétérodimère (Forman *et al*, 1995; Kurokawa *et al*, 1994 ; Valcarel *et al*, 1994). De même, le RXR dans les hétérodimères RAR-RXR fixés sur les motifs DR1 en position inverse ne semble pas lier pas son ligand (Kurokawa *et al*, 1994).

Mais cette réponse n'est pas toujours si claire car sur les motifs DR2 on observe que le RAR et le RXR ont une activité transcriptionnelle additive (Durand *et al*, 1992). Le 9-cis AR pourrait aussi activer la transcription de l'hétérodimère RXR-NGF1 fixé sur un DR5 (Forman *et al*, 1995) ou RXR-LXR fixé sur un DR4 (Willy *et al*, 1995), ou encore RXR-PPAR fixé sur un DR1 (Kliwer *et al*, 1993). Le partenaire RXR n'est donc pas forcément aussi silencieux qu'il n'y paraît.

## (ii) RXR partenaire potentialisateur

Le RXR n'est pas un partenaire silencieux mais plutôt un partenaire qui potentialise l'effet du RAR. Bien que le ligand RXR seul ne soit pas capable comme le ligand RAR d'activer la transcription, son addition au ligand RAR donne une activation synergique de la transcription qui requiert les domaines transactivateurs des deux récepteurs. La fixation du ligand RAR serait un prérequis à la fixation du ligand RXR (Forman *et al*, 1995 ; Minucci *et al*, 1997). De plus le ligand RXR stabilise les hétérodimères sur le promoteur (Minucci *et al*, 1997). De façon intéressante le traitement combiné avec des ligands sélectifs RAR et RXR a montré la génération d'effets synergiques dans plusieurs systèmes biologiques (pour revue: Minucci et Ozato, 1996).

### 3) Modulation de la transactivation

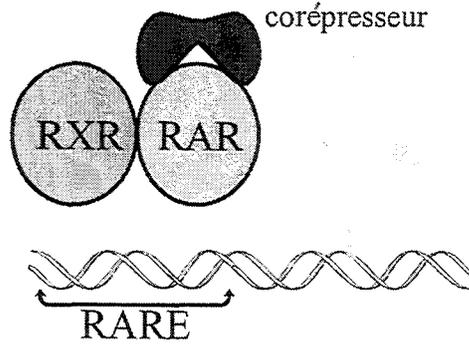
Les différentes voies impliquant le RXR se régulent entre elles par compétition pour l'accessibilité au RXR pour la formation des hétérodimères (Davis et Lazar, 1992 ; Baretino *et al*, 1993; Damm *et al*, 1993).

L'acide 9-cis rétinoïque favorise *in vitro* la formation d'homodimères RXR-RXR (Zhang *et al*, 1992) et pourrait ainsi se comporter comme un antagoniste des réponses médiées par les hétérodimères RAR-RXR (Carlberg *et al*, 1993). L'ARt quant à lui induit *in vitro* la formation d'homodimères RAR-RAR qui n'ont pas d'activité biologique décrite (Lefebvre *et al*, 1995). Les ligands peuvent donc moduler les voies de signalisation par les rétinoïdes en jouant sur les équilibres entre les différents dimères.

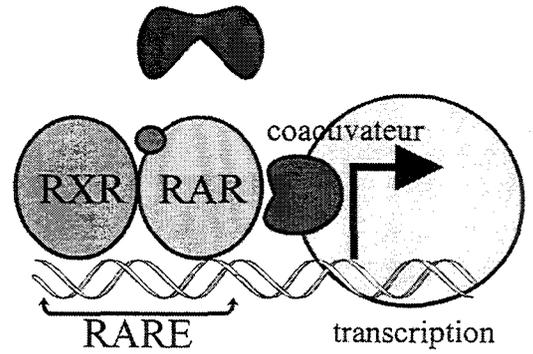
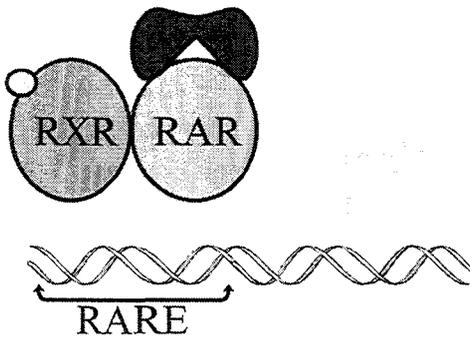
Un autre mécanisme de régulation de la transcription a récemment été mis en évidence avec la découverte de facteurs protéiques qui interagissent avec les récepteurs de l'acide rétinoïque (Minucci et Ozato, 1996) (Figure 15). Deux classes de facteurs ont été isolés : les premiers qui interagissent avec les récepteurs sans ligand et qui se dissocient des récepteurs après fixation du ligand (N-CoR et SMRT), et les seconds, qui interagissent seulement avec les récepteurs fixant leur ligand (SRC-1/TIF2 et CBP/p300). La transactivation par RAR-RXR sur un élément DR5 requiert la dissociation d'un corépresseur des récepteurs nucléaires, et le recrutement de coactivateurs (Glass *et al*, 1997; Minucci et Ozato, 1996). Sur un élément DR1, N-CoR reste associé avec l'hétérodimère même en présence de ligand RAR, avec comme conséquence une répression constitutive (Kurokawa *et al*, 1995).

Le complexe récepteur-ligand-coactivateur ainsi formé va agir sur la machinerie transcriptionnelle par l'intermédiaire de Facteurs Intermédiaires de Transcription (TIFs). Les récepteurs se lient à la TBP et la TAF<sub>II</sub>110 dans le complexe TFIID selon un processus ligand-dépendant et au TFIIB (Minucci et Ozato, 1996 ; Chambon *et al*, 1996) (Figure 16).

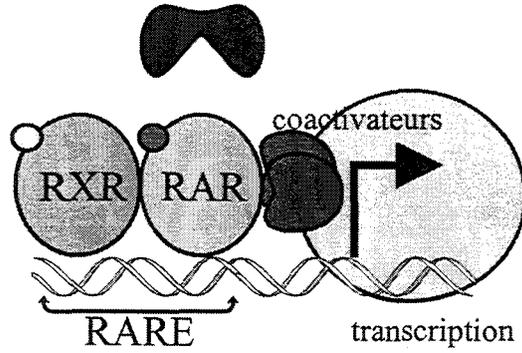
pas de ligand



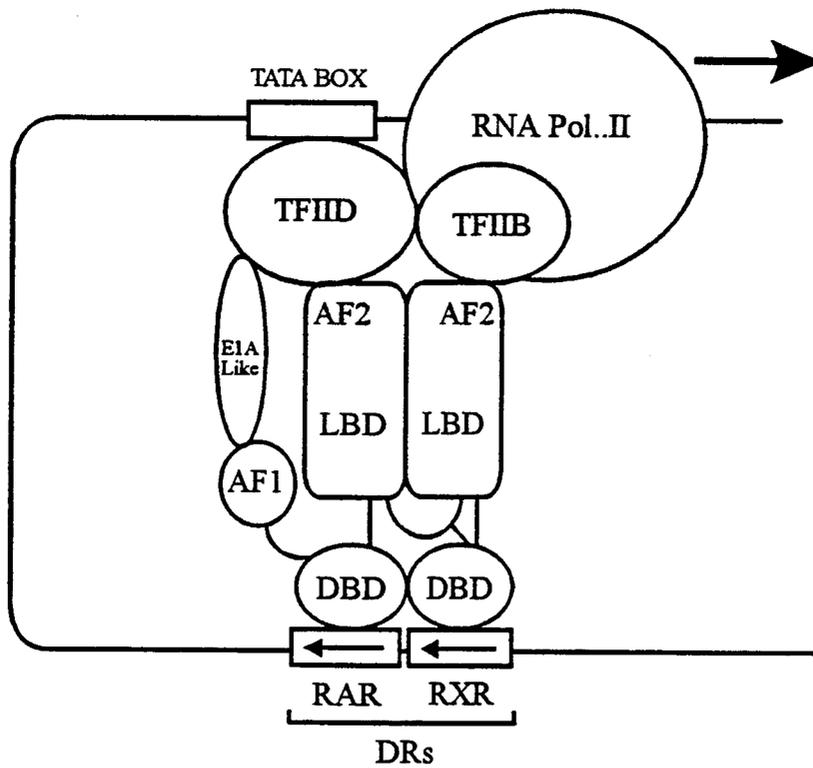
un ligand



deux ligands



**Figure 15: Modèle de régulation de l'activité de transcription par un RXR-RAR et interaction avec les corépresseurs et coactivateurs.**  
(D'après Minucci et Ozato, 1996)



**Figure 16: Modèle illustrant la stabilisation du complexe de préinitiation de la transcription par l'hétérodimère RXR/RAR.**

(D'après Pfahl *et al.*, 1994)

#### 4) Régulation positive

Les rétinoïdes modulent ainsi l'expression de gènes cibles, dont beaucoup sont impliqués dans le métabolisme des lipides, des acides gras et des sucres. Plus frappante est l'autorégulation par les rétinoïdes des voies de signalisation de la vitamine A. Leurs cibles incluent les protéines liant les rétinoïdes et les enzymes impliqués dans le transport et le métabolisme de la vitamine A, aussi bien que les RARs. Des RAREs sont en effet présents dans de nombreux gènes codant les récepteurs et les transporteurs de l'AR (hRAR $\beta$ 2, hRAR $\alpha$ 2, hRAR $\gamma$ 2, mCRBPI, mCRABPII). Il en va de même pour les RXREs (mCRBPII) (Mangelsdorf *et al*, 1991).

#### 5) Modulation croisée

La découverte de modulations croisées introduit un niveau de complexité supplémentaire dans les voies de signalisation par les rétinoïdes. Ainsi la transcription des gènes codant la stromélysine, la collagénase et le TGF $\beta$ 1 est inhibée par l'ARt (Nicholson *et al*, 1990 ; Lafyatis *et al*, 1990). Cette inhibition passe par la répression des sites AP1 dans les promoteurs de ces gènes. Le complexe AP1 est formé d'un dimère de facteurs de transcription c-fos et c-jun. La surexpression de RAR augmente cette répression des sites AP1. RAR ne se fixe pas sur ces sites et réciproquement la surexpression de c-jun ou de c-fos inhibe l'activation des gènes contenant un RARE (Yang-Yen *et al*, 1991). Ces données suggèrent une interaction protéine-protéine entre les récepteurs de l'acide rétinoïque et ces facteurs du complexe AP1.

Cette modulation croisée négative établit un lien entre les signaux de transduction par les récepteurs nucléaires et ceux transduits par les récepteurs associés aux membranes et qui sont connus pour contrôler l'activité AP1 (Chambon *et al*, 1996).

Cette réaction croisée est actuellement exploitée pour la synthèse de nouveaux rétinoïdes qui restent inhibiteurs du complexe AP1 alors qu'ils sont capables d'activer RAR et RXR (Chen *et al*, 1995). Ces ligands posséderaient donc des effets anti-prolifératifs sans les effets secondaires des rétinoïdes.

#### d) Rôle des différents récepteurs

Les effets pléiotropiques des rétinoïdes peuvent être en partie expliqués par la répartition très large des RARs et des RXRs dans l'organisme. L'expression des différents récepteurs diffère du point de vue spatiotemporel. De plus, la conservation des différentes formes de RARs et de RXRs lors de l'évolution des espèces laisse penser qu'ils doivent être impliqués dans le contrôle de réponses biologiques différentes.

Des études par inactivation de gènes par recombinaison homologe "knock-out" révèlent l'existence d'une certaine redondance fonctionnelle entre les trois sous-types de RARs( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (Luo *et*

*al*, 1995). Ainsi, par exemple, la surexpression dans des cellules en culture déplétées en RAR $\gamma$  de RAR $\alpha$  ou de RAR $\beta$  restaure tout ou partie des fonctions altérées de ces cellules (Taneja *et al*, 1995). Le knock-out des gènes codant les RXRs a aussi été réalisé. Il montre une redondance fonctionnelle encore plus importante que pour les RARs. Ainsi, une seule copie d'un RXR $\alpha$  et d'un RXR $\beta$  est suffisante pour la réalisation d'un grand nombre de fonctions dépendantes des RXRs (Krezel *et al*, 1996).

Cependant, en utilisant une approche différente avec des ligands spécifiques d'un sous-type de RAR, Taneja *et al* (1996) ont montré que les redondances fonctionnelles dans l'induction d'un gène cible de l'AR diffèrent selon le type cellulaire, et si les cellules ont été déplétées pour un sous-type de RAR.

Plusieurs conclusions sont à tirer de cette seconde approche sur la redondance fonctionnelle des récepteurs de l'AR.

Dans le cas où les trois RARs possèdent la capacité d'induire un gène cible pour l'AR, l'implication réelle d'un RAR donné dans cette induction dépend du type cellulaire et du contexte du promoteur, probablement du fait de l'existence de facteurs spécifiques du type cellulaire ou d'un promoteur. De plus, un RAR donné peut surpasser les autres RARs dans l'induction d'un gène cible dans un type cellulaire donné, même si en l'absence de ce RAR "dominant" ces RARs sont actifs. Donc, les redondances fonctionnelles observées pour les RARs dans les études de mutants RARs peuvent refléter au moins dans certains cas une situation non physiologique créée par le "knock-out". En d'autres termes, même si les RARs peuvent se substituer les uns aux autres après inactivation de l'un d'entre eux, cela ne prouve pas qu'ils soient effectivement redondants dans les conditions normales, de l'état «sauvage».

#### **e) Les rétinoïdes de synthèse, un outil**

L'utilisation de l'acide rétinoïque dans le traitement de certaines affections cutanées ou cancéreuses, tant dans le domaine de la chimiothérapie que dans celui de la chimioprévention de certains cancers, explique les efforts considérables réalisés dans le développement de nouvelles molécules à activité rétinoïde.

On a vu que les récepteurs de l'acide rétinoïque présentent suffisamment de différences dans le domaine E pour envisager la synthèse de ligands spécifiques d'une isoforme d'un RAR ou d'un RXR. La plupart de ces composés ont été synthétisés par un demi douzaine de laboratoires, appartenant soit à une Université, M.Dawson (Mento Park, Californie, USA) et K.Shudo (Tokyo, Japon), soit à l'industrie pharmaceutique, Hoffmann-La Roche (Bâle, Suisse) et CIRD Galderma (Sophia-Antipolis, France), industrie avec laquelle nous collaborons, ainsi que plus récemment Allergan Ligand et Bristol Meyers Squibb.

Trois générations de rétinoïdes de synthèses ont été développées :

- les rétinoïdes de première génération proviennent de la modification de l'extrémité polaire de la chaîne latérale polyénique de l'acide rétinoïque.

- les rétinoïdes de deuxième génération résultent de la modification de l'extrémité cyclique de la vitamine A par divers cycles ou hétérocycles, substitués ou non.

- les rétinoïdes de troisième génération, actuellement en expansion, regroupent les dérivés présentant différentes formes de cyclisation englobant tout ou partie de la chaîne polyénique.

Les rétinoïdes de synthèse actuels présentent des motifs structuraux très différents des rétinoïdes naturels. Le terme rétinoïde définit, en fait, toute substance capable d'induire une réponse spécifique via sa liaison aux récepteurs de l'acide rétinoïque (Sporn et Roberts, 1985).

Les ligands spécifiques fournissent des outils d'étude des récepteurs qui permettent de disséquer les différents effets induits par les rétinoïdes *in vivo*.

Dans ce domaine ont été développés des rétinoïdes de synthèse spécifiques des RXRs (Lehmann *et al*, 1993) et de chaque forme de RARs (Delescluse *et al*, 1991; Martin *et al*, 1992). Il existe aussi des anti rétinoïdes des récepteurs RAR $\alpha$  (Apfel *et al*, 1992), RAR $\beta$  et  $\gamma$  (Eyrolles *et al*, 1994) ou des RXRs, ainsi que des rétinoïdes présentant une dissociation des activités de transactivation et d'inhibition de la transcription via la voie AP1 (Fanjul *et al*, 1994 ; Chen *et al*, 1995 ; Nagpal *et al*, 1995) (Figure 17).

Ces rétinoïdes nous ont permis de préciser l'implication respective des RARs et des RXRs dans notre modèle cellulaire. La même approche a été utilisée avec succès dans d'autres modèles *in vitro* (Davis *et al*, 1994, Sofanova *et al*, 1994, Beard *et al*, 1995; Boehm *et al*, 1995, Yang *et al*, 1995) et a permis de documenter le rôle des RXRs *in vivo* (Allegreto *et al*, 1995).

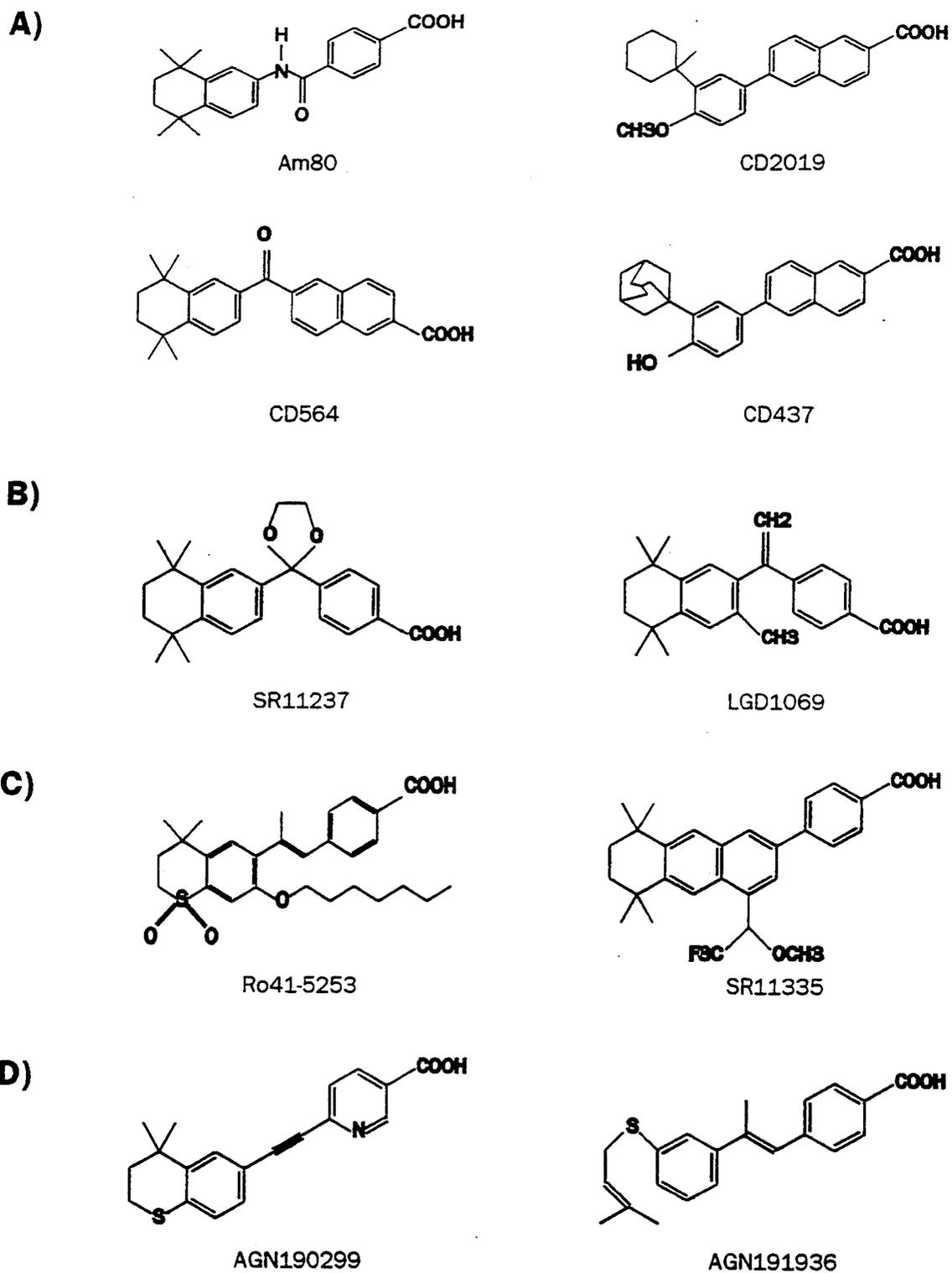
## **B. Les rétinoïdes régulent la transglutaminase de tissu**

### **I. L'acide rétinoïque induit la transglutaminase de tissu**

L'expression de la transglutaminase de tissu est augmentée par l'acide rétinoïque *in vivo* (Tableau XII) et *in vitro* (Tableau XIII) dans une grande variété de types cellulaires normaux et néoplasiques.

Chez des rats rendus déficients en vitamine A, la déplétion des réserves de rétinoïdes endogènes provoque une suppression générale de l'activité TGt dans les poumons, le foie et la trachée (Verma *et al*, 1992), qui peut être rapidement restaurée par l'administration d'ARtt. Ces effets peuvent être reproduits *in vitro* (Davies *et al*, 1991). Cette régulation de la TGt par l'ARtt s'observe au niveau de l'activité enzymatique, de la protéine et de l'ARNm.

Un traitement par la cycloheximide, un inhibiteur de la traduction, n'empêche pas l'induction des ARNm de la TGt par l'ARtt, suggérant que ce contrôle est direct et ne nécessite pas la synthèse de



**Figure 17:** Exemples de rétinoïdes de synthèse sélectifs de RARs (A), RXRs (B), à activités antirétinoïdes (C) et de dérivés présentant des activités transactivatrices et anti AP1 dissociées (D).

<b>Tissus/ cellules</b>	<b>Espèces</b>	<b>Références</b>
foie	rat	Piacentini et al, 1988, 1992 Verma et al, 1992
poumon	rat	Verma et al, 1992
trachée	rat	Verma et al, 1992
macrophages péritonéaux	souris	Metha et al, 1986
bourgeon du membre	souris	Jiang et al, 1992
thymus	souris	Szondy et al, 1997

**Tableau XII : Induction *in vivo* de la transglutaminase de tissu par les rétinoïdes.**

Sources	Lignées cellulaires	Espèces	Références
leucémie myéloïde	HL-60	homme	Nagy et al, 1996 Davies et al, 1985, 1988 Murtaugh et al, 1984, 1986 Maddox et Haddox, 1988 Chiocca et al, 1989 Defacque et al, 1995
leucémie myéloïde	U937	homme	Defacque et al, 1995
leucémie myéloïde	THP-1	homme	Mehta et al, 1986 Defacque et al, 1995
érythroleucémie	HEL	homme	Suedhoff et al, 1990 Fraj et al, 1992, 1996
adénocarcinome	HeLa-TV	homme	Piacentini et al, 1991 Singh et Cerione, 1996
neuroblastome	SK-N-BE	homme	Melino et al, 1988, 1994 Piacentini et al, 1991, 1992
carcinome de poumon	NCI-HUT-460	homme	Vollberg et al, 1992
monocytes	/	homme	Ientile et al, 1992
hépatome	McA-RH7777 McA-RH8994	rat	Fukuda et al, 1994
cellules épithéliales de trachée	2C5 SPOC-1	rat	Denning et Verma, 1991 Zhang et al, 1995
hépatocytes	/	rat	Piacentini et al, 1992
melanome	S91	souris	Scott et al, 1982
fibroblastes	NIH-3T3	souris	Cai et al, 1991
macrophages	/	souris	Murtaugh et al, 1986 Chiocca et al, 1988, 1989 Moore et al, 1984 Ishii et Ui, 1994
thymocytes	/	souris	Szondy et al, 1997
cellules épidermales	PAM212	souris	Lee et al, 1989 Yuspa et al, 1982
cellules d'ovaire	CHO	hamster	Scott et al, 1982
cellules endothéliales	/	boeuf	Nara et al, 1989
cellules épithéliales de trachée	/	lapin	Jetten et al, 1986
cellules myéloïdes			Moore et al, 1990
kératinocytes			Litchi et al, 1985

**Tableau XIII : Induction *in vitro* de la transglutaminase de tissu par les rétinoïdes.**

protéines intermédiaires (Chiocca *et al*, 1988 ; Suedhoff *et al*, 1990 ; Benedetti *et al*, 1996). Ce traitement inhibe cependant l'activité enzymatique indiquant que l'ARtt induirait une néosynthèse de la TGt (Ando *et al*, 1996).

Le traitement par l'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription, a pour effet d'inhiber l'activité transglutaminase induite par l'ARtt (Ando *et al*, 1996), et montre que l'ARtt n'a pas d'effet sur la stabilisation des messagers (Chiocca *et al*, 1988).

Le contrôle transcriptionnel de la TGt par l'ARtt a été démontré dans les macrophages et les cellules endothéliales de souris par la technique de « run-on » (Chiocca *et al*, 1988, 1989).

L'ARtt régule donc directement la synthèse *de novo* de la TGt par le contrôle de la transcription du gène de la TGt.

L'ARtt régule aussi positivement les TGt homologues TGH et TGH2, dont il augmente l'expression des ARNm dans les cellules d'érythroleucémie humaine HEL (Fraij *et al*, 1992, 1996).

L'AR augmente aussi la capacité de la TGt à fixer le GTP (Singh et Cerione, 1996).

## **II. Modulation de l'induction par l'acide rétinoïque de l'expression de la transglutaminase de tissu**

### **a) Effet de l'AMPc**

Alors que seul il possède peu d'effet, l'AMPc potentialise l'induction de l'activité TGt par l'ARtt dans plusieurs modèles comme les macrophages péritonéaux de souris (Murtaugh *et al*, 1986), les cellules de leucémies humaines monocytaires THP-1 (Mehta *et al*, 1986) ou myéloblastiques et promyélocytaires HL-60 (Davies *et al*, 1985 ; Maddox et Haddox, 1988).

### **b) Effet des glucocorticoïdes**

La dexaméthasone (DEX) possède des effets opposés sur l'expression de la TGt selon le type cellulaire étudié. Ainsi elle potentialise l'induction de l'enzyme par l'ARtt dans les cellules d'hépatome de rat McA-RH7777 et McA-RH8994 (Fukuda *et al*, 1994) alors qu'elle la réprime dans les cellules HL-60 (Manechez *et al*, 1991).

### **c) Effet de la 1 $\alpha$ ,25 dihydroxyvitamine D3**

La combinaison de la 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>-VitD<sub>3</sub>, un dérivé actif de la vitamine D, avec l'ARtt provoque un effet synergique sur l'induction de la TGt dans les cellules épidermales de souris PAM 212. (Lee *et al*, 1989) et les macrophages péritonéaux de souris (Ishii et Ui, 1994).

Dans les cellules de leucémie myéloïde U937 la 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>-VitD<sub>3</sub> potentialise tardivement (à 48 heures) l'induction par l'ARtt de la TGt. Par contre elle reste sans effets sur les cellules HL-60 ou THP-1 (Defacque *et al*, 1995). Cette différence est probablement due au contexte cellulaire. Ainsi

la  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}_3$  induit l'expression de  $\text{RXR}\alpha$  dans les U937, mais pas dans les deux autres lignées cellulaires (Defacque *et al*, 1995).

#### **d) Effet de l' $\alpha$ -difluorométhylornithine**

L' $\alpha$ -difluorométhylornithine (DFMO), un inhibiteur de l'ornithine décarboxylase, enzyme impliqué dans la biosynthèse des polyamines, réduit l'activité TGt induite par l'ARtt dans les cellules humaines d'adénocarcinome HeLa-TV, de neuroblastome SK-N-BE ou les monocytes du sang périphérique (Melino *et al*, 1988 ; Ientile *et al*, 1992 ; Piacentini *et al*, 1991). L'addition de polyamine telle que la putrescine ou la spermidine peut réverser l'effet du DFMO (Melino *et al*, 1988 ; Ientile *et al*, 1992). Ces résultats suggèrent que l'induction de la TGt par l'ARtt peut être modulée par la disponibilité de substrats comme les polyamines.

La voie de contrôle par les rétinoïdes de la TGt s'ajoute donc à d'autres voies de contrôle qui peuvent moduler celle de l'ARtt, et il semble que la présence de substrats influence aussi cette voie.

### **III.Éléments de réponse aux rétinoïdes dans les régions promotrices de la transglutaminase de tissu**

#### **a) Les promoteurs de l'homme et du cochon d'Inde**

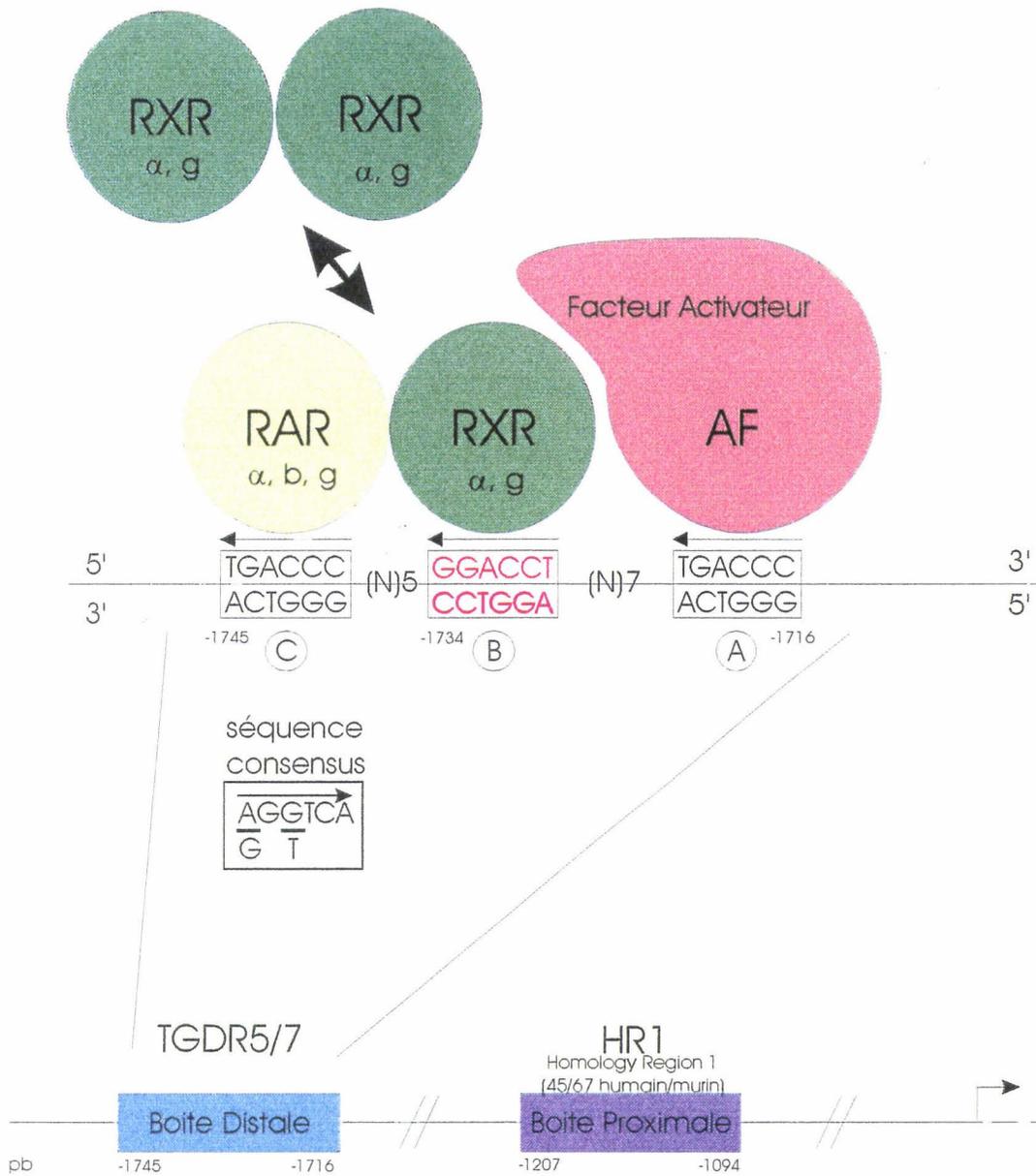
Des études sur les régions promotrices du gène codant la TGt ont été menées dans le but d'élucider le mécanisme moléculaire d'action des rétinoïdes sur cet enzyme.

Une séquence de 1,7 kb chez l'homme et de 2 kb chez le cochon d'Inde, en amont du site d'initiation de la transcription du gène de la TGt ont été clonées (Lu *et al*, 1995 ; Suto *et al*, 1993). Elles ne comportent pas d'éléments de réponse aux rétinoïdes, ni RARE, ni RXRE. Ces deux séquences se comportent comme un promoteur constitutif, laissant supposer l'existence d'éléments régulateurs négatifs.

L'ARtt induit l'activité TGt dans les cellules 3T3. Cependant il n'y pas d'induction dépendante des rétinoïdes de la séquence clonée du promoteur humain transfecté dans ces mêmes cellules (Lu *et al*, 1995). Cette observation suppose que les éléments du gène de la TGt humaine régulés par l'ARtt ne soient pas localisés dans le fragment de 1,7 kb et doivent se trouver plus en amont ou en aval de cette séquence. Il a été cloné un RARE dans le promoteur du gène de l'activateur du plasminogène humain à 7 kb en amont du site d'initiation de la transcription (Bullens *et al*, 1995).

#### **b) Le promoteur de la souris**

Les rétinoïdes régulent l'expression du gène murin de la TGt via l'activation d'éléments régulateurs contenus dans les 4 kb en amont du gène (Figure 18). Des études de cotransfections



			Liaison RAR-RXR	RA Transactivation	Transactivation	
C	B	A	-	-	9 cis RA	++
C	B	A	-	-	TINPB	+
C	B	A	-	-	LGD1069	+
C	B	A	+	+	TINPB + LGD1069	++

○ répétition mutée

**Figure 18:** Élément de réponse aux rétinoïdes versatile (DR5/7) dans la région promotrice du gène de la transglutaminase de tissu murine

(D'après Nagy *et al*, 1996; Yan *et al*, 1996)

réalisées avec les vecteurs d'expression des récepteurs des rétinoïdes dans les cellules CV-1, montrent que le promoteur murin de la TGt est induit par l'activation ligand-dépendante, soit d'un hétérodimère RAR-RXR, soit d'un homodimère RXR-RXR. Le promoteur CRABP II murin est versatile dans sa réponse aux rétinoïdes. Il peut être activé par des ligands sélectifs des RARs, mais son activité est maximale avec des panagonistes des récepteurs rétinoïdes qui lient les deux types de récepteurs RAR et RXR (Durand *et al*, 1992). De même, pour le promoteur TGt murin, l'induction optimale est obtenue avec les panagonistes des récepteurs rétinoïdes ; une activation partielle pouvant être obtenue avec un rétinoïde soit spécifique des RAR, soit spécifique des RXR (Nagy *et al*, 1996), suggérant que les voies de signalisation RAR ou RXR peuvent réguler l'expression de l'enzyme (Zhang *et al*, 1995; Beard *et al*, 1995). L'activation dépendante des rétinoïdes du promoteur murin de la TGt dépend d'une région régulatrice proximale HR1, localisée entre -1,2 et -1,1 kb, contenant des séquences fortement conservées (surconservées) entre les promoteurs humain et murin, et d'une région distale localisée à -1,7 kb, qui inclut un élément de réponse aux rétinoïdes versatile de 30 pb (mTGRRE1 Nagy *et al*, 1996 ou TGRARE Yan *et al*, 1996). mTGRRE1 contient trois demi-sites hexanucléotidiques (2 canoniques et un non canonique) en répétition directe dans un motif DR7/DR5 qui lie les hétérodimères RAR-RXR et les homodimères RXR-RXR. Il existe un espace de 7 pb entre le premier et le second hexanucléotide (A et B) et un espace de 5 pb entre le second et le troisième hexanucléotide (B et C). Des expériences de retard sur gel montrent que la liaison des récepteurs sur cet élément est due aux deux séquences répétées séparées de 5 pb, les répétitions B et C. Cependant des expériences de transactivation montrent que si l'on supprime la séquence de l'hexanucléotide A, on perd la transactivation par l'acide rétinoïque. Les répétitions B et C qui constituent le DR5, sont donc suffisantes pour la liaison des récepteurs, mais l'activité de transactivation requiert les trois répétitions hexanucléotidiques.

Plusieurs familles de récepteurs orphelins sont connues pour se lier probablement sous forme de monomère à des éléments de séquence constitués essentiellement de demi-sites consensus pour les récepteurs nucléaires. Une protéine similaire se fixe peut être sur la répétition hexanucléotidique A du mTGRRE1 comme un facteur accessoire pour l'hétérodimère lié aux répétitions B et C (Yan *et al*, 1996). Il est fort probable que cet élément de réponse joue un rôle crucial *in vivo* dans la régulation de l'enzyme par l'ARTt.

#### **IV. Dissection par les rétinoïdes de synthèse des voies de contrôle de l'expression de la transglutaminase de tissu**

Plusieurs voies de régulation par les rétinoïdes de l'expression de la TGt ont été mises à jour grâce à une approche par les rétinoïdes de synthèse sélectifs, agonistes ou antagonistes d'une classe (RARs ou RXRs) ou d'une sous classe (RAR $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ).

### **a) La voie RAR $\alpha$ des cellules de rat SPOC-1**

Les cellules épithéliales de trachée de rat SPOC-1 expriment les récepteurs des rétinoïdes RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  et RXR $\beta$ . L'expression de la TGt est induite par l'ARtt dans ces cellules. Un rétinoïde sélectif de la classe RAR induit l'expression de l'enzyme alors qu'un ligand sélectif de la classe RXR est sans effet, suggérant un contrôle dépendant de la voie RAR. De plus un ligand sélectif de la sous-classe RAR $\alpha$ , mais pas RAR $\gamma$ , induit l'expression de l'enzyme. Cette induction par le rétinoïde sélectif RAR $\alpha$  peut être inhibée par l'utilisation d'un antagoniste de RAR $\alpha$  ou par la surexpression du gène RAR $\alpha$  tronqué avec une activité dominante négative. Le contrôle de l'expression de la TGt dans les cellules SPOC-1 de rat par les rétinoïdes passe donc par le RAR $\alpha$  (Zhang *et al*, 1995).

### **b) L'étude de la lignée HL-60 et de ses sous-clones : une voie controversée**

La voie de contrôle par les rétinoïdes de l'expression de la TGt dans la lignée cellulaire HL-60 est plus controversée. En effet, des voies différentes ont été décrites.

La lignée cellulaire HL-60 originelle (catalogue ATCC CCL240) exprime trois récepteurs des rétinoïdes : RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$  et RXR $\beta$ . Nagy *et al* (1996) montrent une induction de l'activité enzymatique par traitement de ces cellules avec un ligand RAR sélectif, un ligand RXR sélectif, suggérant que les deux voies de contrôle sont possibles. Cependant d'autres auteurs ne retrouvent dans le clone HL-60 cdm-1 que la voie RXR impliquée dans le contrôle de la TGt (Beard *et al*; 1995 ; Boehm *et al*, 1995). Le même ligand de la classe RAR (le TTNPB) lorsqu'il est employé par Nagy se révèle incapable d'induire l'expression de l'enzyme dans ce clone (Boehm *et al*, 1995). Les cellules du clone HL-60R ne répondent plus aux rétinoïdes par suite de la perte de fonctionnalité de leurs récepteurs, abrogée par une mutation transdominante négative. Dans ces HL-60R, lorsque l'on transfecte un vecteur d'expression comprenant les récepteurs RAR $\alpha$  ou RXR $\alpha$ , seule la transfection de RXR $\alpha$  permet de restaurer l'induction par les rétinoïdes de l'expression de la TGt, ce qui suggère de nouveau l'implication de cette voie (Metha *et al*, 1996).

Il semble donc que les voies de signalisation varient dans un même type de cellules (HL-60) selon le clone utilisé (CCL 240 ou cdm-1 et R), en fonction du contexte cellulaire différent dans chaque clone.

### **c) La voie PML-RAR $\alpha$ dans les cellules de leucémie aiguë à promyélocytes**

La leucémie aiguë promyélocytaire (APL) est associée à une translocation chromosomique réciproque t(15,17) qui fusionne le gène PML avec le gène codant RAR $\alpha$  et donne un produit PML-RAR $\alpha$  capable de lier l'ARtt et d'agir comme un facteur de transcription dépendant de l'ARtt. Le traitement à l'ARtt induit l'expression de la TGt dans les cellules portant la translocation t(15,17) et exprimant le produit PML-RAR $\alpha$ , comme les cellules de la lignée NB4 dérivées d'une APL ou les

cellules isolées de patients. Les cellules NB4 expriment les récepteurs de l'acide rétinoïque : PML-RAR $\alpha$ , RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  et RXR $\beta$ . L'ARtt n'induit cependant pas la TGt dans les cellules NB4.306, un sous-clone NB4 résistant aux rétinoïdes qui exprime un PML-RAR $\alpha$  altéré ou les cellules de patients atteints d'une APL mais ne comportant pas la translocation t(15,17). L'utilisation de ligands sélectifs permet de montrer une induction de la TGt dans les cellules NB4 par RAR ou RAR $\alpha$ , mais pas avec un ligand RXR ou RAR $\gamma$ . De plus, un antagoniste RAR $\alpha$  inhibe l'induction de l'enzyme par ces ligands. Ces résultats suggèrent une implication de PML-RAR $\alpha$  dans la voie de contrôle par les rétinoïdes de l'expression de la TGt. La transfection du gène PML-RAR $\alpha$  dans des cellules de leucémie myélomonocytaire U937 qui, bien qu'exprimant RAR $\alpha$ , n'induisent pas la TGt en réponse à un traitement par l'ARtt, leur donne la capacité d'induire l'enzyme en réponse à un traitement à l'ARtt (Benedetti *et al*, 1996).

Il semble donc que dans les cellules APL, l'induction de la TGt par les rétinoïdes passe par PML-RAR $\alpha$  et non RAR $\alpha$ .

#### **d) La voie RAR $\gamma$ des thymocytes**

L'ARtt et 9cisAR induisent la TGt dans les thymocytes de souris en culture *ex-vivo*, le 9cisAR étant 50 fois plus efficace. L'induction de la TGt passe par RAR $\gamma$  car le phénomène peut être reproduit avec un ligand RAR $\gamma$  sélectif et peut être inhibé par un antagoniste RAR $\gamma$ . *In vivo*, l'administration de ligand RAR $\gamma$  provoque une involution du thymus et une induction de la TGt. En utilisant divers ligands agonistes et antagonistes RAR et RXR, il est démontré que RAR $\alpha$  inhibe la voie RAR $\gamma$ , ce qui explique le manque d'effet de l'ARtt à des concentrations physiologiques, et la costimulation du RXR peut neutraliser cet effet inhibiteur, ce qui explique l'effet inducteur du 9cisAR (Szondy *et al*, 1997).

On constate donc que les voies de contrôle de l'expression de la TGt par les rétinoïdes diffèrent selon les espèces, les origines cellulaires, les sous-clones utilisés, les récepteurs de l'acide rétinoïque exprimés, la pathologie,...

## **La transglutaminase de tissu effecteur de l'apoptose**

### **A. Apoptose**

#### **I. Historique et définition**

On a longtemps considéré que la mort cellulaire était un processus accidentel résultant toujours d'une lésion de la cellule. Le phénomène de mort cellulaire programmée a été décrit la

première fois par Lockshin et Williams (1964), Lockshin (1969) dans des modèles aussi différents que la métamorphose de l'insecte ou l'embryogenèse du poulet.

La mort d'une cellule, si elle n'est pas accidentelle à la suite d'une agression sévère, peut être sous le contrôle d'un programme. Dans ce cas, elle obéit à un programme génétique bien défini d'où le nom de mort cellulaire programmée (MCP). Dictée par les propres composants de la cellule, cette mort naturelle est également appelée suicide cellulaire ou apoptose. L'apoptose est un terme dérivé de l'ancien grec désignant la chute des feuilles en automne (Kerr *et al*, 1972). Ce dernier terme, introduit par Kerr *et al*, à une connotation restrictive, car il décrit un type de mort cellulaire présentant des critères morphologiques particuliers (Kerr *et al*, 1972 ; Whyllie *et al*, 1980).

Les termes "mort cellulaire programmée" et "apoptose" sont souvent utilisés pour désigner le même concept, alors qu'ils désignent deux notions différentes. La mort cellulaire programmée est une mort naturelle, ou mort physiologique. Le terme apoptose désigne un ensemble de phénomènes cellulaires qui sont associés à la mort physiologique de la cellule.

## **II. Rôles biologiques de l'apoptose**

L'apoptose est aujourd'hui considérée comme un mécanisme paradoxalement vital pour l'harmonie des organismes multicellulaires. Ses rouages essentiels semblent avoir été largement préservés au cours de l'évolution. Elle joue un rôle dans les processus biologiques fondamentaux suivants (pour revue : Steller, 1995):

- le développement embryonnaire et foetal. Le développement normal d'un organe s'effectue non par modelage, mais par sculpture. Les cellules sont produites en excès, puis une partie meurt pour permettre l'élaboration définitive de l'organe.
- l'élaboration du système immunitaire. L'apoptose intervient dans la sélection thymique, qui consiste à supprimer les lymphocytes T qui reconnaissent le soi pour ne garder que ce qui reconnaissent le non soi.
- l'organisation du système nerveux central. Dans la synaptogenèse, plus de la moitié des neurones meurent par apoptose.
- le remodelage de tissus hormonoinductible. L'apoptose permet la régression des hyperplasies tissulaires physiologiques comme l'involution de l'utérus après la grossesse ou des glandes mammaires après la lactation.
- l'hématopoïèse. Dans la moelle osseuse ou dans le sang périphérique l'apoptose permet un renouvellement des cellules.
- la suppression de cellules nuisibles. L'apoptose est un mécanisme de défense efficace qui permet de lutter contre l'infection virale, en détruisant la cellule infectée.
- le maintien de l'homéostasie tissulaire de divers tissus.

### III. Dérégulation de l'apoptose

On pouvait donc s'attendre à ce que toute dérégulation de ce programme de mort ait des conséquences néfastes sur l'organisme. On en a aujourd'hui la preuve grâce à des travaux, de plus en plus nombreux, mettant en cause de telles perturbations dans plusieurs maladies chez l'homme (pour revue : Thompson *et al*, 1995). L'apoptose est réprimée dans le cas de certains cancers, certaines pathologies auto-immunes ou virales, et activée au contraire dans le SIDA et certaines maladies neurodégénératives. La mort cellulaire programmée pourrait devenir une cible de choix pour les traitements à venir.

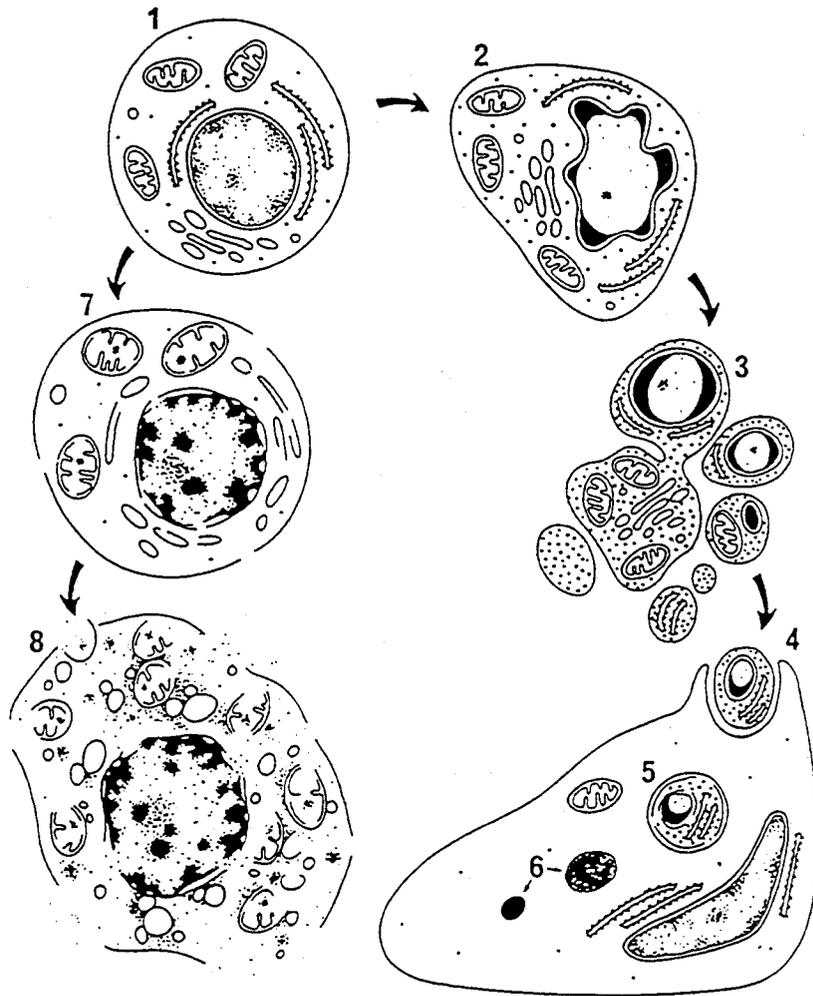
### IV. Caractéristiques morphologiques

L'exécution du programme de mort par apoptose d'une cellule est associée à des changements morphologiques (Whyllie *et al*, 1980) (Figure 19).

Dans la phase initiale, au sein d'un tissu, la cellule perd le contact avec ses voisines. Le noyau se condense et se fragmente, la chromatine formant des croissants à la périphérie de la membrane nucléaire. L'ADN nucléaire est dégradé en fragments qui sont généralement des multiples de 180~200 pb (la longueur d'un nucléosome), ce qui donne en gel d'électrophorèse un aspect caractéristique en « échelle ». Puis le cytoplasme se condense, provoquant une invagination de la membrane plasmique; une perte du volume cellulaire ainsi qu'une augmentation de la concentration protéique. L'intégrité des organites, comme les mitochondries, est conservée, bien que le réticulum endoplasmique devienne dilaté, contrairement à ce qui se passe dans la nécrose. S'ensuit une fragmentation cytoplasmique avec génération de fragments cellulaires : les corps apoptotiques, qui renferment des organites intracellulaires et des fragments nucléaires. Ces corps apoptotiques sont phagocytés par les cellules environnantes et dégradés complètement dans les phagosomes. L'apoptose se déroule sans libération de molécule intracellulaire. Contrairement à la mort cellulaire par nécrose, la mort cellulaire apoptotique n'induit pas de réponse inflammatoire. De plus, il ne se produit pas de dommages secondaires dans les cellules adjacentes, ni des phénomènes de cicatrisation.

La nécrose cellulaire diffère de l'apoptose par un cytoplasme différent en microscopie électronique, le gonflement des mitochondries, la perte d'intégrité de la membrane plasmique, pas de changement morphologique drastique du noyau. La nécrose est considérée comme un phénomène dégénératif passif induit directement par des toxiques ou par blessure physique, ce qui survient le plus souvent accidentellement (Alison et Sarraf, 1994). L'ADN nucléaire est coupé au hasard suite à dégradation cellulaire. La perte de cytoplasme à travers la membrane plasmique altérée entraîne une réponse inflammatoire.

Seul l'examen de toutes les caractéristiques morphologiques et biochimiques de la cellule permet de conclure, de manière fiable, à la mort par apoptose.



**Figure 19 : Changements morphologiques essentiels dans l'apoptose (à droite) et dans la nécrose (à gauche).**

(D'après Wyllie *et al*, 1980)

- 1) Cellule normale
- 2) Condensation chromatinienne et cytoplasmique d'une cellule en début d'apoptose.
- 3) Fragmentation nucléaire et cellulaire
- 4) Phagocytose d'un corps apoptotique
- 5) Corps apoptotique phagocyté
- 6) Résidu apoptotique (apoptose terminale)
- 7) Gonflement d'une cellule en nécrose
- 8) Eclatement cellulaire

## V. Mécanismes moléculaires

Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose sont bien établies. Il n'en va pas de même des mécanismes moléculaires impliqués, qui ne le sont pas encore. L'apoptose est un phénomène actif qui nécessite la synthèse de macromolécules spécifiques et implique une dépense énergétique. Une augmentation des seconds messagers AMPc et  $Ca^{2+}$  est aussi observée. L'apoptose est régulée par un mécanisme moléculaire conservé durant l'évolution (revue : Steller, 1995) et semble donc être un processus actif dans la suppression des cellules.

### a) Les inducteurs de l'apoptose

L'apoptose peut être déclenchée par toute une variété de signaux extrinsèques et intrinsèques (tableau XIV). De multiples stimuli physiologiques et physico-chimiques inhibent ou activent la mort cellulaire.

Des agents biologiques peuvent induire l'apoptose. Certains facteurs apoptotiques sont des polypeptides qui interagissent avec des récepteurs de la surface cellulaire (exemple : TNF). Ces facteurs induisent l'apoptose via des signaux induits par les seconds messagers. D'autres facteurs apoptotiques sont des molécules lipophiles qui interagissent avec les récepteurs nucléaires (exemple : les glucocorticoïdes ou les rétinoïdes). Ces récepteurs activent la transcription de gènes liés au processus apoptotiques.

L'apoptose peut se développer après la perte des signaux trophiques qui normalement suppriment l'expression du programme de mort. De nombreuses cytokines, hormones et autres stimuli externes préviennent l'apoptose. Comme les facteurs apoptotiques, ces facteurs de survie peuvent agir par les récepteurs de surface cellulaires ou nucléaires. Il semble que la plupart des cellules de Vertébrés soient programmés pour se suicider, si elles ne reçoivent pas constamment ou à intervalles de temps régulier, des facteurs de survie environnementaux (Raff, 1992).

Des agents non physiologiques peuvent aussi induire l'apoptose. Ainsi, les drogues du cytosquelette (colchicine, vinblastine, vincristine), les inhibiteurs de topoisomérase I et II (camptothécine, ectoposide) et les médicaments anticancéreux induisent l'apoptose.

L'apoptose peut aussi être contrôlée par des agents physiques. L'hyperthermie et les radiations ionisantes ( $\gamma$ , UV) induisent une apoptose. La régulation de l'apoptose apparaît donc aussi complexe que celle de la prolifération cellulaire, deux phénomènes qui semblent d'ailleurs soumis aux même type de contrôle. En effet, la majorité des signaux inhibiteurs de l'apoptose stimulent également la prolifération des cellules. Le mode d'action de ces signaux est complexe, leur effet dépend du type cellulaire et de son stade de développement.

<b>Signaux inducteurs de l'apoptose</b>			
<b>activateurs physiologiques</b>	<b>Dommages</b>	<b>Agents thérapeutiques</b>	<b>Toxines</b>
famille TNF (ligand Fas, TNF) TGFβ neurotransmetteurs manque de facteurs de croissance perte d'attachement à la matrice extracellulaire calcium glucocorticoïdes rétinoïdes céramides	choc thermique  infection virale toxines bactériennes  oncogènes (myc, rel, E1A) gènes suppresseur de tumeur (p53)  cellules T cytotoxiques oxydants, radicaux libres, privation d'éléments nutritifs, antimétabolites	agents anticancéreux  Rayon γ Rayon UV	éthanol peptide β-amyloïde
<b>Signaux inhibiteurs de l'apoptose</b>			
<b>Activateurs physiologiques</b>	<b>Gènes viraux</b>	<b>Agents pharmacologiques</b>	
facteurs de croissance matrice extracellulaire ligand CD40 acides aminés neutres zinc oestrogènes androgènes	adénovirus E1B baculovirus p35, IAP virus de la variole crmA virus d'Epstein-Barr BHRF1, LMP1 Virus de la fièvre porcine africaine LMW5-HL virus de l'herpès γ 1.34.5	inhibiteur de la calpaïne inhibiteurs des protéases à cystéine «promoteur » de tumeur	

**Tableau XIV : Signaux inducteurs et inhibiteurs de l'apoptose.**  
(D'après Thompson, 1995).

La grande variété de signaux et de leurs effets ne facilite pas la dissection des mécanismes moléculaires de transmission de ces stimuli et de leur intégration dans la machinerie de la mort cellulaire.

## **b) Les transducteurs**

Un certain nombre de gènes a pu être associé à la mort cellulaire programmée. Ils agissent soit en induisant l'apoptose soit en l'inhibant.

### **1) Régulation génique chez *Caenorhabditis elegans***

La compréhension de la régulation de l'apoptose a grandement bénéficié des études conduites chez le nématode *C. elegans*. Lors du développement embryonnaire normal, 131 des 1090 cellules somatiques qui le constituent, meurent par apoptose. La connaissance de la carte génétique de ce ver a permis d'identifier 14 gènes *ced* (pour "cell death") qui contrôlent ce phénomène. Parmi eux *ced-3*, *ced-4* et *ced-9* semblent jouer un rôle central, les deux premiers étant des régulateurs positifs de l'apoptose dont l'action est contrecarrée par le troisième.

### **2) Les gènes de la famille Bcl-2**

Le gène *bcl-2* a été identifié au point de cassure de la translocation t(14,18) des lymphomes B humains. Le gène *bcl-2* semble avoir le même rôle que le gène *ced-9* trouvé chez le nématode *C. elegans*, qui régule négativement la mort cellulaire. En effet, une surexpression de *bcl-2* inhibe l'apoptose induite dans divers modèles cellulaires.

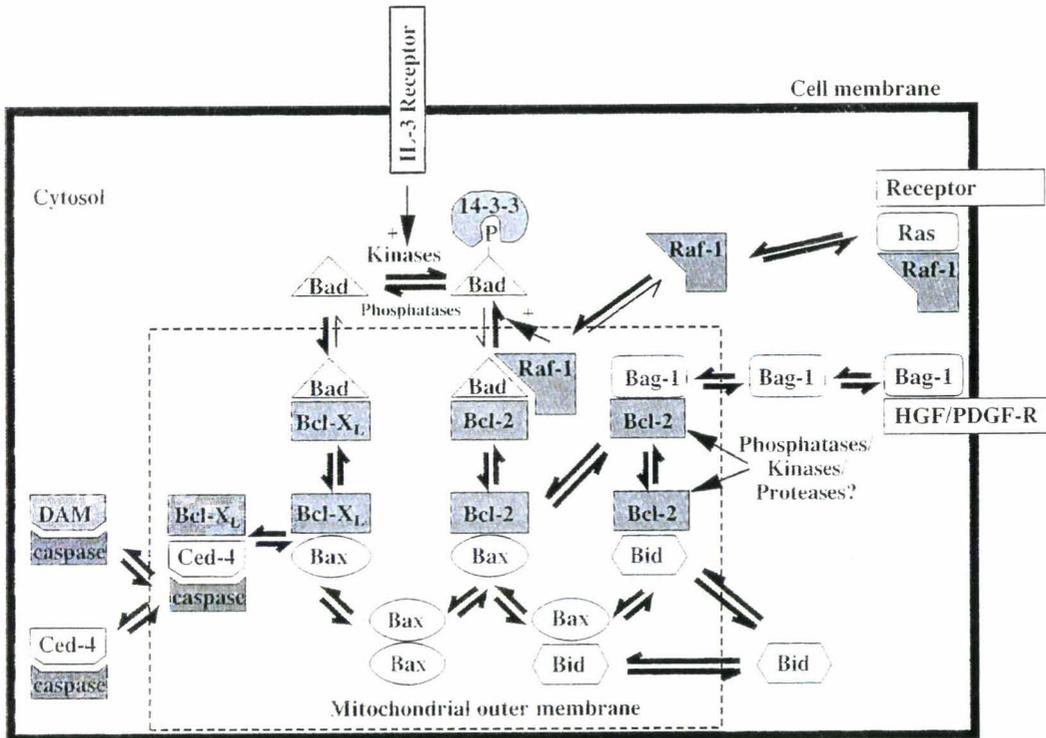
Cependant *bcl-2* n'est pas le seul gène responsable de la résistance à l'apoptose chez les mammifères. La délétion par recombinaison homologue de *bcl-2* chez la souris, n'empêche pas le développement embryonnaire et donne des souriceaux apparemment normaux (Veis *et al*, 1993), bien qu'il y ait par la suite un effondrement du système lymphoïde et une destruction des reins par apoptose. Ces données suggèrent que *bcl-2* ne régule pas seul l'apoptose.

*Bcl-2* est en fait le premier membre d'une famille qui ne cesse de s'agrandir et qui contient des antagonistes de l'apoptose (*Bcl-2*, *Bcl-xl*, *Bcl-w*, *Bfl1*, *Brag-1*, *Mcl-1* et *A1*) et des agonistes de l'apoptose (*Bax*, *Bak*, *Bcl-xs*, *Bad*, *Bid*, *Bik* et *Hik*) (Tableau XV). Les membres de la famille possèdent des quantités variables de domaine BH (*Bcl-2* Homology) (BH1 à BH4) qui déterminent leur capacité à interagir entre elles ou avec d'autres protéines. En outre, la plupart de ses membres possèdent une queue hydrophobe qui leur permet de s'ancrer aux membranes intracellulaires notamment au niveau de la membrane mitochondriale externe, de l'enveloppe nucléaire ou du réticulum endoplasmique.

Deux gènes, *bcl-x* et *bax*, nous ont particulièrement intéressé dans notre travail.

Fonction	
anti-apoptotique	pro-apoptotique
Bcl-2	Bclxs
Bclxl	Bax
A1	Bad
Brag-1	Bak
Bclw	Bid
Bfl1	Bik
Bclxs	Hrk

**Tableau XV: Gènes de la famille Bcl-2.**  
(D'après Thompson, 1995 ; Yang et Korsmeyer ; 1996)



**Figure 20 : Modèle représentant les interactions agoniste-antagoniste de mort entre les membres de la famille Bcl2 et protéines associées.**

(D'après Kroemer *et al*, 1997)

Le gène *bcl-x* donne naissance à deux transcrits par épissage alternatif : *Bcl-xl* qui code pour une protéine qui possède comme *Bcl2*, une fonction anti-apoptotique, et *Bcl-xs* qui code pour une protéine pro-apoptotique tronquée, probablement en piégeant certains substrats ou effecteurs des protéines *Bcl2* ou *Bcl-xl*. Le gène *bax* code pour une protéine pro-apoptotique, qui homodimérise ou hétérodimérise avec *Bcl2* (Zha *et al*, 1996). Ces dimères étant respectivement pro et anti-apoptotiques. Le rapport entre les produits des gènes anti et pro-apoptotiques détermine si une cellule répond à un signal apoptotique. Ce rhéostat est contrôlé, pour une part au moins, par la dimérisation compétitive des agonistes et des antagonistes (Figure 20).

### 3) Autres gènes impliqués dans le contrôle de l'apoptose

#### **p53, c-myc**

Deux protéines jouent un rôle clef dans le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose :

La protéine p53, gardien du génome, qui induit un arrêt des cellules ayant subi des dommages à l'ADN en G1 pour obliger celles-ci à réparer. La p53 diminue l'expression de *Bcl-2* et augmente celle de *bax*, et peut donc conduire à la mort de la cellule si elle ne répare pas son ADN et ne redémarre dans le cycle cellulaire.

La protéine c-myc est, quant à elle, un régulateur de l'apoptose qui intègre le contexte cellulaire, ainsi en absence de facteur de croissance, elle induit l'apoptose alors qu'en présence de ceux-ci, elle induit la prolifération cellulaire (Canman et Kastan, 1995)

#### **Fas/apo1/CD95**

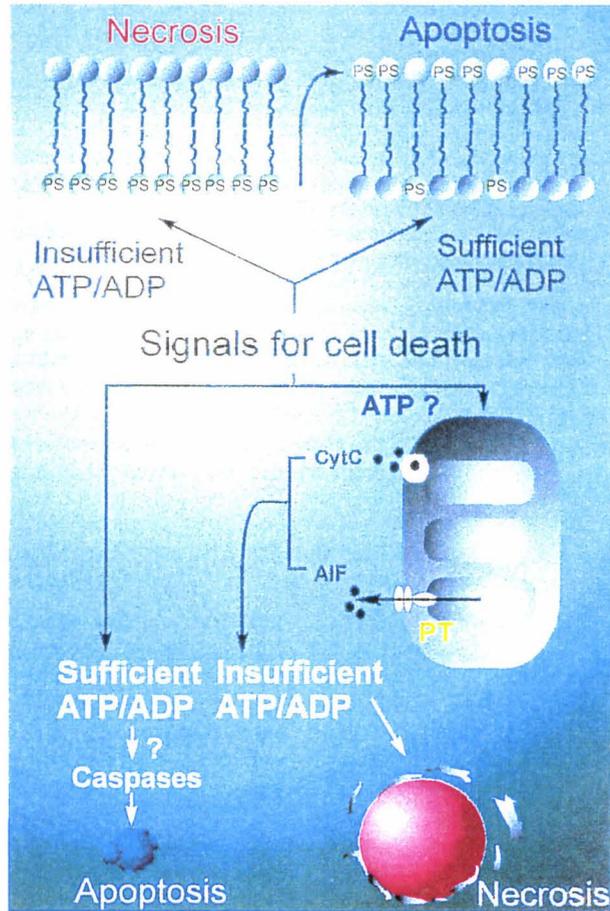
Fas (ou APO1, ou CD95) est une molécule de surface, qui provoque la mort des cellules qui l'exprime lorsqu'elle est reconnue par son ligand (ligand Fas) ou un anticorps. Un grand nombre de tissus expriment Fas, par contre le ligand Fas est une protéine qui s'exprime essentiellement à la surface des lymphocytes T.

### 4) Rôle de la mitochondrie

Au cours des deux dernières années, les données se sont accumulées pour démontrer que la mitochondrie joue un rôle important dans l'apoptose (Figure 21).

La préservation de mitochondries intactes est considérée comme une caractéristique de la mort par apoptose.

Des études indiquent que des agents inducteurs de l'apoptose peuvent déclencher le découplage du transport d'électrons de la production d'ATP, qui conduit à une diminution du potentiel de membrane mitochondriale et une production d'oxygène réactif.



**Figure 21: Signaux mitochondriaux et nécessité de l'ATP dans la mort cellulaire.**

(D'après Nicoreta et Leist, 1997)

PS: phosphatidyl sérine; cyt c: holocytochrome c; AIF: facteur induisant l'apoptose; PT: transition de perméabilité

Kromer *et al* (1995, 1997) suggèrent qu'une étape cruciale et commune dans l'apoptose est l'ouverture de méga canaux mitochondriaux, par transition de perméabilité.

De plus, la mitochondrie peut libérer des molécules qui contribuent à l'exécution de la mort cellulaire. Un facteur induisant l'apoptose (AIF) est libéré par la mitochondrie, suite à la transition de perméabilité (Zamzami *et al*, 1996).

Un autre facteur, le cytochrome c est libéré depuis l'espace intermembranaire mitochondrial dans le cytosol des cellules en apoptose et peut induire l'activation de la caspase 3 (Yang *et al*, 1997; Kluck *et al*, 1997). Cependant, la libération du cytochrome c ne semble pas dépendre du changement de potentiel de membrane mitochondriale.

Les effets protecteurs des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-xl, pourraient s'expliquer par le fait qu'elles vont agir sur les mitochondries et empêchent la perméabilisation de transition ainsi que la libération des facteurs mitochondriaux (Golstein, 1997; Kromer, 1997; Tsujimoto, 1997).

### **5) Rôle de l'ATP**

Il semble que l'ATP est requis durant le processus apoptotique et que le niveau d'ATP détermine si une cellule va mourir par apoptose ou par nécrose (Nicoreta et Leist, 1997; Tsujimoto, 1997). La déplétion en ATP intracellulaire bloque certains événements de l'apoptose et entraîne la cellule qui devait mourir par apoptose vers la nécrose (Richter *et al*, 1996).

Au moins deux étapes distinctes, la dégradation nucléaire et l'expression à la surface de la cellule des phosphatidylsérines, détectables par l'annexine V, semblent requérir de l'énergie pour leur réalisation (Figure 21).

### **c) Les effecteurs**

Les éléments effecteurs biochimiques majeurs de la mort cellulaire sont les enzymes catalysant les changements irréversibles de l'ADN (endonucléase DNase) et des protéines (protéase caspases) (Martin et Green, 1995 ; Martins et Earnshaw, 1997).

La liaison covalente des protéines cellulaires par la TGt est aussi une des réactions biochimiques irréversibles dans le processus apoptotique. Nous l'aborderons dans la seconde partie de ce chapitre.

### **1) Les endonucléases**

La coupure internucléosomale de l'ADN génomique par une endonucléase, qui génère des fragments multiples de 180 à 200 pb, visualisable par la formation d'échelles après électrophorèse en gel d'agarose, ou par la technique TUNEL qui permet la visualisation des cassures de l'ADN, a longtemps été considérée comme le marqueur biochimique par excellence d'identification de l'apoptose. Il ne peut cependant plus actuellement être le seul facteur pris en compte puisque, d'une part, d'autres types de dégradation de l'ADN libérant des fragments de 300 à 500 kb ou des coupures simples brins ont été

Nouveau nom	Ancien nom	Substrats
Caspase-1	ICE	Pro-IL-1 $\beta$ , PKC- $\delta$ , actine, pro-caspases 1, -3
Caspase-2	ICH-1	?
Caspase-3	CPP32/Yama/apopaine	PARP, Pro-caspases 6, -9, SREBP-1, SREBP-2, Huntingtine, U1-70 kD, DNA-PKcs
Caspase-4	ICErel-II/TX/ICH-2	Pro-IL-1 $\beta$ , Pro-caspase-1
Caspase-5	ICErel-III/TY	?
Caspase-6	Mch2	PARP, Lamines A, B1/B2, C
Caspase-7	Mch3/ICE-LAP3/CMH-1	PARP
Caspase-8	FLICE/MACH/Mch5	PARP
Caspase-9	ICE-LAP6/Mch6	PARP
Caspase-10	Mch4	Pro-caspases 3, -7

ICE : enzyme de conversion de l'interleukine 1 $\beta$

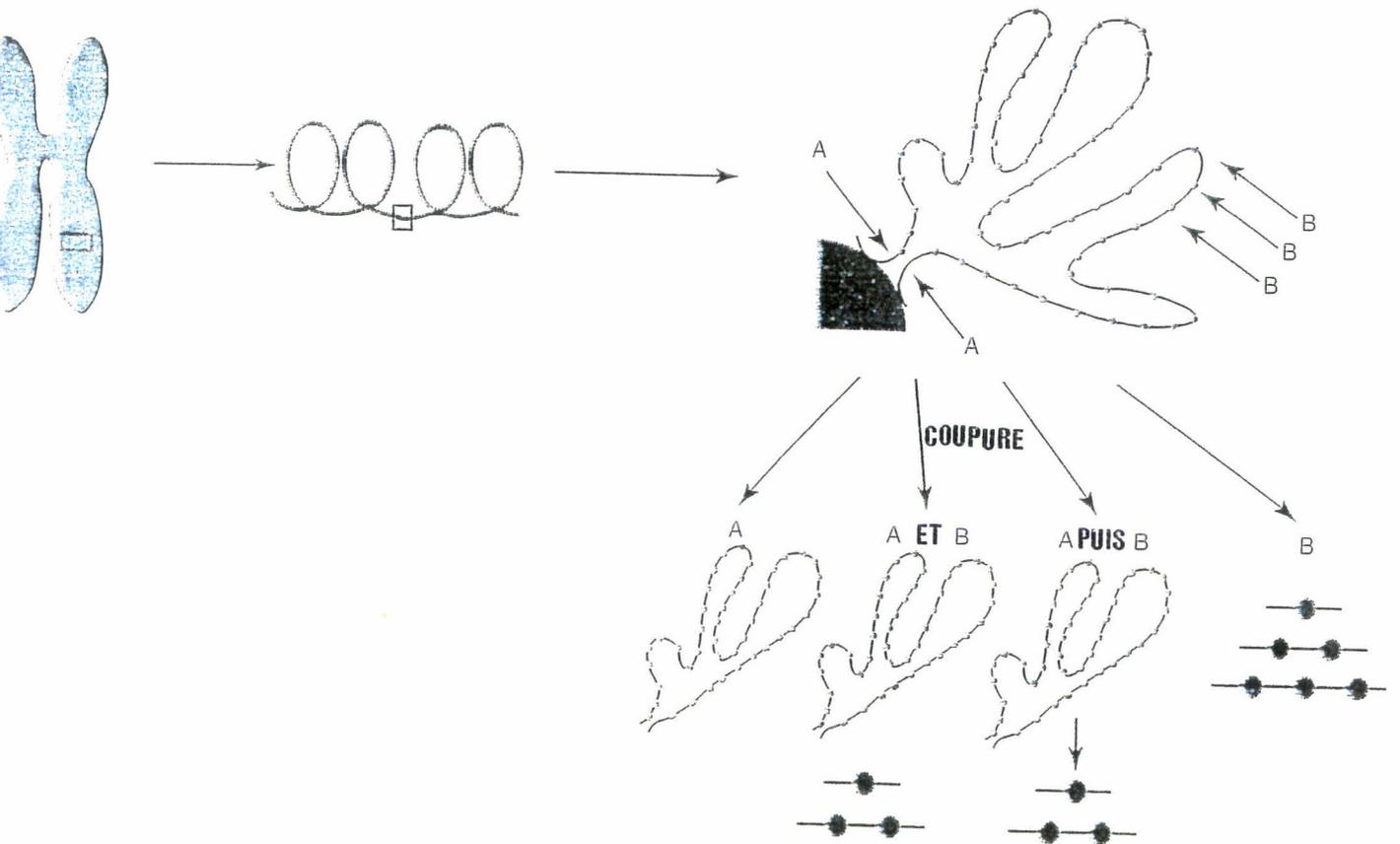
PARP : polymérase poly(ADP-ribose)

pro-IL1 $\beta$  : prointerleukine 1 $\beta$

SREBP : protéine se fixant aux éléments régulateurs stérol

**Figure 23 : Les caspases humaines et leurs substrats connus.**

(D'après Martins et Earnshaw, 1997).



**Figure 22 : Différentes voies de dégradation de l'ADN observées durant le processus apoptotique.**

L'ADN associé aux protéines nucléaires peut être coupé au point A pour donner de larges fragments d'ADN. Si les histones H1 sont enlevés à ce moment là, la coupure au point B peut arriver, et donner simultanément des fragments d'ADN de grandes tailles et internucléosomiaux. Si les histones H1 sont libérés plus tardivement, les fragments de grandes tailles devancent les fragments internucléosomiaux. Si la coupure au point A est bloquée, seul les coupures internucléosomiales sont observées

(D'après Bortner *et al*, 1995)

mises en évidence (Bortner *et al*, 1995) (Figure 22). D'autre part, l'apoptose peut se produire en absence de coupure internucléosomale de l'ADN (Sletter, 1995; Schulze-Osthoff *et al*, 1994) et les cellules anucléées peuvent mourir par apoptose (selon les critères morphologiques). L'endonucléase responsable des coupures de l'ADN durant l'apoptose n'a pas encore été clairement définie, bien que plusieurs candidates soient proposés (DNase I, DNase II, et NUC 18).

Plusieurs endonucléases pourraient être impliquées dans le processus de dégradation de l'ADN dans l'apoptose. La dégradation de l'ADN reste cependant un bon indicateur de l'apoptose, particulièrement quand sa recherche est combinée avec une caractérisation morphologique.

## 2) les protéases.

Les études utilisant les cellules anucléées ou les systèmes "cell-free" indiquent que les composants centraux de la machinerie de mort sont plus probablement localisés dans le cytosol plutôt que dans le noyau. Une famille de protéases cellulaires, appelée caspases, semble jouer un rôle important dans l'exécution de l'apoptose, car la coupure spécifique et reproductible de protéines cellulaires est identifiée dans l'apoptose. Des inhibiteurs de protéases inhibent l'apoptose et l'addition de protéase exogène induit l'apoptose.

Ainsi, le gène *ced3* de *C.elegans*, qui est requis pour la mort cellulaire durant le développement du nématode, montre une homologie avec l'enzyme ICE (caspase 1), qui convertit l'U1 $\beta$  en sa forme active. Plusieurs autres caspases ont été identifiées. Ces caspases sont produites sous la forme d'un précurseur inactif qui est activé par coupure protéolytique. Les caspases pourraient faire partie d'une cascade d'événements protéolytiques. Cette hypothèse repose sur l'observation qu'une caspase peut en activer une autre. On a décrit une dégradation des cibles pour les caspases associée au processus apoptotique. Ces coupures protéolytiques pourraient jouer un rôle dans les changements structuraux, l'activation d'autres effecteurs comme les nucléases ou la suppression d'inhibiteurs dans le processus apoptotique (figure 23).

## B. TGt et Apoptose

### I. Corrélation TGt-apoptose

C'est en 1987 que Fesus *et al* ont montré pour la première fois l'existence d'une corrélation entre l'expression de la TGt et l'apoptose dans deux modèles d'hépatocytes et de thymocytes *in vivo*.

Lors de l'embryogenèse, les cellules qui meurent à des moments et à des endroits précis pendant le développement expriment des taux élevés de TGt (Davies *et al*, 1991 ; Nagy *et al*, 1994). Il en va de même dans les processus d'involution des hyperplasies du foie (Fesus *et al*, 1989) ou du thymus (Szondy *et al*, 1997).

Origines	Lignées cellulaires	Références
neuroblastome	SK-N-BE	Melino et al, 1994 Piacentini et al, 1991, 1992, 1996
adénocarcinome	HeLa-TV	Piacentini et al, 1991
	HL-60	Mehta et al, 1996 Nagy et al, 1995, 1996
érythroleucémie	HEL	
fibroblastes	Balb-C 3T3	Gentile et al, 1992
	hépatocytes	Piacentini et al, 1991 Fesus et al, 1987, 1989, 1991 Taresca et al, 1992
cellules trachéobronchiale	SPOC1	Zhang et al, 1995
cellules ectocervicale	ECE16-1	Rorke et Jacobberger, 1995
	cellule T	Amendola et al, 1994
hépatome	McA-RH7777	Fukuda et al, 1993
fibrosarcome		Alaoui et al, 1992
cellules mesenchyale		Siang et Kochhar, 1992
	thymocytes	Szondy et al, 1997
	lymphocytes T CD4+	Amendola et al, 1994, 1996
cellules bronchoalveolaires	NCI-H226 , NCI-H358 , NCI-H596	Lokshin et Levitt, 1996
	cellules photorecepteur	Zhang et al, 1996
	cellules épithéliales	Cummings et al, 1996
neuroblastome		Piacentini et al, 1994
gliome		Iwaki et al, 1994
	chondrocytes	Borge et al, 1996
leucémie promyélocytaire aiguë	NB4	Benedetti et al, 1996

**Tableau XVI : Modèles cellulaires où l'expression de la transglutaminase de tissu est corrélée avec le processus apoptotique.**

Il a été montré dans plusieurs modèles *in vivo*, *in vitro*, normaux ou pathologiques que l'expression de la TGt coïncide avec le processus apoptotique (Tableau XM). Le début de l'apoptose est généralement associé à une augmentation de l'ARNm de la TGt, suivie d'une augmentation de la synthèse de l'enzyme et de l'activité de liaison (pour revue : Piacentini, 1995 ; Fesus *et al*, 1996).

Cette association de la TGt avec l'apoptose a aussi été démontrée par des techniques de double marquage *in cellulo*.

## **II. Implication de la TGt dans l'apoptose.**

L'expression simultanée de la TGt avec l'apoptose laisse sous-entendre que l'enzyme pourrait avoir une fonction dans ce processus de mort cellulaire.

### **a) La TGt serait elle impliquée dans la voie conduisant à la mort des cellules chez *C. elegans* ?**

L'étude du développement génétique du nématode *C. elegans*, l'organisme modèle, a permis de découvrir les principes fondamentaux qui régissent la mort cellulaire. Comme la réticulation de protéines par la TGt est une caractéristique essentielle et générale de la mort cellulaire programmée, on peut supposer que cet enzyme fasse partie du programme de mort chez *C. elegans*. Il a été démontré qu'il existe une transglutaminase chez *C. elegans*, l'enzyme étant exprimé constitutivement dans certaines cellules du ver adulte et induit dans les cellules programmées pour mourir. Jusqu'à présent l'étude des gènes *ced*, n'a pas permis d'isoler une transglutaminase. Cependant, plusieurs organismes mutants *ced* présentent des changements caractéristiques et distincts dans l'activité de l'enzyme - dont une augmentation significative dans le taux de protéines liées par liaisons  $\epsilon(\gamma$ -glutamyl) lysine où les cellules meurent mais ne sont pas éliminées par suite de la mutation de gènes impliqués dans la phagocytose des cadavres de cellules - donnant ainsi une preuve indirecte que la TGt prend part au mécanisme de base de mort cellulaire programmée (pour revue : Fesus *et al*, 1996).

### **b) La modulation de l'apoptose par la TGt**

Les lignées cellulaires de neuroblastome SK-N-BE et de fibroblastes Balb-C 3T3 et L929 transfectées avec l'ADNc complet de la TGt, montrent une diminution de leur capacité à proliférer avec une augmentation en parallèle du pourcentage de mort cellulaire (Gentile *et al*, 1992; Melino *et al*, 1994). Ces cellules mourantes, transfectées par la TGt présentent les changements caractéristiques cytoplasmiques et nucléaires de l'apoptose. Inversement, la transfection des cellules de neuroblastome avec un vecteur d'expression contenant des segments de l'ADNc de la TGt, en orientation inverse, provoque une diminution prononcée de l'apoptose spontanée et induite (Melino *et al*, 1994).

Ces données suggèrent que les liaisons irréversibles de protéines intracellulaires, catalysées par la TGt, peuvent représenter un événement biochimique important dans l'induction des changements cellulaires caractéristiques de l'apoptose.

### **III. Rôle de la TGt dans l'apoptose.**

Plusieurs rôles sont imputés à la TGt lors du processus de mort par apoptose.

#### **a) Stabilisation des membranes – formation des corps apoptotiques**

L'activation de la TGt dans les cellules apoptotiques induit la formation d'un échafaudage protéique. Le nombre important de liaisons confère à ces structures intracellulaires une résistance aux détergents et aux agents chaotropiques (Fesus *et al*, 1989 ; Piacentini *et al*, 1991 b).

La caractérisation biochimique de ces échafaudages de protéines révèle qu'ils contiennent des protéines intracellulaires connues (actine, annexine I, vinculine, fibronectine, involucrine), des protéines non encore identifiées (pour revue Aeschlimann et Paulsson, 1994 ; Knight *et al*, 1993 ; Tarsca *et al*, 1993) et des fragments d'ADN oligonucléosomiques (Fesus *et al*, 1989).

Ces réseaux de protéines stabilisent l'intégrité des cellules apoptotiques et interviennent dans la formation des corps apoptotiques, où une accumulation de protéines liées par la TGt est retrouvée (pour revue Fesus *et al*, 1991).

#### **b) La TGt rend « silencieuse » l'apoptose**

La polymérisation de protéines intracellulaires peut aussi stabiliser le cytoplasme des cellules apoptotiques et empêcher la libération des macromolécules nuisibles, avant leur nettoyage par phagocytose.

Les cellules L929 tuées par le TNF $\alpha$  libèrent de l'ADN et des macromolécules. La surexpression de la TGt dans ces cellules empêche cette libération (Piredda *et al*, 1997). L'inhibition de l'enzyme, quant à elle, augmente la libération des macromolécules dans divers modèles (pour revues Piacentini *et al*, 1994 ; Fesus *et al*, 1996 ; Piredda *et al*, 1997).

Cela peut expliquer pourquoi l'apoptose est un événement silencieux du point de vue immunologique, qui n'est pas associé à une inflammation ou à la formation de dégâts dans les tissus environnants (Wyllie *et al*, 1980 ; pour revue Piacentini, 1995).

#### **c) Induction de l'apoptose par la TGt**

La TGt est capable d'induire l'apoptose via l'activation de molécules (pour revue Fesus *et al*, 1996). Un dimère covalent d'IL2, produit *in vitro* par la TGt, est capable d'induire l'apoptose des oligochondrocytes (Eitan et Schwartz, 1993 ; Eitan *et al*, 1994).

La TGt est aussi capable d'activer le TGF $\beta$ 1 (Kojima *et al*, 1993), le rendant capable d'induire l'apoptose dans différents types cellulaires.

La courbe d'apparition en fonction du temps de la TGt après induction de l'apoptose dans le thymus devance celle des noyaux apoptotiques, montrant que l'induction de l'enzyme précède l'activation de l'endonucléase. Cela suggère que l'induction de la TGt peut jouer un rôle dans l'initiation du programme apoptotique par des signaux dépendant de la synthèse *de novo* d'ARN (Szondy *et al*, 1997).

La TGt semble donc agir indirectement dans l'induction de l'apoptose de certains modèles et surtout dans la réalisation du programme tardif de l'apoptose.

#### **IV. TGt sans apoptose.**

Le gène de la TGt est exprimé constitutivement dans quelques types cellulaires localisés dans des tissus spécifiques des mammifères (Thomazy et Fesus, 1989). Une conclusion simpliste est d'en déduire que, par conséquent, la présence de TGt ne peut être considérée comme indicateur de l'apoptose. Cependant, dans la grande majorité des cellules, l'enzyme n'est pas exprimé est induit au début du processus apoptotique (Piacentini *et al*, 1991). Le rôle de la TGt exprimée constitutivement dans ces cellules n'est pas connu. Néanmoins, ces cellules sont localisées dans des tissus soumis à des stress environnementaux et fonctionnels (Thomazy et Fesus, 1989) qui doivent donc, pour éviter les conséquences néfastes d'une mort par nécrose, avoir un système apoptotique prêt à agir en cas d'agression. Le fait que l'apoptose puisse avoir lieu en absence de synthèse de protéines dans les cellules anucléées est en accord avec cette hypothèse (Raff *et al*, 1992). Il est concevable de supposer que durant l'évolution, le gène de la TGt ait acquis une régulation tissu-spécifique amenant à une accumulation de l'enzyme dans les tissus les plus exposés.

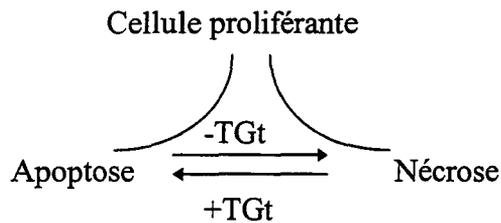
De plus, rappelons que la TGt est un enzyme Ca<sup>2+</sup> dépendant, qui n'est pas actif aux concentrations de Ca<sup>2+</sup> normalement détectées dans les cellules viables (Greenberg *et al*, 1992), et que l'augmentation de concentration en Ca<sup>2+</sup> rapportée dans les cellules apoptotiques est suffisante pour induire l'enzyme (pour revue Piacentini, 1995). Un traitement à l'ionophore de Ca<sup>2+</sup> de ces cellules exprimant constitutivement l'enzyme entraîne la formation de protéines liées et la mort par apoptose (pour revue Fesus *et al*, 1996). Le manque d'apoptose en présence de TGt s'expliquerait donc par l'existence d'une forme inactive de l'enzyme, d'ailleurs retrouvée dans certains cas de cancers (Knight *et al*, 1990).

#### **V. Mort cellulaire sans TGt**

Dans les neutrophiles l'inhibition de l'enzyme, par des inhibiteurs ou une approche antisens, n'empêche pas la mort des cellules (Fesus *et al*, 1996). Cependant, bloquer l'enzyme conduit les cellules à mourir par nécrose et à la libération de macromolécules. Inversement, le morphotype de

mort par nécrose peut être déplacé vers le type apoptotique par transfection de l'ADNc de la TGt dans les cellules L929 montrant une réponse nécrotique au TNF $\alpha$  (Piredda *et al*, 1997).

De même, l'induction de la mort cellulaire programmée des thymocytes par stimulation du récepteur Fas, contrairement à celles par l'anticorps anti CD3, la dexaméthasone ou les irradiations qui donnent un morphotype apoptotique classique, avec expression de la TGt, n'induit pas la TGt et mène à un morphotype moins organisé (Szondy *et al*, 1997).



Ces résultats suggèrent que la TGt prend une part importante dans le processus d'apoptose pris au sens strict de sa définition morphologique.

La TGt est donc impliquée dans la réalisation du programme apoptotique complet, qui peut avoir des implications en pathologie, et différentes voies de régulation existent. Notre travail nous a permis d'aborder ces deux axes sur un modèle de myélome multiple, où les rétinoïdes ouvrent des perspectives thérapeutiques intéressantes.

**RESULTATS**  
**&**  
**DISCUSSION**

Ce travail comporte deux parties. La première partie consiste en l'étude du mécanisme de régulation par les rétinoïdes de l'expression de la TGt et sa corrélation avec l'apoptose. La seconde partie est l'étude de la mort cellulaire induite par un rétinoïde de synthèse le CD437 et sa comparaison avec l'apoptose induite par l'ARtt. L'ensemble de ce travail est réalisé sur la lignée humaine de myélome multiple RPMI 8226.

## **PARTIE I : Etude du mécanisme de régulation par les rétinoïdes de l'expression de la TGt et sa corrélation avec l'apoptose**

### **A. Questions posées**

Ce travail part des observations suivantes : l'ARtt induit l'apoptose dans de nombreux modèles cellulaires. Cette induction s'accompagne d'une expression de la TGt, qui semble jouer un rôle non négligeable dans ce processus. L'ARtt a été proposé comme traitement du myélome multiple (voir revue générale). C'est la raison pour laquelle le choix du modèle s'est porté sur la lignée continue myélomateuse RPMI 8226. Cette étude a été entamée pour répondre aux questions suivantes :

- L'ARtt régule-t-il l'expression de la TGt ?
- Par quelle(s) voie(s) des rétinoïdes (RAR et/ou RXR) passe(nt) cette régulation ?
- A quel(s) niveau(x) ce contrôle a-t-il lieu (transcriptionnel, traductionnel, post-traductionnel) ? Ce contrôle est-il direct ou indirect ?
- Et enfin, existe-t-il une corrélation entre l'expression de la TGt et le processus apoptotique ?

### **B. Approches utilisées**

L'étude du contrôle de l'expression de la TGt par les rétinoïdes s'est tout d'abord focalisée sur le dosage de l'activité enzymatique, qui fait référence dans l'étude de son expression.

Deux approches sont possibles pour disséquer les voies des rétinoïdes impliquées dans le contrôle de l'expression de la TGt.

La première approche cible directement les récepteurs. Elle modifie leur expression par des techniques de transfections (vecteurs d'expression des récepteurs ou de dominants négatifs) ou inactive leur gène par recombinaison homologue (knock-out). Cependant, cette approche interroge une réponse globale. Agir sur un récepteur donné peut avoir des conséquences sur les autres récepteurs en jouant sur les équilibres entre les récepteurs, leur dimérisation, leur possibilité d'interaction avec les éléments de réponse,... . De plus, certaines redondances fonctionnelles des récepteurs des rétinoïdes peuvent être des artefacts du au «knock out», et n'existent pas normalement dans la cellule (Taneja et al, 1996).

L'approche par le ligand a été préférée pour cette étude. Le laboratoire dispose en effet, d'une grande variété de rétinoïdes de synthèse fourni par le CIRD Galderma. Ce sont autant d'outil sélectifs, qui, s'ils sont utilisés à des concentrations adaptées, permettent de déterminer l'implication de tel ou tel récepteur dans une régulation. Cette approche permet aussi de tester de nombreuses combinaisons de rétinoïdes, avec une souplesse d'exploration que n'offre pas la première approche. Ainsi, l'utilisation de ligands de synthèses a permis de déterminer avec succès les voies de régulation par les rétinoïdes de l'expression de protéines au rôle biologique important, *e.g* Fas (Yang *et al*, 1995).

Nous nous sommes également intéressé aux différents niveaux de contrôle de l'expression de la TGt. L'expression de la protéine a été étudié *in vitro* par Western blot et *in cellulo* par immunofluorescence indirecte. En ce qui concerne l'étude des ARNm, le Northern-Blot technique de référence pour l'étude de la transcription des gènes, donnant des résultats difficilement interprétables, nous avons mis au point une technique de RT-PCR «seuil».

L'étude de l'apoptose a quant à elle été essentiellement réalisée sous un angle morphologique.

### C.Résultats

Une partie des résultats fait l'objet d'une publication actuellement en révision à Blood.

### **I. Evidence for the involvement of both Retinoic acid Receptor and Retinoic X Receptor-dependent signaling pathways in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis in the human myeloma cell line RPMI 8226**

#### a) Résumé de l'article

Dans cet article, nous montrons que l'ARtt et le 9-*cis* AR induisent l'expression de la TGt, un enzyme impliqué dans l'apoptose, au niveau de l'activité enzymatique et des ARNm, dans les cellules RPMI 8226. Ces cellules expriment les ARNm de RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  et RXR $\gamma$ . Pour identifier les récepteurs impliqués dans cette régulation de l'expression de la TGt, plusieurs rétinoïdes de synthèse sélectifs d'une classe de récepteurs ont été utilisés. Ni le CD 367, un rétinoïde agoniste sélectif des RARs, ni le CD 2425, un rétinoïde agoniste sélectif des RXRs ne sont capables d'induire la TGt. Cependant, leur association induit une expression de l'enzyme proche de celle obtenue par l'ARtt. De plus, lorsqu'ils sont utilisés en association avec l'ARtt, le CD 367 inhibe partiellement l'induction de la TGt par l'ARtt alors que le CD2425 l'augmente.

Les effets de l'Am 580, du Cd 417 et du CD 437, trois rétinoïdes sélectifs respectivement du RAR $\alpha$ , du RAR $\beta$  et du RAR $\gamma$  ont aussi été étudiés. Aucun de ces composés n'est capable, s'il est utilisé seul, d'induire l'activité enzymatique TGt. Cependant, l'association de chacun d'entre eux avec le CD 2425 provoque une induction de l'enzyme mais de 30 à 50% par rapport à celle obtenue avec l'ARtt. Ces résultats suggèrent une redondance fonctionnelle entre les sous-types de RAR. Finalement

le traitement par l'ARtt ou l'association du CD 367 et du CD 2425, mais pas par le CD 367 ni le CD 2425 utilisés seuls, sont aussi capables d'entraîner l'apoptose des cellules RPMI 8226, avec une accumulation de la TGt dans les cellules apoptotiques. Ces résultats suggèrent que l'induction de l'expression de l'activité enzymatique TGt et de l'apoptose dans les cellules RPMI 8226 nécessite l'activation dépendante du ligand des deux classes de récepteurs : RARs et RXRs.

**b) Article**

**Evidence for the involvement of both Retinoic Acid Receptor and Retinoic X Receptor-dependent signaling pathways in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis in the human myeloma cell line RPMI 8226**

Bertrand Joseph, Olga Lefebvre, Claude Méreau-Richard, Pierre-Marie Danzé, Marie-Thérèse Belin-Plancot and Pierre Formstecher

INSERM U 459 «Signaux, Récepteurs et Différenciation Cellulaire»,  
Faculté de Médecine, 1 place de Verdun 59045 Lille cedex, France

Supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Ligue du Nord Contre le Cancer, the Association de la Recherche contre le Cancer (ARC), the CIRD GALDERMA and Université de Lille II. INSERM U 459 belongs to IFR 22 supported by INSERM, CH et U de Lille, Université de Lille II and Centre Oscar Lambret.

Corresponding author : Pierre Formstecher, INSERM U459 «Signaux, Récepteurs et Différenciation Cellulaire», Faculté de médecine,  
1 place de Verdun 59045 Lille cedex, France

Telephone : (33) 3-20-62-69-52. Fax : (33) 3-20-62-68-68.

Email : [formstecher@inserm.lille.fr](mailto:formstecher@inserm.lille.fr)

## ABSTRACT

In this study, we show that both *all-trans*-retinoic acid (*atRA*) and 9-*cis*-retinoic acid (9-*cis*-RA) are potent inducers of tissue transglutaminase (TGase II), an enzyme involved in apoptosis, at the level of both enzyme activity and mRNA in the human myeloma cell line RPMI 8226. RPMI 8226 cells were demonstrated to express mRNAs for all the retinoid receptors subtypes, *i.e.* RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , and RXR $\gamma$ . To identify which of these receptors are involved in regulating TGase II expression, several receptor-selective synthetic retinoids were used. Neither CD 367, a very potent retinoid which selectively binds and activates receptors of the RAR family, nor CD 2425, a RXR selective agonist, did induce TGase II when used alone. However combination of CD 367 and CD 2425 resulted in nearly full induction of the enzyme. Moreover when used in combination with *atRA*, CD 367 partially inhibited the *atRA*-dependent induction of TGase II, whereas CD 2425 enhanced it.

The effects of Am 580, CD 417 and CD 437, three synthetic retinoids selective for the RARs subtypes RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  and RAR $\gamma$  respectively, were also investigated. None of these compounds was able to induce TGase II when used alone, however the combination of each of them with CD 2425 resulted in strong induction of the enzyme activity, reaching 30-50% of the values obtained in the presence of retinoic acid and suggesting functional redundancy between the RAR subtypes. Finally treatment with *atRA* or the combination of CD 367 and CD 2425, but not with CD 367 or CD 2425 alone, was also shown to trigger apoptosis in RPMI 8226 cells, with prominent accumulation of TGase II immunoreactivity in apoptotic cells. Taken together these data suggest that the induction of TGase II expression and apoptosis in the RPMI 8226 myeloma cell line required ligand dependent activation of both the RAR and RXR receptors.

## INTRODUCTION

Transglutaminases (EC 2.3.2.13, TGase) are Ca<sup>++</sup>-dependent enzymes catalyzing the formation of  $\epsilon$ ( $\gamma$ -glutamyl)lysine cross-links between polypeptide chains <sup>1</sup>. Several members of this gene family have been identified including the type II (tissue) TGase <sup>2,3</sup>. TGase II, the biological functions of which remain unclear, is an intracellular enzyme found in many cell types <sup>4</sup>. TGase II is implicated in the activation of several cytokines <sup>5,6</sup> and in signal transduction <sup>7</sup>. Expression of TGase II has been found associated with apoptosis in several cell types, and a role for TGase II in this process has been suggested <sup>8-10</sup>.

Apoptosis is a genetically controlled process of cell death and is important for the elimination of cells during morphogenesis, in embryonic development as well as in many adult tissues<sup>10,11</sup> and in cancer. Although the function of TGase II in apoptosis has yet to be elucidated, it has been proposed that TGase II may cross-link cellular proteins, thereby preventing the release of intracellular macromolecules<sup>12</sup>.

*atRA* induces TGase II expression in various cell types<sup>2,13-21</sup>. In mouse macrophages, regulation of TGase II expression by *atRA* occurs at the transcriptional level<sup>2</sup>. Most of the effects of *atRA* on gene expression are mediated by the activation of nuclear retinoid receptors, RARs and/or RXRs<sup>22</sup>. The RAR and RXR gene family comprises three subtypes named  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ <sup>22</sup>. These subtypes are expressed in a developmental stage- and cell type-specific manner<sup>22</sup>, and each may regulate the expression of different genes. In this study, we examined the retinoid signaling pathways involved in the induction of TGase II (and apoptosis) in the human myeloma cell line RPMI 8226, utilizing several retinoid receptor-selective agonists. This cellular model was chosen because *atRA* has been proposed for the treatment of multiple myeloma.

Our results provide evidence indicating that the induction of TGase II gene expression and apoptosis by *atRA* in RPMI 8226 cells is mediated through specific retinoid signaling pathways that involve both RAR(s) and RXR(s).

## MATERIALS AND METHODS

### Retinoids

*all-trans* and 9-*cis*-retinoic acid were purchased from Sigma (St. Louis, Missouri, USA), Am 580, CD 367, CD 417, CD 437 and CD 2425 were obtained from CIRD Galderma (Sophia Antipolis, France). Retinoids were dissolved in dimethyl sulfoxide at an initial  $10^{-2}$ M stock concentration and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in the dark. Dilutions were performed in ethanol. The final concentration of ethanol in culture was 1‰.

### Cell line and cell treatments

RPMI 8226 cells (CCL-155 American Type Culture Collection, USA) were cultured routinely at  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  in complete medium (RPMI 1640 with Glutamax I, 10% FCS inactivated by heating, penicillin (100U/ml), and streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )). Viability (higher than 95%) was determined by trypan blue exclusion. TGase induction by retinoids was performed in cells grown in standard medium (RPMI 1640 with Glutamax I, penicillin (100U/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), insulin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), transferrin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and sodium selenite (5ng)) supplemented either with 3% FCS at 7 hours for TGase activity measurement, or with 10% FCS at 48 hours for microscopic studies.

### TGase activity measurement<sup>23</sup>

TGase activity of cell lysates was determined by  $\text{Ca}^{++}$ -dependent incorporation of [ $^3\text{H}$ ]putrescine into N,N' dimethylated casein.  $10^7$  cells were induced by retinoid at  $5 \cdot 10^5$  cells/ml for 48 hours and lysed

in 150µl 10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 0.5% Triton X-100. Aliquots of cell extracts (0.2mg of proteins) were incubated at 30°C in a total volume of 100µl containing 20mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM β mercaptoethanol, 2mg/ml N,N' dimethylated casein, 2 µCi [<sup>3</sup>H]putrescine (30-60Ci/mmol Dupont-NEN) and 0.2mM putrescine. After 20 min., aliquots were spotted on Whatman 3MM filter paper, fixed and washed in 10% trichloroacetic acid, 5% trichloroacetic acid, ethanol/acetone (v/v) and acetone. Protein-bound [<sup>3</sup>H]putrescine was determined by liquid scintillation counting. Background value was obtained by substitution of 1mM EGTA for CaCl<sub>2</sub> in the reaction mixture added to cell extracts and lysis buffer. Enzyme activity was expressed as picomoles of [<sup>3</sup>H]putrescine incorporated into N,N' dimethylated casein per minute and per milligram of cell lysate protein. Protein amount was assayed by the Bradford method <sup>24</sup> using fraction V Albumin (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) as the standard.

### RT-PCR and Northern blot analysis

Total RNA was isolated from 10<sup>7</sup> cells using RNable<sup>®</sup> (Eurobio, Les Ullis, France) and was used for reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Northern blot analysis.

For PCR amplification, pairs of primers were selected using the cDNA sequences of human TGase II from umbilical vein endothelial cells, human β actin, human RARα, RARβ, RARγ and human RXRα, RXRβ, RXRγ (Table 1). TGase II primers are located in the coding region of two contiguous exons<sup>25</sup>. The reverse transcriptase reaction was performed in a final volume of 20µl containing 1 µg total RNA (denatured at 68°C for 5min), 20U RNasin<sup>®</sup> Ribonuclease inhibitor (Promega, Wisconsin, USA), 5µM pd(N)<sub>6</sub> (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), 0.5mM dNTPs, and 200U Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Promega, Wisconsin, USA) in RT buffer. An aliquot (5µl) of the RT reaction product was mixed with 20µl PCR buffer containing 1U Taq DNA polymerase (Promega, Wisconsin, USA), 0.1mM dNTPs and 100ng of each primer. PCR was performed in a minicycler (MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA), as follows : 95°C for 5 min, then n (15 to 40) cycles consisting of 1min at 95°C, 1min at 54°C and 1min at 72°C. After the last cycle, incubation at 72°C was prolonged for 10min. TGase II, RARs, RXRs and β actin PCR reactions were performed separately. PCR products (15µl) were analyzed on a 2% agarose gel in TAE using a DNA ladder 100bp marker and a PCR product from human TGase II cDNA <sup>26</sup> (kindly provided by Dr. Gentile, Naples, Italy) as controls. Samples were analyzed by Southern blot using as a probe internal primers for amplified sequence (Table 1). Primers were labeled with 20 µCi γ[<sup>32</sup>P]ATP (3000Ci/mmol Dupont-NEN) using 5-10U/µl T4 polynucleotide kinase (Promega, Wisconsin, USA).

Northern blot analysis was performed using 8 µg total RNA and cDNA probes for human TGase II, RARα, RARβ, RARγ and RXRα, and for mouse RXRβ, RXRγ kindly provided by Dr. Gentile, Pr Chambon (LGME, Strasbourg, France), Pr. Evans and Dr. Mangelsdorf (The Salk Institute, La Jolla, California, USA) respectively. cDNAs were labeled with 20µCi α[<sup>32</sup>P]ATP (800Ci/mmol) using a multi labeling kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

Autoradiograms were quantified by densitometric analysis with REP (Helena Laboratory, Texas, USA). Values were normalized using β actin as external standard.

### Morphological studies

At the indicated times, 15.10<sup>4</sup> cells were taken to make cytospin preparations. Slides were stored at -20°C. Cell morphology was observed after staining with May-Grünwald-Giemsa (MGG). DNA staining with Hoechst 33258 [Bis (benzidine)] was performed as described by Galli and Fratelli <sup>27</sup>. In situ DNA fragmentation was measured by using the TUNEL method based on 3'OH end labeling of DNA breaks with deoxyuridine terminal deoxynucleotidyl transferase <sup>28</sup>. Immunofluorescence detection <sup>29</sup> of TGase II was performed by using a mouse monoclonal antibody (IgG) raised against purified guinea pig TGase II <sup>30</sup> and kindly provided by Dr. Birckbichler (Ardmore, Oklahoma). A

	primer	Sequence 5'→3'	EMBL Bank accession number
TGase II	upper lower internal	CAGTTCCAGTTCGTGCCATCA ATGCCTGTCTCCTCCTTCTCG ATCACCCACACCTACAAATACCCAGAG	M55153
$\beta$ actin	upper lower internal	ATCATGTTTGAGACCTTCAA CATCTCTTGCTCGAAGTCCA GACCTGGCTGGGCCGGACCTGACTGACTAC	X00351
RAR $\alpha$	upper lower internal	CATTGAGACCCAGAGCAGC CCGTCTCCGCATCATCCATC GCTCTGAGAGCTACACGCT	X006614
RAR $\beta$	upper lower internal	GAATTGAAACACAGAGCACC GCAGGAGTGGTGACTGACTG GACAGCTGAGTTGGACGATC	Y00291
RAR $\gamma$	upper lower internal	TGGAGACACAGAGCACCAGCTCA GTCAGTCTGCTGCCTGAAGCC TGAGCCCTCAGTTAGAAGAGC	M38258
RXR $\alpha$	upper lower internal	CTCCTCAGGCAAGCACTATG AGAGCTTAGCGAACCTTCCC AGGAGCGGCAGCGTGGCAAGGAC	X52773
RXR $\beta$	upper lower internal	TCAGGCAAACACTACGGGGT GCATACACTTTCTCCCGCAG AAAGGACAAGGATGGGGATGGGGAG	X63522
RXR $\gamma$	upper lower internal	CTCAGGAAAGCACTACGGGG CAGGGTCATTTGTCGAGTTC AGAAGAAAGACAGAGGAGCCGAGAG	U38480

**Table 1** *Oligonucleotide sequences of PCR primers and probes.*

All sequences are displayed 5',3'. Sequences of TGase II primer was the same as reported<sup>25</sup>.

fluorescein conjugated anti mouse IgG (Biosys, Compiègne, France) was used for detection by fluorescence microscopy.

## RESULTS

### **Time course and dose response induction by *at*RA of TGase II activity.**

TGase II activity was undetectable in untreated RPMI 8226 cells. *at*RA treatment resulted in a time and dose dependent induction of the enzyme (Figure 1). This induction was easily detected after two days of incubation and increased linearly until four days (panel A). Interestingly 9-*cis*-RA, that activates both RARs and RXRs, appeared more potent than *at*RA in dose-response experiments (panel B).

### **mRNA TGase II induction by *at*RA in RPMI 8226 cells.**

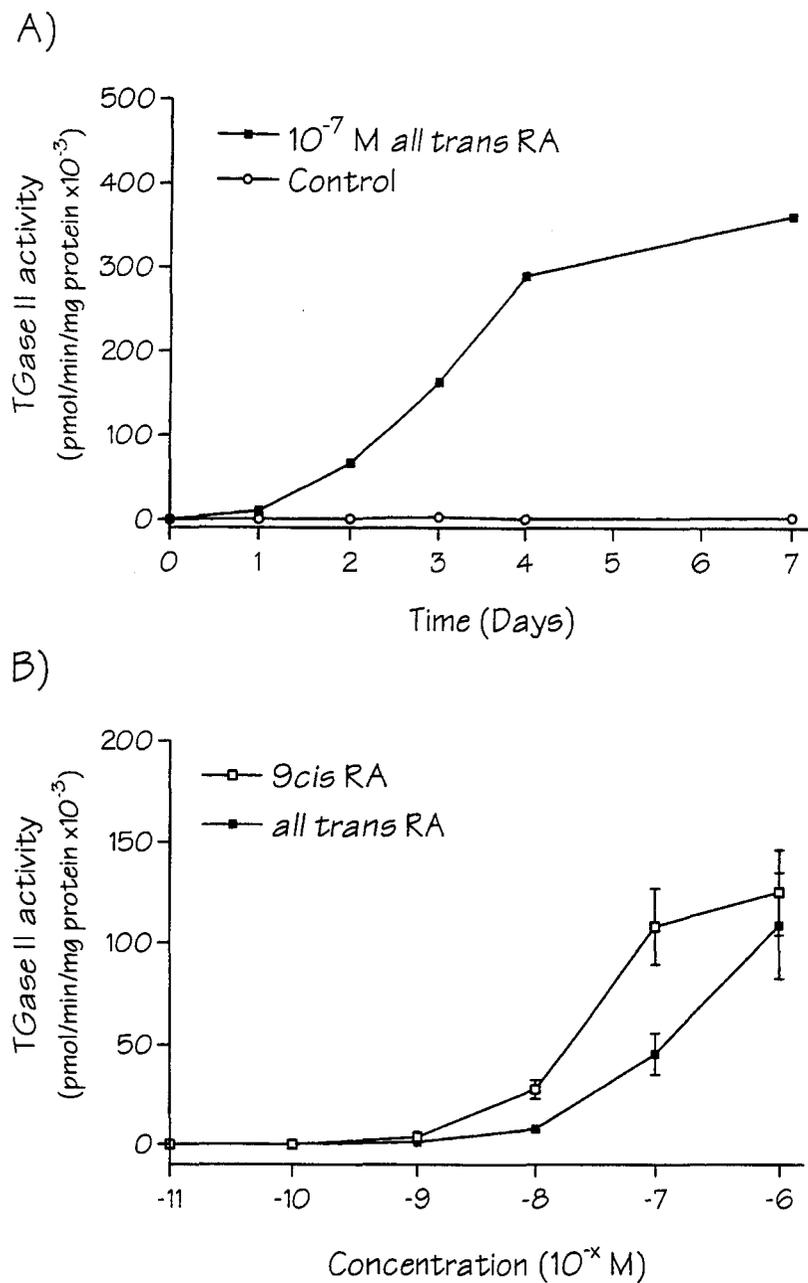
TGase II induction was also detected at the mRNA level by using a RT-PCR assay (Figure 2). Whereas the expected 301 bp amplification product could not be detected before the 29<sup>th</sup> cycle of PCR in untreated cells, it was clearly observed after only 22 cycles in *at*RA treated cells and increased dramatically after 29 and 36 cycles. The 301 bp band specificity was controlled using PCR performed with a *bona fide* cloned human TGase II cDNA<sup>26</sup> and Bam H1 cleavage, which yielded the expected digestion pattern (data not shown). Actin levels were not altered upon *at*RA treatment. Taken together these results demonstrated that the *at*RA-dependent induction of TGase II in RPMI 8226 cells occurs at a pretranslational stage.

### **Expression of RARs and RXRs in RPMI 8226 cell line**

The induction of TGase II by *at*RA may be directly or indirectly mediated by nuclear retinoid receptors. To determine which retinoid receptors could be involved in this regulation, the expression of RARs and RXRs in RPMI 8226 cells was investigated. Total RNA from control and *at*RA-treated RPMI 8226 cells was submitted to Northern blot analysis. Untreated cells expressed RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  and RXR $\gamma$  mRNAs (Figure 3A) at similar levels with the exception of RAR $\gamma$  which was 1.5-fold more expressed. Treatment of RPMI 8226 cells for 7 hours with  $10^{-7}$  M *at*RA did not result in clear modulation of RARs and RXRs mRNAs according to Northern blot experiments. However with the more sensitive RT-PCR assay an up-regulation of RAR $\beta$  and RAR $\gamma$  was detected (Figure 3B).

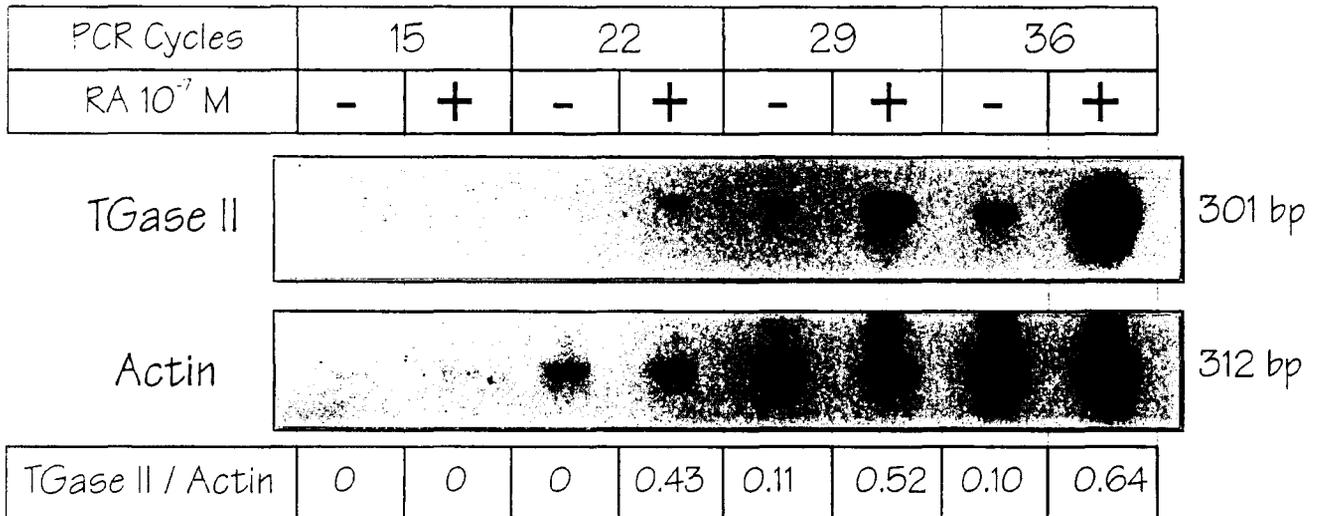
### **Effects of receptor selective retinoids**

To evaluate the respective involvement of RARs and RXRs in the induction of TGase II, we used several retinoids that bind selectively to and activate specific RARs or RXRs (Table 2).

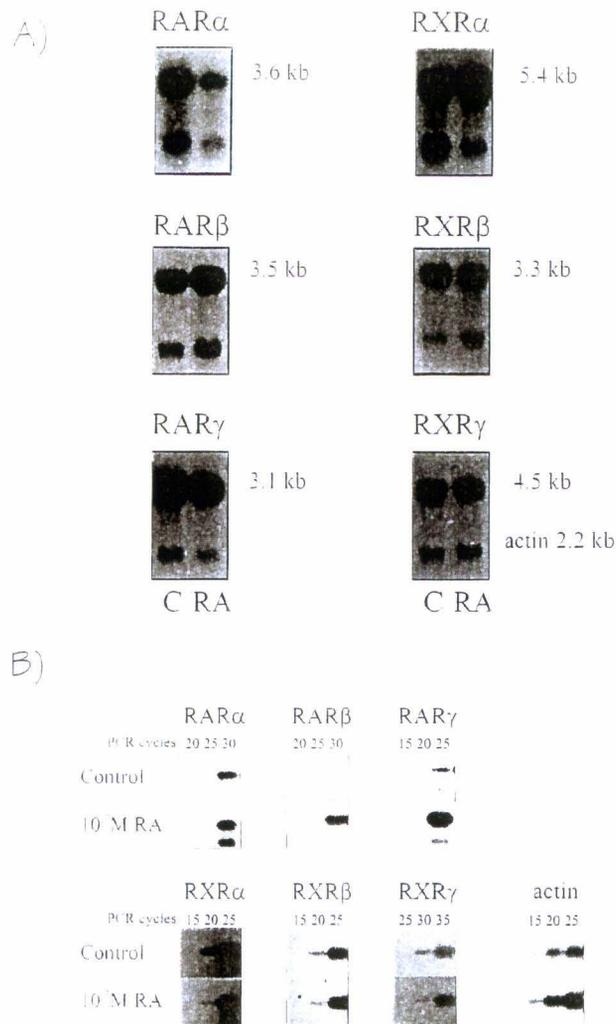


**Figure 1** *Induction of TGase II activity by retinoic acid in RPMI 8226 cells.*

Cells were treated with *at*RA or 9-*cis*-RA and TGase II activity was assayed by [<sup>3</sup>H]putrescine incorporation into N,N' dimethylated casein. Panel A: time course of the induction of TGase II activity by 10<sup>-7</sup> M *at*RA. Panel B: dose-response curves after 48 hours induction with various concentration of all trans or 9 *cis* RA.



**Figure 2** *Induction of TGase II mRNA in RPMI 8226 cells.* Cells were treated or not for 7 hours with  $10^{-7}$ M *atRA* in defined medium. Total RNA ( $1\mu\text{g}$ ) was submitted to reverse transcription and polymerase chain reaction (for 22, 28, 34 or 40 cycles), fractionated on 2% agarose gel, transferred to a Hybond N<sup>+</sup> membrane, and hybridized to <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotidic probes for human TGase II, and actin.(for primers and probes see materials and methods).



**Figure 3** *Retinoid receptor profile of RPMI 8226 cell line.* Cells were treated or not for 7 hours with  $10^{-7}$ M *atRA* in defined medium. **A)** Northern blot: total RNA was isolated, fractionated (8 $\mu$ g) on 1% agarose gel, transferred to a Hybond N<sup>+</sup> membrane, and hybridized to <sup>32</sup>P-labeled cDNA probes for human RAR $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , RXR $\alpha$ , mouse RXR $\beta$ , - $\gamma$ , and actin. **B)** RTPCR assay: total RNA (1 $\mu$ g) was submitted to reverse transcription and polymerase chain reaction (for 15, 20, 25, 30 or 35 cycles), fractionated on 2% agarose gel, transferred to a Hybond N<sup>+</sup> membrane, and hybridized to <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotidic probes for human RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$  or  $\beta$  actin.(for primers and probes see materials and methods).

Retinoid	Structure	Selectivity
All-trans retinoic acid		RAR $\beta$
9-cis retinoic acid		RAR $\beta$ RXR $\beta$
CD 367		RAR $\beta$
CD 2425		RXR $\beta$
Am 580		RAR $\alpha$
CD 417		RAR $\beta$
CD 437		RAR $\gamma$

**Table 2** Structures of the natural and synthetic retinoids used.

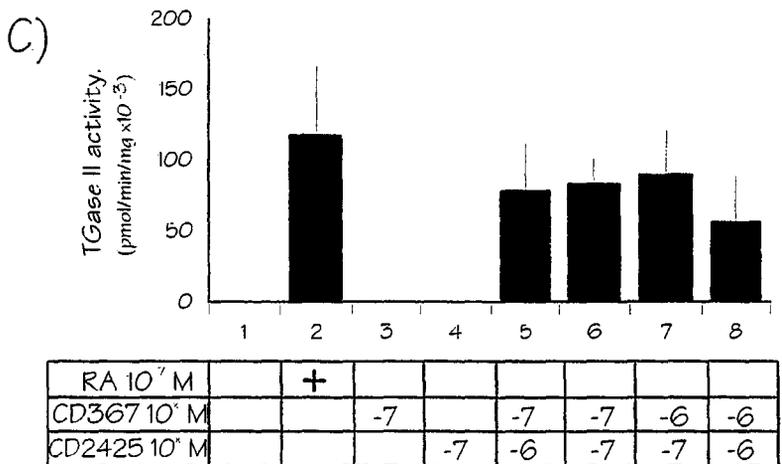
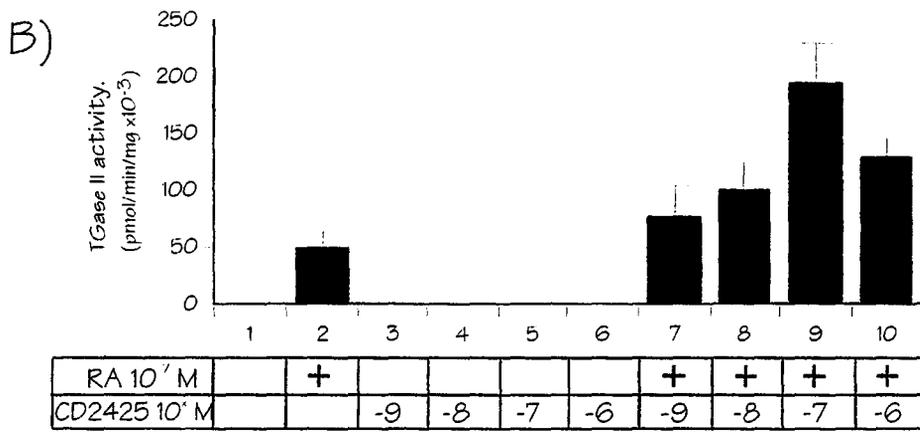
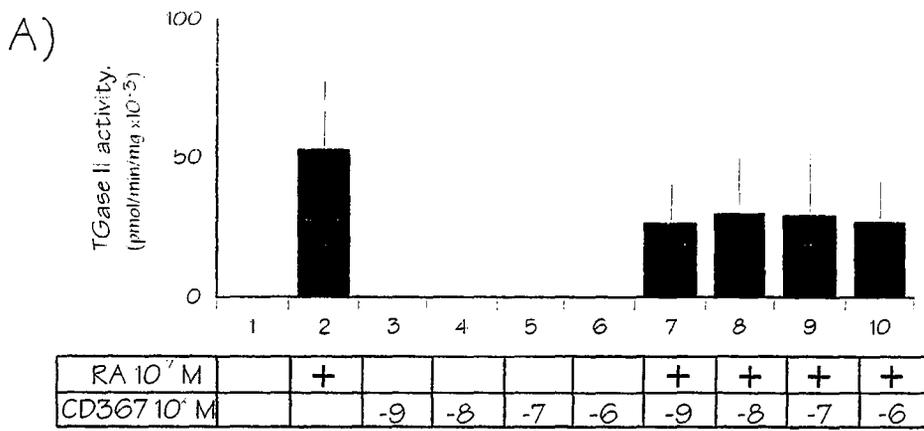
Structures of *all-trans*-retinoic acid (*atRA*), 9-*cis*-retinoic acid (9-*cis*-RA), 4-[5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-anthracenyl]-benzoic acid (CD367), (E)-2-[2-(5,6,7,8-tetrahydro-3,5,5,8,8-pentamethyl-2-naphthyl)propen-1-yl]-4-thiophenecarboxylic acid (CD2425 or AGN191701), [4-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)carboxamido]benzoic acid (Am580), 6-(3-tert-butyl-4-methoxyphenyl)-2-naphthoic acid (CD417), and 6-[3-adamantyl-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid (CD437). The selectivity of each compound is indicated according to previously published K<sub>d</sub> and EC<sub>50</sub> data<sup>31, 32, 43</sup>. CD2425 does not transactivate RARs, but transactivate RXRs (EC<sub>50</sub> = 54nM). It binds to RARs with a very weak affinity (K<sub>d</sub> = 10,000, 1470 and 712nM for RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  and RAR $\gamma$  respectively, U. Reichert, personal communication). No RXR binding data have been published for this compound.

We first analyzed effects of CD 367 and CD 2425, two retinoids highly selective for the RAR and the RXR receptors families respectively : CD 367 binds to and activates RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  and RAR $\gamma$  at nanomolar concentrations<sup>31</sup>, whereas CD 2425 (or AGN 191701) is a RXR panagonist<sup>32</sup>. RPMI 8226 cells were treated for 48 hours with these retinoids at concentrations ranging from 10<sup>-9</sup> to 10<sup>-6</sup> M, either alone or in combination with 10<sup>-7</sup> M *atRA*. This concentration of *atRA*, yielding only suboptimal (about 30%) TGase II induction, was chosen to detect any positive or negative modulation of the response by the synthetic retinoid used. Results are presented in Figure 4. When used alone, and at every concentration tested, the RAR selective retinoid CD 367 did not cause any increase in the TGase II activity (panel A). Moreover it appeared able to partially inhibit the *atRA* dependent TGase II induction. When used alone the RXR selective compound, CD 2425, appeared also unable to induce TGase II activity (panel B). However, CD 2425 in combination with *atRA* strikingly enhanced the *atRA* response in a dose dependent manner, the maximum being observed at 10<sup>-7</sup> M CD 2425 (3-fold enhancement when compared with 10<sup>-7</sup> M *atRA* alone). At higher CD 2425 concentrations (10<sup>-6</sup> M) combination with 10<sup>-7</sup> M *atRA* appeared less efficient. Finally, as shown in panel C, combination of both RAR and RXR selective agonists resulted in synergistic induction of TGase II, reaching 80% of the value obtained with 10<sup>-7</sup> M *atRA*. Taken together these observations suggested that activation of both RAR and RXR is required for induction of TGase II.

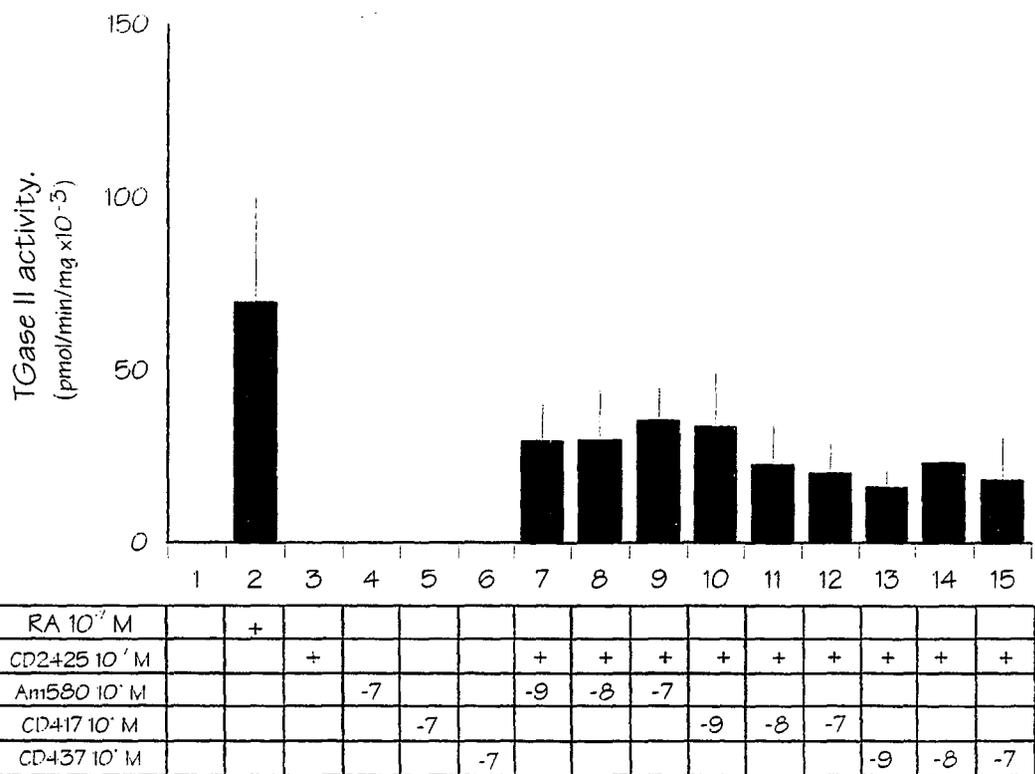
The next step in our studies was to determine if one of the RAR subtype, *i.e.* RAR $\alpha$ ,  $\beta$  or  $\gamma$ , was selectively involved in the control of TGase II expression. RPMI 8226 cells were treated as before in the presence of either Am 580, CD 417 or CD 437, three synthetic retinoids which are RAR $\alpha$ ,  $\beta$  or  $\gamma$  selective respectively, when used at nanomolar concentrations<sup>33,34</sup>. As shown on Figure 5, RAR subtype selective retinoids used alone were inactive. However, when used at 10<sup>-9</sup> M concentration in combination with CD 2425, each of them induced TGase II activity to an extent varying from 25 to 45% of the level obtained after treatment with 10<sup>-7</sup> M *atRA*. Interestingly no further induction was observed when the RAR subtype ligands were used at higher, non selective concentrations. Thus the various RAR subtypes which are all expressed in RPMI 8226 displayed functional redundancy with respect to the synergistic induction of TGase II in the presence of a RXR selective ligand.

### **Correlation between the induction of TGase II and apoptosis in RPMI 8226 cells**

Several studies have suggested a role for TGase II in apoptosis<sup>8-10</sup>. To examine whether the *atRA*-induced TGase II expression in RPMI 8226 cells was correlated with the induction of apoptosis, we performed both indirect immunofluorescence detection of TGase II protein (Figure 6, left panel) and MGG staining (right panel) of cells within 6 days of addition of different retinoids to the culture .



**Figure 4** *Effects of RAR and RXR receptor selective retinoids or both on TGase II activity in RPMI 8226 cells.* Cells were treated for 48 hours with  $10^{-7}$ M *atRA*, varying doses of CD367 (A), CD2425 (B), and their combination (C), in defined medium for 7 hours, and then in 3% FCS supplemented medium.



**Figure 5** *Effect of RAR $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$  receptor selective retinoids in combination with a RXR receptor selective retinoid on TGase II activity in RPMI 8226 cells.* Cells were treated for 48 hours with either 10<sup>-7</sup>M *atRA*, or 10<sup>-7</sup>M CD2425 (RXR selective) and various doses of Am580 (RAR $\alpha$  selective) ,CD417 (RAR $\beta$  selective) CD437 (RAR $\gamma$  selective) in defined medium for 7 hours, and then in 3% FCS supplemented medium.

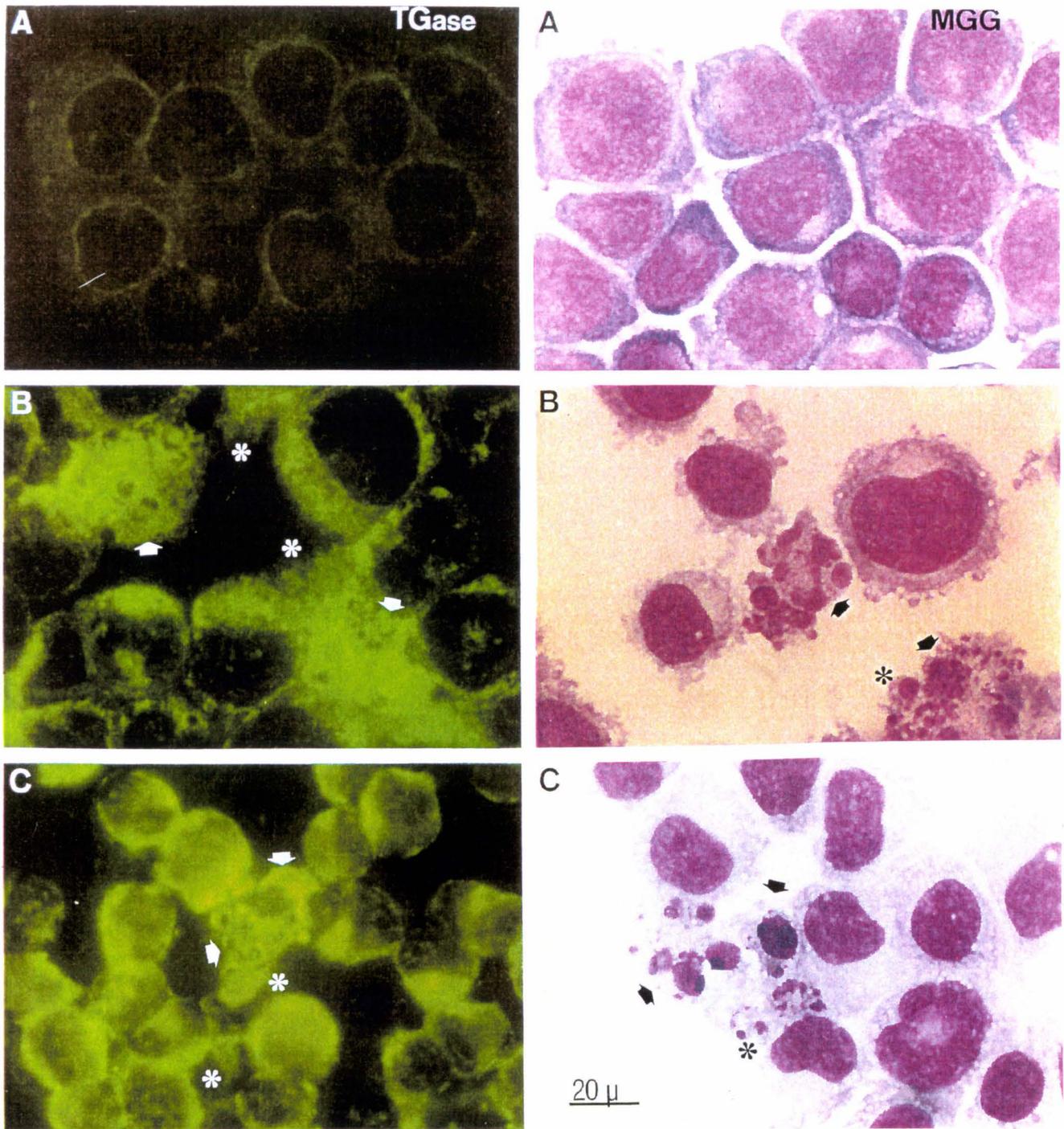


Figure 6 Correlation between the induction of TGase II protein and apoptosis in RPMI 8226 cells.

Cells were incubated for six days in the absence of retinoids (A) or in the presence of  $10^{-7}$  M *all-trans*-retinoic acid (B) or the combination of both  $10^{-7}$  M CD 367 and  $10^{-7}$  M CD 2425 (C). TGase II protein expression was detected by indirect immunofluorescence using a monoclonal anti TGase II antibody (left panel) and apoptotic cells were detected after MGG coloration on cytopsin preparations (right panel).

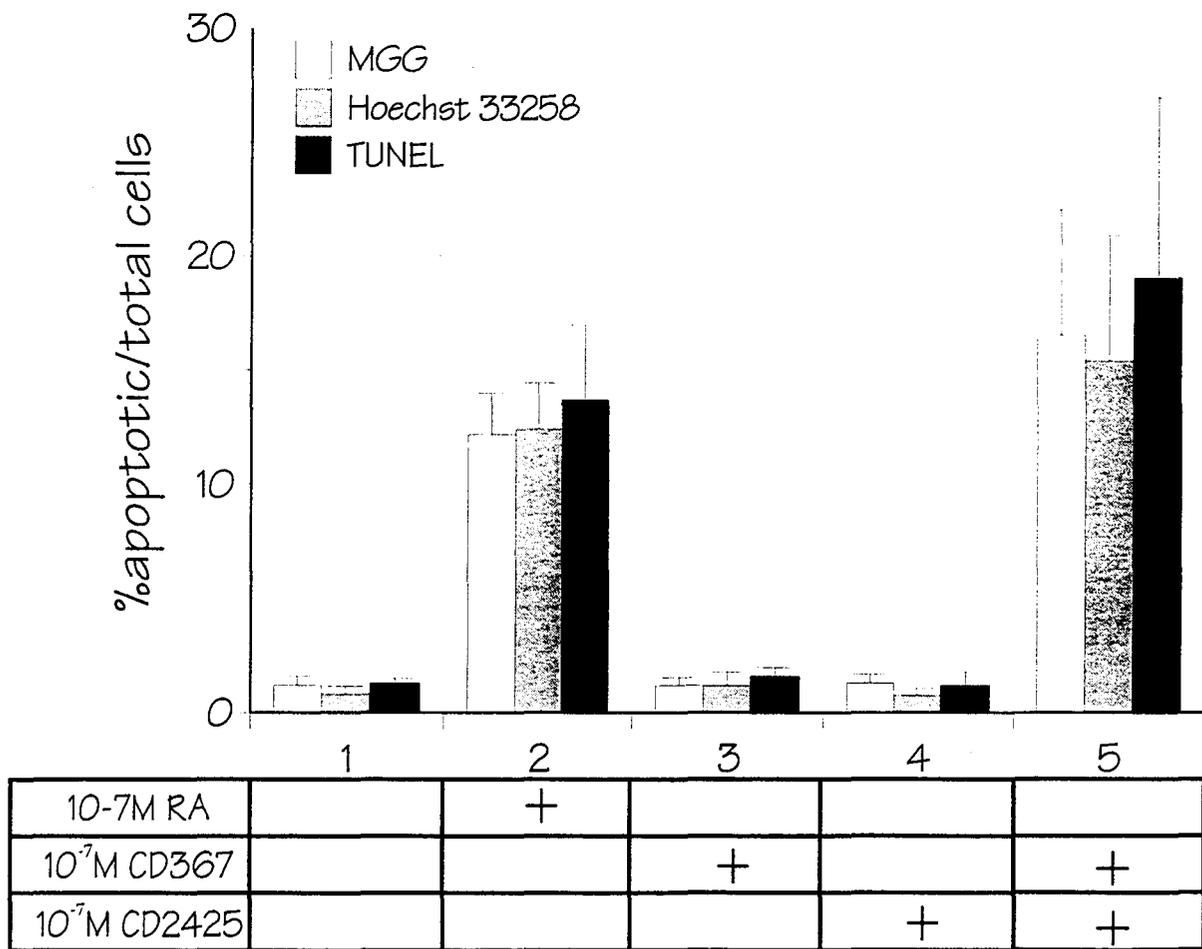
Apoptosis was quantified by counting apoptotic cells after MGG and Hoechst 33258 staining. Count of TUNEL positive cells gave similar results (Figure 7).

As shown in Figure 6A, after treatment of RPMI 8226 cells with  $10^{-7}$  M CD 367 or  $10^{-7}$  M CD 2425 alone neither apoptotic cell death (right panel) nor TGase II (left panel) were induced. The apoptotic index in the CD 367- or CD 2425-treated cultures was not different from that in control (Figure 7). Thus, mere activation of endogenous RARs by a RAR-selective retinoid such as CD 367 or of endogenous RXRs by a RXR-selective retinoid such as CD 2425 is insufficient to induce apoptosis in RPMI 8226 cells.

Interestingly, treatment with  $10^{-7}$  M *atRA*, the natural panagonist ligand, resulted in both TGase II induction (Figure 6B, left panel) and significant apoptosis. As shown in Figure 6B (right panel) numerous cells displayed the characteristics of a classical apoptotic phenotype with condensed nuclei, extensive cytoplasmic blebs, marked decrease in cellular volume and cellular fragmentation. The apoptotic index of *atRA*-treated cells was approximately 12% (Figure 7). Finally, after 6 days of culture in the presence of both  $10^{-7}$  M CD 367 and  $10^{-7}$  M CD 2425 we observed the same morphological evidence of apoptosis as in *atRA* treated cells (Figure 6C, right panel). The apoptotic index was in the 18% range (Figure 7). After *atRA* treatment TGase II appeared induced in cells undergoing apoptosis and accumulated in apoptotic bodies (Figure 6C, left panel). Taken together our results demonstrated that the induction of TGase II and apoptosis by retinoids in RPMI 8226 cells are linked and that the activation of both RARs and RXRs is required for the induction of apoptosis. Interestingly the same requirement was observed for the inhibition of cell proliferation elicited by retinoids in RPMI 8226 cells (data not shown).

## DISCUSSION

In this study we demonstrated that retinoic acid induce TGase II expression in a dose dependent manner at both the mRNA and the enzyme activity levels in RPMI 8226 cells. A retinoic acid dependent expression of the protein was also demonstrated in intact cells by indirect immunofluorescence assay. In RPMI 8226 cells, there is no detectable basal expression of TGase II, a situation also observed in other cellular models, including HL-60 human leukaemia cells, a model extensively used for the study of the mechanisms controlling TGase II expression<sup>15</sup>. Conversely, in some other cell types and tissues significant basal expression of TGase II has also been reported<sup>35-38</sup>. In most cellular models, however and whatever the basal level, retinoic acid induced TGase II, with only few exceptions<sup>35,39</sup> probably related to some poorly understood post receptor resistance.



**Figure 7** *Quantification of apoptosis.*

Cells were incubated for six days in the absence of retinoids or in the presence of  $10^{-7}$ M *atRA*,  $10^{-7}$  M CD 367,  $10^{-7}$  M CD 2425 or the combination of both  $10^{-7}$  M CD 367 and  $10^{-7}$  M CD 2425. Count of apoptotic cells were performed on cytospin preparations after MGG coloration, Hoechst 33258 staining or TUNEL assay. In each case the percentage of apoptotic cells was determined in duplicate counts of 400 cells. Mean values  $\pm$ SD from 6 independent experiments are shown.

RPMI 8226 cells express all the retinoic acid receptors mRNA, suggesting that all the RARs and RXRs proteins are also expressed in these cells, which could therefore constitute a very attractive model for the elucidation of their respective role in the control of various target genes by retinoic acid. A more limited pattern of expression of the retinoic acid receptors has been reported in HL-60 and SPOC-1 cells, two models recently used for the study of the control of expression of TGase II by retinoids : HL-60 expressed only RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$  and RXR $\beta$ , whereas SPOC-1 cells expressed only RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  and RXR $\beta$ <sup>32,40</sup>.



RAR subtype ( $\alpha$ ,  $\beta$  or  $\gamma$ ) and RXR-specific retinoids are extremely useful ligands, that, when used at appropriate selective concentrations, allow the investigation of the respective contribution of the various RARs and RXRs in the molecular control of a given retinoic acid induced response<sup>34,41</sup>. Our results demonstrated that in RPMI 8226 cells TGase II induction required the activation of both the RAR and the RXR pathways. Our report is the first trying to elucidate the molecular mechanism of the control of TGase II by retinoic acid and its correlation to apoptosis in human myeloma cells. This control however has been already investigated in other human cells by using the same kind of approach. In the HL-60 promyelocytic leukaemia cell line TGase II induction was observed in the presence of both RAR/RXR panagonists and RXR selective ligands<sup>42-45</sup>, implying that the activation of RXR alone is able to elicit the response. The implication of the RAR pathway is less clear, since conflicting results have been reported using TTNPB, a RAR selective ligand, in two different HL-60 subclones. In the HL-60 cdm-1 clone TTNPB was inactive<sup>42</sup>, whereas in the HL-60 CCL240 clone it induced TGase II activity at the same level as retinoic acid and RXR specific ligands<sup>45</sup>. These discrepancies are probably related to differences in the cellular context of the two subclones. Interestingly the HL-60 cdm-1 line is a differentiation resistant line<sup>32</sup>. In NB4 cells, a human promyelocytic leukaemia cell line expressing both the wild type RAR $\alpha$  and the PML-RAR $\alpha$  fusion protein (resulting from the reciprocal chromosomal translocation t(15:17) that is the molecular hallmark of acute promyelocytic leukaemia) RAR and RAR $\alpha$  selective retinoids were able to induce TGase II, whereas RXR-selective retinoids were inactive<sup>39</sup>. Moreover a RAR $\alpha$ -antagonist completely inhibited the expression of TGase II. Thus in these cells expression of TGase II appeared to be controlled by RARs rather than by RXR, and a peculiar role for PML-RAR $\alpha$  in the regulation has also been reported. Interestingly, the specific involvement of RAR $\alpha$  in the control of TGase II expression has been also documented in rat and mouse fibroblasts and rat tracheobronchial cells by using both RAR and RXR selective retinoids<sup>40,46</sup> and modulation of RAR $\alpha$  level by transfecting sense and antisense RAR $\alpha$  expression vectors<sup>47</sup>. RXR selective ligands displayed neither activity when used alone, nor synergy with RAR selective ligands<sup>40</sup>.

Taken together these data indicate that, whereas retinoic acid is able to induce TGase II in a large variety of tissues and species, the molecular mechanism by which it exerts this control differ strikingly and involve different retinoid receptor subtypes according to the cell model used. The pattern of expression of the various RARs and RXRs in a given cell, the promoter context of the TGase II gene and more generally the cellular context are probably responsible for the diversity observed. Recently the mouse TGase II promoter has been cloned and its inducibility by retinoids has been studied in CV-1 cells transfected with various RARs and RXRs<sup>48</sup>. In the CV-1 cells context this promoter was shown to be activated by both RAR and RXR pathways, a result different from the RAR preference observed in "natural" mouse and rat cells.

We observed that activation of both the RAR and RXR pathways is required to obtain a synergistic induction of TGase II. Such a synergy has been already reported for other retinoic acid induced responses<sup>34</sup>. A potentiation of the effect of a RAR selective ligand on HL-60 cell differentiation by RXR selective ligands has been also reported<sup>49</sup>. Such synergic and potentiating effects probably involve the activation of RAR-RXR heterodimers and a cooperation between the ligand-dependent activation functions of both partners<sup>34</sup>. No retinoid response element has been identified on the partial sequence of the human TGase II promoter published so far<sup>50</sup>, and the existence of such elements in this promoter remains to be documented. Our results suggest that a subtle equilibrium between the respective activation levels of RARs and RXRs has to be reached to obtain maximum synergy. (see the opposite effects of the combination of CD 2425 versus CD 367 with *atRA* in figure 4A and B). The observed enhancing effect of CD 2425, when added to  $10^{-7}M$  *atRA*, could be explained by a better activation of RXR, since *atRA* activates mainly RARs, its ability to activate RXRs too in living cells resulting probably from partial conversion into 9-*cis*-RA. Interestingly 9-*cis*-RA, that activates both RARs and RXRs appeared more efficient than *atRA* for the induction of TGase II (Figure 1B). Thus, in the presence of CD 2425, the response to *atRA* was shifted to a 9-*cis*-RA like response with better TGase II induction. Conversely in the presence of CD 367, the RAR selective ligand, the balance was shifted towards lower induction (Figure 4A). This inhibitory effect could result from a disequilibrium between RAR and RXR activation. We previously demonstrated that CD 367 induce the formation of RARs homodimers *in vitro*<sup>51</sup>, however the occurrence of such homodimers is not documented *in vivo*. Another possibility is an interference of CD 367 with the metabolism of *atRA* and its isomerization into 9-*cis*-RA.

Whereas the combination of a RAR panagonist (CD 367) with a RXR agonist (CD 2425) resulted in a synergic induction of TGase II and apoptosis at a level quite equivalent to the one obtained with *atRA*, the combination of the various RAR subtypes selective ligands tested with CD 2425 resulted in similar but only partial synergic induction of TGase II.

These results suggest that full TGase II induction by *atRA* probably involved the activation of all the RAR-subtypes, *i.e.* RAR $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  present in RPMI 8226 cells, and that these subtypes are partially redundant for this induction. Such a functional redundancy has been already observed in other models<sup>34</sup>.

Finally our observation that the expression of TGase II and the induction of apoptosis are regulated by retinoids in a very similar way in our cells is in good agreement with previous reports suggesting that TGase II play a role in apoptosis<sup>8-10,52,53</sup>. With their complete equipment in RARs and RXRs receptor subtypes, RPMI 8226 cells afford a very suitable model for further studies of the molecular control of apoptosis by retinoids in human myeloma.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Birckbichler for the gift of the monoclonal antibody to TGase II, Dr. Gentile for the gift of the TGase II plasmid, Dr. Mangelsdorf, Dr. Chambon and Dr. Evans for the gift of the RAR's and RXR's plasmids. We are also indebted to B Masselot, P Segard, P Plouvier and S. Tournay for technical and secretarial assistance. We thank Dr. Uwe Reichert (CIRD GALDERMA) for providing RAR and RXR selective ligands and for helpful discussion

### REFERENCES

1. Folk JE: Transglutaminases. *Annu Rev Biochem* 49:517, 1980.
2. Chiocca EA, Davies PJ, Stein JP: Regulation of tissue transglutaminase gene expression as a molecular model for retinoid effects on proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* 39:293, 1988.
3. Ikura K, Nasu T, Yokota H, Tsuchiya Y, Sasaki R, Chiba H: Amino acid sequence of guinea pig liver transglutaminase from its cDNA sequence. *Biochemistry* 27:2898, 1988.
4. Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH: Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J* 5:3071, 1991.
5. Eitan S, Schwartz M: A transglutaminase that converts interleukin-2 into a factor cytotoxic to oligodendrocytes. *Science* 261:106, 1993.
6. Kojima S, Nara K, Rifkin DB: Requirement for transglutaminase in the activation of latent transforming growth factor-beta in bovine endothelial cells. *J Cell Biol* 121:439, 1993.
7. Nakaoka H, Perez DM, Baek KJ, Das T, Husain A, Misono K, Im MJ, Graham RM: Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Science* 264:1593, 1994.

8. Fesus L, Thomazy V, Falus A: Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett* 224:104, 1987.
9. Tarcsa E, Kedei N, Thomazy V, Fesus L: An involucrin-like protein in hepatocytes serves as a substrate for tissue transglutaminase during apoptosis. *J Biol Chem* 267:25648, 1992.
10. Piacentini M, Davies PJA, Fesus L: Apoptosis II: Tissue transglutaminase in cells undergoing apoptosis, in Tomei LD, Cope FO (eds): *The Molecular Basis of Apoptosis in Disease*, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1994, p 143.
11. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251, 1980.
12. Knight RL, Hand D, Piacentini M, Griffin M: Characterization of the transglutaminase-mediated large molecular weight polymer from rat liver; its relationship to apoptosis. *Eur J Cell Biol* 60:210, 1993.
13. Yuspa SH, Ben T, Steinert P: Retinoic acid induces transglutaminase activity but inhibits cornification of cultured epidermal cells. *J Biol Chem* 257:9906, 1982.
14. Scott KF, Meyskens FL, Jr., Russell DH: Retinoids increase transglutaminase activity and inhibit ornithine decarboxylase activity in Chinese hamster ovary cells and in melanoma cells stimulated to differentiate. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:4093, 1982.
15. Davies PJA, Murtaugh MP, Moore WT, Jr., Johnson GS, Lucas D: Retinoic acid-induced expression of tissue transglutaminase in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *J Biol Chem* 260:5166, 1985.
16. George MD, Vollberg TM, Floyd EE, Stein JP, Jetten AM: Regulation of transglutaminase type II by transforming growth factor-beta 1 in normal and transformed human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 265:11098, 1990.
17. Rubin AL, Rice RH: Differential regulation by retinoic acid and calcium of transglutaminases in cultured neoplastic and normal human keratinocytes. *Cancer Res* 46:2356, 1986.
18. Denning MF, Verma AK: Involvement of retinoic acid nuclear receptors in retinoic acid-induced tissue transglutaminase gene expression in rat tracheal 2C5 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 175:344, 1991.
19. Piacentini M, Fesus L, Melino G: Multiple cell cycle access to the apoptotic death programme in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 320:150, 1993.
20. Vollberg TM, George MD, Nervi C, Jetten AM: Regulation of type I and type II transglutaminase in normal human bronchial epithelial and lung carcinoma cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:10, 1992.
21. Davies PJA, Stein JP, Chiocca EA, Basilion JP, Gentile V, Thomazy V, Fesus L: Retinoid-regulated expression of transglutaminase: links to the biochemistry of programmed cell death, in Morriss-Kay G (ed): *Retinoids in normal development and teratogenesis*, Oxford, Oxford university press, 1992, p 249.
22. Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM: The retinoid receptors, in Sporn M, Roberts AB, Goodman DS (eds): *The retinoids : Biology, Chemistry and Medecine*, 1994, p 319.

23. Lorand L, Campbell-Wilkes LK, Cooperstein L: A filter paper assay for transamidating enzymes using radioactive amine substrates. *Anal Biochem* 50:623, 1972.
24. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248, 1976.
25. Elsässer HP, MacDonald R, Dienst M, Kern HF: Characterisation of a transglutaminase expressed in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Eur J Cell Biol* 61:321, 1993.
26. Gentile V, Saydak M, Chiocca EA, Akande O, Birckbichler PJ, Lee KN, Stein JP, Davies PJ: Isolation and characterization of cDNA clones to mouse macrophage and human endothelial cell tissue transglutaminases. *J Biol Chem* 266:478, 1991.
27. Galli G, Fratelli M: Activation of apoptosis by serum deprivation in teratocarcinoma cell line: inhibition by L-acetylcarnitine. *Exp Cell Res* 204:54, 1993
28. Gavriely Y, Sherman Y, Ben-Sasson: Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493, 1992
29. Collard JF, Senecal JL, Raymond Y: Redistribution of nuclear lamin A is an early event associated with differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Cell Sci* 101:657, 1992.
30. Birckbichler PJ, Upchurch HF, Patterson MK, Jr., Conway E: A monoclonal antibody to cellular transglutaminase. *Hybridoma* 4:179, 1985.
31. Delescluse C, Cavey MT, Martin B, Bernard BA, Reichert U, Maignan J, Darmon M, Shroot B: Selective high affinity retinoic acid receptor  $\alpha$  or  $\beta$ - $\gamma$  ligands. *Mol Pharmacol* 40:556, 1991.
32. Nagy L, Thomazy VA, Shipley GL, Fesus L, Lamph W, Heyman RA, Chandraratna RAS, Davies PJA: Activation of Retinoid X Receptor induce Apoptosis in HL-60 cell lines. *Mol Cell Biol* 15:3540, 1995.
33. Bernard BA, Bernardon JM, Delescluse C, Martin B, Lenoir MC, Maignant J, Charpentier B, Pilgrim WR, Reichert U, Shroot B: Identification of synthetic retinoids with selectivity for human nuclear retinoic acid receptor  $\gamma$ . *Biochem Biophys Res Commun* 186:977, 1992.
34. Roy B, Taneja R, Chambon P: Synergistic activation of retinoic acid (RA)-responsive genes and induction of embryonal carcinoma cell differentiation by an RA receptor  $\alpha$  (RAR $\alpha$ )-, RAR $\beta$ -, or RAR $\gamma$ -selective ligand in combination with a retinoid X receptor-specific ligand. *Mol Cell Biol* 15:6481, 1995.
35. Suedhoff T, Birckbichler PJ, Lee KN, Conway E, Patterson Jr MK: Differential expression of transglutamine in human erythroleukemia cells in response to retinoic acid. *Cancer Res* 50:7830, 1990.
36. Piacentini M, Fesus L, Farrace MG, Ghibelli L, Piredda L, Melino G: The expression of "tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis). *European J Cell Biol* 54:246, 1991.
37. Thomazy V, Fesus L: Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. *Cell Tissue Res* 255:215, 1989.

38. Aeschlimann D, Paulsson M: Transglutaminases : protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids. *Thrombosis and haemostasis* 71:402, 1994.
39. Benedetti L, Grignani F, Scicchitano BM, Jetten AM, Diverio D, Lo Coco F, Avvisati G, Gambacorti-Passerini C, Adamo S, Levin AA, Pelicci PG, Nervi C. Retinoid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia involves PML-RAR $\alpha$ -mediated increase of type II transglutaminase. *Blood* 87:1939, 1996.
40. Zhang LX, Mills KJ, Dawson MI, Collins SJ, Jetten AM: Evidence for the involvement of retinoic acid receptor RAR alpha-dependent signaling pathway in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoids. *J Biol Chem* 270:6022, 1995.
41. Taneja R, Roy B, Plassat J-L, Zusi CF, Ostroski J, Reczek PR, Chambon P: Cell-type and promoter-context dependent retinoic acid receptor (RAR) redundancies for RAR  $\beta$ 2 and Hoxa-1 activation in F9 and P19 cells can be artefactually generated by gene knockouts. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6197, 1996.
42. Beard RL, Chandraratna RAS, Colon DF, Gillett SJ, Henry E, Marler DK, Song T, Denys L, Garst ME, Arefieg T, Klein E, Gil DW, Wheeler L, Kochhar DM, Davies PJA: Synthesis and structure-activity relationships of stilbene retinoid analogs substituted with heteroaromatic carboxylic acids. *J Med Chem* 38:2820, 1995.
43. Beard RL, Colon DF, Song TK, Davies PJA, Kochhar DM, Chandraratna RAS: Synthesis and structure-activity relationships of retinoid X receptor selective diaryl sulfide analogs of retinoic acid. *J Med Chem* 39:3556, 1996.
44. Boehm MF, Zhang L, Zhi L, McClurg MR, Berger E, Wagoner M, Mais DE, Suto CM, Davies JA, Heyman RA, Nadzan AM: Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells. *J Med Chem* 38:3146, 1995.
45. Nagy L, Thornazy VA, Chandraratna RAS, Heyman RA, Davies PJA: Retinoid-regulated expression of Bcl-2 and tissue transglutaminase during the differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia (HL-60) cells. *Leukaemia Res* 20:499, 1996.
46. Cai D, Ben T, De Luca LM: Retinoids induce tissue transglutaminase in NIH-3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 175:1119, 1991.
47. Denning MF, Verma AK: Involvement of retinoic acid nuclear receptors in retinoic acid-induced tissue transglutaminase gene expression in rat tracheal 2C5 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 175:344, 1991.
48. Nagy L, Saydak M, Shipley N, Lu S, Basilion JP, Yan ZH, Syka P, Chandraratna RAS, Stein JP, Heyman RA, Davies PJA: Identification and characterization of a versatile retinoid response element (retinoic acid receptor response element-retinoid X receptor response element) in the mouse tissue transglutaminase gene promoter. *J Biol Chem* 271:4355, 1996.
49. Apfel CM, Kamber M, Klaus M, Mohr P, Keidel S, LeMotte PK: Enhancement of HL-60 differentiation by a new class of retinoids with selective activity on retinoid X receptor. *J Biol Chem* 270:30765, 1995.
50. Lu S, Saydak M, Gentile V, Stein JP, Davies PJA: Isolation and characterization of the human tissue transglutaminase gene promoter. *J Biol Chem* 270:9748, 1995.

51. Lefebvre B, Rachez C, Formstecher P, Lefebvre P: Structural determinants of the ligand-binding site of the human retinoic receptor alpha. *Biochemistry* 34:5477, 1995
52. Melino G, Annicchiarico Petruzzelli M, Piredda L, Candi E, Gentile V, Davies PJA, Piacentini M: Tissue transglutaminase and apoptosis: sense and antisense transfection studies with human neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol* 14:6584, 1994
53. Piacentini M: Tissue transglutaminase : a candidate effector element of physiological cell death. In «Apoptosis in Immunology» G. Kroemer and C. Martinez. A Eds., Springer, 1995, p 163-175

**c) Discussion de l'article**

Dans cette étude nous démontrons que l'ARtt induit l'expression de la TGt de manière dose dépendante dans les cellules RPMI 8226 au niveau des ARNm et de l'activité enzymatique. L'expression de la protéine TGt est aussi démontrée *in cellulo* par immunofluorescence indirecte. Dans les cellules RPMI 8226, on ne détecte pas d'activité TGt, une situation que l'on observe dans d'autres modèles comme les HL-60 (Davies *et al*, 1985). A l'inverse, une expression de base de la TGt a été rapportée dans d'autres modèles cellulaires et tissulaires (Thomazy *et al*, 1989 ; Suedhoff *et al*, 1990 ; Piacentini *et al*, 1991) ; dans la plupart des modèles cependant, et quel que soit le niveau de base, l'ARtt induit la TGt avec seulement quelques exceptions probablement liées à des phénomènes de résistances post-récepteur non encore élucidés.

Les cellules RPMI 8226 expriment l'ensemble des ARNm des RARs et des RXRs. Elles constituent donc un modèle intéressant pour déterminer le rôle respectif de ces récepteurs dans le contrôle de divers gènes cibles de l'ARtt. Les cellules HL-60 et SPOC-1 utilisées par certains auteurs pour l'étude du contrôle de l'expression de la TGt par les rétinoïdes présentent une expression plus restreinte des récepteurs des rétinoïdes (HL-60 : RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$  et RXR $\beta$  ; SPOC-1 : RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  et RXR $\beta$ ) (Nagy *et al*, 1995 ; Zhang *et al*, 1995).

Nos résultats montrent que dans les cellules RPMI 8226, l'induction de l'activité enzymatique de la TGt nécessite les voies RARs et RXRs. Par une approche similaire à la nôtre, d'autres voies ont été élucidées dans d'autres modèles (voir revue générale).

Ces résultats indiquent que l'ARtt est capable d'induire dans une grande variété de tissus et d'espèces, et que le mécanisme moléculaire par lequel il exerce son contrôle diffère et implique des récepteurs différents selon le modèle utilisé. L'expression des divers RARs et RXRs dans la cellule, le contexte du promoteur et plus généralement celui de la cellule sont probablement responsables de la diversité des réponses observées.

Récemment, une région promotrice du promoteur murin de la TGt a été clonée et sa régulation par les rétinoïdes testée dans les cellules CV-1 transfectées (Nagy *et al*, 1996). Dans le contexte des cellules CV-1 ce promoteur peut être activé par la voie RARs et la voie RXRs. Ce résultat diffère de la voie RAR $\alpha$  trouvée dans les cellules SPOC-1 de rat (Zhang *et al*, 1995).

L'observation que les deux voies RARs et RXRs sont requise pour l'induction de l'activité TGt suggère que l'effet des rétinoïdes passe probablement par l'activation d'un hétérodimère RAR-RXR et une coopération entre les fonctions d'activations dépendantes du ligand des deux partenaires. Aucun élément de réponse aux rétinoïdes n'a été identifié dans la séquence partielle du promoteur humain de la TGt, l'existence de tel motif restant à documenter.

Nos résultats suggèrent qu'un équilibre subtil entre l'activation des RARs et des RXRs permet l'activation optimale de l'enzyme. L'augmentation observée quand le CD 2425 est ajouté à l'ARtt peut être expliquée par une meilleure activation des RXRs, puisque l'ARtt active uniquement les RARs et que sa capacité à activer les RXRs résulte probablement de sa conversion dans les cellules en *9-cis* AR. Ainsi le *9-cis* AR qui active les RARs et les RXRs est plus efficace que l'ARtt dans l'induction de la TGt. Donc en présence de CD 2425, la réponse de l'ARtt est déplacée vers une induction similaire à celle du *9-cis* AR. Inversement en présence de CD 367, un RAR sélectif, la balance est déplacée vers une plus faible induction. Cet effet inhibiteur pourrait être le résultats d'un déséquilibre entre l'activation des RARs et des RXRs. Il a été montré au laboratoire que le CD 367 induit la formation d'homodimères RAR *in vitro* (Lefebvre, 1995), cependant, la fonction de cet homodimère n'est pas documenté *in vivo*. Une autre possibilité est que le CD 367 interfère sur le métabolisme de l'ARtt et son isomérisation en *9-cis* AR.

L'association des rétinoïdes sélectifs des sous-types de RAR avec le CD 2425 provoque une induction partielle de la TGt par rapport à l'association CD 367 plus CD 2425. Ces résultats suggèrent que l'induction complète de la TGt par l'ARtt implique probablement l'activation de tous les RARs, *i.e* RAR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  présent dans les cellules RPMI 8226, et que ces sous-types sont partiellement redondants dans l'induction de l'enzyme.

Finalement, l'observation que l'expression de la TGt et de l'induction de l'apoptose sont régulées par des voies très similaires dans les cellules RPMI 8226 est en accord avec les données qui suggèrent que la TGt joue un rôle dans l'apoptose (voir revue générale : TGt et apoptose).

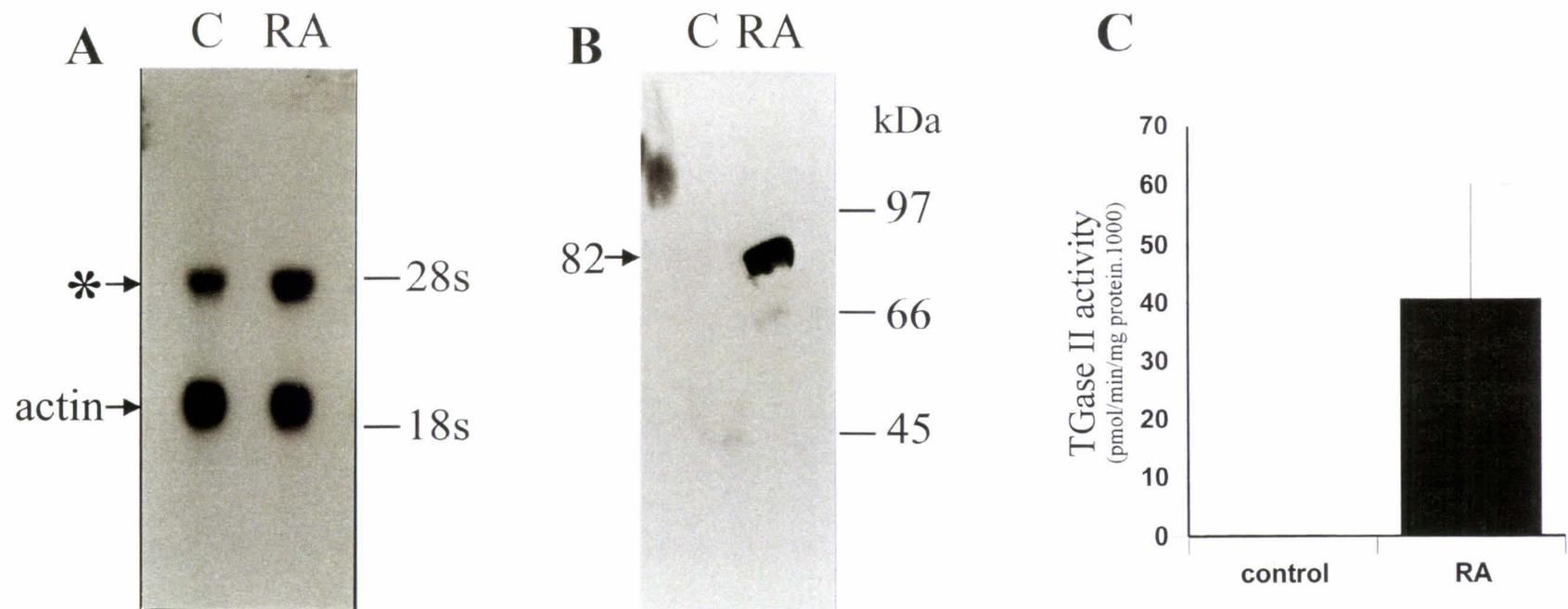
## II. Mise au point de la technique de RT-PCR pour l'étude des ARNm de la TGt

L'ARtt induit l'expression de la TGt dans divers types cellulaires (Yuspa *et al*, 1982; Davies *et al*, 1985, 1992; Rubin *et al*, 1986; Suedhoff *et al*, 1990; Piacentini *et al*, 1991, 1992; Goossens *et al*, 1993; Fraij *et al*, 1992, 1996; Defacque *et al*, 1995). Cependant, le niveau (transcriptionnel, traductionnel ou enzymatique) où cette régulation arrive n'est pas toujours bien élucidé.

L'activité TGt est indécélable dans les cellules RPMI 8226 non traitées. Un traitement par l'ARtt induit l'activité enzymatique (Figure 24 C). Une protéine de 82kDa est trouvée dans les cellules traitées par l'ARtt. L'induction de la protéine et de son activité enzymatique n'est pas corrélée au taux des ARNm détectés par Northern blot. On peut voir la présence d'un transcrite dans les cellules traitées ou non par l'ARtt (Figure 24 A). Cette divergence entre l'analyse des ARNm étudiés par Northern blot analysis versus l'activité enzymatique et l'analyse des protéines par Western blot, amène deux hypothèses : une régulation post-transcriptionnelle de la TGt ou un artefact dans l'analyse par Northern blot.

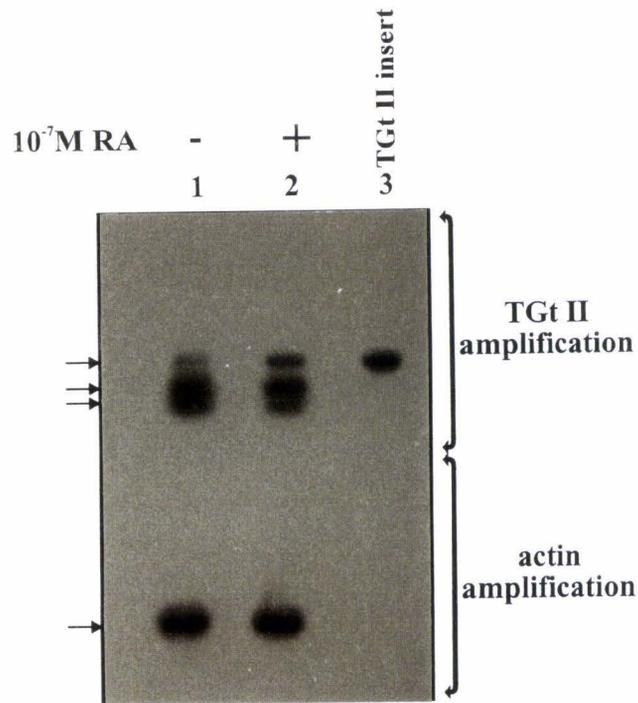
Avant de tester la première hypothèse, le taux des ARNm a été testé par RT-PCR, une méthode réputée plus sensible que le Northern blot. Les amorces ont été choisies d'après les travaux publiés par Elsässer *et al* (1993), et pour leur absence d'homologie connue dans les banques de données (FASTA à EBI : Institut Européen de Bio-informatique). La RT-PCR est réalisée sur des ARN totaux. La révélation des produits de RT-PCR par l'ADNc (hTG1) de la TGt (Gentile *et al*, 1991), utilisée pour la révélation des Northern blot, permet de compter 3 bandes. Une bande de 301pb attendue régulée par l'ARtt, et deux bandes non régulées par l'ARtt (à 200 et 150 pb approximativement) (Figure 25). Les taux d'expression de la  $\beta$  actine ne sont pas modifiés après traitement par l'ARtt. La même analyse par RT-PCR d'ARN totaux issus de la lignée cellulaire humaine dérivée d'un carcinome pancréatique (PaTu 8902) (Elsässer *et al*, 1993), ne révèle que la bande à 301pb. Une autre lignée cellulaire humaine de myélome U266 (A.T.C.C. TIB-196) testée au laboratoire montre trois bandes comme dans les RPMI 8226 (résultats non montrés).

Deux homologues de la TGt ont été isolés de cellules d'érythroleucémie humaine HEL induites par l'ARtt: la TGH (Fraij *et al*, 1992) et la TGH2 (Fraij *et al*, 1996) avec des transcrits de 1.9 et 2.4kb respectivement. TGH2 ne peut pas hybrider avec nos amorces. TGH peut réagir et donner le même produit que la TGt, mais aucun transcrite de taille de 1.9 kb n'est détecté dans le Northern blot. L'étape suivante a été de caractériser et d'identifier ces trois bandes. La bande de 301 bp régulée par l'ARtt supposée être la TGt a été contrôlée en réalisant une PCR sur l'ADNc de la TGt, puis une coupure par l'enzyme de restriction Bam HI (un seul site dans la séquence). Elle donne la figure de digestion attendue : 2 fragments de 207 pb et 94 pb (Figure 26). Le fragment d'ARNm de la TGt recouvre au moins un intron comme le montre le produit de PCR réalisé sur l'ADN génomique



**Figure 24** : Effet de l'ARt  $10^{-7}M$  sur les ARNm (A), de la protéine (B) et de l'activité enzymatique (C) de la TGt dans les cellules RPMI 8226.

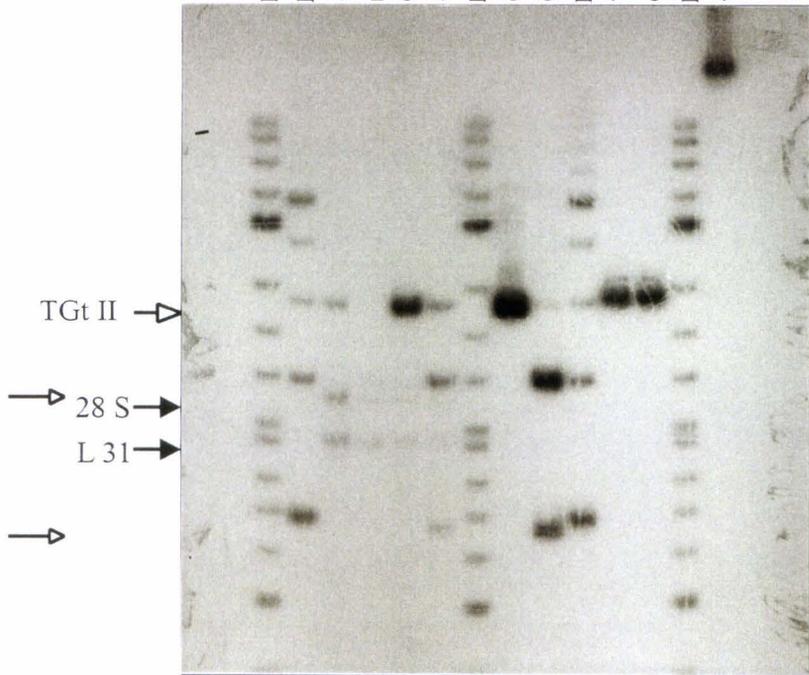
Les cellules sont traitées pendant 7 heures dans un milieu défini, complété ensuite à 3% SVF. **A** : 8  $\mu g$  d'ARN totaux de cellules traitées pendant 7 heures sont analysés par Northern blot. Pour l'hybridation, des sondes d'ADNc de la TGt et de l'actine marquées au  $^{32}P$  sont utilisées. Les positions des ARNr 28s et 18s sont indiquées sur le côté gauche (\* indique la position hypothétique de la TGt). **B** : Les protéines d'un lysat cellulaire de cellules traitées pendant 48 heures sont testées en Western blot. Un anticorps monoclonal anti-TGt humaine et un anticorps secondaire couplé à la peroxydase sont utilisés pour visualiser la bande. **C** : Les protéines d'un lysat cellulaire de cellules traitées pendant 48 heures sont testées pour l'activité TGt. (C : contrôle ; RA : AR  $10^{-7}M$ ).



**Figure 25** : RT-PCR réalisée sur les ARN totaux dans les cellules RPMI 8226.

Les cellules sont cultivées dans un milieu défini et traitées en présence (couloir 1) ou non d'ARtt (couloir 2) pendant 7 heures. Les ARN totaux (1 $\mu$ g) sont soumis à une RT-PCR (35 cycles) avec les amorces TGt ou actine. Les produits d'amplification sont fractionnés sur gel d'agarose 2%, transférés sur membrane Hybond N+ et hybridés avec des sondes d'ADNc marquée au  $^{32}$ P de la TGt et de l'actine. Une échelle de 100 pb d'ADN est utilisée comme marqueur. La taille des produits de PCR est estimée à 301 pb, 250 pb et 150 pb pour la PCR TGt et 314 pb pour la PCR actine. Un plasmide TGt est utilisé comme contrôle PCR (couloir 3).

TGt II amplification		+	+	+	+		+	+		-	-		+	
actin amplification		-	-	-	-		-	-		+	+		-	
10 <sup>-7</sup> M RA		-	-	+	+		-	-		-	+		-	
Bam HI digestion		-	+	-	+		-	+		-	-		-	
	MM $\phi$ x174	MM ladder 100bp	1	2	3	4	MM $\phi$ x174	5	6	MM ladder 100bp	7	8	MM $\phi$ x174	9



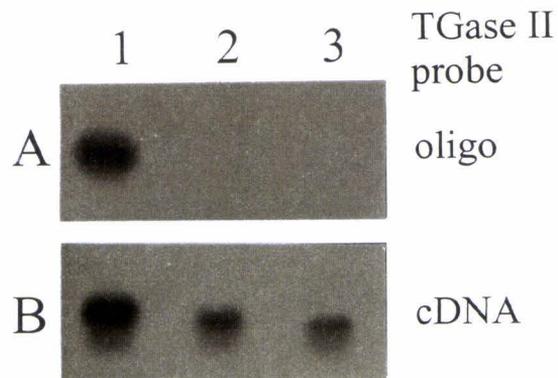
**Figure 26 : Identification de la bande correspondant à la TGt.**

Les cellules sont traitées dans un milieu défini pendant 7 heures. Les ARN totaux (1µg) sont soumis à une rétrotranscription. Une PCR en présence de <sup>32</sup>P αdCTP (35 cycles) est réalisée avec les amorces TGt ou actine. Les produits d'amplification sont fractionnés sur gel de polyacrylamide à 6%. Les échelles d'ADN de 100pb et Φx174 sont utilisées comme marqueurs. (couloir 1 à 4, et 7 et 8 : ARN ; couloir 5 et 6 : ADNc TGt ; couloir 9 : ADN génomique).

(Figure 26, couloir 9). Pour identifier les autres bandes non régulées par l'ARtt, les produits de PCR ont été séquencés (Eurogentec, Belgique) (Figure 27). La bande régulée par l'ARtt montre 100% d'identité sur les 301 pb avec l'ARNm de la TGt humaine entre 1253 pb et 1553 pb. La bande de 201 pb montre sur les 159 bp, en dehors des amorces, une identité de 99.4% avec l'ARN ribosomal 28S humain entre les positions 1911 pb et 2069 pb (Banque EMBL: M11167). La dernière bande de 147 pb montre, excepté les amorces (soit 106 pb), 85.84% d'identité avec l'ARNm humain pour la protéine ribosomale L31 (séquence +40 pb à +146 pb) (Banque EMBL: X69181) (Figure 26). Le produit d'amplification reste le même lorsque l'on change les concentration en  $MgCl_2$  (0.5 à 3 mM) ou la température d'hybridation (52 à 58°C) avec un  $T_m$  à 49.2°C et 51.2°C pour l'amorce en amont et en aval respectivement (résultats non montrés). Ce résultats est surprenant car l'amorce en amont et l'amorce en aval présentent respectivement une homologie stricte avec la séquence de l'ARNr 28s de 23,8% et de 42,85%. Néanmoins, il est à noter que, les homologies strictes bien que modérées entre les amorces et les séquences de l'ARNr 28S sont localisés en 3' des séquences. Des erreurs d'appariements sont tolérées si elles sont localisées en 5' des amorces, qui peuvent s'hybrider à la séquence de l'ARN d'une manière dégénérée durant les premiers cycles de PCR (Liang et Pardee, 1992). De plus, l'abondance de l'ARNr 28s dans la cellule favorise son amplification. L'ARNm de la protéine L31, moins abondant que l'ARNr 28s, quant à lui présente une homologie de 47,61% avec les deux amorces et une localisation de ces homologies toujours en 3' des amorces. Comment supprimer ces réactions croisées ? Travailler avec de l'ARNm polyA va supprimer les bandes d'ARNr, mais l'ARN polyA n'est pas aussi facile à obtenir que l'ARN total, cela demande plus de cellules, et ne peut pas supprimer les réactions croisées avec l'ARNm. Une solution est de pratiquer une détection sélective du produit recherché en utilisant des amorces internes à la séquence amplifiée comme sonde. Le résultat est montré dans la Figure 28. Seule la bande régulée par l'ARtt est révélée avec la sonde amorce interne versus toutes les bandes par la sonde d'ADNc TGt. Le même résultat est obtenu avec la lignée cellulaire U266 (résultats non montrés). Donc l'ARtt induit la TGt à la fois au niveau de l'activité enzymatique, de la protéine et des ARNm, suggérant une régulation pré-traductionnelle .

Une adaptation de la méthode de RT-PCR nous à permis d'affiner nos résultats. Nous avons appelé cette méthode, qui est également utilisée par d'autres équipes, la RT-PCR «seuil». La technique de RT-PCR «seuil» consiste à réaliser tout d'abord une étape de transcription inverse des ARN totaux (RT), puis d'une étape de polymérisation en chaîne (PCR) avec un nombre de cycles variable sur les ADNc synthétisés. La PCR est réalisée avec des amorces spécifiques du gène d'intérêt. La sélectivité est renforcée par l'utilisation d'un oligonucléotide interne à la séquence amplifiée, lors de la révélation des produits de PCR. Les variations d'expression des ARNm s'apprécie par leur seuil d'apparition (nombre de cycles PCR). Plus un messager est exprimé, plus il sera détecté avec un





**Figure 28** : Hybridation différentielle des produits de RT-PCR de la TGt dans les cellules RPMI 8226.

Les cellules sont traitées avec l'ARtt  $10^{-7}M$  dans un milieu défini pendant 7 heures. Les ARN totaux ( $1\mu g$ ) sont soumis à une RT-PCR (35 cycles) avec des amorces TGt. Les produits d'amplification sont fractionnés sur gel de polyacrylamide à 6%. Après coloration au BET, les bandes sont extraites, séparées sur gel d'agarose à 2%, transférées sur membrane Hybond N+. Les bandes sont révélées par la sonde d'ADNc TGt marquée au  $^{32}P$  (**A**) ou par la sonde oligonucléotidique interne à la séquence amplifiée de la TGt marquée au  $^{32}P$  (**B**). (produits de PCR : couloir 1 : 301 pb ; couloir 2 : 250 pb ; couloir 3 : 150 pb).

nombre de cycles petit. La méthode est standardisée avec la  $\beta$  actine, gène domestique, qui se trouve être invariablement amplifiée pour les différents échantillons.

L'évaluation de la variation des produits d'amplification se fonde sur le principe de la PCR qui multiplie d'un facteur 2 à chaque cycle de PCR le produit de départ ( $n$  cycles =  $2^n$ ). Cependant, cette règle est à prendre avec précaution, car elle dépend du rendement de la réaction. Comme l'on compare toujours les produits d'amplification pour un même couple d'amorces, on peut faire abstraction de ce problème, puisque s'il existe un problème de rendement ( $<2$ ), il sera le même pour chaque échantillon. De plus, on ne compare que des échantillons traités simultanément, évitant ainsi toute erreur d'interprétation due à des variations techniques. Ce qui n'empêche pas la reproductibilité inter-manipulation d'être excellente. La linéarité de la réaction a été testée par une dilution en cascade au demi d'échantillons d'ADNc et par l'addition d'un cycle d'amplification PCR pour chaque dilution. La réaction est linéaire, sauf aux très faibles concentrations d'ADNc où la bande détectée par PCR augmente. Les manipulations réalisées à partir d' $1\mu\text{g}$  d'ARN totaux se situent au dessus de cette zone où l'on perd la linéarité.

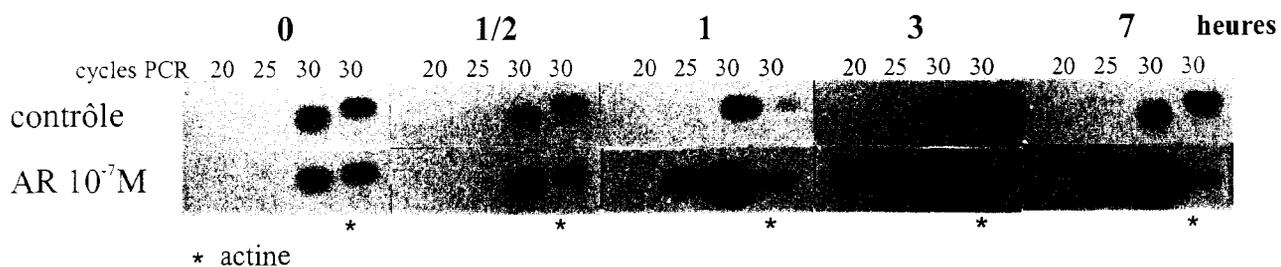
L'originalité de la technique se trouvant non dans l'utilisation de la RT-PCR qui poussée à l'extrême peut rendre positif tout échantillon, mais dans son utilisation seuil qui permet de constater des variations. Elle permet un dosage semi-quantitatif de l'expression de l'ARNm de TGt. Il est à noter que la coamplification des deux bandes parasites 201 et 159 pb qui se produit dans nos tubes n'empêche pas l'utilisation de la méthode. Comme ces deux bandes ne sont pas régulées par l'acide rétinoïque, leur interférence avec le dosage de la bande 301 pb est considérée comme équivalente dans les échantillons traités et non traités. Nous avons d'ailleurs vérifié la linéarité en ajoutant à un même extrait d'ADNc de cellules non traitées des quantités croissantes d'ADNc complémentaire de la TGt provenant de notre sonde plasmidique.

### **III.Régulation de l'expression des ARNm de la TGt par les rétinoïdes**

Comme pour la détermination de l'implication des voies RARs et RXRs dans le contrôle par les rétinoïdes de l'activité enzymatique, une série de rétinoïdes de synthèse sélectifs d'un type ou d'un sous-type de récepteur a été utilisée pour disséquer la(les) voie(s) de régulation de la transcription de la TGt (voir tableau II article Blood).

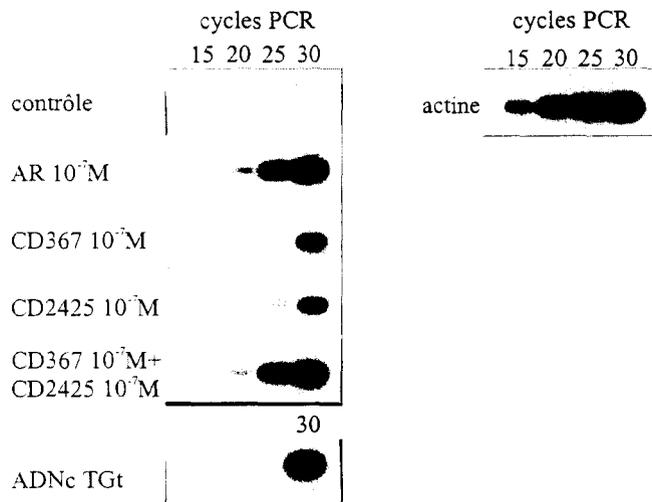
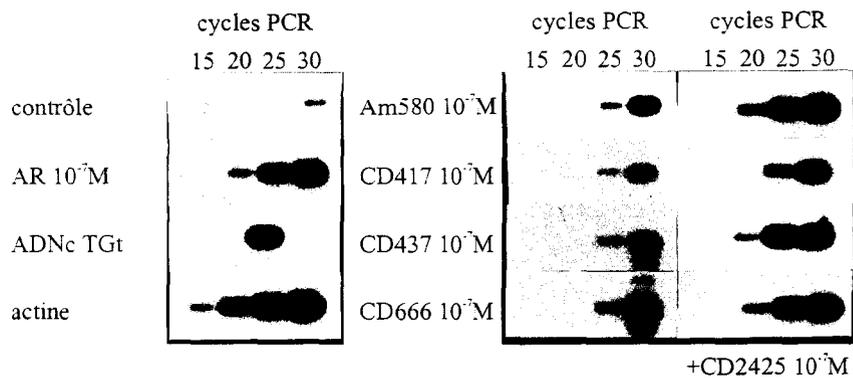
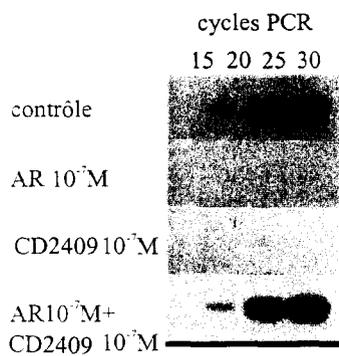
Un traitement à l'ARtt  $10^{-7}$  M induit l'expression des ARNm de la TGt dans l'heure qui suit (Figure 29) et d'un facteur de l'ordre de 1000 au bout de 7 heures par rapport au contrôle (10 cycles PCR de différence  $2^{10} = 1024$ ) (Figure 30 A).

Le CD367 (RARs sélectif) ( $10^{-7}$  M) ou le CD2425 (RXRs sélectif) ( $10^{-7}$  M) sont capables d'induire l'expression des ARNm d'un facteur 100. L'association des deux ligands donne une induction similaire à celle obtenue avec l'ARtt (Figure 30 A). L'association de ces ligands avec l'ARtt ne permet pas de retrouver les modulations observées au niveau de l'activité enzymatique. On ne



**Figure 29** : Cinétique d'apparition des ARNm de la TGt après traitement par l'ARtt 10<sup>-7</sup>M des cellules RPMI 8226.

Les ARN totaux (1µg) sont soumis à une réaction de RT-PCR. Les produits d'amplification sont fractionnés sur gel d'agarose à 2%, transférés sur membrane Hybond N+, hybridés avec des sondes oligonucléotidiques marquées au <sup>32</sup>P pour la TGt et l'actine.

**A****B****C**

**Figure 30** : Effet des rétinoïdes sur l'expression des ARNm de la TGt dans les cellules RPMI 8226 après 7 heures de traitement.

retrouve pas l'augmentation par le CD 2425 ou la diminution par la CD 367 de la réponse induite par l'ARtt (résultats non présentés). En fait les différences d'activité observées (inhibition de 30 à 40% en présence de CD 367; induction multipliée par un facteur 2 à 3 en présence de CD 2425) sont trop faibles pour être vues en RT-PCR (différence d'un seul cycle d'amplification).

Dans le but de déterminer le rôle respectif des sous-types RAR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , des ligands monospécifiques ont été utilisés. On retrouve comme pour la régulation de l'activité une certaine redondance fonctionnelle de ces sous-types, avec une induction partielle ou similaire à celle obtenue avec l'ARtt, selon qu'ils sont utilisés seuls ou associés au ligand RXRs (Figure 30 B).

L'utilisation d'un rétinoïde à activité anti-AP1 sans activité de transactivation (CD2409) n'induit pas l'expression des ARNm de la TGt ni ne module celle obtenue par traitement avec l'ARtt (Figure 30 C).

Avec la sensibilité de la RT-PCR on peut observer une augmentation de l'expression des ARNm en présence de ligand RARs ou RXRs sélectifs alors qu'aucune activité enzymatique n'est détectée. L'existence de cette augmentation montre qu'une activation faible des voies RARs ou RXRs est possible avec ces ligands. En revanche aucune activité enzymatique n'est détectée, ce qui est logique compte tenu du seuil de sensibilité de la méthode de dosage de la TGt : un taux d'ARNm correspondant à 1% du taux maximal obtenu avec l'ARtt devrait conduire logiquement à l'induction d'une activité TGt correspondant à 1% de l'activité maximale. Cette valeur est pratiquement égale au seuil de détection de la méthode.

La voie RAR et la voie RXR sont capables d'induire de façon modérée par rapport à l'ARtt l'expression des ARNm de la TGt. Les deux voies sont synergiques puisque l'on obtient un résultat comparable à l'ARtt en les associant. Le contrôle observé ici est comparable à celui de l'élément de réponse versatile DR5/7 trouvé dans la région promotrice du gène murin de la TGt. En effet, les auteurs retrouvent une induction partielle avec un ligand RAR ou RXR utilisé seul et une induction similaire à celle obtenue avec l'ARtt quant on les associe (Nagy *et al*, 1996 ; Yan *et al*, 1996). Les voies RARs et RXRs agissent de façon synergique dans divers modèles cellulaires (pour revue : Minucci et Ozato, 1996). Bien qu'un motif de type AP1 soit détecté dans la région promotrice du gène TGt humain (Lu *et al*, 1995), il ne semble pas impliqué dans le contrôle par les rétinoïdes comme le montre l'utilisation du CD2409.

#### **IV. Les homologues de la TGt**

Dans les cellules d'érythroleucémie humaine HEL, l'ARtt induit l'expression de trois transcrits de 4 kb, 2,4 kb et 1,9 kb (Fraj *et al*, 1996). Les transcrits de 1,9 et 2,4 kb correspondent aux homologues de la TGt : TGH et TGH2. On ne détecte pas en northern blot dans les cellules RPMI

8226 de tels transcrits (Figure 24). Cependant, les amorces utilisées pour l'étude de l'expression des ARNm de la TGt croissent avec la séquence de la TGH. Pour évaluer l'induction relative de chacun de ces transcrits par l'ARtt dans nos cellules, des amorces spécifiques ont été sélectionnés pour chaque ARNm (Figure 31 A et B). Les amorces spécifique de la TGt, qui ne croisent plus avec la TGH, donne un résultat similaire à celui obtenu avec le premier jeu d'amorces. Les amorces pour la TGH ou TGH2 quant à elles permettent de détecter dans les cellules traitées par l'ARtt un produit de PCR qui se révèle après séquençage être la TGH ou la TGH2 (Figure 31 C). Cependant, l'expression de ces deux homologues de la TGt est très faible.

L'ARtt régule donc l'expression des trois transcrits et les ARNm TGt sont largement majoritaires dans les cellules RPMI 8226.

### **V.Effet de l'actinomycine D et de la cycloheximide sur l'expression de la TGt induite par l'ARtt**

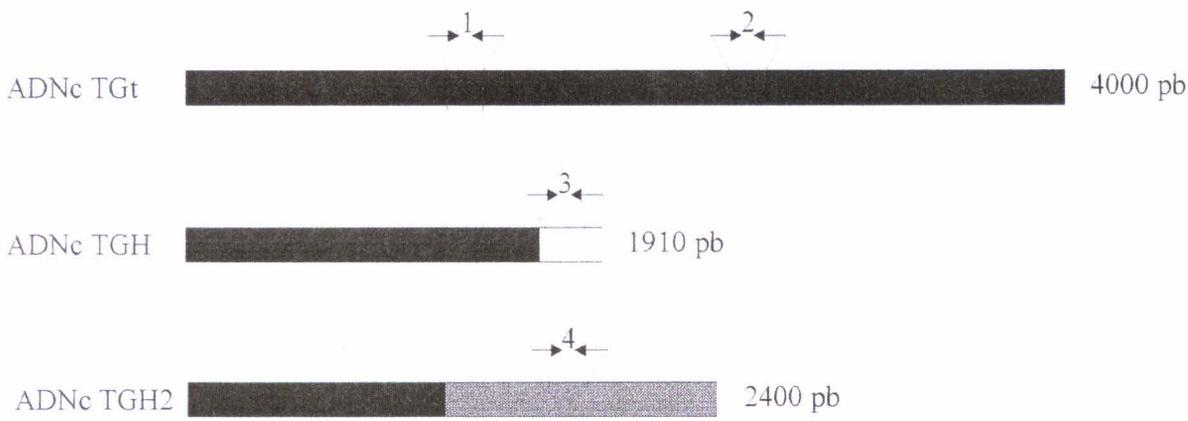
Un traitement à la cycloheximide ( $10 \cdot 10^{-6}$  M), un inhibiteur de la traduction, n'empêche pas l'induction des ARNm de la TGt par l'ARtt ( $10^{-7}$  M) (Figure 32 B). Cela suggère que le contrôle par l'ARtt est direct et ne nécessite pas la synthèse de protéines intermédiaires. Ce traitement inhibe l'activité enzymatique de la TGt induite par l'ARtt, indiquant qu'il faut une néosynthèse de la TGt (Figure 32 A).

Un traitement à l'actinomycine D ( $5 \cdot 10^{-6}$  M), un inhibiteur de la transcription, quant à lui inhibe l'induction par l'ARtt ( $10^{-7}$  M) des ARNm et l'activité enzymatique de la TGt (Figure 32 A et B). Ce résultat suggère un contrôle transcriptionnel de l'expression la TGt par les rétinoïdes.

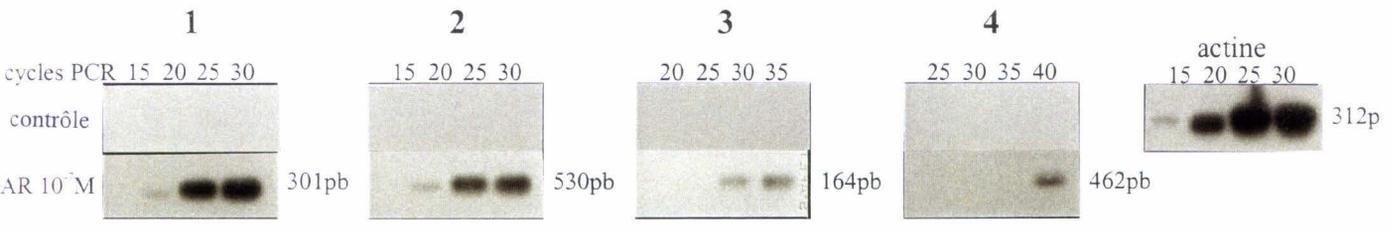
### **VI.Régulation de l'expression de la protéine TGt par les rétinoïdes**

Un anticorps monoclonal dirigé contre la TGt humaine (Birckbichler *et al*, 1985), a été utilisé pour étudier l'expression de la protéine en western blot, afin de déterminer sa régulation par les rétinoïdes.

L'ARtt  $10^{-7}$  M induit en 48 heures, l'expression d'une bande massive entre 97 et 66 kDa (figure 24). L'anticorps utilisé au laboratoire nous a été fourni au départ par le Dr. Birckbichler puis il a été commercialisé par la suite par NeoMarker. Ce nouvel anticorps permet la révélation dans les cellules traitées par l'ARtt, de deux bandes en western blot, la bande attendue pour la TGt à 82 kDa et une bande inférieure à 76 kDa (Figure 33). L'existence d'une telle bande n'est pas documentée sauf par Fesus *et al* (1989). Cette bande pourrait être due à une réaction croisée de l'anticorps avec une protéine autre que la TGt ou représenter une isoforme, un produit de dégradation ou de modification covalente de la protéine TGt. En absence de stimulation, les deux bandes sont absentes sauf la bande à 76 kDa que l'on retrouve parfois dans le contrôle. La stimulation par l'ARtt augmente fortement et constamment la bande à 82 kDa alors que celle à 76 kDa présente une augmentation plus variable. Le

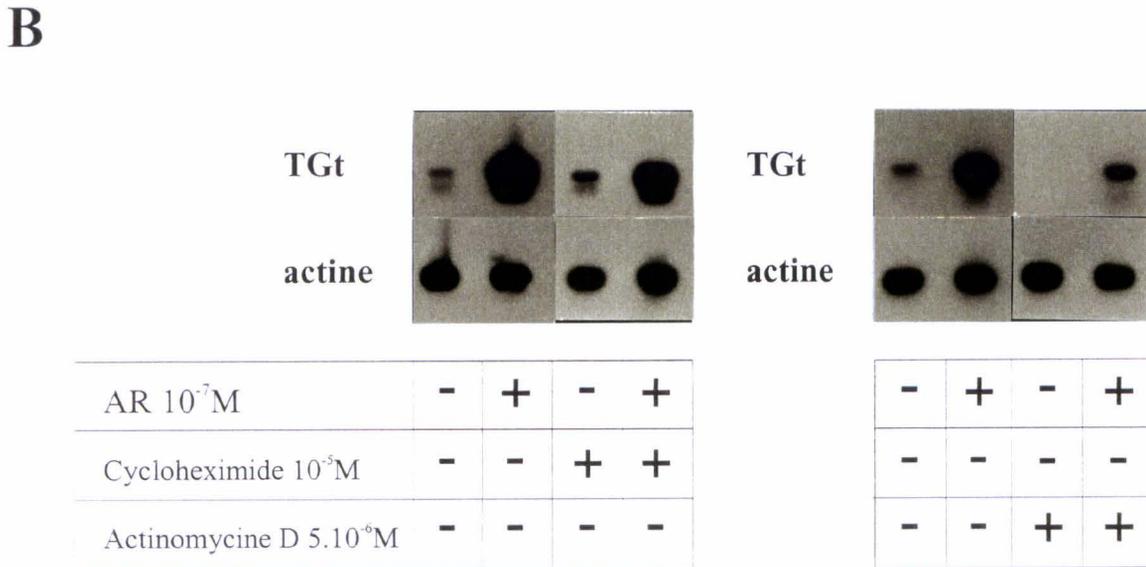
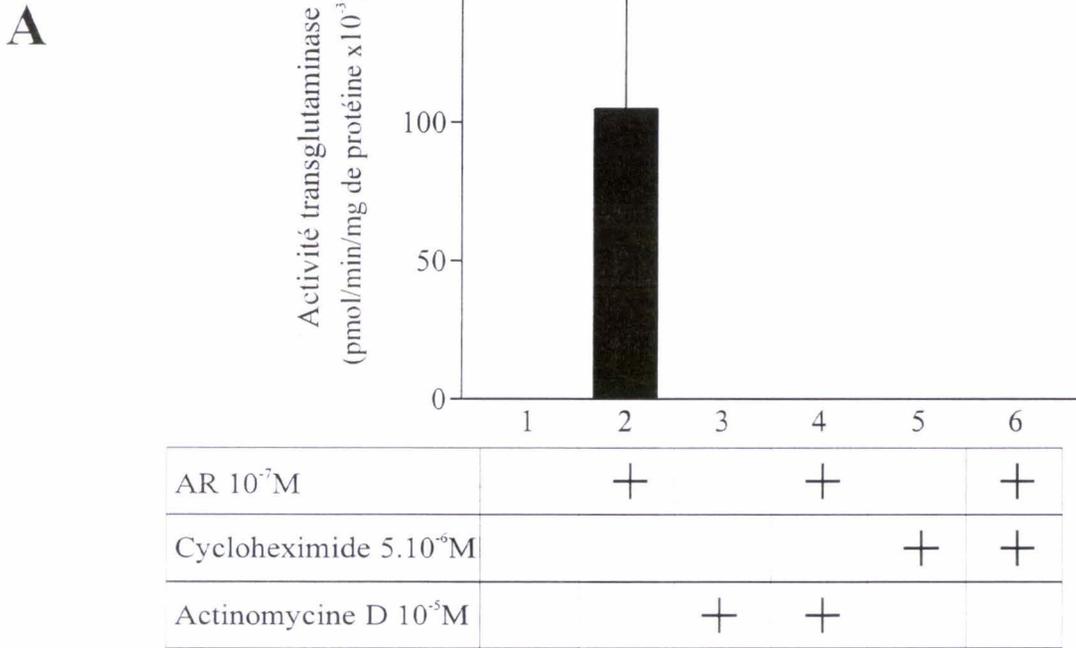


N° du jeu d'amorces	Cibles	amorce	Séquences (de 5' en 3')
1	TGt/TGH	en amont en aval interne	CAG TTC CAG TTC GTG CCA TCA ATG CCT GTC TCC TCC TTC TCG ATC ACC CAC ACC TAC AAA TAC CCA GAG
2	TGt	en amont en aval interne	GAC CTA CAT TCC CTC TCC TGC CTG CCT CCT CTC TCT AAG CCT GAG GCA CCC AGC ACA TAG TAG
3	TGH	en amont en aval interne	GGT AAA GCC CTG TGT TCC TGG AAG TGG GTT GAT ATT TAT AAA AGT GTC TGT GGG GTG AAA TCA
4	TGH2	en amont en aval interne	TGG AGT AGG AAT CAG GAC ATC TGC TTT CTT TCT TGA CAC TGA AGT CTC TCC AAT GAT AGC CCT



**Figure 31 : Etude des homologues de la TGt par RT-PCR.**

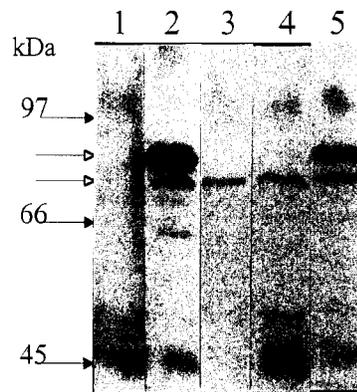
A position des couples d'amorces utilisés.  
 B séquences des amorces  
 C produits d'amplification obtenus sur les ARN totaux de cellules traitées ou non par l'ARt 10<sup>-7</sup>M pendant 7 heures.



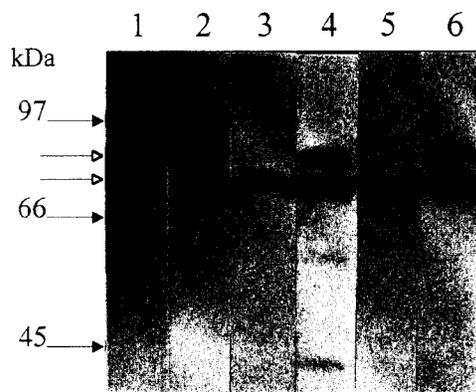
**Figure 32** : Effets de l'actinomycine D et de la cycloheximide sur l'induction de l'expression de la TGt par l'ARtt.

**A** activité enzymatique.

**B** ARNm détectés par RT-PCR.



AR $10^{-7}$ M	+		
CD367 $10^{-7}$ M		+	+
CD2425 $10^{-7}$ M			+



AR $10^{-7}$ M	+				
CD666 $10^{-9}$ M		+	+	+	+
CD2425 $10^{-8}$ M			+		+
CD2665 $10^{-7}$ M				+	+

**Figure 33** : Etude des effets des rétinoïdes sur l'induction de la protéine de la TGt par Western blot dans les cellules RPMI 8226 après 48 heures de traitement.

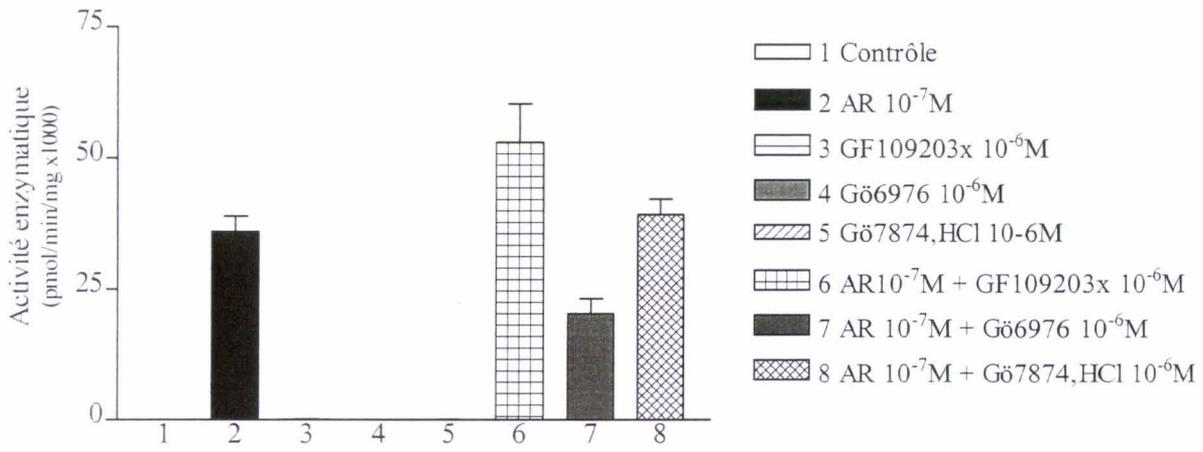
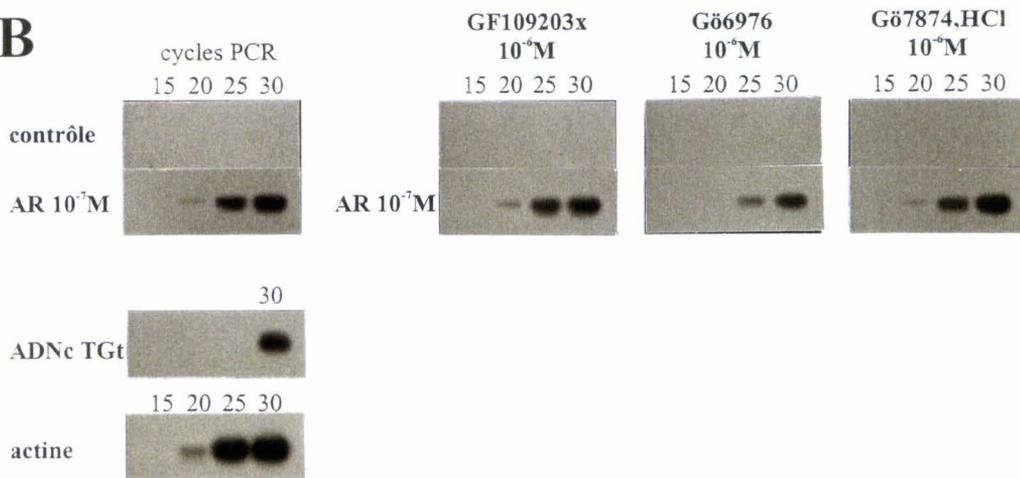
CD367, le CD 2425 ou le CD 666 utilisés seuls n'induisent pas la bande à 82 kDa et donnent une induction modeste de la bande à 76 kDa. L'association des ligands RAR et RXR (CD 367 + CD 2425 ou CD 666 + CD 2425) produit une induction synergique de la bande à 82 kDa et une synergie plus inconstante pour la bande à 76 kDa. L'addition d'un antagoniste RAR $\beta$  (CD 2665) inhibe les effets du CD 666 et CD 2425 sur l'induction de la bande à 82 kDa et ne semble pas moduler la bande à 76 kDa. Ces résultats, encore préliminaires, montrent une régulation claire et reproductible de la bande à 82 kDa et des résultats plus variables en ce qui concerne la bande à 76 kDa.

## **VII.PKC et phosphorylation dans la régulation de l'induction de l'expression de la TGt par l'ARtt**

Bien qu'il n'est jamais été fait mention d'une phosphorylation de la TGt, une telle modification ne peut être totalement exclue. Cette phosphorylation pourrait concerner l'activité enzymatique ou d'autres fonctions de la protéine (localisation intracellulaire, interaction avec les partenaires de la voie des protéines G, ...). Une des explications des résultats précédents (hétérogénéité des bandes révélées en western blot) pourrait être une modification post-traductionnelle par phosphorylation. Nous avons donc entrepris une étude préliminaire en utilisant deux types d'approches :

- L'utilisation d'inhibiteurs des PKCs sur les cellules intactes.
- Le traitement à la phosphatase alcaline des extrait cellulaire contenant la TGt.

Les effets provoqués par les inhibiteurs des PKCs ont été étudiés pour savoir si l'ARtt induit l'expression de la TGt en impliquant des systèmes indépendants des récepteurs, par exemple ceux qui impliquent les PKCs. Trois inhibiteurs des PKCs ont été testés (GF109203X, Gö6976 et Gö7874,HCl) à  $10^{-6}$ M sur les cellules traitées ou non par l'ARtt. Les effets étudiée étaient le taux d'ARNm détecté par RT-PCR à 7 heures et l'activité enzymatique à 48 heures. Ces molécules utilisées seules sont sans effet sur l'activité enzymatique. Lorsqu'on les associe à l'ARtt, la réponse est différente. Ainsi, le Gö7874,HCl seul ou associé à l'ARtt n'a pas d'effet, le GF109203x augmente modérément la réponse à l'ARtt alors que Gö6976 l'inhibe de moitié (Figure 34 A). Ce résultat est difficilement interprétable. Une hypothèse pourrait être que certaines PKCs interviendraient positivement (inhibition par Gö6976) et négativement (inhibition par GF109203X) dans la régulation de l'activité enzymatique et qu'elles seraient inhibées différemment par les inhibiteurs de PKCs. Il existe en effet, de nombreuses isoformes des PKCs. On retrouve au niveau de l'expression des ARNm, l'effet inhibiteur de Gö6976, sur la réponse à l'ARtt (Figure 34 B). Bien que ces données permettent d'envisager que des phosphorylations induites par les PKCs interviennent dans la régulation de la TGt, elles ne permettent pas de déterminer la cible de ces PKCs.

**A****B**

**Figure 34** : Effets des inhibiteurs des PKC sur l'induction de l'expression de la TGt par l'ARtt .

A activité enzymatique.

B ARNm détectés par RT-PCR.

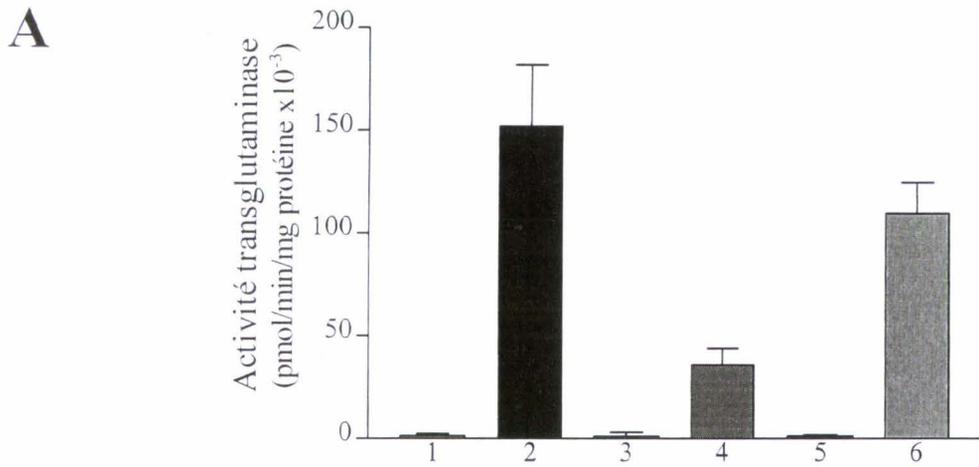
Un traitement à la phosphatase alcaline inhibe l'activité enzymatique de la TGt mesurée dans l'échantillon traité par l'ARtt (Figure 35 A). La phosphatase alcaline inactivée par la chaleur n'a pas cet effet. Les échantillons ont été testés en Western blot (Figure 35 B). L'échantillon traité par l'ARtt montre une bande intense dans la région 76-82 kDa et d'autres bandes de poids moléculaires plus faible (55-66 kDa). Le traitement à la phosphatase alcaline entraîne une diminution drastique de toutes ces bandes à l'exclusion de la bande à 76 kDa (couloir 2 et 4). L'inactivation de la phosphatase alcaline par la chaleur supprime l'essentiel de ces effets (couloir 5). Le traitement à la phosphatase alcaline seul entraîne la disparition de la faible bande à 76 kDa observée dans le témoin (couloir 3). Ces résultats suggèrent très fortement l'existence d'une phosphorylation de la TGt. Mais cependant, les expériences de Western blot demandent à être complétées et confirmées (contrôle de l'absence de dégradation des protéines dans l'échantillon traité par la phosphatase alcaline, démonstration de la phosphorylation des différentes bandes).

La modification post-traductionnelle par phosphorylation est décrite dans le cas de la TGk, mais sur un site qui lui est spécifique dans sa région N terminale (Rice *et al*, 1996). Cette phosphorylation ne modifie pas l'activité enzymatique mais la localisation intracellulaire de l'enzyme et notamment son ancrage membranaire. La TGt n'est pas considérée comme phosphorylée par le groupe de Davies (Gentile *et al*, 1991). Ces auteurs ont montré qu'après traduction *in vitro*, la TGt humaine des cellules humaines endothéliales présente la masse moléculaire attendue et surtout un caractère fonctionnel car elle catalyse la conjugaison covalente (dépendante du  $Ca^{2+}$ ) de la putrescine à la diméthylcaséine, suggérant qu'une modification post-traductionnelle n'est pas un pré-requis pour l'activité enzymatique. Cependant, ces expériences sont réalisées sur des extraits cellulaires qui pourraient fort bien contenir des kinases. Cette présomption demandera donc à être validée ou invalidée par une approche moléculaire, en essayant d'identifier des sites de phosphorylations dans la TGt.

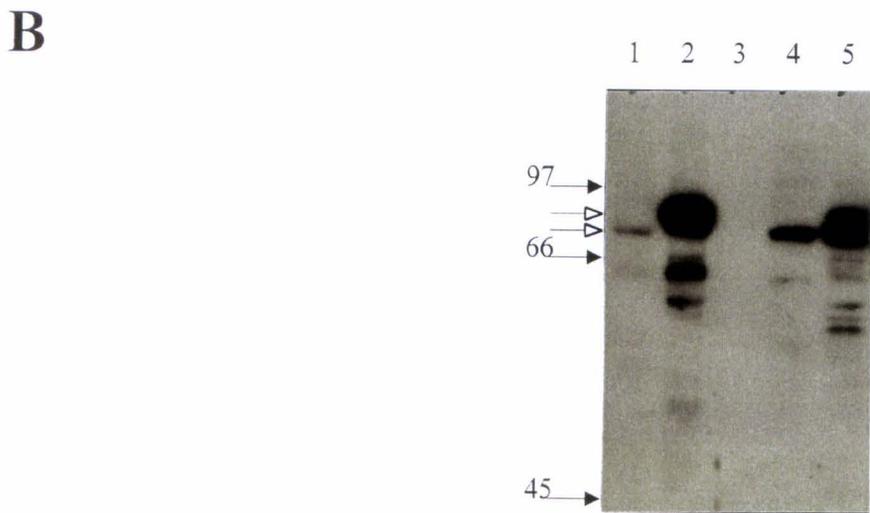
#### **D.Conclusion**

Dans cette étude, nous avons démontré que, dans les cellules de la lignée RPMI 8226, l'ARtt induit l'expression de la TGt à la fois au niveau de l'ARNm, de la protéine et de l'activité enzymatique. Il n'existe pas d'expression de base de la TGt, situation également retrouvée dans d'autres modèles cellulaires, incluant les cellules leucémique humaine HL60 (Davies *et al*, 1985). La lignée RPMI 8226 exprime les 6 ARNm des récepteurs de l'AR, suggérant que toutes les 6 protéines RARs et RXRs sont également exprimées dans ces cellules, ce qui en fait un modèle idéal pour étudier leur rôle respectif dans l'induction de l'expression de la TGt par les rétinoïdes.

L'utilisation des rétinoïdes de synthèse a permis de démontrer l'implication des voies RARs et/ou RXRs dans ce contrôle et d'ouvrir des pistes de travail pour leur(s) niveau(x) de régulation(s). Les deux voies RAR et RXR sont requises pour l'activation de l'activité enzymatique de la TGt. Il en



AR 10 <sup>-7</sup> M		+		+		+
Phosphatase alcaline			+	+		
Phosphatase alcaline inactivée par la chaleur					+	+



AR 10 <sup>-7</sup> M		+	+	+
phosphatase alcaline			+	+
phosphatase alcaline inactivée par la chaleur				+

**Figure 35** : Etude d'une phosphorylation potentielle de la TGt. Effet de la phosphatase alcaline inactivée ou non par la chaleur sur la TGt induite par l'ARtt.

A sur l'activité enzymatique.

B sur la protéine détectée par Western blot.

va de même pour l'expression de la protéine de 82 kDa ou l'expression maximale des ARNm de la TGt., la voie RAR ou la voie RXR sont capables d'induire partiellement, par rapport à l'induction par l'ARtt ou l'association des deux voies, l'expression des ARNm de la TGt. Il a été décrit dans la région promotrice du gène murin de la TGt, un élément de réponse aux rétinoïdes versatile de type DR5/7. Cet élément est capable de répondre aux deux voies des rétinoïdes, et donne une réponse comparable à celle obtenue avec l'ARtt quand on associe les voies RARs et RXRs (Nagy *et al*, 1996). Aucun élément de réponse aux rétinoïdes n'est détecté dans la séquence de 1,7 kb, en amont du site d'initiation de la transcription du gène de la TGt humaine. Cependant, l'absence de réponse aux rétinoïdes de ce fragment laisse supposer qu'il existe un élément de réponse en dehors de cette séquence (Lu *et al*, 1995). Les résultats obtenus sur l'expression des ARNm de la TGt dans les cellules humaines RPMI 8226, suggèrent qu'un élément de réponse comparable à celui trouvé chez la souris pourrait exister chez l'homme.

L'ARtt induit l'apoptose des cellules RPMI 8226 après 6 jours de traitement. Cette mort cellulaire présente les caractéristiques morphologiques classiques de l'apoptose : les caractéristiques nucléaires avec la condensation et la fragmentation de la chromatine ainsi que les caractéristiques cytoplasmiques avec un bourgeonnement de la membrane cytoplasmique et la formation de corps apoptotiques. Cette induction de l'apoptose est associée à une expression de la protéine TGt détectée par immunofluorescence indirecte. L'utilisation des rétinoïdes RARs ou RXRs sélectifs démontre comme pour la régulation de la TGt l'implication des deux voies des rétinoïdes dans l'induction de l'apoptose des cellules RPMI 8226.

L'observation que l'expression de la TGt et l'induction de l'apoptose sont régulées par des voies très similaires dans nos cellules est en accord avec les études qui montrent que la TGt jouerait un rôle dans l'apoptose.

## **PARTIE II : Le rétinoïde CD437 induit une mort cellulaire rapide, indépendante de la voie RAR $\gamma$ et sans expression de la transglutaminase de tissu**

### **A. Questions posées**

Le rétinoïde de synthèse CD437 6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid (AHPN) sélectif du RAR $\gamma$  (Bernard *et al*, 1992) (Tableau XVII).

Notre étude approfondie des effets du CD437 a été suscitée par une observation faite durant la première partie de notre travail. En effet, nous avons été surpris par la difficulté à obtenir dans les échantillons traités par le CD437 des extraits cellulaires suffisants pour doser l'activité enzymatique de la TGt, Ceci nous a amené à regarder si ce rétinoïde n'avait pas des effets sur la prolifération ou la mort des cellules RPMI 8226. A notre grande surprise nous avons constaté qu'il induisait une apoptose rapide et massive. Nous avons donc entrepris, en collaboration avec Olga Lefebvre, de comparer très soigneusement les effets de ce rétinoïde de synthèse à ceux du rétinoïde naturel : l'ARt.

### **B. Approches utilisées**

L'approche est la même que celle utilisée précédemment, c'est à dire le recours à des rétinoïdes de synthèse sélectifs agonistes ou antagonistes d'un type ou d'un sous-type de récepteur de l'AR. Elle a été utilisée sous deux angles : un descriptif et un mécanistique.

### **C. Résultats**

#### **I. Inhibition de la prolifération et induction de l'apoptose par l'ARt ou le CD437 dans les cellules RPMI8226**

Utilisé à  $10^{-6}$  M, l'ARt provoque une réduction de la population cellulaire. Cette diminution est visible à partir de trois jours de traitement (Figure 36 A).

Le CD437, tout comme l'ARt, est capable de diminuer la population cellulaire, mais semble nettement plus efficace que le rétinoïde naturel. En effet, cette diminution est visible dès 6<sup>ième</sup> heures de traitement, et on observe une mort de l'ensemble de la population cellulaire au bout de 24 heures (Figure 36 B).

L'addition de ligand sélectif du RXR (CD 2425) et/ou d'un antagoniste RAR $\beta\gamma$  (CD2665) ne modifie en rien cette réponse. Contrairement au CD437, le CD666 un autre ligand RAR $\gamma$  sélectif (Tableau XVII) est incapable d'inhiber la croissance de la population cellulaire pendant les 48<sup>ères</sup> heures (Figure 36 C).

L'ARt à  $10^{-6}$  M est capable d'induire l'apoptose des cellules RPMI8226 de façon modérée (voir article Blood) en 6 jours de traitement seulement (Tableau XVIII).

Incubation	Apoptose				Nécrose			
	6 heures	12 heures	24 heures	6 jours	6 heures	12 heures	24 heures	6 jours
Contrôle	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
AR 10 <sup>-7</sup> M	∅	∅	∅	++	∅	∅	∅	+
CD43710 <sup>-9</sup> M	++	+++	++	ND	+/-	+++	+++	ND

∅, pas de cellules avec une morphologie altérée.

+/-, cellules isolées.

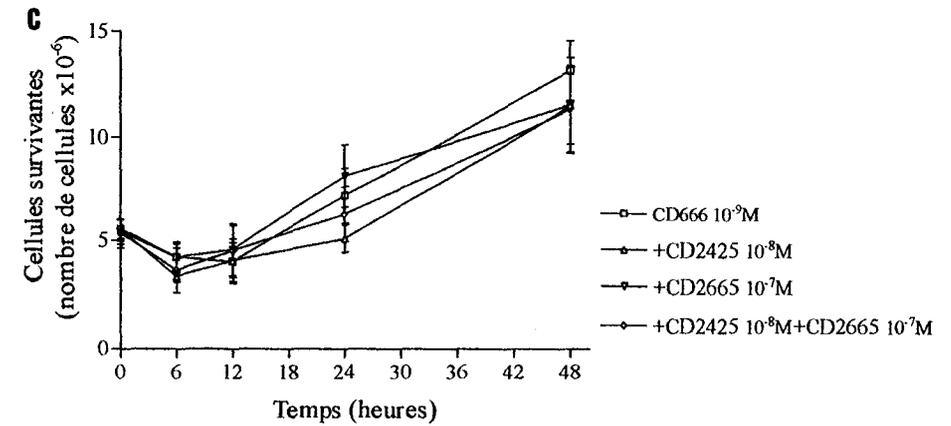
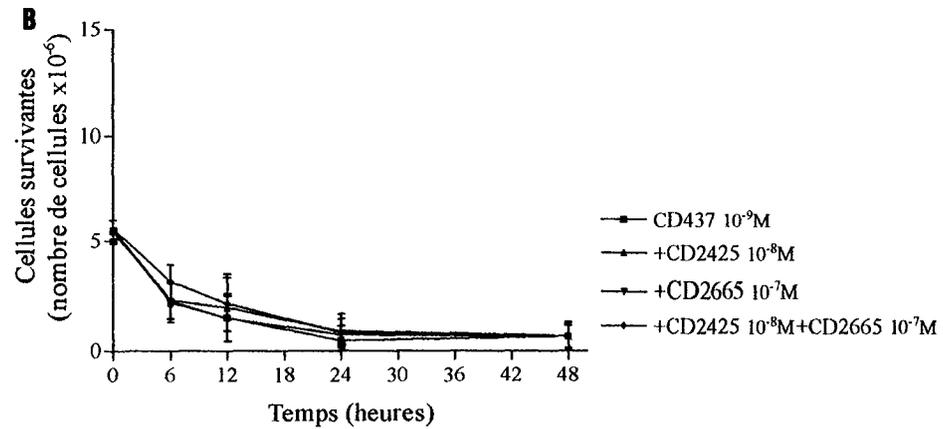
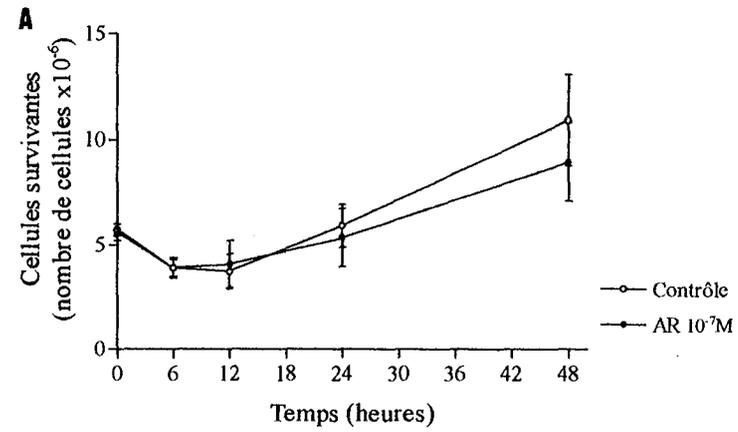
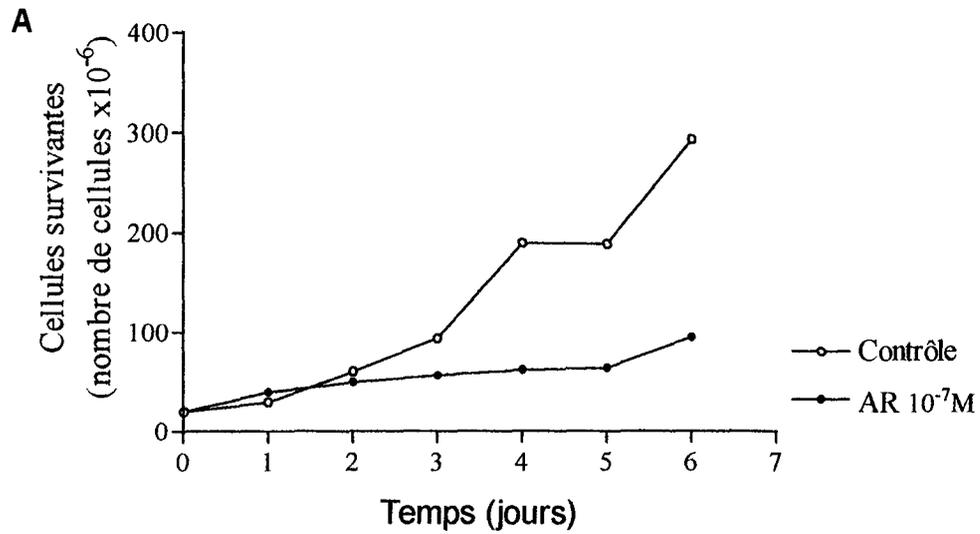
+, quelques cellules.

++, nombre de cellules modéré.

+++ , cellules nombreuses.

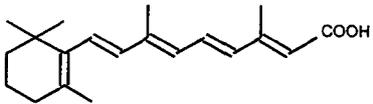
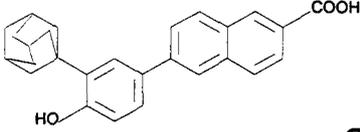
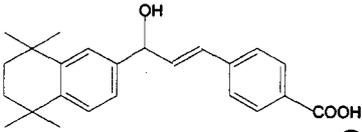
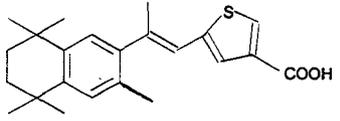
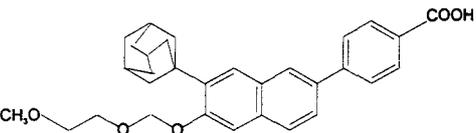
ND, non déterminé.

**Tableau XVIII : Semi-quantification de l'apoptose *versus* la nécrose dans les cellules RPMI 8226.**



**Figure 36** : Effets de l'ARtt (A), des RAR $\gamma$  sélectifs : CD 437 (B) et CD 666 (C), seuls ou associés avec un RXR sélectif et/ou un antagoniste RAR $\beta$  sur la prolifération des cellules RPMI 8226.

Fixation Kd      Transactivation      Propriété  
 RAR $\alpha$    RAR $\beta$    RAR $\gamma$       EC50  
    RXR $\alpha$

 <b>Acide rétinolique</b>	16	7	3	>1000	agoniste
 <b>CD437</b>	6500	2480	77	>1000	agoniste
 <b>CD666</b>	2240	2300	66	>1000	agoniste
 <b>CD2425</b>	>1000	1467	712	54	agoniste
 <b>CD2665</b>	>1000	306	110	>1000	antagoniste

**Tableau XVII : Rétinoïdes de synthèse utilisés dans cette étude.**

Utilisé à une concentration de  $10^{-9}$  M, le CD437 provoque la mort des cellules RPMI 8226 de façon massive. Un taux d'apoptose comparable à celui obtenu en présence de l'ARtt à 6 jours de traitement, est ici observé dès 7 heures d'induction en présence de CD437. Cette induction de l'apoptose est suivie d'une nécrose secondaire abondante que l'on ne retrouve pas avec le traitement à l'ARtt (Tableau XVIII).

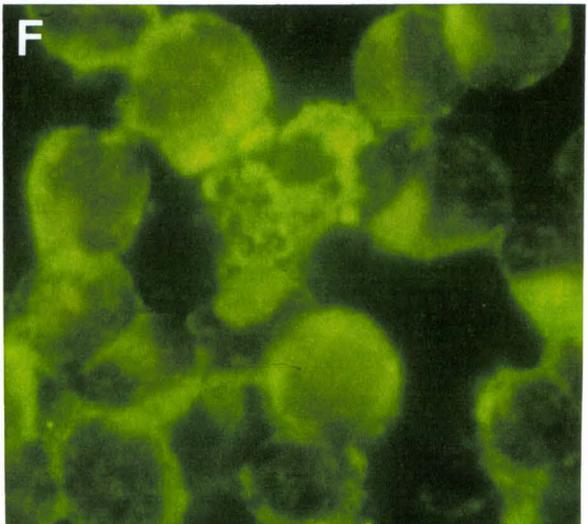
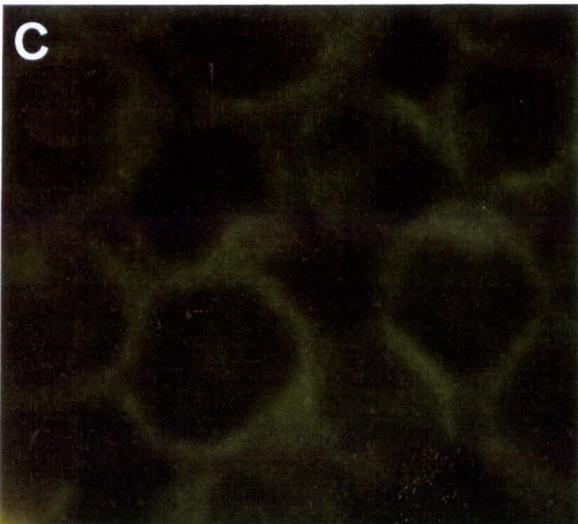
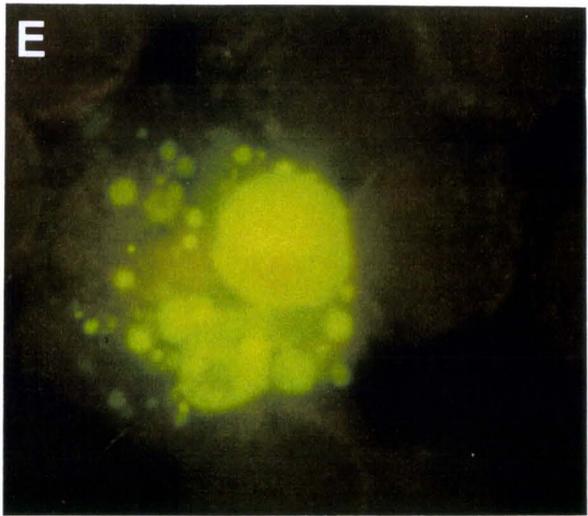
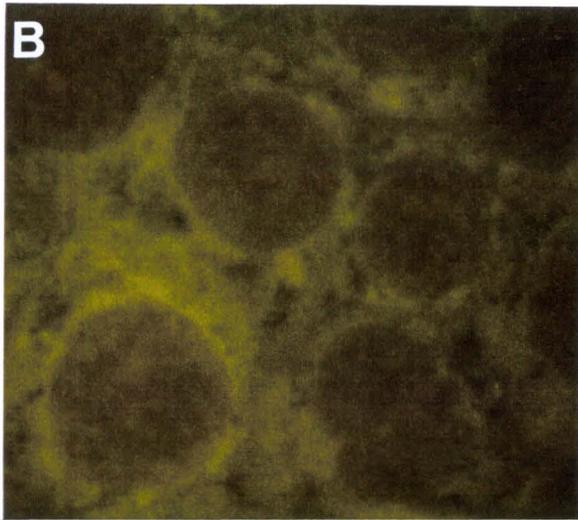
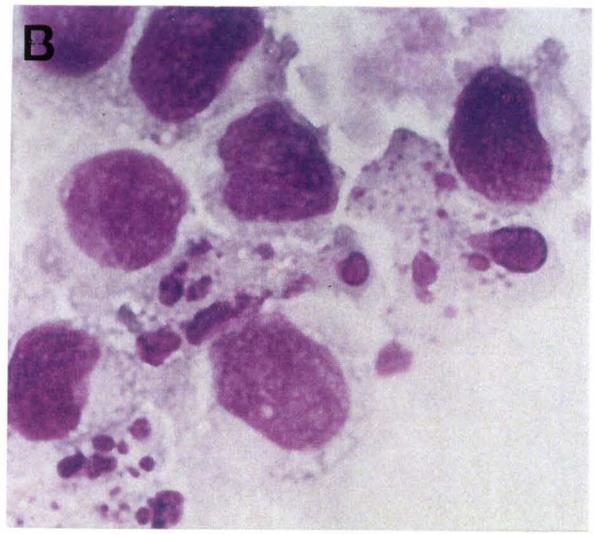
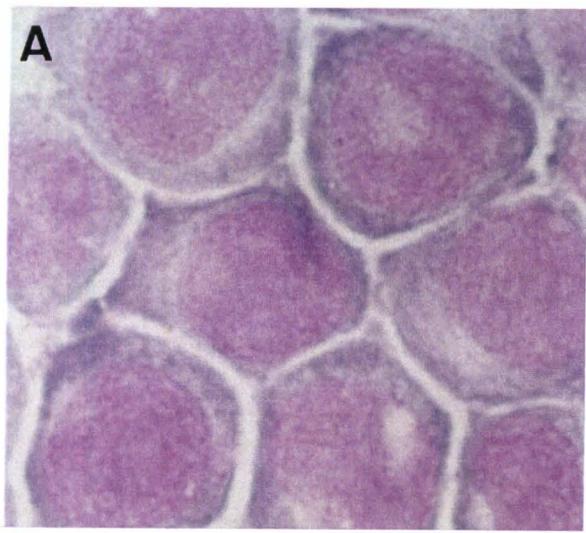
## **II. Caractérisation de l'apoptose induite par l'ARtt ou le CD437**

L'apoptose induite par l'ARtt ou le CD437 a été caractérisée par coloration au MGG, colorant classique des cellules hématopoïétiques et par le Hoescht 33258, un intercalant de l'ADN. La fragmentation de l'ADN a aussi été étudiée par la technique TUNEL qui permet de visualiser les cassures de l'ADN (Figures 37 et 38).

Les deux rétinoïdes induisent les caractéristiques morphologiques nucléaires de l'apoptose avec la condensation de la chromatine (MGG, Hoescht) et sa fragmentation (TUNEL). Cependant, les caractéristiques morphologiques cytoplasmiques de l'apoptose semblent réduites sous l'action du CD437. Contrairement à l'ARtt, la condensation et la fragmentation (absence de bourgeonnement des membranes), ainsi que la formation de corps apoptotiques sont réduites dans le morphotype apoptotique induit par CD437.

Le CD437 induit donc l'inhibition de la prolifération et la mort cellulaire massive des cellules RPMI 8226. Cette mort ne présente pas toutes les caractéristiques de l'apoptose, puisque certains phénomènes cytoplasmiques sont largement absents. L'importance du nombre de cellules mourantes et l'absence de phénomène cytoplasmique pourraient expliquer la nécrose secondaire par un manque de fragmentation des cellules en corps apoptotiques et de cellules capables de les phagocyter.

Si l'on considère le CD437 comme un ligand sélectif RAR $\gamma$  dans cette réponse, ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus dans la première partie de l'étude. En effet, un rétinoïde sélectif de la classe RAR (CD367) donc, par conséquence de RAR $\gamma$ , est incapable d'inhiber la prolifération ou d'induire l'apoptose des cellules RPMI 8226. Seul son association avec le CD2425 (RXRs sélectif) permet d'obtenir ces réponses. De plus, même dans ce cas, la réponse n'est pas aussi massive que celle obtenue avec le CD437, elle se compare à celle obtenue par l'ARtt (voir article Blood). Il faut donc déterminer si cette réponse passe ou non par RAR $\gamma$ .



**Figure 37** : Caractérisation de l'apoptose induite par l'ARtt  $10^{-7}M$  dans les cellules RPMI 8226 après 6 jours de traitement.

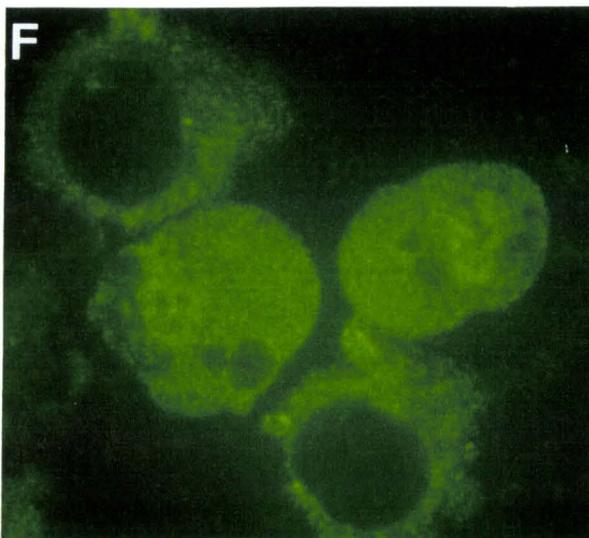
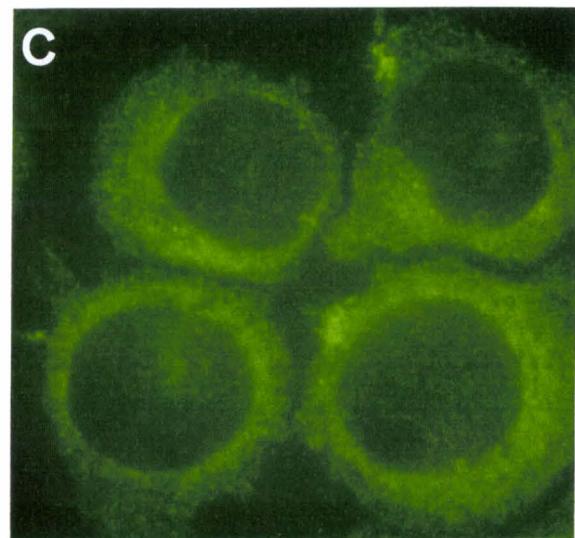
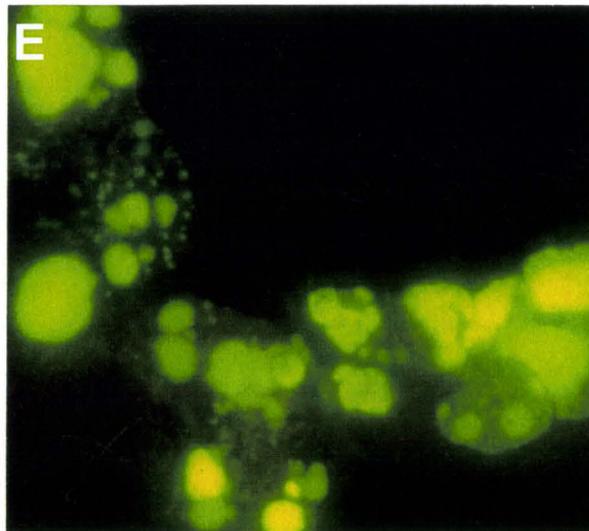
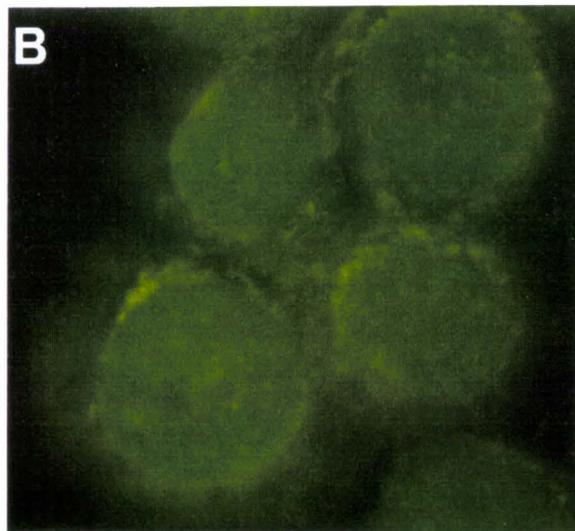
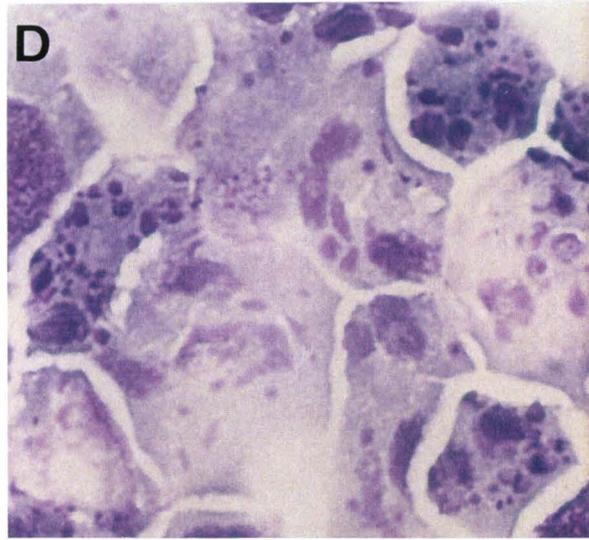
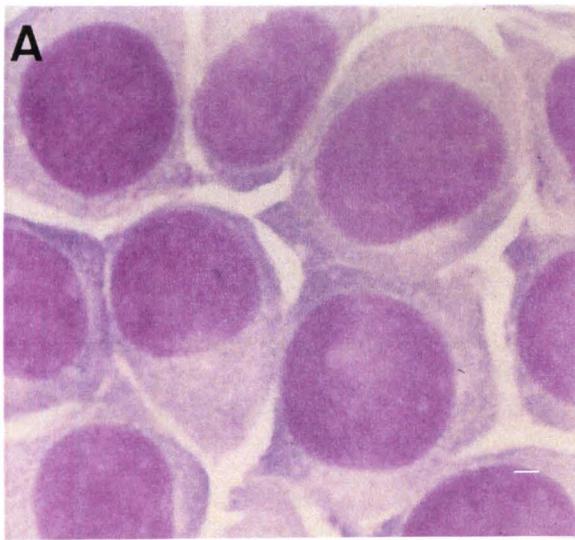
A D Coloration au MGG.

B E Détection des cassures de l'ADN par la technique TUNEL.

C F Détection de la TGt par immunofluorescence indirecte.

A B C Contrôle

D E F ARtt  $10^{-7}M$



**Figure 38** : Caractérisation de l'apoptose induite par le CD 437  $10^{-9}$ M dans les cellules RPMI 8226 après 7 heures de traitement.

A D Coloration au MGG.

B E Détection des cassures de l'ADN par la technique TUNEL.

C F Détection de la TgT par immunofluorescence indirecte.

A B C Contrôle

D E F CD 437  $10^{-9}$ M

### **III. Voie du CD437 dépendante ou indépendante du RAR $\gamma$ dans l'induction de la mort cellulaire**

Comme pour la prolifération, l'induction de l'apoptose par le CD437 dans la lignée RPMI 8226 n'est pas modulée par l'addition de ligands sélectifs du RXR ou antagoniste RAR $\beta\gamma$  (Figure 39A). Le CD666 se montre incapable de reproduire les effets du CD437 (Figure 39 A couloirs 7 à 10). Des résultats similaires sont obtenus sur deux autres lignées myélomateuses humaines (Figure 39 B et C): les U266 qui expriment les 6 récepteurs de l'AR ainsi que la lignée L363 incapable de répondre à l'ARtt et ne possédant pas de récepteur RAR $\gamma$  (Figure 40).

Tous ces résultats montrent à l'évidence que l'action du CD437 passe par une voie indépendante du RAR $\gamma$ .

### **IV. Mécanisme d'action du CD437**

Dans le but d'essayer de démontrer le mécanisme par lequel le CD437 induit la mort des cellules, différentes voies ont commencé à être étudiées.

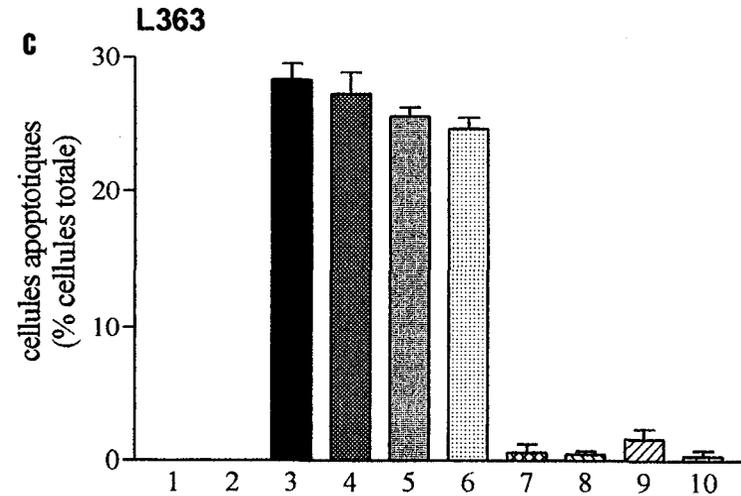
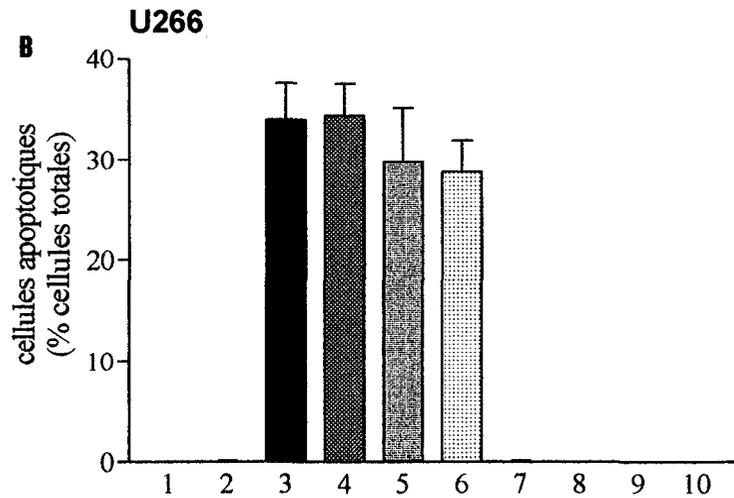
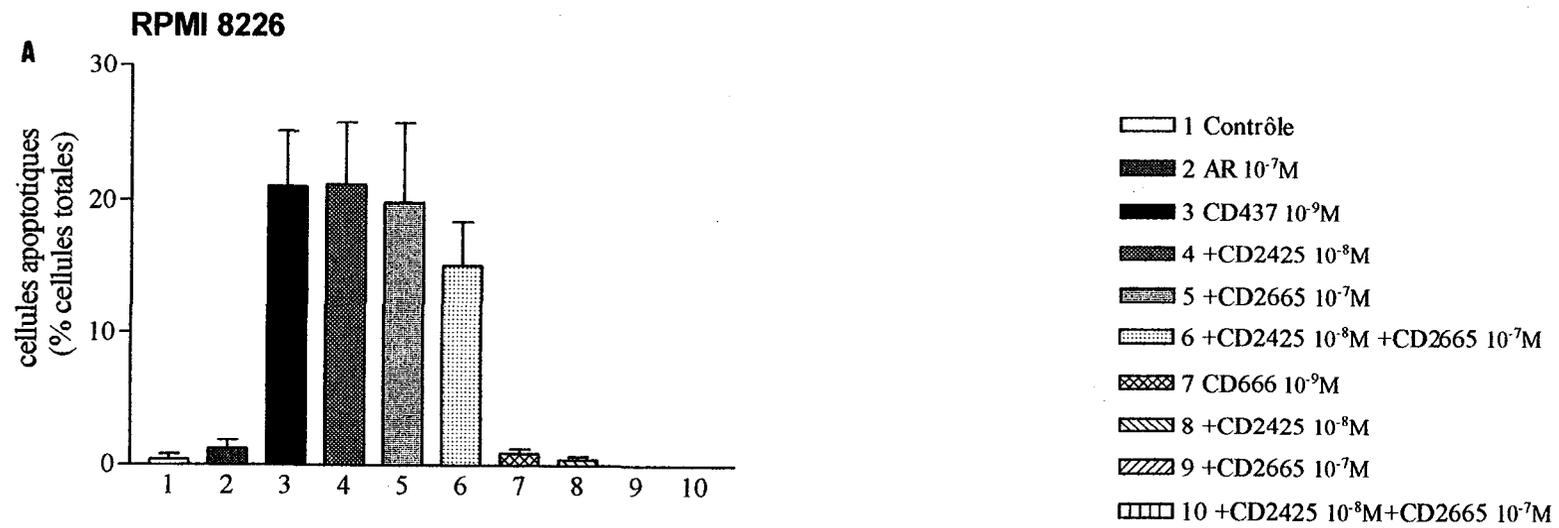
La cycloheximide, inhibiteur de la traduction, n'empêche pas les effets du CD437 sur la prolifération ou la mort des cellules (Figure 41). De même, l'actinomycine, inhibiteur de la transcription, se montre incapable de moduler les effets du CD437. Dans les conditions utilisées, la cycloheximide n'est pas toxique et l'actinomycine D l'est faiblement (légère augmentation de la nécrose) (Tableau XIX).

Ces données suggèrent que le contrôle par le CD437 n'est ni transcriptionnel, ni traductionnel. Il agirait sur un système déjà présent dans les cellules RPMI 8226. Ces cellules constituent un modèle intéressant pour identifier ce système, en effet, sa réponse rapide suggère qu'il est exprimé fortement dans nos cellules.

L'expression des gènes de la famille bcl2 (bcl2, bclxl et bax) a été étudiée. Le CD437 ne module pas de façon significative l'expression de leurs messagers (résultats non montrés). Le CD437 semble donc agir indépendamment de la voie de contrôle par les gènes pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques de la famille bcl2.

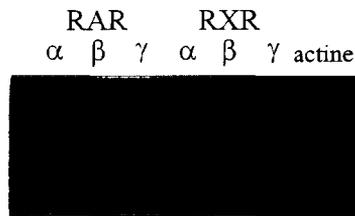
Un influx Ca<sup>2+</sup> est souvent décrit dans les cellules induites vers l'apoptose. On ne retrouve pas d'influx Ca<sup>2+</sup> suite au traitement des cellules par le CD437 (étude réalisée par Jean François Gossens).

Enfin, le CD437 donne une dégradation rapide et importante de la lamine B, une cible des caspases (Figure 42). La cascade des caspases semble donc active dans cette mort induite par CD437. Elle demandera à être poursuivie au moyen d'autres cibles des caspases comme la PARP ou par l'utilisation d'inhibiteurs des caspases.



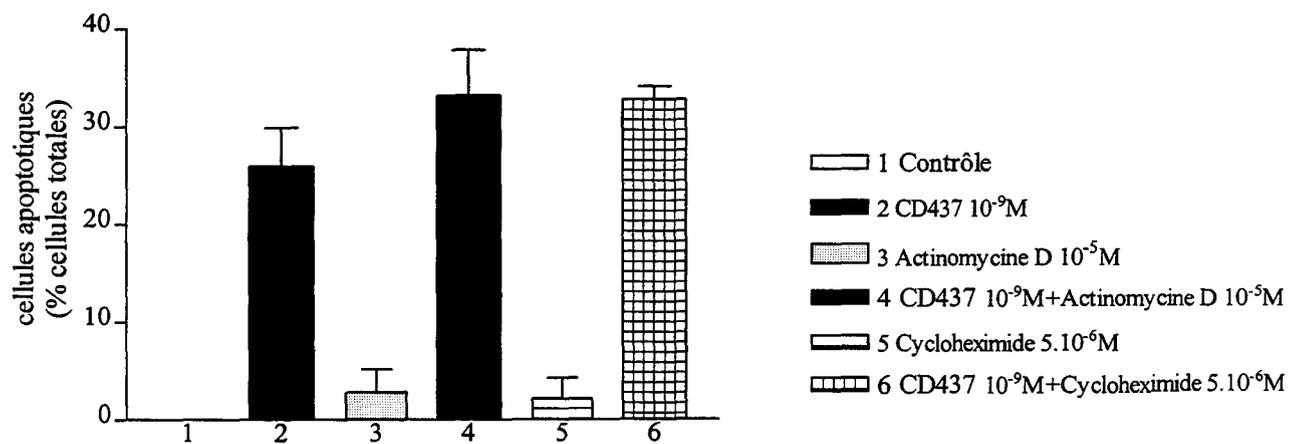
**Figure 39** : Quantification de l'apoptose dans les cellules RPMI 8226 (A), U266 (B) et L363 (C).

Les cellules sont incubées pendant 7 heures avec différents rétinoïdes (voir légende). Le comptage des cellules apoptotiques est réalisé sur des préparations «cytospin» après coloration au MGG.



**Figure 40 : Equipement en RARs et RXRs dans la lignée L363.**

Les ARN totaux (1 $\mu$ g) sont soumis à une réaction de RT-PCR (35 cycles). Les produits d'amplification sont fractionnés sur gel d'agarose à 2%, transférés sur membrane Hybond N+, hybridés avec des sondes oligonucléotidiques marquées au  $^{32}$ P pour les RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  RXR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et l'actine.



**Figure 41** : Effets de l'actinomycine D et de la cycloheximide sur l'induction de l'apoptose dans les cellules RPMI 8226 après 7 heures de traitement par le CD437  $10^{-9}M$ .

Incubation	Apoptose	Nécrose
	6 heures	6 heures
Contrôle	∅	∅
CD43710 <sup>-9</sup> M	++	+/-
Actinomycine D 5.10 <sup>-6</sup> M	+ /-	+
CD43710 <sup>-9</sup> M +Actinomycine D 5.10 <sup>-6</sup> M	++	++
Cycloheximide 10 <sup>-5</sup> M	+/-	∅
CD43710 <sup>-9</sup> M +Cycloheximide 10 <sup>-5</sup> M	++	+/-

∅, pas de cellules avec une morphologie altérée.

+/-, cellules isolées.

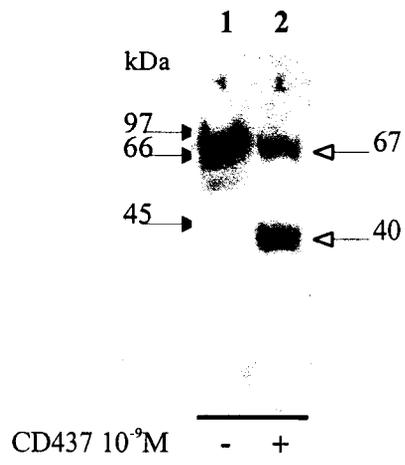
+, quelques cellules.

++, nombre de cellules modéré.

+++, cellules nombreuses.

ND, non déterminé.

**Tableau XIX : Effets de l'actinomycine D et de la cycloheximide sur l'induction par le CD 437 10<sup>-9</sup>M de l'apoptose *versus* la nécrose dans les cellules RPMI 8226 après 7 heures de traitement**



**Figure 42** : Effet du CD437  $10^{-9}$ M sur la dégradation de la lamine B détectée par Western blot dans les cellules RPMI 8226 après 7 heures de traitement.

Ces résultats préliminaires nous permettent de mettre en place les bases du mécanisme d'action du CD437. L'utilisation de rétinoïdes radiomarqués permettrait de déterminer la cible exacte du CD437.

### **V.Expression de la TGt**

L'observation suivante, à savoir le manque d'événements cytoplasmiques dans la mort cellulaire induite par le CD437, nous a conduit à nous focaliser sur l'expression de la TGt et son rôle. Le CD437 se montre incapable d'induire l'expression de la TGt dans les cellules RPMI8226 (voir Blood + Figure 43). Il se comporte dans le cas de la régulation de la TGt comme un ligand RAR $\gamma$  : seul, il induit modérément l'expression de l'ARNm; associé au ligand RXR, il permet l'induction de l'activité enzymatique. Le CD666, autre rétinoïde RAR $\gamma$  sélectif se comporte comme le CD437 (Figure 43). De plus, l'antagoniste RAR $\beta\gamma$  (CD2665), réverse partiellement l'induction obtenue par l'association CD437 ou CD666 plus CD2425. Cette réversion partielle serait due à une activité agoniste RAR $\alpha$  du CD2665 (communication personnel d'Uwe Reichert). Nous avons en effet, démontré que les RAR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sont redondants fonctionnellement dans l'induction de la TGt (voir précédemment).

La voie RAR $\gamma$  indépendante du CD437 qui induit la mort cellulaire, ne peut donc pas induire l'expression de la TGt qui elle, nécessite les deux voies RAR( $\alpha$ ,  $\beta$ , ou  $\gamma$ ) et RXRs des rétinoïdes.

### **VI.Effet d'un pré-traitement à l'ARtt sur la réponse du CD437**

L'ARtt est capable d'induire en 48 heures l'expression de la TGt. Une pré-induction avec l'ARtt  $10^{-7}$  M pendant 48 heures a été réalisée avant d'induire les cellules par le CD437  $10^{-9}$  M.

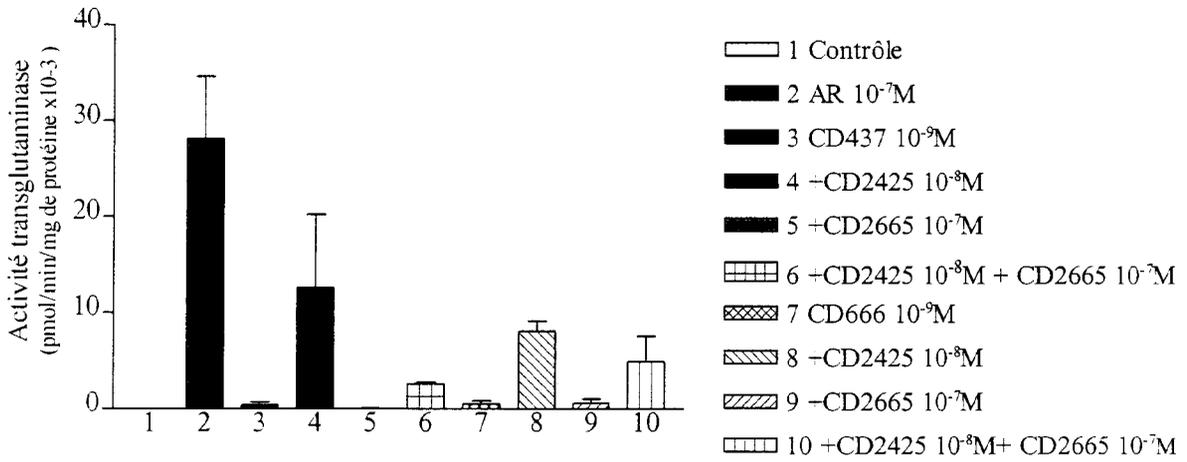
Cette pré-induction par l'ARtt n'est pas capable de restaurer un morphotype apoptotique complet avec les caractéristiques cytoplasmiques. Cependant, cette pré-induction par l'ARtt est capable d'inhiber de 75% l'apoptose induite au bout de 7 heures par le CD437 (Figure 44).

L'ARtt induirait soit un ou des facteur(s) contrecarrant la voie de mort RAR $\gamma$  indépendante du CD437 ou un état de la cellule réfractaire à l'action du CD437 (blocage dans une phase particulière du cycle cellulaire, différenciation, ...).

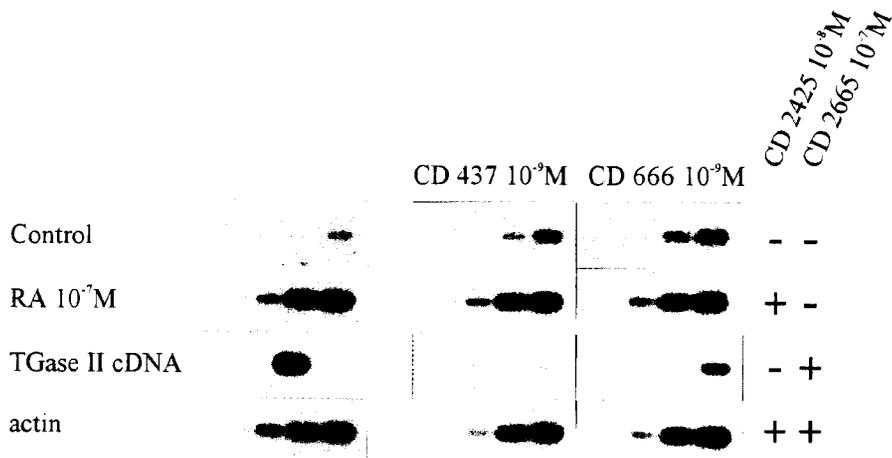
### **D.Discussion générale**

Dans cette étude, nous avons montré que le rétinoïde de synthèse CD437 est capable d'inhiber la prolifération cellulaire et d'induire la mort des cellules de myélome RPMI 8226. Un effet comparable du CD437 est aussi observé dans d'autres modèles de lignées tumorales comme les cellules de mélanome, de leucémie, de cancer du sein, de l'ovaire et du col utérin ou de cellules comme les thymocytes (Schadendorf *et al*, 1994, 1996; Shao *et al*, 1995; Li *et al*, 1996; Chao *et al*,

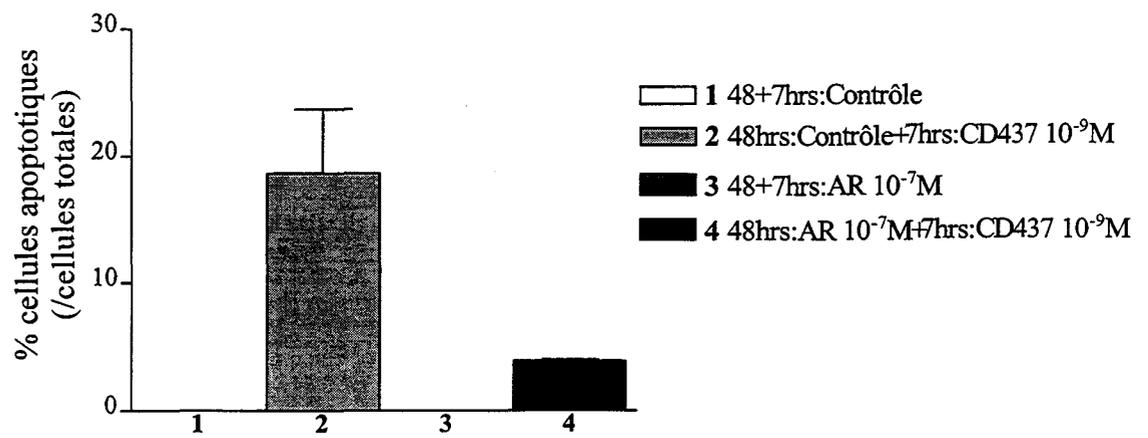
**A**



**B**



**Figure 43** : Effets des rétinoïdes RAR $\gamma$  sélectifs, seuls ou associés avec un RXR sélectif et/ou un antagoniste RAR $\beta$  sur le taux d'ARNm détecté par RT-PCR (A) et l'activité enzymatique (B) de la TGt dans les cellules RPMI 8226.



**Figure 44** : Effet d'une pré-induction des cellules RPMI 8226 par l'ARtt  $10^{-7}$ M pendant 48 heures avant leur traitement par le CD 437  $10^{-9}$ M pendant 7 heures. Les résultats sont exprimés en % de cellules apoptotiques.

1997; Oridate *et al*, 1997; Hsu *et al*, 1997 ; Szondy *et al*, 1997). Cependant, les cellules de myélome semblent plus sensibles à l'effet du CD437, comme le montre la rapidité de la réponse (quelques heures par rapport à quelques jours), ou les concentrations en rétinoïdes utilisées (de l'ordre du nM à la place du  $\mu$ M). L'apoptose induite a été caractérisée par des études morphologiques, la dégradation de l'ADN observée par la technique TUNEL, et par la coupure de la lamine B qui est une cible des caspases induites durant le processus apoptotique. D'autres cibles des caspases comme la PAPR ou la CPP32 (procaspase) ont été décrites comme coupées dans les cellules de leucémiques, après traitement par le CD437 (Hsu *et al*, 1997). Le morphotype apoptotique décrit dans les cellules RPMI8226 traitées par le CD437 est incomplet puisque les caractéristiques morphologiques cytoplasmiques sont réduites.

L'ARtt est un agent thérapeutique efficace dans le traitement de la leucémie promyélocytaire aiguë (APL). Malheureusement, d'autres types de leucémies myéloïdes aiguës (AML) sont résistants aux effets anti-prolifératifs et différenciateur de l'ARtt (Chomienne *et al*, 1997). Le CD437 se montre capable d'induire l'inhibition de prolifération et l'apoptose des cellules L363 ainsi que d'autres modèles cellulaires qui sont résistantes aux effets de l'ARtt (Schadendorf *et al*, 1994, 1996; Shao *et al*, 1995; Hsu *et al*, 1997; Oridate *et al*, 1997). De plus, le CD437 peut inhiber *in vivo*, le développement des xenogreffes de cellules de mélanome (Schadendorf *et al*, 1996). Le CD437 serait donc le chef de file d'une nouvelle classe de rétinoïdes qui peuvent ouvrir de nouvelles voies de traitement du cancer dont le myélome multiple. D'une manière intéressante d'autres molécules apparentées au CD 437 inhibent la prolifération et induisent l'apoptose de cellules cancéreuses pulmonaires résistantes à l'ARtt (Lu *et al*, 1997).

L'induction de cette apoptose passe par RAR $\gamma$  dans les thymocytes (Szondy *et al*, 1997), mais passerait pas par le RAR $\gamma$  dans les lignées cancéreuses

Le mécanisme par lequel le CD437 induit la mort des cellules RPMI8226 n'est pas clair. Cependant, il est clair que la signalisation par les récepteurs nucléaires des rétinoïdes n'est pas impliquée. En effet, l'utilisation d'antagoniste RAR $\beta\gamma$  se montre incapable d'inhiber l'effet du CD437 décrit comme étant un rétinoïde RAR $\gamma$  sélectif. De plus, un autre ligand RAR $\gamma$  est inefficace. L'utilisation des mêmes ligands donne un résultat similaire sur les cellules C33A de carcinome cervicale (Oridate *et al*, 1997). La lignée cellulaire L363, qui est capable de répondre au CD437, ne possède pas de messenger du RAR $\gamma$ . Donc, les effets du CD437 passent par une voie indépendante du RAR $\gamma$ . Cette voie indépendante des récepteurs des rétinoïdes, est aussi démontrée dans la lignée cellulaire HL60R qui ne possède pas de RARs fonctionnels (Shao *et al*, 1995; Hsu *et al*, 1997). De plus, Chao *et al* (1997) montrent que l'inhibition de prolifération du CD437 n'est corrélée ni avec l'activité de liaison, ni l'activité de transactivation du RAR $\gamma$  dans les cellules de tumeur ovarienne.

On ne connaît pas le(s) relais par le(s)quel(s) passe(nt) l'effet du CD437 dans ces lignées tumorales. Plusieurs relais ont été proposés, mais ils diffèrent selon les modèles. Chaque modèle aurait son propre mécanisme de réponse, ou plus probablement le relais commun n'est pas encore identifié.

Le CD437 ne module pas l'expression des messagers de *bcl2*, *bax* et *bclxl* dans les cellules RPMI 8226. L'induction de l'apoptose par CD437 ne passerait donc pas par une régulation des gènes de la famille *bcl2*. Cette indépendance vis-à-vis de *bax* ou de *bcl2* est également suggérée par d'autres auteurs (Shao *et al*, 1995; Schadendorf *et al*, 1996; Oridate *et al*, 1997). L'équipe de Fontana (Shao *et al*, 1995; Hsu *et al*, 1997) propose l'implication, indépendante de p53, de p21<sup>WAF1/CIP1</sup> dans le contrôle de la prolifération et l'apoptose induite par CD437. Cependant, des fibroblastes dépourvus de p21 se montrent capables de subir l'apoptose suite à un traitement par le CD437 (Hsu *et al*, 1997).

Cette régulation n'agirait pas *via* une répression de la voie AP1, car le CD437 ne possède pas d'activité anti-AP1 (Shao *et al*, 1995). Cependant, Schadendorf *et al* (1996), proposent que le CD437 induise l'apoptose des cellules de mélanome *via* l'activation de AP1 *in vitro*. Dans ce modèle le CD437, active et régule positivement AP1, avec une augmentation de l'expression de *c-fos* et de *c-jun*. Cependant, cela ne semble pas être le cas dans notre modèle puisque ni l'actinomycine D, ni la cycloheximide ne sont capables d'empêcher l'effet du CD437. Il existe donc très probablement un système déjà présent dans nos cellules, qui est activé par le CD437 et qui demandera à être identifié.

L'apoptose induite par le CD437 dans les cellules RPMI 8226, montre un morphotype apoptotique incomplet, et est suivie d'une nécrose secondaire. Aucun des rétinoïdes RAR $\gamma$  sélectifs utilisés seul n'est capable d'induire l'expression de la TGt, un enzyme décrit comme impliqué dans le programme apoptotique, alors que son induction est obtenu avec l'ARtt. La combinaison du CD437 ou du CD666 avec le CD2425, un ligand RXR sélectif, donne une induction de la TGt. Cette induction est partiellement empêchée par le CD2665, un antagoniste RAR $\beta\gamma$ . Le CD437 présente donc des réponses dépendantes et indépendantes des RAR et l'induction de l'apoptose peut être dissociée de celle de la TGt. L'absence de TGt dans ce morphotype apoptotique, sans les caractéristiques cytoplasmiques, suggère que la TGt est nécessaire pour le déroulement complet de l'apoptose. Une pré-induction par l'ARtt des cellules RPMI 8226 induit l'expression de la TGt. Cette pré-induction inhibe fortement le nombre de cellules mourantes et réduit le phénomène de nécrose secondaire après traitement par le CD437. L'équipe de Fesus (1996), montre que la transfection de l'ADNc de la TGt dans les cellules montrant une réponse nécrotique en réponse au TNF, les «basculent» vers un morphotype apoptotique. Ces résultats suggèrent que la mort cellulaire induite par le CD437 serait une apoptose qui ne finirait son programme en raison de l'absence de l'expression de la TGt. Cette absence expliquerait, au moins en partie, la nécrose secondaire observée.

## Conclusions et perspectives

L'étude des mécanismes de régulation par les rétinoïdes, dispose d'outils très utiles, les rétinoïdes de synthèse, et d'un modèle complet, les cellules humaines de myélome multiple. Notre étude a permis de déterminer l'implication des voies RARs et RXRs des rétinoïdes dans le contrôle de l'expression de la TGt. Elle a aussi démontré la corrélation entre son expression et l'induction d'un morphotype apoptotique complet. Enfin, les résultats concernant le CD437, ouvrent une voie dans l'induction de la mort des cellules de myélome. Cette étude ne peut servir de conclusion, mais plutôt d'une base pour l'élaboration de nouvelles études.

Ainsi il serait intéressant dans le cadre de l'étude du niveau de régulation de la TGt par les rétinoïdes, de clarifier la possibilité de modifications post-traductionnelles de la protéine. L'équipe pourrait séparer (par HPLC) les deux protéines trouvées en western blot, après immunorévélation par l'anticorps anti-TGt, et les caractériser ou étudier leur activité enzymatique respective. La phosphorylation pourrait aussi être étudiée par l'utilisation de phosphore radiomarqué.

Le CD437 demanderait quant à lui de poursuivre l'étude de son mécanisme d'action par l'étude plus approfondie de la cascade des caspases (inhibiteur des caspases, étude de PARP), des variations de pH, ou du rôle possible de la mitochondrie. La disposition du rétinoïde tritié serait d'un grand recours dans la détermination de la cible du CD437, dans les cellules RPMI 8226 qui semblent posséder un système très actif vu la rapidité de la réponse et la faible quantité de rétinoïdes nécessaire.

La recherche rend humble, puisque plus on découvre et plus on se rend compte qu'il y a à découvrir. De plus, les «outils» du chercheur le domine parfois, je remercie donc les cellules pour leur collaboration !

## Collaborations

La technique de RT-PCR seuil mise au point au sein du laboratoire, a été mise à profit pour l'étude d'autres messagers. Elle a permis d'étudier l'expression des ARNm, des isoformes de HNF4 et des variants HNF-1 $\alpha$  / HNF-1 $\beta$  (Suaud *et al*, 1997). Cette technique a aussi été utilisée pour l'étude des ARNm bcl2, bax et bclxl dans les cellules CEM infectées par le virus HIV1 (Ben Jilami *et al*, 1997, en préparation).

## **APPENDICE TECHNIQUE**

## Principaux tampons

### **PBS 10x : (4°C)**

- 80 g NaCl.
  - 2 g KCl.
  - 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
  - 11,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .
  - ou 14 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ .
  - ou 29 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 12  $\text{H}_2\text{O}$ .
- qsp 1 l  $\text{H}_2\text{O}$ .

Ajuster le pH à 7,4, filtrer et autoclaver.

### **TAE 10x :**

- 48,4 g Tris (hydroxymethyl) amino-méthane.
  - 11,42 ml Acide Acétique glaciale.
  - 20 ml EDTA disodique 0,5 M, pH 8.
- qsp 1 l  $\text{H}_2\text{O}$ .
- Ajuster le pH à 8,3-8,4.

### **TBS 10x : (4°C)**

- 24,2 g Tris (hydroxymethyl) amino-méthane.
  - 87,6 g NaCl.
- qsp 1 l  $\text{H}_2\text{O}$ .

Ajuster le pH à 7,5, filtrer et autoclaver.

### **SSPE 20x :**

- 210 g NaCl.
- Dissoudre dans 900 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Puis ajouter :
- 31,2 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$ .

Puis en même temps :

- 6,8 à 7 g NaOH.
- 7,4 g EDTA.

Ajuster le pH à 7,2 avec la soude 10 N et autoclaver.

### **Denhardt 50x :**

- 2 g PolyVinylPyrrolidone 40 (MERCK).
  - 2 g Ficool 400 (MERCK).
- qsp 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ .

Autoclaver pendant 10 min. à 120°C.

Refroidir et ajouter :

- 2 g Sérum Albumine Bovine (Boeringher).
- qsp 200 ml  $\text{H}_2\text{O}$ .

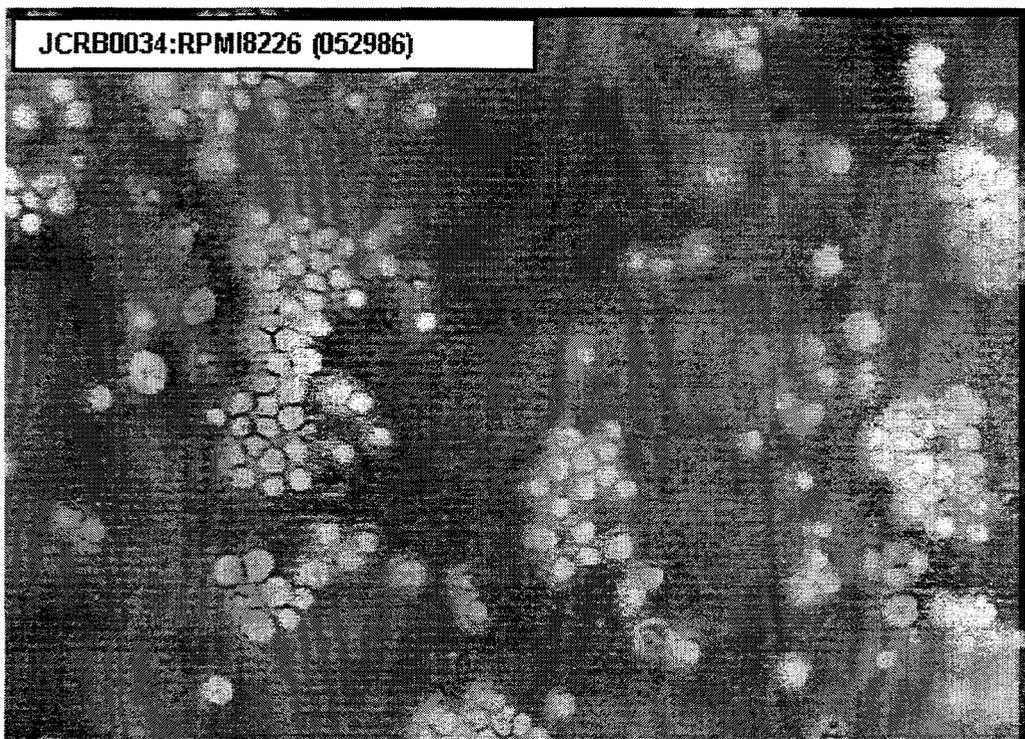
## A- Biologie Cellulaire.

### A-1 Culture cellulaire.

#### 1- Les lignées cellulaires.

##### RPMI 8226 :

Les cellules de la lignée myélomateuse humaine RPMI 8226 (catalogue A.T.C.C (American Type Culture Collection) CCL-155 (soumise en février 1971), E.C.A.C.C 87012702) sont des cellules dérivées du sang périphérique d'un homme âgé de 61 ans (Moore et al, 1967). Elles produisent et sécrètent la chaîne légère  $\lambda$  d'une immunoglobuline G.



La lignée cellulaire RPMI 8226 est l'une des lignées cellulaires hématopoïétiques établie par G. Moore (1967). La culture a été initiée dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% de Sérum de Veau Foetal (SVF) en juin 1966, et établie 66 jours plus tard. Les cellules cultivées ressemblent aux cellules lymphoblastoïdes des autres lignées cellulaires de lymphocytes humains développées à partir du sang périphérique, mais elles ne contiennent pas de cellules matures typiques du plasma, seules des cellules immatures avec un cytoplasme marqué sont présentes.

Une étude des immunoglobulines révèle que ces cellules produisent et sécrètent les chaînes légères de type  $\lambda$  d'immunoglobuline. Aucune preuve n'est obtenue quant à la détection dans les cellules ou leur milieu de la production de chaîne lourde. Les cellules sécrètent approximativement 15mcg de chaînes  $\lambda$  par 24 heures pour  $10^6$  cellules (soit  $45.10^7$  molécules/ cellule/ par jour).

### U266 :

Les cellules de la lignée myélomateuse humaine U266BL ou U266BI (catalogue A.T.C.C TIB-196, E.C.A.C.C 85051003) sont des cellules dérivées du sang périphérique, établies à partir d'un patient atteint d'un myélome IgE, avec sécrétion d'immunoglobuline E ( $\epsilon 2$ ,  $\lambda 2$ ) (Nilsson *et al.* 1970).

### L363 :

Les cellules de la lignée myélomateuse humaine l363 (catalogue DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) ACC49) sont des cellules dérivées du sang périphérique, établies à partir d'une patiente âgée de 36 ans. (Diehl *et al.*, 1978).

## **2-La culture cellulaire de routine.**

Les cellules RPMI 8226, U266, L363 sont cultivées en suspension dans un milieu RPMI 1640 contenant de la L-glutamine (Glutamax I-GIBCO), auquel on ajoute 10% de SVF (GIBCO BRL) inactivé par la chaleur (30 min. à 56°C), de la pénicilline 100 UI/ml (TECHGEN), de la streptomycine 100 µg/ml (TECHGEN) en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> à 37°C. Les cellules sont maintenues à une concentration inférieure à 1.10<sup>6</sup> cellules/ml pour éviter la confluence qui inhibe la prolifération. Pour cela, on effectue une numération sur cellule de Malassez avec le test d'exclusion au bleu trypan (0,3% en solution saline NaCl 0,9% p/v). Cette méthode permet de distinguer les cellules vivantes qui excluent le bleu trypan des cellules mortes dont la membrane altérée laisse passer le colorant. On renouvelle le milieu tous les deux jours en remettant la concentration à 0,3.10<sup>6</sup> cellules/ml.

### **Remarque :** au sujet d'éventuelles contaminations.

En cas de contaminations bactériennes, les cultures sont traitées par la ciprofloxacine Ciflox® (200mg/100ml BAYER) à 5 à 7 µg/ml de milieu de culture. La ciprofloxacine est un antibiotique de synthèse appartenant à la famille des fluoroquinolones. Son activité est fortement bactéricide par inhibition de l'ADN gyrase bactérienne empêchant la synthèse de l'ADN chromosomique bactérien.

Dans le cas d'une contamination de type fongique, un traitement à l'amphotéricine B Fongizone® (250µg/ml, LIFE TECHNOLOGIES) à 2,5 µg/ml (1%), est appliqué. L'amphotéricine est un antibiotique antifongique de contact de la famille polyènes, son spectre d'activité s'étend à de nombreux champignons et en particulier aux levures. Elle n'a aucune action antibactérienne.

Un troisième antibiotique, la gentamycine (50mg/ml, GIBCO BRL) peut être aussi utilisée à une concentration de 50 µg/ml de milieu de culture. Il a une action antibactérienne et antimycoplasmique, mais n'a aucune activité contre les moisissures, levures et autres protozoaires.

Un temps de latence devra être observé après toutes périodes de décontamination, avant de reprendre les manipulations.

### **3- La Cryoconservation des cellules.**

Le développement des cultures cellulaires se trouve confronté à un problème important qui est celui de la stabilité des cellules utilisées en recherche. Le repiquage successif des cultures présente le double inconvénient de prendre beaucoup de temps et de pouvoir engendrer des déviations génétiques par sélection de petites fractions de population.

La cryoconservation permet de stabiliser une population de cellules au plan génétique et d'arrêter le temps. De plus, il est conseillé de congeler fréquemment des cellules en période faste, ce qui permet de relancer les cultures dans les périodes qui le sont moins. Cette technique fut pour la première fois appliquée à des cellules en culture par Scherer et Hoogasian en 1954.

#### **Congélation des cellules.**

Le milieu de congélation est composé de milieu RPMI 1640 contenant de la L-glutamine (Glutamax I-GIBCO), auquel on ajoute 30% de SVF (GIBCO BRL) inactivé par la chaleur (30 min. à 56°C), 10% de DMSO (MERCK), de la pénicilline 100 UI/ml (TECHGEN) et de la streptomycine 100 µg/ml (TECHGEN).

L'état physiologique des cellules au moment de la congélation est l'un des facteurs prépondérants capables d'affecter leur récupération après la congélation. Le meilleur rendement de congélation est obtenu avec des cultures en fin de phase de croissance exponentielle, ayant subi un changement de milieu la veille.

Les cellules sont récupérées par centrifugation pendant 10 min. à 600 trs/min., puis lavées deux fois par 10 ml de milieu de Earle ou EBSS (Biowhitaker), avant d'être dispersées dans du milieu de congélation contenant 10% d'agent cryoprotecteur, ici le DMSO (MERCK), à raison de  $10^7$  à  $10^8$  cellules/ml. Les agents cryoprotecteurs ont pour but d'éviter la formation de larges cristaux de glace pendant le refroidissement, cristaux pouvant être à l'origine de déchirement de la membrane cellulaire. La suspension cellulaire est répartie par aliquotes de 1,5 ml dans les cryotubes. Un temps d'équilibre doit être respecté avant de débiter la phase de refroidissement. Cette étape, qui ne doit pas être inférieure à 15 min., ni excéder 45 à 60 min., est nécessaire pour permettre à l'agent cryoprotecteur de pénétrer à l'intérieur des cellules.

Le refroidissement des cellules est l'une des étapes clés de la cryoconservation, puisque la vitesse de refroidissement contrôle la dimension des cristaux de glace et leur vitesse de formation, deux paramètres pouvant affecter la récupération ultérieure des cellules. Les cryotubes sont transférés dans le cryoconténaire, et l'ensemble placé à -70°C. Les conditions optimales de congélation

consistent à abaisser la température de la suspension de 1°C/min. Lorsque les cryotubes ont atteint une température entre -70 et -100°C, ils peuvent être transférés rapidement dans l'azote liquide afin de les maintenir à une température de -196°C.

Généralement, cette méthode permet la conservation des cellules et de leurs fonctions spécifiques pendant de nombreuses années. Il existe une méthode alternative qui consiste à faire passer la suspension à 0°C, puis -20°C, et enfin -70°C et de les conserver à cette température, si l'on ne dispose pas de l'ensemble du matériel. Cependant à cette température les cellules peuvent contenir de petites quantités d'eau non congelées, qui peuvent avec le temps donner lieu à des réactions chimiques, susceptibles d'entraîner la mort des cellules.

### **Remise en vie des cellules congelées / Décongélation.**

Si la congélation doit être progressive, l'étape de décongélation doit, en revanche, être rapide pour obtenir un rendement optimal. Cette rapidité évite comme dans le cas de la congélation la formation de cristaux de glace.

Le milieu de décongélation est composé de milieu RPMI 1640 contenant de la L-glutamine (Glutamax I-GIBCO), auquel on ajoute 15 à 20% de SVF (GIBCO BRL) inactivé par la chaleur (30 min. à 56°C), de la pénicilline 100 UI/ml (TECHGEN) et de la streptomycine 100 µg/ml (TECHGEN).

Le principe consiste à placer le cryotube dans le bain marie à 37°C pendant 1 à 2 min, en fonction du volume, jusqu'à la décongélation complète de la suspension cellulaire. Afin de limiter au maximum les risques de contamination, dès la décongélation et avant l'ouverture, les cryotubes sont stérilisés à l'alcool à 70%. Leur contenu est prélevé et transféré dans un tube contenant 10 à 20 ml de milieu de décongélation. Après une centrifugation pendant 10 min. à 600 trs/min. destinée à éliminer les traces de DMSO, qui à 37°C est toxique pour les cellules. Le culot est repris dans 10 ml de milieu et les cellules sont placées dans un flacon de culture de 25 cm<sup>2</sup> en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> à 37°C. La viabilité et la concentration des cellules sont contrôlées par un test d'exclusion au bleu trypan à t= 0 et 4 heures, ce qui permet de connaître le rendement de congélation/décongélation. Le milieu est remplacé par du milieu frais après 4 heures. A partir du deuxième jour, les cellules sont cultivées classiquement avec le milieu de culture à 10% de SVF

## **A-2 Induction.**

### **1-Les inducteurs.**

#### **Rétinoïdes.**

L'acide rétinolique *tout-trans* et *9 cis* proviennent de chez SIGMA, l'ensemble des rétinolides de synthèse : Am580, CD367, CD417, CD437, CD666, CD2425, CD2665 et CD2906 sont obtenus du

CIRD Galderma (Sophia Antipolis, France). Les rétinoïdes sont dissous dans le DMSO à une concentration stock initiale de  $10^{-2}$ M et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans l'obscurité. Les dilutions sont réalisées dans l'éthanol.

### **Autres inducteurs.**

L'actinomycine D et la cycloheximide (SIGMA) sont conservés à  $4^{\circ}\text{C}$ , les inhibiteurs des PKCs : GF109203x, Gö6976, Gö7874,HCl (Calbiochem) sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  et à l'obscurité.

## **2-L'induction des cellules.**

Pour l'induction de la transglutaminase tissulaire on utilise un milieu défini contenant, dans un milieu RPMI 1640 (Glutamax I-GIBCO), de la pénicilline 100 UI/ml (TECHGEN), de la streptomycine 100  $\mu\text{g/ml}$  (TECHGEN), et 5  $\mu\text{g/ml}$  d'insuline et de transferrine ainsi que 5 ng/ml de séléniate de sodium (SIGMA). L'induction s'effectue sans SVF pour éviter la séquestration des inducteurs par la RBP (Retinol Binding Protein) contenue dans le sérum. Cependant, pour la viabilité des cellules, on rajoute au bout de 7 heures 3% de SVF, que l'on complète à 10% (volume final) au bout de 48 heures.

La population cellulaire, et sa concentration sont estimés par un test d'exclusion au bleu trypan sur un aliquote de la culture cellulaire. Une étude des ARNm, un dosage enzymatique de la transglutaminase de tissu, et une étude de l'apoptose nécessitent respectivement  $10 \cdot 10^6$  ( $20 \cdot 10^6$  pour les HL 60),  $10 \cdot 10^6$ , et  $1 \cdot 10^6$  cellules. Selon les études à réaliser sur les cellules induites, une quantité de milieu de culture correspondant au nombre de millions de cellules désirées est prélevée et centrifugée pendant 10 min. à 600 trs/min. Le culot est rincé plusieurs fois par de l'EBSS et centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Le culot cellulaire est repris dans du milieu défini, de façon à obtenir une concentration de  $0,5 \cdot 10^6$  cellules/ml et distribué dans les différents flacons de culture représentant les différentes conditions à tester. Le volume d'inducteur ne dépasse jamais 1/1000 du volume final pour éviter les problèmes de toxicité du solvant éthanol. Pour les concentrations les plus faibles, des dilutions en séries sont réalisées.

## **A-3 Dosages.**

### **1- Dosage de l'activité enzymatique de la Transglutaminase de tissu.**

La réaction est basée sur l'incorporation d'un substrat radioactif aminé, la putrescine tritiée, dans une protéine acceptrice, la caséine. La précipitation sur filtre du complexe [ $^3\text{H}$ -putrescine-caséine] par l'acide trichloroacétique (TCA) est suivie de l'élimination de la radioactivité libre par des lavages successifs et du comptage de la radioactivité restante sur le filtre (correspondant à la protéine précipitée).

$10 \cdot 10^6$  cellules traitées par différentes concentrations de rétinoïdes en milieu défini pendant 48 heures sont centrifugées à 700g pendant 10 min. et lavées par du TBS. Les culots sont congelés à

-20°C, si le dosage n'est pas réalisé après centrifugation.

Pendant la décongélation à température ambiante, 150 µl de solution de lyse TET (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA disodique 1 mM, Triton X100 0,5%) sont ajoutés aux culots cellulaires. Après décongélation, les cellules sont immédiatement transférées dans la glace. Une centrifugation pendant 10 min. à 20 000 g est réalisée. Les surnageants sont récupérés. Des échantillons de 50 µl sont préparés en double pour le dosage de l'activité enzymatique, le reste étant congelé à -20°C pour le dosage ultérieure des protéines. On ajoute ensuite aux échantillons 50 µl de mélange réactionnel, soit dans les 100 µl finaux (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; CaCl<sub>2</sub> 5 mM; β mercaptoéthanol 10 mM; N,N'-diméthylcaséine 2 mg/ml; <sup>3</sup>H-putrescine 2 µCi (41,05 Ci/mmol); putrescine 0,1 mM et 0,2 mg de protéine du lysat cellulaire dans un volume final de 100 µl). Deux types de blancs sont prévus en début et en fin de série, par 50 µl de solution de lyse TET ou de lysat cellulaire additionné de 50 µl de mélange réactionnel sans CaCl<sub>2</sub>, en présence d'EGTA 100 mM, agent chélateur du calcium qui inhibe donc la réaction enzymatique. La réaction a lieu à 30°C pendant 20 min., puis est stoppée dans la glace. 80 µl du mélange sont déposés sur un carré de papier Whatman 3MM (1 cm de côté) que l'on plonge aussitôt dans un bain de TCA 10% à 4°C, sous agitation douce, pendant 20 min. Le complexe [<sup>3</sup>H putrescine-N, N'diméthylcaséine] précipite sur le papier filtre. La <sup>3</sup>H putrescine libre est éliminée par lavages successifs : 3 fois par TCA 5% 5 min. à 4°C, 1 fois dans un mélange éthanol/acétone (1v/1v) 5 min. à 4°C et 1 fois dans l'acétone 5 min. à 4°C. Les filtres sont séchés à température ambiante puis plongés dans du liquide à scintillation et la radioactivité est mesurée par un compteur à scintillation β.

Calcul : l'activité spécifique de la TGt est exprimée en pmol/min./mg de protéine.

1 unité d'enzyme est définie comme la quantité d'enzyme liant 1 pmol de putrescine à la N, N'diméthylcaséine par minute et par mg de protéine présente dans le lysat cellulaire.

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

cpm = nombre de cpm obtenu à partir de l'échantillon.

cpm blanc = nombre de cpm obtenu à partir du blanc.

r = rendement de la putrescine tritiée.

2220 dpm = 1 nCi.

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

T = temps réactionnel en minutes.

Q = quantité de protéines du lysat cellulaire déposée sur le filtre en mg.

### **Remarque**

Pour éviter de "ramer" trop longtemps pour obtention des blancs, un conseil empirique: rincer vos filtres de papiers Whatmann au TCA 5% et sécher les à l'étuve avant de faire vos dosages.

## **2- Dosage des protéines. (Bradford 1976, Read *et al* 1981)**

135 µl de l'échantillon dilué au 1/20<sup>ème</sup> sont ajoutés à 2565 µl de réactif colorant (bleu de Coomassie G250 (FLUKA) 15 mg; éthanol absolu 4,7 ml; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% 10 ml; H<sub>2</sub>O qsp 100 ml; filtré sur papier Whatman) et laissés 5 min. à température ambiante. La lecture se fait à 595 nm contre le blanc. Une gamme étalon de sérualbumine bovine fraction V (BOEHRINGER) de 5 à 200 µg est préalablement établie.

### **Remarque.**

Conserver à 4°C et pas plus de 15 jours le réactif colorant.

## **A-4 Microscopie**

Utilisation d'un microscope OLYMPUS.

### **1- Les cytocentrifugations sur lames de verre.**

Les lames de verre sont annotées (lignée cellulaire, inducteur(s), temps de contact et date d'induction). 15.104 cellules sont cytocentrifugées pendant 10 min à 600 tours/min (CYTOSPIN 3), le milieu étant absorbé sur buvard (SHANDON). Les lames sont séchées une nuit à température ambiante et emballées hermétiquement dans de l'aluminium. Les cytopréparations sont stockées à -20°C.

Les cellules sur lames sont, une fois décongelées pendant 1 heure à température ambiante, utilisées pour les techniques qui suivent.

### **2- Coloration des cellules par la méthode de May Grünwald Giemsa.**

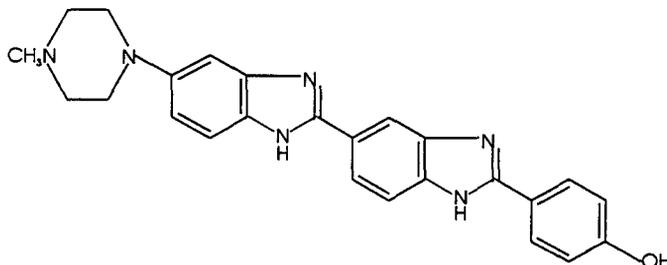
La coloration au May Grünwald Giemsa (MGG) permet une coloration du cytoplasme et du noyau .

La coloration au MGG s'effectue par le passage des lames dans les solutions suivantes : May Grünwald (BIOLYON) pur pendant 3 min, May Grünwald dilué au 1/2 pendant 2 min, Giemsa (BIOLYON) dilué au 1/10 pendant 10 min et dans l'eau distillée pendant 1 min.

Le montage des lamelles s'effectue par une solution de Eukitt. L'observation s'effectue en lumière blanche.

### 3- Coloration au Hoechst 33258.

Le Hoechst 33258 est un agent qui s'intercale dans l'ADN des cellules et permet la visualisation des noyaux et en particulier de la chromatine. Cette coloration permet la quantification des cellules apoptotiques.



Le Hoechst 33258 [Bis(benzimidazole); SIGMA réf. B2883] est un agent qui s'intercale dans l'ADN des cellules et permet la visualisation des noyaux et en particulier de la chromatine. Les cellules sont préalablement traitées par différentes doses de rétinoïdes pendant 5 à 6 jours. 150 000 cellules sont cytocentrifugées pendant 10 min à 600 trs/min. sur lame de verre et lavées par du PBS. Elles sont fixées pendant 10 min; à -20°C dans la solution de Carnoy (méthanol/acide acétique : 3v/1v) et colorées pendant 10 min. à 37°C par dépôt sur les cellules de 60 µl de Hoechst 33258 à 0,1 µg/ml dans PBS. Après un lavage à l'eau distillée de 5 min., les cellules sont séchées. Le montage des lamelles s'effectue par une solution contenant 80% de glycérol, 20% de PBS et 100 mg/ml de DABCO [1,4-diazabicyclo(2,2,2)octane; ALDRICH]. L'observation se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence. La longueur d'onde d'excitation est de 365 nm. On détermine ainsi le nombre de cellules fragmentées pour 100 cellules totales (moyenne de 4 comptage de 400 cellules).

### 4- TUNEL.

TUNEL = Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP biotin Nick End Labeling.

C'est une technique très sensible qui permet de mettre en évidence les coupures de l'ADN résultant de l'activation d'endonucléases dans une cellule en cours d'apoptose.

Le TUNEL permet un marquage des cassures de l'ADN en 3'OH par une uridine marquée à la fluorescéine.

Les lames, stockées à -20°C, sont sorties 1 heure avant la manipulation. Elles sont réhydratées par 100 µl de PBS pendant 5 min, fixées à la paraformaldéhyde à 1% pH 7,4 (100 µl) pendant 15 min.

à 4°C, et rincées 2 fois par 100 µl de PBS pendant 5 min. Le réactif T.U.NEL. (CoCl<sub>2</sub> 2,5 mM, terminale transférase 12,5U, Fluoresceine 12-UTP 5 µM, triton 0,1%, dans tampon de terminale transférase 1x) (BOEHRINGER) préparé extemporanément est appliqué à raison 20 µl par lame. Un contrôle est réalisé avec une solution témoin dépourvue de l'enzyme. Après une incubation pendant 1 heure à 37°C, les lames sont rincées 2 fois par 100 µl de PBS pendant 5 min. Une contre coloration au Bleu Evans est effectuée avant de monter les lamelles par du DABCO (80% de glycérol, 20% de PBS et 100 mg/ml de DABCO [1,4-diazabicyclo(2,2,2)octane] ALDRICH). Les lames sont conservées à 45°C et à l'obscurité.

### **5- Détection de la transglutaminase de tissu par immunofluorescence indirecte :**

La transglutaminase de tissu est reconnue par un anticorps monoclonal (CUB 7402 aimablement fourni par le professeur P.J.Birckbichler, Oklahoma ou commercialisé par NeoMarker) révélé par un anticorps de mouton antisouris marqué à la fluorescéine (BIOSYS). Un anticorps non immun de souris (CUB 101) est utilisé comme contrôle.

Les cellules traitées par différentes concentrations de rétinoïdes, pendant 48 heures dans un milieu défini complété par 3% de sérum de veau foetal à 7 heures, sont récupérées par cytocentrifugation 10 min. à 600 g et lavées par du PBS. Les cellules sont fixées 5 min. à -20°C par une solution contenant du méthanol à 95% dans le PBS, puis incubées 10 min. à -70°C dans un bain d'acétone et lavées 3 fois 5 min. par du PBS. Une perméabilisation de 5 min. par du tween 80 à 1% dans du PBS est effectuée à température ambiante. Après 3 lavages de 5 min. par du PBS, les cellules sont d'abord préincubées une nuit à 4°C en présence de sérum de mouton non immun (5% dans du PBS) plus 3% de séralbumine bovine (SAB), puis elles sont incubées 1 heure à 37°C avec l'immunsérum spécifique dilué au 1/200 dans du PBS avec 3% de SAB et enfin pendant 1 heure à température ambiante avec l'immunsérum fluorescent dilué dans du PBS avec 3% de SAB et lavées 4 fois 10 min. par du PBS. 10 µl de solution de DABCO (glycérol 80%, PBS 20%, DABCO 100ng/ml, azide de sodium 0,1%) permettent le montage des lamelles. Des témoins où l'anticorps spécifique est omis (témoin de fluorescence) ainsi que des témoins où il est remplacé par un anticorps de souris non immun, sont soumis au même traitement.

## **B- Biologie Moléculaire.**

### **B-1 ARNm**

#### **1- Extraction ARN totaux. (Chomczynski et Sacchi, 1987)**

La principale source d'échec dans toute tentative d'extraction de l'ARN est la contamination par les ribonucléases. Les RNAses sont des enzymes très stables qui n'exigent pas de cofacteurs pour agir. Pour éviter toute contamination par les ribonucléases, on travaille stérilement, à 4°C dans la glace avec du matériel stérile et en portant des gants à usage unique.

10<sup>7</sup> cellules sont centrifugées à 600 g pendant 10 min., puis lavées deux fois par du PBS avec les mêmes conditions de centrifugation. Le culot cellulaire est lysé par 2 ml de RNAlable (BIOPROBE SYSTEMS RNA 1501-100), auquel on ajoute 0,1 volume de chloroforme. Le mélange est homogénéisé puis laissé à 4°C pendant 5 min. Le lysat est centrifugé à 12 000 g pendant 15 min. à 4°C. La phase aqueuse supérieure contenant l'ARN est transférée dans un nouveau tube (la phase organique inférieure contient l'ADN et les protéines). L'ARN de la phase aqueuse est précipité par 1 volume d'isopropanol et incubé pendant 15 min. à 4°C. Le tout est centrifugé à 12 000 g pendant 15 min. à 4°C. Le précipité est lavé par 1 ml d'éthanol à 75%, puis centrifugé à 7 500 g pendant 8 min. à 4°C. Le culot dissous dans 20 µl d'eau stérile est conservé à -70°C.

Calcul de la pureté et calcul du rendement de l'extraction. Une lecture de l'absorbance à 260 nm et 280 nm, est effectuée sur 4 µl d'ARN en solution dilués dans 1 ml d'eau. La mesure de l'absorbance à 260 nm et 280 nm permet de déterminer la concentration respective en ARN et en protéines. Lorsque le rapport A260/A280 est compris entre 1,7 et 2, la pureté est jugée suffisante. 1 unité de DO à 260 nm correspond à 40 µg d'ARN. Or on teste 4 µl d'échantillon. La concentration en µg/µl d'ARN dans l'échantillon testé est donc égale à : 10 x A260.

#### **2- Electrophorèse en gel d'agarose en présence de formaldéhyde.**

La cuve horizontale (BIORAD) est lavée par NaOH 1N.

Le gel dénaturant est un gel d'agarose à 1% préparé avec un tampon MOPS (MOPS 1 g; acétate de sodium 5 mM; EDTA 1 mM; pH 7), en présence de formaldéhyde désionisée (16%). Le tampon de dénaturation est composé de formamide désionisée (50%), de formaldéhyde désionisée (17,8%) et de tampon MOPS. Le tampon de migration est le MOPS 1x.

8 µg d'ARN sont repris dans 15 µl de tampon de dénaturation, placés pendant 5 min. à 68°C, puis refroidis dans la glace. Les échantillons sont déposés dans les puits en présence de bleu de bromophénol (0,025%) et de glycérol (0,06%). La migration s'effectue à 80 volts pendant 2 heures 30

à 4°C. Une partie du gel est incubée dans une solution de bromure d'éthidium et lue sous lumière UV (254 nm) pour vérifier la migration et la taille des ARNm.

### **3- Northern Blot.**

Les fragments sont transférés par capillarité sur support solide (Nylon) à température ambiante.

Le gel est trempé 20 min. dans le tampon de transfert (soude 0,05 M). Sur une cuve contenant du tampon de transfert, on pose une plaque de verre recouverte d'un pont de papier Whatman 3MM imbibé du même tampon. Le gel retourné est déposé sur l'ensemble. Une membrane Nylon (AMERSHAM Hybond-N<sup>+</sup>) est placée sur le gel et recouverte de papier Whatmann 3MM imbibée de tampon de transfert et d'une épaisse couche de papier absorbant. Le gel est entouré de parafilm pour éviter tout reflux du tampon de transfert. L'ensemble est surmonté d'une plaque de verre et d'un poids puis laissé une nuit.

Le lendemain matin, la membrane est neutralisée pendant 10 min. dans SSC 2x.

## **B-2 ADN**

### **1- Transcription inverse (RT).**

La réaction de transcription inverse (Reverse Transcription) permet la synthèse d'un ADN complémentaire à partir d'une matrice d'ARN.

Les ARN totaux sont chauffés à 68°C pendant 5 min. Et refroidis dans la glace. La réaction de RT est réalisée dans un volume final de 20µl contenant 1µg d'ARN totaux dénaturés, 20U de RNasin<sup>v</sup> inhibiteur des ribonucléases (PROMEGA), des pd(N)<sub>6</sub> 5µM (Pharmacia Biotech), des dNTPs 0,5 mM (PROMEGA) et 200U de M-MLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (PROMEGA) dans du tampon RT 1x. La réaction s'effectue à 37°C pendant 1 heure.

Les échantillons peuvent être conservés à 4°C pour une utilisation rapide ou à -20°C pour une utilisation plus éloignée.

### **2- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).**

Un aliquot (5µl) du produit de réaction de RT est mélangé avec 20 µl de tampon PCR 1x contenant 1 U Taq DNA polymérase (PROMEGA), MgCl<sub>2</sub> 1 mM, dNTPs (PROMEGA), et 100ng de chaque amorce. L'ensemble est recouvert d'une goutte d'huile minérale (Perkin Elmer). La réaction de polymérisation en chaîne est réalisée sur un thermocycleur (MJ Research) sur la base du programme suivant : 95°C pendant 5 min., puis n (15 à 45) cycles consistant en une dénaturation à 95°C pendant une minute, une hybridation à 54°C pendant une minute et une élongation à 72°C pendant une minute. La température d'hybridation peut être modifiée en fonction des T<sub>m</sub> des couples d'amorces. Après le

dernier cycle, l'incubation à 72°C est prolongée durant 10 minutes, puis stopper à 4°C. Les réactions PCR pour chaque gène étudié, sont réalisés séparément.

### **3- Electrophorèse en gel d'agarose:**

On utilise une cuve horizontale (BIORAD).

Le gel d'agarose à 1,6 ou 2% est préparé avec un tampon TAE 1x (Tris-HCl 40 mM, pH 7; Acide Acétique glaciale 0,2 mM; EDTA 1 mM), qui sert aussi de tampon de migration.

10 µl de produits de PCR (ADNc) sont déposés dans les puits en présence de bleu de bromophénol (0,025%) et de glycérol (50%). La migration s'effectue à 75 volts pendant 1 heure à 4°C. Le gel est lu sous lumière UV (254 nm) pour vérifier la migration et la taille des ARNm.

On dépose comme témoin de poids moléculaire le DNA ladder 100 bp (PROMEGA), qui se compose d'une série de bandes multiples de 100 pb, de 100 à 1000 pb avec une double intensité pour la bande 500 pb et une bande surnuméraire à 1500 pb.

**Remarque :** ce témoin de poids moléculaire n'est pas phosphorylé en 5', il peut donc être marqué par l'utilisation de la T4 kinase et du <sup>32</sup>P γATP.

### **4- Southern Blot.**

Les fragments sont transférés par capillarité sur support solide (Nylon) à température ambiante, selon le même principe que pour le Northern blot, mais dans un autre tampon de transfert (NaCl 0,6M, NaOH 0,4N).

Le lendemain matin, la membrane est neutralisée pendant 10 min. dans SSC 2x.

### **5- Gel polyacrylamide.**

Le gel de polyacrylamide est réalisé sur une cuve verticale (CBS Scientific CO).

Le gel de polyacrylamide (acrylamide / bisacrylamide 29:1 (6 à 12% p/v)) (Appligen) est préparé avec un tampon TAE 1x, qui sert aussi de tampon de migration. Les échantillons sont déposés en présence de bleu (bleu de bromophénol 5 mg, xylène cyanol 10 mg, 20µl EDTA 500mM, 10µl NaOH 10n, 8ml formamide). La réaction de polymérisation est réalisée en présence d'ammonium persulfate et de TEMED (PROMEGA).

## **B-3 Sondes.**

### **1- Marquage de sondes par la technique de multiamorçage au hasard.**

(Feinberg et Vogelstein 1983)

(BOEHRINGER Random Primed DNA labeling Kit 1004.760)

Nous utilisons les inserts plasmidiques correspondant aux ADN complémentaires des RARs, des RXRs, de la Transglutaminase tissulaire et de l'actine (témoin interne). 25 ng d'insert sont repris dans l'eau stérile qsp 11  $\mu$ l et placés pendant 2 min. 30, à 100°C pour dénaturer l'ADN, puis à 4°C. Ensuite, nous ajoutons 3  $\mu$ l d'un mélange de dATP, dTTP, dGTP à 0,5 mM/l dans Tris-HCl pH 7,4, 30  $\mu$ Ci  $\alpha$ dCTP  $^{32}$ P (3000Ci/mmol), 2  $\mu$ l de tampon Klenow 10x contenant des hexanucléotides au hasard servant d'amorce, à 2 UI de Klenow (fragment ADN polymérase I). L'ensemble est laissé à 37°C pendant 1 heure.

## **2- Marquage de sondes par la polynucléotide T4 kinase.**

Nous utilisons des oligonucléotides correspondants à des séquences internes aux produits d'amplification PCR. La réaction s'effectue à 37°C pendant une heure, dans un volume final de 20 $\mu$ l contenant l'oligonucléotide 1 $\mu$ M, 1U de T4 kinase (PROMEGA), 2 $\mu$ l de  $\gamma$ ATP $^{32}$  (Dupont Nemours) dans du tampon T4 kinase 1x.

## **3- Dessalage sur colonne séphadex G<sub>50</sub>.**

La sonde est dessalée sur colonne Sephadex G50 par un tampon (Tris-HCl pH 7,5 10 mM, EDTA 0,02 mM, sarcosyl 1%) pour éliminer la radioactivité libre, puis elle est reprise dans 10 ml de tampon (formamide 50%, SDS 0,5%, SSC 6x, ADN de sperme de hareng dénaturé (10 min. à 100°C) 0,2 mg/ml, Tris-HCl pH 7,4 1,35 mM, EDTA 0,13 mM). On estime que la sonde est correctement marquée lorsqu'un aliquote de 10  $\mu$ l correspond à une radioactivité de 30.10<sup>6</sup> cpm au compteur.

## **4- Dessalage sur colonne Chromaspin 10 et 100.**

Après homogénéisation des colonnes et séchage par centrifugation 2 min à 700g, la sonde est déposée sur colonne puis dessalée par centrifugation pendant 6 min à 700g. On utilise des chromaspin 10 pour les oligonucléotides et 100 pour les ADNc (CLONTECH).

**Remarque :** le temps est précieux adopter cette technique très rapide.

## **B-4 Révélation.**

### **1-Préhybridation et hybridation.**

#### **a) technique au sperme de hareng.**

Cette étape va permettre de visualiser le signal d'hybridation entre l'ARNm ou le produit PCR recherché et la sonde marquée au  $^{32}$ P. Préhybridation et hybridation sont réalisées à 42°C dans un four à hybridation, dans le même tampon (Tris-HCl pH 7,4 1,35 mM, EDTA 0,13 mM, formamide 50%,

SDS 0,5%, SSC 6x, ADN de sperme de hareng dénaturé (10 min. à 100°C) 0,2 mg/ml) à raison de 100  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  de membrane.

La membrane est préhybridée dans ce tampon pendant 4 heures afin de saturer les sites non spécifiques. L'hybridation est réalisée pendant une nuit, dans le même tampon auquel on a ajouté la sonde marquée au  $^{32}\text{P}$ . Cette technique a été abandonnée au profit de la technique qui suit et qui donne de bien meilleurs résultats.

#### **b) technique au Denhardt.**

Par rapport à la technique précédente, seul le tampon change (SSPE 6x, pH 7,2, denhardt 1x, Heparine 0,5 mg/ml, SDS 0,2%) à raison de 100  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  de membrane.

### **2-Lavage de la membrane.**

Ces lavages vont permettre d'éliminer l'excès de sonde retenue de façon non spécifique sur la membrane.

#### **a) technique au sperme de hareng.**

Un lavage à température ambiante pendant 2 min. dans une solution SSC 2x, SDS 0,005%, puis deux lavages à 42°C pendant 30 min. sous agitation douce dans une solution SSC 0,1x, SDS 0,005%.

#### **b) technique au Denhardt.**

Un lavage à température ambiante pendant 5 min., puis un lavage à 70°C pendant 30 min. sous agitation douce dans une solution SSPE 6x, SDS 0,2%.

### **3-Autoradiographie.**

La membrane est mise au contact d'un film KODAK X-OMAT™ AR (AMERSHAM) dans une cassette (PHILIPS) contenant deux écrans intensificateurs (DUPONT CROMEX Lightning plus) à -70°C. Le temps d'exposition varie en fonction de l'intensité du signal. Le film est révélé par passage dans 4 bains successifs : révélateur, bain d'arrêt, fixateur, lavage.

Le film est analysé sur un intégrateur (REP Helena Laboratories). On calcul le rapport ARNm étudié sur ARNm de la  $\beta$  actine (gène domestique) pour chaque échantillon.

**Table II** : oligonucléotides utilisés comme amorces ou sondes lors de cette étude (non encore citées).

gènes	amorces	séquence
Bcl 2	en amont	5' -AGA GGG GCT ACG AGT GGG ATG-3'
	en aval	5' -CCC CAC CGA ACT CAA AGA AGG-3'
	interne	5' -CGG GCT GGG AGG AGA AGA TGC-3'
Bax	en amont	5' -ATG CGT CCA CCA AGA AGC TGA-3'
	en aval	5' -AGC ACT CCC GCC ACA AAG ATG-3'
	interne	5' -GAT CAG TTC CGG CAC CTT GGT-3'
Bclx 1	en amont	5' -GCA GGT ATT GGT GAG TCG GAT-3'
	en aval	5' -GAA GAG TGA GCC CAG CAG ACC-3'
	interne	5' -TAG GTG GTC ATT CAG GTA AGT-3'

## B-5 Protéines

### 1-Gel SDS-Page.

#### Tampon de gel de concentration 4X :

6,05 g Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane  
 0,4 g SDS  
 ajuster le pH à 6,8  
 qsp 100 ml H<sub>2</sub>O

#### Tampon de gel de séparation 4X :

91 g Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane  
 2 g SDS  
 ajuster le pH à 8,8  
 qsp 500 ml H<sub>2</sub>O

#### Tampon de cuve 5X :

15,1 g Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane  
 72 g glycine  
 5,0 g SDS  
 qsp 1000 ml H<sub>2</sub>O

#### Tampon échantillon SDS 2X (bleu):

1,52 g Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane  
 20 ml glycerol  
 2,0 g SDS  
 2,0 ml β-mercapto-ethanol  
 1 mg Bleu de bromophénol  
 ajuster le pH à 6,8  
 qsp 100 ml H<sub>2</sub>O

#### Gel de séparation :

7,5 ml acrylamide/ bisacrylamide 40% (Appligen)  
 7,5 ml tampon de séparation  
 qsp 30 ml H<sub>2</sub>O

#### Gel de concentration :

1,5 ml acrylamide/ bisacrylamide 40%  
 2,5 ml tampon de concentration  
 qsp 10,5 ml H<sub>2</sub>O

Le gel de polyacrylamide est réalisé sur une cuve verticale (CBS Scientific CO).

Les protéines d'un lysat cellulaire de  $10^6$  cellules sont séparées sur un gel de polyacrylamide 10% en présence de SDS. L'extraction des protéines est identique à celle du dosage de l'activité enzymatique. Après avoir soigneusement nettoyer les plaques à l'éthanol et les avoir assemblées, on coule successivement le gel de séparation, puis le gel de concentration. Une prémigration en présence de bleu est effectuée pendant 3 heures à 35mA ou une nuit à 5mA. Les échantillons sont repris dans le bleu (1v/1v) et dénaturés pendant 3 min. à 100°C et refroidis immédiatement à 4°C. Les dépôts se font à la seringue. La migration s'effectue pendant 3 heures à 35mA ou une nuit à 5mA.

## **2-Western-blot.**

Le principe du Western-blot consiste à transférer des protéines d'un gel de polyacrylamide sur une membrane de nitrocellulose pour une détection immunochimique. Le protocole décrit ici est spécifique à la détection de protéines lorsque votre second anticorps est couplé à la peroxydase.

### **Tampon de blot :**

14,59g Tris (hydroxymethyl) amino-méthane.

69,12g Glycine.

1,20 l Méthanol.

qsp 6 l H<sub>2</sub>O

Ajuster le pH à 8,3 si nécessaire.

Le gel SDS-PAGE est réalisé comme décrit précédemment. On enlève un coin du gel et on place ce dernier sur une feuille de papier Whatmann 3MM préalablement humidifiée par le tampon de blot. Une feuille de nitrocellulose (Technomara) est également humidifiée dans ce tampon puis placée sur le gel. Attention à marquer la membrane pour l'orienter correctement. Enlever toutes les bulles d'air qu'il pourrait y avoir entre le gel et la membrane.

Souvenez-vous que NC n'est pas efficace pour retenir les protéines. Un temps de transfert trop long ou un voltage excessif peuvent conduire à un "overblotting".

La membrane utilisée est recouverte par une autre feuille de papier 3MM Whatmann et les bulles d'air sont éliminées. La membrane est alors placée entre deux blocs de Scotch-Brite pré-humidifié ou un équivalent et le blot est assemblé. Ne pas oublier d'orienter la membrane de nitrocellulose vers l'électrode positive. Le transfert se fait à 60 volts pendant 3 à 5 heures, ou à 20 volts durant toute une nuit.

Ensuite, la membrane de nitrocellulose est colorée au rouge de Ponceau (0,2% rouge de Ponceau, 3% acide acétique) pendant quelques minutes, puis décolorée dans de l'eau.

250 ml de PBS à 3% poudre de lait sont alors préparés extemporanément. La membrane est incubée dans un tampon d'arrêt (poudre de lait 3% dans PBS 1X) pendant 2 heures à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. Trois lavages dans du PBS 1X, de 15 min. sont réalisés. La membrane est ensuite incubée avec le premier anticorps (monoclonal de souris anti-TGt) dilué au 1/1000 dans la solution à 3% lait dans PBS pendant 1 heure à 37°C. Elle est lavée 3 fois 15 min. dans du PBS 1X puis incubée avec le second anticorps (de chèvre anti-IgG de souris) couplé à la peroxydase dilué au 5/10000 dans la solution à 3% lait dans PBS pendant 1 heure à 37°C. On réalise à nouveau trois lavages de 15 minutes avec le PBS 1%. La membrane est révélée chimioluminescence avec l'application d'une membrane Biomax (KODAK) et l'exposition à un film autoradiographique pendant 10 min.

### **3-Traitement à la phosphatase alcaline.**

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse des groupements 5'-phosphate de l'ADN, l'ARN, et des ribo et desoxyribonucléosides triphosphates.

Ajouter 10 µl (10U) de phosphatase alcaline (PROMEGA) pour 100 µl d'échantillon à traiter. Incuber à 37°C pendant une heure. Stopper la réaction à 4°C. Il est possible d'inactiver la phosphatase alcaline en la chauffant 30 min. à 75°C.

Achyuthan-KE; Greenberg-CS

Identification of a guanosine triphosphate-binding site on guinea pig liver transglutaminase. Role of GTP and calcium ions in modulating activity.

J-Biol-Chem. 1987 Feb 5; 262(4): 1901-6

Achyuthan-KE; Mary-A; Greenberg-CS

The binding sites on fibrin(ogen) for guinea pig liver transglutaminase are similar to those of blood coagulation factor XIII. Characterization of the binding of liver transglutaminase to fibrin.

J-Biol-Chem. 1988 Oct 5; 263(28): 14296-301

Aeschlimann-D; Paulsson-M

Cross-linking of laminin-nidogen complexes by tissue transglutaminase. A novel mechanism for basement membrane stabilization.

J-Biol-Chem. 1991 Aug 15; 266(23): 15308-17

Aeschlimann-D; Paulsson-M; Mann-K

Identification of Gln726 in nidogen as the amine acceptor in transglutaminase-catalyzed cross-linking of laminin-nidogen complexes.

J-Biol-Chem. 1992 Jun 5; 267(16): 11316-21

Aeschlimann-D; Wetterwald-A; Fleisch-H; Paulsson-M

Expression of tissue transglutaminase in skeletal tissues correlates with events of terminal differentiation of chondrocytes.

J-Cell-Biol. 1993 Mar; 120(6): 1461-70

Aeschlimann-D; Paulsson-M

Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids.

Thrombosis-Haemostasis 1994 Jan 12; 71(4): 402-15

Aeschlimann-D; Kaupp-O; Paulsson-M

Transglutaminase-catalyzed matrix cross-linking in differentiating cartilage: identification of osteonectin as a major glutaminyl substrate.

J-Cell-Biol. 1995 May; 129(3): 881-92

Alaoui S; Mian S; Lawry J; Quash G; Griffin M

Cell cycle kinetics, tissue transglutaminase and programmed cell death (apoptosis).

FEBS Lett, 311(2):174-8 1992 Oct 19

Alison-MR ; Sarraf-CE

Liver cell death : patterns and mechanisms.

Gut 1994 May, 35(5) : 577-81

Allegretto EA; Shevde N; Zou A; Howell SR; Boehm MF; Hollis BW; Pike JW

Retinoid X receptor acts as a hormone receptor in vivo to induce a key metabolic enzyme for 1,25-dihydroxyvitamin D3.

J Biol Chem, 270(41):23906-9 1995 Oct 13

Amendola-A; Lombardi-G; Oliverio-S; Colizzi-V; Piacentini-M

HIV-1 gp120-dependent induction of apoptosis in antigen-specific human T cell clones is characterized by 'tissue' transglutaminase expression and prevented by cyclosporin A.

FEBS-Lett. 1994 Feb 21; 339(3): 258-64

Amendola A; Gougeon ML; Poccia F; Bondurand A; Fesus L; Piacentini M

Induction of "tissue" transglutaminase in HIV pathogenesis: evidence for high rate of apoptosis of CD4+ T lymphocytes and accessory cells in lymphoid tissues.

Proc Natl Acad Sci U S A, 93(20):11057-62 1996 Oct 1

- Ando-Y; Imamura-S; Owada-MK; Kakunaga-T; Kannagi-R  
 Cross-linking of lipocortin I and enhancement of its Ca<sup>2+</sup> sensitivity by tissue transglutaminase.  
 Biochem-Biophys-Res-Commun. 1989 Sep 15; 163(2): 944-51
- Ando-H ; Adachi-M ; Umeda-K ; Matsuura-A ; Nonaka-M ; Uchio-R ; Tanaka-H ; Motoki-M  
 Purification and characterisation of a novel transglutaminase derived from microorganism.  
 Agric. Biol. Chem. 1989 ; 53 : 2613-2617
- Ando-Y; Imamura-S; Owada-MK; Kannagi-R  
 Calcium-induced intracellular cross-linking of lipocortin I by tissue transglutaminase in A431 cells.  
 Augmentation by membrane phospholipids.  
 J-Biol-Chem. 1991 Jan 15; 266(2): 1101-8
- Ando-M; Yamauchi-M; Fujita-K; Kakita-M; Nagata-Y  
 Induction of tissue transglutaminase in rat superior cervical sympathetic ganglia following in vitro stimulation of  
 retinoic acid.  
 Neuroscience-research 1996 Mar ; 24(4): 357-62
- Anwar R; Stewart AD; Miloszewski KJ; Losowsky MS; Markham AF  
 Molecular basis of inherited factor XIII deficiency: identification of multiple mutations provides insights into  
 protein function.  
 Br J Haematol, 91(3):728-35 1995 Nov
- Apfel-C ; Bauer-F ; Crettaz-M ; Forni-L ; Kamber-M ; Kaufmann-F ; LeMotte-P ; Pirson-W ; Klaus-M  
 A retinoic acid receptor  $\alpha$  antagonist selectively counteracts retinoic acid effects  
 Proc-Natl-Acad-Sci-USA 1992 ; 89 : 7129-33
- Ashton AC; Li Y; Doussau F; Weller U; Dougan G; Poulain B; Dolly JO  
 Tetanus toxin inhibits neuroexocytosis even when its Zn(2+)-dependent protease activity is removed.  
 J Biol Chem, 270(52):31386-90 1995 Dec 29
- Baek-KJ; Das-T; Gray-CD; Desai-S; Hwang-KC; Gacchui-R; Ludwig-M; Im-MJ  
 A 50 KDa protein modulates guanine nucleotide binding of transglutaminase II.  
 Biochemistry. 1996 Feb 27; 35(8): 2651-7
- Baretino-D ; Bugge-TH ; Bartunek-P ; Ruiz-MDMV ; Sonntagbuck-V ; Beug-H ;Zenke-M ; Stunnenberg-HG  
 Unliganded T3R, but not its on,cogenic variant, v-erb A, suppresses RAR-dependant transactivation by titrating  
 out RXR.  
 EMBO J. 1993, 12 : 1343-1354
- Barnes-RN ; Bungay-PJ ; Elliott-BM ; Walton-PL ; Griffin-M  
 Alterations in the distribution and activity of transglutaminase during tumour growth and metastasis.  
 Carcinogenesis 1985 Mar, 6(3) : 459-63
- Barsigian-C; Fellin-FM; Jain-A; Martinez-J  
 Dissociation of fibrinogen and fibronectin binding from transglutaminase-mediated cross-linking at the  
 hepatocyte surface.  
 J-Biol-Chem. 1988 Oct 5; 263(28): 14015-22
- Barsigian-C; Martinez-J  
 Binding and covalent processing of fibrinogen by hepatocytes and endothelial cells.  
 Blood-Coagul-Fibrinolysis. 1990 Oct; 1(4-5): 551-5
- Barsigian-C; Stern-AM; Martinez-J  
 Tissue (type II) transglutaminase covalently incorporates itself, fibrinogen, or fibronectin into high molecular  
 weight complexes on the extracellular surface of isolated hepatocytes. Use of 2-[(2-oxopropyl)thio] imidazolium  
 derivatives as cellular transglutaminase inactivators.  
 J-Biol-Chem. 1991 Nov 25; 266(33): 22501-9

Beard-RL; Chandraratna-RA; Colon-DF; Gillett-SJ; Henry-E; Marler-DK; Song-T; Denys-L; Garst-ME; Arefieg-T; et-al

Synthesis and structure-activity relationships of stilbene retinoid analogs substituted with heteroaromatic carboxylic acids.

J-Med-Chem. 1995 Jul 21; 38(15): 2820-9

Bendixen-E; Borth-W; Harpel-PC

Transglutaminases catalyze cross-linking of plasminogen to fibronectin and human endothelial cells.

J-Biol-Chem. 1993 Oct 15; 268(29): 21962-7

Bendixen-E; Harpel-PC; Sottrup-Jensen-L

Location of the major epsilon-(gamma-glutamyl)lysyl cross-linking site in transglutaminase-modified human plasminogen.

J-Biol-Chem. 1995 Jul 28; 270(30): 17929-33

Benedetti-L; Grignani-F; Scicchitano-BM; Jetten-AM; Diverio-D; Lo-Coco-F; Avvisati-G; Gambacorti-Passerini-C; Adamo-S; Levin-AA; Pelicci-PG; Nervi-C

Retinoid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia involves PML-RARalpha-mediated increase of type II transglutaminase.

Blood. 1996 Mar 1; 87(5): 1939-50

Beninati-S; Mukherjee-AB

A novel transglutaminase-catalyzed posttranslational modification of HIV-1 aspartyl protease.

Biochem-Biophys-Res-Commun. 1992 Sep 30; 187(3): 1211-8

Bergamini-CM; Signorini-M; Poltronieri-L

Inhibition of erythrocyte transglutaminase by GTP.

Biochim-Biophys-Acta. 1987 Nov 5; 916(1): 149-51

Bergamini-CM; Signorini-M

Studies on tissue transglutaminases: interaction of erythrocyte type-2 transglutaminase with GTP.

Biochem-J. 1993 Apr 1; 291 ( Pt 1): 37-9

Bernard BA, Bernardon JM, Delescluse C, Martin B, Lenoir MC, Maignant J, Charpentier B, Pilgrim WR, Reichert U, Shroot B.

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

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

Bianchi L; Farrace MG; Nini G; Piacentini M

Abnormal Bcl-2 and "tissue" transglutaminase expression in psoriatic skin.

J Invest Dermatol, 103(6):829-33 1994 Dec

Birckbichler-PJ; Orr-GR; Conway-E; Patterson-MK Jr

Transglutaminase activity in normal and transformed cells.

Cancer-Res. 1977 May; 37(5): 1340-4

Birckbichler-PJ; Patterson-MK Jr

Cellular transglutaminase, growth, and transformation.

Ann-N-Y-Acad-Sci. 1978 Jun 20, 312() : 354-65

Birckbichler-PJ; Orr-GR; Patterson-MK Jr ; Conway-E; Carter-HA

Increase in proliferation markers after inhibition of transglutaminase.

Proc-Natl-Acad-Sci-USA 1981 Aug, 78(8) : 5005-8

- Birckbichler-PJ; Orr-GR; Patterson-MK Jr ; Conway-E; Carter-HA ; Maxwell-MD  
Enhanced transglutaminase activity in transformed human lung fibroblast cells after exposure to sodium butyrate.  
Biochim-Biophys-Acta. 1983 Aug 17, 763(1) : 27-34
- Birckbichler PJ, Upchurch HF, Patterson MK, Jr., Conway E.  
A monoclonal antibody to cellular transglutaminase.  
Hybridoma 4:179, 1985.
- Board PG; Webb GC; McKee J; Ichinose A  
Localization of the coagulation factor XIII A subunit gene (F13A) to chromosome bands 6p24----p25.  
Cytogenet Cell Genet, 48(1):25-7 1988
- Board P; Coggan M; Miloszewski K  
Identification of a point mutation in factor XIII A subunit deficiency.  
Blood, 80(4):937-41 1992 Aug 15
- Boehm-MF; Zhang-L; Zhi-L; McClurg-MR; Berger-E; Wagoner-M; Mais-DE; Suto-CM; Davies-JA; Heyman-RA; et-al  
Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells.  
J-Med-Chem. 1995 Aug 4; 38(16): 3146-55
- Boissel-JP ; Kasper-TJ ; Shah-SC ; Malone-JI ; Bunn-HF  
Amino-terminal processing of proteins : hemoglobin South Floride, a variant with retention of initiator methionine and N alpha-acetylation.  
Proc-Natl-Acad-Sci-USA 1985 Dec, 82(24) : 8448-52
- Borge-L; Demignot-S; Adolphe-M  
Type II transglutaminase expression in rabbit articular chondrocytes in culture: relation with cell differentiation, cell growth, cell adhesion and cell apoptosis.  
Biochim-Biophys-Acta. 1996 Jun 13; 1312(2): 117-24
- Borth-W; Chang-V; Bishop-P; Harpel-PC  
Lipoprotein (a) is a substrate for factor XIIIa and tissue transglutaminase.  
J-Biol-Chem. 1991 Sep 25; 266(27): 18149-53
- Bortner-CD ; Oldenburg-NBE ; Cildowski-JA  
The rôle of DNA fragmentation in apoptosis.  
Trends in cell bviology. 1995 ; 5 :21-26.
- Bowness-JM; Folk-JE; Timpl-R  
Identification of a substrate site for liver transglutaminase on the aminopropeptide of type III collagen.  
J-Biol-Chem. 1987 Jan 25; 262(3): 1022-4
- Bowness-JM; Tarr-AH; Wong-T  
Increased transglutaminase activity during skin wound healing in rats.  
Biochim-Biophys-Acta. 1988 Nov 17; 967(2): 234-40
- Breitman TR; Selonick SE; Collins SJ  
Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid.  
Proc Natl Acad Sci U S A, 77(5):2936-40 1980 May
- Brockes-J  
We may not have a moprhogen.  
Nature. 1991 ; 350 :15

Bulens-F; Ibanez-Tallon-I; Van Acker-P; De Vriese-A; Nelles-L; Belayew-A; Collen-D  
Retinoic acid induction of human tissue-type plasminogen activator gene expression via a direct repeat element (DR5) located at -7 kilobases.  
J-Biol-Chem. 1995 Mar 31; 270(13): 7167-75

Bungay-PJ; Owen-RA; Coutts-IC; Griffin-M  
A role for transglutaminase in glucose-stimulated insulin release from the pancreatic beta-cell.  
Biochem-J. 1986 Apr 1; 235(1): 269-78

Byrd-JC; Lichti-U  
Two types of transglutaminase in th PC12 pheochromocytoma cell line.  
J-Biol-Chem. 1987 Aug 25; 262(24): 11699-705

Cai-D; Ben-T; De-Luca-LM  
Retinoids induce tissue transglutaminase in NIH-3T3 cells.  
Biochem-Biophys-Res-Commun. 1991 Mar 29; 175(3): 1119-24

Canman-CE ; Kastan-MB  
Induction of apoptosis by tumor suppressor genes and oncogenes.  
Semin-Cancer-Biol 1995 Feb, 6(1) : 17-25

Cariello L; de Cristofaro T; Zanetti L; Cuomo T; Di Maio L; Campanella G; Rinaldi S; Zanetti P; Di Lauro R;  
Varrone S  
Transglutaminase activity is related to CAG repeat length in patients with Huntington's disease.  
Hum Genet, 98(6):633-5 1996 Dec

Carlberg-C ; saurat-JH ; Siegenthaler-G  
9-cis-retinoic acid is a natural antagonist for the retinoic acid receptor response pathway ;  
Biochem-J. 1993 ; 295 : 343-46

Ceru-MP; Piacentini-M; Piredda-L; Farace-MG; Autuori-F; Fesus-L  
Modulation of transglutaminase by retinoic acid in liver cells.  
Ital-J-Biochem. 1989 Jul-Aug; 38(4): 278A-280A

Chambon-P  
A decade of molecular biology of retinoic acid receptors.  
FASEB-J. 1996 Jul; 10: 940-54

Chen-JY; Penco-S; Ostrowski-J; balaguer-P; Pons-P; Starrett-J; Reczek-P; Chambon-P; Gronemeyer-H  
RAR-specific agonist/antagonistes which dissociate transactivation and AP1 transrepression inhibit anchorage-independent cell proliferation.  
EMBO-J 1995; 14: 1187-97

Chen-JY; Clifford-J; Zusi-C; Starrett-J; Tortolani-D; Ostrowski-J; Reczek-P; Chambon-P; Gronemeyer-H  
Two distinct actions of retinoid-receptor ligands.  
Nature 1996 Aug 29; 382: 819-22

Chiocca-A; Davies-P; Stein-J  
The molecular basis of retinoic acid action.  
J-Biol-Chem. 1988 Aug 15; 263(23): 11584-89

Chiocca EA; Davies PJ; Stein JP  
Regulation of tissue transglutaminase gene expression as a molecular model for retinoid effects on proliferation and differentiation.  
J Cell Biochem, 39(3):293-304 1989 Mar

Chomienne-C; Fenaux-P; Degos-L

Retinoid differentiation therapy in promyelocytic.  
FASEB-J. 1996 Jul; 10: 1025-30

Cocuzzi-E; Piacentini-M; Beninati-S; Chung-SI

Post-translational modification of apolipoprotein B by transglutaminases.  
Biochem-J. 1990 Feb 1; 265(3): 707-13

Coffield JA; Considine RV; Jeyapaul J; Maksymowych AB; Zhang RD; Simpson LL

The role of transglutaminase in the mechanism of action of tetanus toxin.  
J Biol Chem, 269(39):24454-8 1994 Sep 30

Cordella-Miele-E; Miele-L; Mukherjee-AB

A novel transglutaminase-mediated post-translational modification of phospholipase A2 dramatically increases its catalytic activity.

J-Biol-Chem. 1990 Oct 5; 265(28): 17180-8

Cordella-Miele-E; Miele-L; Beninati-S; Mukherjee-AB

Transglutaminase-catalyzed incorporation of polyamines into phospholipase A2.  
J-Biochem-Tokyo. 1993 Feb; 113(2): 164-73

Cornic-M ; Agadir-A ; Degos-I ; Chomienne-C

Retinoids and differentiation treatment : a strategy for treatment in cancer.  
Anticancer Res 1994 Nov-Dec, 14(6A) : 2339-46

Cummings-M

Apoptosis of epithelial cells in vivo involves tissue transglutaminase upregulation.  
J-Pathol. 1996 Jul; 179(3): 288-93

Dadabay-CY; Pike-LJ

Rapid increases in the transglutaminase activity of A431 cells following treatment with epidermal growth factor.  
Biochemistry. 1987 Oct 20; 26(21): 6587-91

Dadabay-CY; Pike-LJ

Purification and characterization of a cytosolic transglutaminase from a cultured human tumour-cell line.  
Biochem-J. 1989 Dec 15; 264(3): 679-85

Damm-K ; Heyman-RA ; Umesono-K ; Evans-RM

Functional inhibition of retinoic acid response by dominant negative retinoic acid receptor mutants.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993 ; 90 : 2989-2993

D'Argenio-G; Sorrentini-I; Cosenza-V; Gatto-A; Iovino-P; D'Armiento-EP; Baldassarre-F; Mazzacca-G

Serum and tissue transglutaminase correlates with the severity of inflammation in induced colitis in the rat.  
Scand-J-Gastroenterol. 1992; 27(2): 111-4

D'Argenio-G; Biancone-L; Cosenza-V; Della-Valle-N; D'Armiento-FP; Boirivant-M; Pallone-F; Mazzacca-G

Transglutaminases in Crohn's disease.  
Gut. 1995 Nov; 37(5): 690-5

Davies-PJ; Davies-DR; Levitzki-A ; Maxfield-FR ; Milhaud-P ; Willingham-MC ; Pastan-IH

Transglutaminase is essential in receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin and polypeptide hormones.

Nature 1980 Jan 10, 283(5743) : 162-7

Davies-PJ; Murtaugh-MP

Transglutaminase and receptore-mediated endocytosis in macrophages and cultured fibroblasts.  
Mol-Cell-Biochem. 1984 ; 58(1-2) : 69-77

- Davies-PJ; Murtaugh-MP; Moore-WT; Johnson-GS; Lucas-D  
Retinoic acid-induced expression of tissue transglutaminase in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells.  
J-Biol-Chem. 1985 Apr 25; 260(8): 5166-74
- Davies-PJ; Chiocca-EA ; Stein-JP  
Retinoid-regulated expression of tissue transglutaminase in normal and leukemic myeloid cells.  
Adv-Exp-Med-Biol. 1988 ; 231 : 63-71
- Davies-PJ; Stein-JP ; Chiocca-EA ; Basilion-JP ; Gentile-V ; Thomazy-V ; Fesus-L  
Retinoid-regulated expression of transglutaminase : link to the biochemistry of programmed cell death.  
In Retinoids in Normal Development and Carcinogenesis ; 1991 ; pp 249-263, Morris-Kay-G (ed) Oxford University Press
- Davis-KD ; Lazar-MA  
Selective antagonism of thyroid hormone action by retinoic acid.  
J.Biol.Cell. 1992 ; 267 : 3185-3189
- Davis-KD ; Berrodin-TJ ; Stelmach-JE ; Winler-JD ; Lazar-MA  
Endogenous retinoid X receptors can function as hormone receptor in pituitary cells.  
Mol-Cell-Biol. 1994 ; 14 : 7105-10
- Defacque-H; Commes-T; Contet-V; Sevilla-C; Marti-J  
Differentiation of U937 myelomonocytic cell line by all-trans retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3:  
synergistic effects on tissue transglutaminase.  
Leukemia. 1995 Oct; 9(10): 1762-7
- Degos-I ; Chomienne-C ; Daniel-MT ; Berger-R ; Dombret-H ; Fenaux-P ; Castaigne-S  
Treatment of first relapse in acute promyelocytic leukaemia with all-trans retinoic acid.  
Lancet. 1990 Dec 8 ; 336(8728) : 1440-1
- Delcros-JG; Bard-S; Roch-AM; Quash-G; Poupon-MF; Korach-S  
Transglutaminase activity and putrescine-binding capacity in cloned cell lines with different metastatic potential.  
FEBS-Lett. 1986 Feb 17; 196(2): 325-30
- Delescluse C, Cavey MT, Martin B, Bernard BA, Reichert U, Maignan J, Darmon M, Shroot B.  
Selective high affinity retinoic acid receptor  $\alpha$  or  $\beta$ - $\gamma$  ligands.  
Mol Pharmacol 40:556, 1991.
- De Luca-LM  
retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia.  
FASEB-J 1991 Nov ;5(14) : 2924-33
- Demignot S; Borge L; Adolphe M  
Transglutaminase activity in rabbit articular chondrocytes in culture.  
Biochim Biophys Acta, 1266(2):163-70 1995 Apr 28
- Denning-MF; Verma-AK  
Involvement of retinoic acid nuclear receptors in retinoic acid-induced tissue transglutaminase gene expression  
in rat tracheal 2C5 cells.  
Biochem-Biophys-Res-Commun. 1991 Feb 28; 175(1): 344-50
- De The-H ; Marchio-A ; Tiollais-P ; Dejean-A  
A novel steroid thyroid hormone receptor-related gene inappropriately expressed in human hepatocellular carcinoma  
Nature. 1987 ; 330 : 667-670

Dubbink-HJ; Verkaik-NS; Faber-PW; Trapman-J; Schroder-FH; Romijn-JC  
Tissue specific and androgen-regulated expression of human prostate-specific transglutaminase.  
Biochem-J. 1996 May 1; 315 ( Pt 3): 901-8

Dudek-SM; Johnson-GV  
Transglutaminase catalyzes the formation of sodium dodecyl sulfate-insoluble, Alz-50-reactive polymers of tau.  
J-Neurochem. 1993 Sep; 61(3): 1159-62

Dudek-SM; Johnson-GV  
Transglutaminase facilitates the formation of polymers of the beta-amyloid peptide.  
Brain-Res. 1994 Jul 18; 651(1-2): 129-33

Duester G  
involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis.  
Biochemistry, 35(38):12221-7 1996 Sep 24

Durand-B ; Saunders-M ; Leroy-P ; Leid-M ; Chambon-P  
All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs  
Cell ; 1992 ; 71 : 73-85

Earnshaw-WC  
Nuclear changes in apoptosis.  
Current-Opin-Cell-Biol. 1995 ; 7 : 337-43

Elsasser-HP; MacDonald-R; Dienst-M; Kern-HF  
Characterization of a transglutaminase expressed in human pancreatic adenocarcinoma cells.  
Eur-J-Cell-Biol. 1993 Aug; 61(2): 321-8

Eitan-S; Schwartz-M  
A transglutaminase that converts interleukin-2 into a factor cytotoxic to oligodendrocytes.  
Science. 1993 Jul 2; 261(5117): 106-8

Eitan S; Solomon A; Lavie V; Yoles E; Hirschberg DL; Belkin M; Schwartz M  
Recovery of visual response of injured adult rat optic nerves treated with transglutaminase.  
Science, 264(5166):1764-8 1994 Jun 17

Esmann J; Voorhees JJ; Fisher GJ  
Increased membrane-associated transglutaminase activity in psoriasis.  
Biochem Biophys Res Commun, 164(1):219-24 1989 Oct 16

Evans-RM  
The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.  
Science 1988; 240: 889-95

Eyrolles-L ; Kagechika-H ; Kawashi-E ; Fukasawa-H ; Iijima-T ; Matsushima-Y ; Hashimoto-Y ; Shudo-K  
Retinobenzoic acids .6.Retinoid antagonists with a heterocyclic ring.  
J-Med-Chem. 1994 ; 37 : 1508-17

Facchiano-F; Luini-A  
Tetanus toxin potently stimulates tissue transglutaminase. A possible mechanism of neurotoxicity.  
J-Biol-Chem. 1992 Jul 5; 267(19): 13267-71

Facchiano-F; Benfenati-F; Valtorta-F; Luini-A  
Covalent modification of synapsin I by a tetanus toxin-activated transglutaminase.  
J-Biol-Chem. 1993 Mar 5; 268(7): 4588-91

Facchiano-F; Valtorta-F; Benfenati-F; Luini-A

The transglutaminase hypothesis for the action of tetanus toxin.

Trends-Biochem-Sci. 1993 Sep; 18(9): 327-9

Facchiano-F; Di-Tullio-M; Luini-A

Evidence that transglutaminase and synapsin I are involved in the neuroparalytic action of tetanus toxin.

Ann-N-Y-Acad-Sci. 1994 Mar 9; 710: 107-19

Fanjul-A; Dawson-MI; Hobbs-PD; Jong-L; Cameron-JF; Harlev-E; Graupner-G; Lu-XP; Pfahl-M

A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation.

Nature 1994; 372: 107-111

Feng-JF; Rhee-SG; Im-MJ

Evidence that phospholipase delta1 is the effector in the Gh (transglutaminase II)-mediated signaling.

J-Biol-Chem. 1996 Jul 12; 271(28): 16451-4

Fesus-L ; Szucs-EF ; Barrett-KE ; Metcalfe-DD ; Folk-JE

Activation of transglutaminase and production of protein-bound gamma-glutamylhistamine in stimulated mouse mast cells.

J-Biol-Chem. 1980 Nov 5; 260 (25): 13771-8

Fesus L; Szucs EF; Barrett KE; Metcalfe DD; Folk JE

Activation of transglutaminase and production of protein-bound gamma-glutamylhistamine in stimulated mouse mast cells.

J Biol Chem, 260(25):13771-8 1985 Nov 5

Fesus-L; Metsis-ML; Muszbek-L; Koteliansky-VE

Transglutaminase-sensitive glutamine residues of human plasma fibronectin revealed by studying its proteolytic fragments.

Eur-J-Biochem. 1986 Jan 15; 154(2): 371-4

Fesus-L; Thomazy-V; Falus-A

Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death.

FEBS-Lett. 1987; 224: 104-8

Fesus-L; Thomazy-V

Searching for the function of tissue transglutaminase : its possible involvement in the biochemical pathway of programmed cell death.

Adv-Exp-Med-Biol. 1988; 231(): 119-34

Fesus-L; Thomazy-V; Autuori-F; Ceru-MP; Tarcsa-E; Piacentini-M

Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action.

FEBS-Lett. 1989 Mar 13; 245(1-2): 150-4

Fesus-L; Davies-PJA; Piacentini-M

Apoptosis : molecular mechanisms in programmed cell death.

Eur-J-Cell-Biol. 1991; 56:170-7

Fesus-L; Tarcsa-E; Kedei-N; Autuori-F; Piacentini-M

Degradation of cells dying by apoptosis leads to accumulation of epsilon(gamma-glutamyl)lysine isodipeptide in culture fluid and blood.

FEBS-Lett. 1991 Jun 17; 284(1): 109-12

Fesus-L; Madi-A; Balajthy-Z; Nemes-Z; Szondy-Z

Transglutaminase induction by various cell death and apoptosis pathways.

Experientia. 1996 Oct 31; 52(10-11): 942-9

Folk-JE; Cole-PW

Mechanism of action of piga pig liver transglutaminase : purification and properties of th enzyme; identification of a functional cysteine essential for activity.

J-Biol-Chem. 1966; 241: 5518-25

Folk-JE; Finlayson-JS

The  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine cross-link and the catalytic role of transglutaminases.

Adv-Protein-Chem. 1977; 31: 1-133

Folk JE.

Transglutaminases.

Annu Rev Biochem 49:517, 1980.

Forman-BM ; Umesono-K ; Chen-J ; Evans-RM

Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors.

Cell ; 1995 ; 81 : 541-50

Fraij-BM; Birckbichler-PJ; Patterson-MK Jr; Lee-KN; Gonzales-RA

A retinoic acid-inducible mRNA from human erythroleukemia cells encodes a novel tissue transglutaminase homologue [published erratum appears in J Biol Chem 1993 Apr 25;268(12):9156]

J-Biol-Chem. 1992 Nov 5; 267(31): 22616-23

Fraij-BM; Gonzales-RA

A third human tissue transglutaminase homologue as a result of alternative gene transcripts.

Biochim-Biophys-Acta. 1996 Apr 10; 1306(1): 63-74

Fukuda-K; Kojiro-M; Chiu-JF

Induction of apoptosis by transforming growth factor-beta 1 in the rat hepatoma cell line McA-RH7777: a possible association with tissue transglutaminase expression.

Hepatology. 1993 Oct; 18(4): 945-53

Fukuda-K; Kojiro-M; Chiu-JF

Differential regulation of tissue transglutaminase in rat hepatoma cell lines McA-RH7777 and McA-RH8994: relation to growth rate and cell death.

J-Cell-Biochem. 1994 Jan; 54(1): 67-77

Gentile-V; Saydak-M; Chiocca-EA; Akande-O; Birckbichler-PJ; Lee-KN; Stein-JP; Davies-PJ

Isolation and characterization of cDNA clones to mouse macrophage and human endothelial cell tissue transglutaminases.

J-Biol-Chem. 1991 Jan 5; 266(1): 478-83

Gentile-V; Thomazy-V; Piacentini-M; Fesus-L; Davies-PJ

Expression of tissue transglutaminase in Balb-C 3T3 fibroblasts: effects on cellular morphology and adhesion.

J-Cell-Biol. 1992 Oct; 119(2): 463-74

Gentile-V; Davies-PJ; Baldini-A

The human tissue transglutaminase gene maps on chromosome 20q12 by in situ fluorescence hybridization.

Genomics. 1994 Mar 15; 20(2): 295-7

Gentile-V; Grant-FJ; Porta-R; Baldini-A

Localization of the human prostate transglutaminase (type IV) gene (TGM4) to chromosome 3p21.33-p22 by fluorescence in situ hybridization.

Genomics. 1995 May 1; 27(1): 219-20

George-MD; Vollberg-TM; Floyd-EE; Stein-JP; Jetten-AM

Regulation of transglutaminase type II by transforming growth factor-beta 1 in normal and transformed human epidermal keratinocytes.

J-Biol-Chem. 1990 Jul 5; 265(19): 11098-104

Giguere-V; Ong-E; Segui-P; Evans-RM

Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid.

Nature 1987; 330: 624-29

Glass-CK ; Rose-DW ; Rosenfeld-MG

Nuclear receptor coactivators.

Current Opinion in Cell Biology. 1997 ; 9 : 222-232

Gollnick-HP

Oral retinoids-efficacy and toxicity in psoriasis.

Br-J-Dermatol. 1996 Oct ; 135 suppl 49() : 6-17

Golstein-P

Controlling cell death.

Science 1997 Feb 21 ;275(5303) : 1081-2

Gorman-JJ ; Folk-JE

Structural features of glutamine substrates for transglutaminases. Specificities of human plasma factor XIIIa and the guinea pig liver enzyme toward synthetic peptides.

J-Biol-Chem. 1981 Mar 25 ; 256(6) : 2712-5

Goossens JF; Manechez D; Pommery N; Formstecher P; Hénichart JP

VIP potentiates retinoic-acid effect on tissue transglutaminase activity in human neuroblastoma, the SK-N-SH cells.

Neuropeptides, 24(2):99-103 1993 Feb

Grant-FJ; Taylor-DA; Sheppard-PO; Mathewes-SL; Lint-W; Vanaja-E; Bishop-PD; O'Hara-PJ

Molecular cloning and characterization of a novel transglutaminase cDNA from a human prostate cDNA library.

Biochem-Biophys-Res-Commun. 1994 Sep 15; 203(2): 1117-23

Greenberg-CS; Achyuthan-KE; Borowitz-MJ; Shuman-MA

The transglutaminase in vascular cells and tissues could provide an alternate pathway for fibrin stabilization.

Blood. 1987 Sep; 70(3): 702-9

Greenberg-CS; Birckbichler-PJ; Rice-RH

Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues.

FASEB-J. 1991 Dec; 5(15): 3071-7

Groenen-PJ; Bloemendal-H; de-Jong-WW

The carboxy-terminal lysine of alpha B-crystallin is an amine-donor substrate for tissue transglutaminase.

Eur-J-Biochem. 1992 Apr 15; 205(2): 671-4

Groenen PJ; Grootjans JJ; Lubsen NH; Bloemendal H; de Jong WW

Lys-17 is the amine-donor substrate site for transglutaminase in beta A3-crystallin.

J Biol Chem, 269(2):831-3 1994 Jan 14

Gronemeyer-H; Laudet-V

Transcription factors 3 : nuclear receptors.

Protein Profile 1996; 2

Grudmann-U; Amann-E; Zettlmeissl-G; Kupper-HA

Characterization of cDNA coding for human factor XIIIa.

Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1986 ; 83(): 8024-8

Gudas-L

Retinoids and vertebrate development.

J-Biol-Chem. 1994 Jun 3; 269(22): 15399-402

- Hand D; Elliott BM; Griffin M  
Correlation of changes in transglutaminase activity and polyamine content of neoplastic tissue during the metastatic process [published erratum appears in *Biochim Biophys Acta* 1987 Dec 10;931(3):385]  
*Biochim Biophys Acta*, 930(3):432-7 1987 Oct 1
- Hudson M; Wakefield AJ; Hutton RA; Sankey EA; Dhillon AP; More L; Sim R; Pounder RE  
Factor XIIIa subunit and Crohn's disease.  
*Gut*, 34(1):75-9 1993 Jan
- Hegyí-G; Michel-H; Shabanowitz-J; Hunt-DF; Chatterjee-N; Healy-Louie-G; Elzinga-M  
Gln-41 is intermolecularly cross-linked to Lys-113 in F-actin by N-(4-azidobenzoyl)-putrescine.  
*Protein-Sci.* 1992 Jan; 1(1): 132-44
- Hettasch-JM; Greenberg-CS  
Analysis of the catalytic activity of human factor XIIIa by site-directed mutagenesis.  
*J-Biol-Chem.* 1994 Nov 11; 269(45): 28309-13
- Hettasch-JM; Bandarenko-N; Burchette-JL; Lai-TS; Marks-JR; Haroon-ZA; Peters-K; Dewhirst-MW; Iglehart-JD; Greenberg-CS  
Tissue transglutaminase expression in human breast cancer.  
*Lab-Invest.* 1996 Nov, 15(5): 637-45
- Heyman-RA ; Mangelsdorf-DJ ; Dyck-JA ; Stein-RB ; Eichele-G ; Evans-RM ; Thaller-C  
9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor.  
*Cell.* 1992 ; 68 : 397-406
- Hidasi-V; Muszbek-L  
Transglutaminase activity in normal human lenses and in senile cataracts.  
*Ann-Clin-Lab-Sci.* 1995 May-Jun; 25(3): 236-40
- Hohenadl-C; Mann-K; Mayer-U; Timpl-R; Paulsson-M; Aeschlimann-D  
Two adjacent N-terminal glutamines of BM-40 (osteonectin, SPARC) act as amine acceptor sites in transglutaminase-catalyzed modification.  
*J-Biol-Chem.* 1995 Oct 6; 270(40): 23415-20
- Ho-GJ; Gregory-EJ; Smirnova-IV; Zoubine-MN; Festoff-BW  
Cross-linking of beta-amyloid protein precursor catalyzed by tissue transglutaminase.  
*FEBS-Lett.* 1994 Jul 25; 349(1): 151-4
- Hsu-A ; Rishi-AK ; LI-XS ; Gerald-TM ; Dawson-MI ; Schiffer-C ; Reichert-U ; Shroot-B ; Poirier-GC ; Fontana-JA  
Retinoid induced apoptosis in leukemia cells through a retinoic acid nuclear receptor-independent pathway  
*Blood.* 1997 ; 12 : 4470-4479
- Hwang-KC; Gray-CD; Sivasubramanian-N; Im-MJ  
Interaction site of GTP binding Gh (transglutaminase II) with phospholipase C.  
*J-Biol-Chem.* 1995 Nov 10; 270(45): 27058-62
- Ichinose-A; Hendrickson-LE; Fujikawa-K; Davie-EW  
Amino acid sequence of the  $\alpha$ -subunit of human factor XIII.  
*Biochemistry.* 1986 Nov 4; 25(22): 6900-6
- Ichinose-A; Davie-EW  
Characterization of the gene for the  $\alpha$  subunit of human factor XIII (plasma transglutaminase), a blood coagulation factor.  
*Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 1988 Aug; 85(16): 5829-33

- Ientile-R; Merendino-RA; Fabiano-C; Di-Giorgio-RM; Macaione-S  
Polyamines are involved in retinoic acid-mediated induction of tissue transglutaminase in human peripheral blood monocytes.  
Res-Commun-Chem-Pathol-Pharmacol. 1992 Sep; 77(3): 313-26
- Ikura-K; Nasu-T; Yokota-H; Tsuchiya-Y; Sasaki-R; Chiba-H  
Amino acid sequence of guinea pig liver transglutaminase from its cDNA sequence.  
Biochemistry. 1988 Apr 19; 27: 2898-905
- Ikura-K; Yokota-H; Sasaki-R; Chiba-H  
Determination of amino- and carboxyl-terminal sequences of guinea pig liver transglutaminase: evidence for amino-terminal processing.  
Biochemistry. 1989 Mar 7; 28(5): 2344-8
- Ikura-K; Tsuchiya-Y; Sasaki-R; Chiba-H  
Expression of guinea-pig liver transglutaminase cDNA in Escherichia coli. Amino-terminal N alpha-acetyl group is not essential for catalytic function of transglutaminase.  
Eur-J-Biochem. 1990 Feb 14; 187(3): 705-11
- Ikura K; Takahata K; Sasaki R  
Cross-linking of a synthetic partial-length (1-28) peptide of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein by transglutaminase.  
FEBS Lett, 326(1-3):109-11 1993 Jul 12
- Ikura-K; Shinagawa-R; Suto-N; Sasaki-R  
Increase caused by interleukin-6 in promoter activity of guinea pig liver transglutaminase gene.  
Biosci-Biotechnol-Biochem. 1994 Aug; 58(8): 1540-1
- Ikura-K; Yu-C; Nagao-M; Sasaki-R; Furuyoshi-S; Kawabata-N  
Site-directed mutation in conserved anionic regions of guinea pig liver transglutaminase.  
Arch-Biochem-Biophys. 1995 Apr 20; 318(2): 307-13
- Ishii I; Ui M  
Retinoic acid-induced gene expression of tissue transglutaminase via protein kinase C-dependent pathway in mouse peritoneal macrophages.  
J Biochem (Tokyo), 115(6):1197-202 1994 Jun
- Iwaki T; Miyazono M; Hitosumatsu T; Tateishi J  
An immunohistochemical study of tissue transglutaminase in gliomas with reference to their cell dying processes.  
Am J Pathol, 145(4):776-81 1994 Oct
- Jensen-PH; Lorand-L; Ebbesen-P; Gliemann-J  
Type-2 plasminogen-activator inhibitor is a substrate for trophoblast transglutaminase and factor XIIIa : transglutaminase-catalyzed cross-linking to cellular and extracellular structures.  
Eur-J-Biochem. 1993; 214:141-6
- Jensen-PH; Sorensen-ES; Petersen-TE; Gliemann-J; Rasmussen-LK  
Residues in the synuclein consensus motif of the alpha-synuclein fragment, NAC, participate in transglutaminase-catalysed cross-linking to Alzheimer-disease amyloid beta A4 peptide.  
Biochem-J. 1995 Aug 15; 310 ( Pt 1): 91-4
- Jeong-JM; Murthy-SN; Radek-JT; Lorand-L  
The fibronectin-binding domain of transglutaminase.  
J-Biol-Chem. 1995 Mar 10; 270(10): 5654-8

Jetten AM; Shirley JE

Characterization of transglutaminase activity in rabbit tracheal epithelial cells. Regulation by retinoids.  
J Biol Chem, 261(32):15097-101 1986 Nov 15

Jetten-AM ; Andreson-K ; Deas-MA ; Kagechika-H ; Lotan-R ; Rearick-JL ; Shudo-K

New benzoic acid derivatives with retinoid activity : lack of direct correlation between biological activity and binding to cellular retinoic acid binding protein.  
Cancer Res. 1987 ; 47 : 3523-3527

Jiang-H; Kochhar-DM

Induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoic acid in the limb bud.  
Teratology. 1992 Oct; 46(4): 333-40

Juprelle-Soret-M; Wattiaux-De-Coninck-S; Wattiaux-R

Subcellular localization of transglutaminase. Effect of collagen.  
Biochem-J. 1988 Mar 1; 250(2): 421-7

Kahlem P; Terré C; Green H; Djian P

Peptides containing glutamine repeats as substrates for transglutaminase-catalyzed cross-linking: relevance to diseases of the nervous system [see comments]  
Proc Natl Acad Sci U S A, 93(25):14580-5 1996 Dec 10

Kanaji-T; Ozaki-H; Takao-T; Kawajiri-H; Ide-H; Motoki-M; Shimonishi-Y

Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* sp. strain s-8112.  
J-Biol-Chem. 1993 Jun 5; 268(16): 11565-72

Kang-H; Cho-YD

Purification and properties of transglutaminase from soybean (*Glycine max*) leaves.  
Biochem-Biophys-Res-Commun. 1996 Jun 14; 223(2): 288-92

Kannagi-R ; Teshigawara-K ; Noro-N ; Masuda-T

Transglutaminase activity during the differentiation of macrophages.  
Biochem-Biophys-Res-Commun 1982 Mar 15 ; 105(1) : 164-71

Kerr-JFR ; Wyllie -AH ; Curie-AR

Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.  
Br. J. Cancer. 1972 ; 26 : 239-257

Kim-HC; Idler-WW; Kim-IG; Han-JH; Chung-SI; Steinert-PM

The complete amino acid sequence of the human transglutaminase K enzyme deduced from the nucleic acid sequences of cDNA clones.  
J-Biol-Chem. 1991 Jan 5; 266(1): 536-9

Kim-IG; McBride-OW; Wang-M; Kim-SY; Idler-WW; Steinert-PM

Structure and organization of the human transglutaminase 1 gene.  
J-Biol-Chem. 1992 Apr 15; 267(11): 7710-7

Kim-IG; Gorman-JJ; Park-SC; Chung-SI; Steinert-PM

The deduced sequence of the novel protransglutaminase E (TGase3) of human and mouse.  
J-Biol-Chem. 1993 Jun 15; 268(17): 12682-90

Kimura-S; Aoki-N

Cross-linking site in fibrinogen for alpha 2-plasmin inhibitor.  
J-Biol-Chem. 1986 Nov 25; 261(33): 15591-5

Kinsella-MG; Wight-TN

Formation of high molecular weight dermatan sulfate proteoglycan in bovine aortic endothelial cell cultures. Evidence for transglutaminase-catalyzed cross-linking to fibronectin. *J-Biol-Chem.* 1990 Oct 15; 265(29): 17891-8

Kitahara-A; Mikawa-H; Ohtsuki-H; Yamagata-Y; Murachi-T; Kannagi-R

Specific localization of tissue-type transglutaminase in adrenocorticotropin-producing cells of the human pituitary gland as demonstrated by immunohistochemistry. *J-Clin-Endocrinol-Metab.* 1987 Nov; 65(5): 885-90

Klein-B ; Bataille-R

Interleukine 6 et myelome multiple chez l'homme ; *Medecine/Sciences* 1991 ;7 : 937-43

Klein-JD; Guzman-E; Kuehn-GD

Purification and partial characterization of transglutaminase from *Physarum polycephalum*. *J-Bacteriol.* 1992 Apr; 174(8): 2599-605

Kleman-JP; Aeschlimann-D; Paulsson-M; van-der-Rest-M

Transglutaminase-catalyzed cross-linking of fibrils of collagen V/XI in A204 rhabdomyosarcoma cells. *Biochemistry.* 1995 Oct 24; 34(42): 13768-75

Kliwer-SA ; Umehono-K ; Noonan-DJ ; Heymann-RA ; Evans-RM

Convergence of 9 cis retinoic acid and peroxisome proliferator signaling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature.* 1993 ; 358 : 771-774

Kluck-RM ; Bossy-Wetzel-E ; Green-DR ; Newmeyer-DD

The release of cytochrome c from mitochondria : a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997 Feb 21 ; 275(5303) : 1132-6

Knight-CR; Rees-RC; Elliott-BM; Griffin-M

The existence of an inactive form of transglutaminase within metastasising tumours. *Biochim-Biophys-Acta.* 1990 Jun 12; 1053(1): 13-20

Knight-CR; Rees-RC; Griffin-M

Reduction in transglutaminase activity associated with tumour metastasis is due to the presence of an inactive form of the enzyme. *Biochem-Soc-Trans.* 1990 Aug; 18(4): 681-2

Knight-CR; Rees-RC; Griffin-M

Apoptosis: a potential role for cytosolic transglutaminase and its importance in tumour progression. *Biochim-Biophys-Acta.* 1991 Jun 5; 1096(4): 312-8

Knight-RL; Hand-D; Piacentini-M; Griffin-M

Characterization of the transglutaminase-mediated large molecular weight polymer from rat liver; its relationship to apoptosis. *Eur-J-Cell-Biol.* 1993 Feb; 60(1): 210-6

Kojima-S; Nara-K; Rifkin-DB

Requirement for transglutaminase in the activation of latent transforming growth factor- $\beta$  in bovine endothelial cells. *J-Cell-Biol.* 1993; 121: 439-48

Korsgren-C; Lawler-J; Lambert-S; Speicher-D; Cohen-CM

Complete amino acid sequence and homologies of human erythrocyte membrane protein band 4.2. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 1990 Jan; 87(2): 613-7

Korsgren-C; Cohen-CM

Organization of the gene for human erythrocyte membrane protein 4.2: structural similarities with the gene for the  $\alpha$  subunit of factor XIII.

Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1991 Jun 1; 88(11): 4840-4

Korsgren C; Cohen CM

cDNA sequence, gene sequence, and properties of murine pallidin (band 4.2), the protein implicated in the murine pallid mutation.

Genomics, 21(3):478-85 1994 Jun

Kosa-K; Meyers-K; De-Luca-LM

Transformation of NIH3T3 cells with ras oncogenes abrogates the retinoic acid induction of tissue transglutaminase.

Biochem-Biophys-Res-Commun. 1993 Nov 15; 196(3): 1025-33

Krezel-W; Dupe-V; Mark-M; Dierich-A, Kastner-P; Chambon-P

RXR $\gamma$  null mice are apparently normal and compound RXR $\alpha$ <sup>-/-</sup> / RXR $\beta$ <sup>-/-</sup> / RXR $\gamma$ <sup>-/-</sup> mutant mice are viable.

Proc-Natl- Acad-Sci. 1996 Aug; 93: 9010-14

Kroemer-G ; Petit-P ; Zamzami-N ; Vayssiere-JL ; Mignotte-B

The biochemistry of programmed cell death.

FASEB-J. 1995 Oct ; 9(13) : 1277-87

Kroemer-G ; Zamzami-N ; Susin-SA

mitochondrial control of apoptosis.

Immunol-Today. 1997 Jan ; 18(1) : 44-51

Kroemer-G

The proto-oncogene Bcl-2 and its rôle in regulating apoptosis

Nature medicine. 1997 jun ; 6 : 614-620

Kurokawa-R; DiRenzo-J; Boehm-M; Sugarman-J; Gloss-B; Rosenfeld-MG; Heyman-RA; Glass-CK

Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding.

Nature 1994; 371; 528-31

Kurokawa-R; Soderstrom-M ; Horlein-A ; Halachmi-S ; Brown-M ; Rosenfeld-MG; Glass-CK

Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determines by a co-repressor.

Nature 1995 Oct 5 ; 377(6548) : 451-4

Lafyatis-R ; Kim-SJ ; Angel-P ; Roberts-AB ; Sporn-Mb ; Karin-M ; Wilder-RL

Interleukin-1 stimulates and all-trans-retinoic acid inhibits collagenase gene expression through its 5' activator protein-1-binding site.

Mol-Endocrinol. 1990 Jul ; 4(7) : 973-80

Lampron-C; Rochette-Egly-C; Gorry-P; Dolle-P; Mark-M; Lufkin-T; LeMeur-M; Chambon-P

Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABP II) or in both CRABPI and CRABP II are essentially normal.

Development 1995; 121: 539-48

Laudet-V ; Hanni-C ; Coll-J ; Cattzeflis-F ; Stehelin-D

Evolution of the nuclear receptor gene superfamily

EMBE-J. 1992 ; 11 : 1003-13

Lavrijsen AP; Maruyama T

Absent transglutaminase TGK expression in two of three patients with lamellar ichthyosis Íletterí

Arch Dermatol, 131(3):363-4 1995 Mar

- Lee-KN; Birckbichler-PJ; Patterson-MK Jr  
GTP hydrolysis by guinea pig liver transglutaminase.  
Biochem-Biophys-Res-Commun. 1989 Aug 15; 162(3): 1370-5
- Lee SC; Ikai K; Ando Y; Imamura S  
Effects of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on the transglutaminase activity of transformed mouse epidermal cells in culture.  
J Dermatol, 16(1):7-11 1989 Feb
- Lee-KN; Arnold-SA; Birckbichler-PJ; Patterson-MK Jr; Fraij-BM; Takeuchi-Y; Carter-HA  
Site-directed mutagenesis of human tissue transglutaminase: Cys-277 is essential for transglutaminase activity but not for GTPase activity.  
Biochim-Biophys-Acta. 1993 Sep 3; 1202(1): 1-6
- Lefebvre-B ; Rachez-C ; Formstecher-P ; Lefebvre-P  
Structural determinants of the ligand-binding site of the human retinoic acid receptor  $\alpha$ .  
Biochem. 1995 ; 34 : 5477-5485
- Leid-M ; Kastner-P ; Chambon-P  
Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways.  
Trends-Biochem-Sci. 1992 ; 17 : 427-33
- Lehmann-JM ; Jong-L ; Fanjul-A ; Cameron-JF ; Lu-XP ; Haefner-P ; Dawson-MI ; Pfahl-M  
Retinoid selective for the retinoid X receptor response pathways.  
Science. 1993 ; 258 : 1944-1946
- LeMosy-EK; Erickson-HP; Beyer-WF Jr; Radek-JT; Jeong-JM; Murthy-SN; Lorand-L  
Visualization of purified fibronectin-transglutaminase complexes.  
J-Biol-Chem. 1992 Apr 15; 267(11): 7880-5
- Leu-Rw ; herriott-MJ ; Moore-PE ; Orr-GR ; Birckbichler-PJ  
Enhanced transglutaminase activity associated with macrophage activation. Possible role in Fc-mediated phagocytosis.  
Exp-Cell-Res. 1982 Sep ; 141(1) : 191-9
- Levin-M ; Sturzenbecker-LJ ; Kastner-S ; Bosakowski-T ; Huselton-C ; Allenby-G ; Speck-J ; Kratzeisen-C ; Rosenberger-M ; Lovey-A ; Grippo-JF  
9-cis retinoic acid stereoisomer binds and transacts the nuclear receptor RXRalpha.  
Nature. 1992 ; 355 : 259-361
- Levitzki-A ; Willingham-M ; Pastan-I  
Evidence for participation of transglutaminase in receptor-mediated endocytosis.  
Proc-Natl.Acad.Sci.USA 1980 May; 77(5): 2706-10
- Li XS; Rishi AK; Shao ZM; Dawson MI; Jong L; Shroot B; Reichert U; Ordonez J; Fontana JA  
Posttranscriptional regulation of p21WAF1/CIP1 expression in human breast carcinoma cells.  
Cancer Res, 56(21):5055-62 1996 Nov 1
- Liang P; Pardee AB  
Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [see comments]  
Science, 257(5072):967-71 1992 Aug 14
- Lichti-U ; Ben-T ; Yuspa-SH  
Retinoic acid-induced transglutaminase in mouse epidermal cells is distinct from epidermal transglutaminase.  
J-Biol-Chem. 1985 Feb 10 ; 77(5) , 1422-6

- Lichti-U; Yuspa-SH  
Modulation of tissue and epidermal transglutaminases in mouse epidermal cells after treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and/or retinoic acid in vivo and in culture.  
Cancer-Res. 1988 Jan 1; 48(1): 74-81
- Lockshin-RA ; Williams-CM  
Programmed cell death. II endocrine potentiation of breakdown of the intersegmental muscles of silkworms.  
J. Insect. Physiol. 1964 ; 10 : 643-649
- Lockshin-RA  
programmed cell death : activation of lysis by a mechanism involving the synthesis of protein.  
J.Physiol. 1969 ; 15 : 1505-1516
- Lorand-L; Dailey-JE; Turner-PM  
Fibronectin as a carrier for the transglutaminase from human erythrocytes.  
Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1988 Feb; 85(4): 1057-9
- Lotan-R  
Suppression of squamous cell carcinoma growth and differentiation by retinoids.  
Cancer research suppl. 1994 Apr 1; 54: 1987s-90s
- Lotan-R  
Retinoids in cancer chemoprevention.  
FASEB-J. 1996 Jul; 10: 1031-39
- Lu-S; Saydak-M; Gentile-V; Stein-JP; Davies-PJ  
Isolation and characterization of the human tissue transglutaminase gene promoter.  
J-Biol-Chem. 1995 Apr 28; 270(17): 9748-56
- Lu-S; Davies-PJ  
Regulation of the expression of the tissue transglutaminase gene by DNA methylation.  
Proc-Natl.Acad.Sci.USA 1997 Apr; 94: 4692-97
- Lu-XP ; Fangul-A ; Picard-N ; Pfahl-M ; Rungta-D ; Nared-Hood-K ; Carter-B ; Piedrafita-J ; Tang-S ; Ffbrizio-E ; Pfajl-M  
Novel retinoid-related molecules as apoptosis inducers and effective inhibitors of human lung cancer cells in vivo.  
Nature Medicine. 1997 ; 6 : 686-690
- Luo-JM ; Pascer-P ; Conlon-RA ; Rossant-J ; Giguere-V  
Mice lacking all isoforms of retinoic acid receptor beta develop normally and are susceptible to the teratogenic effects of retinoic acid.  
Mech-Devel. 1995 ; 53 : 61-71
- Maddox-AM; Haddox-MK  
Characteristics of cyclic AMP enhancement of retinoic acid induction of increased transglutaminase activity in HL60 cells.  
Exp-Cell-Biol. 1988; 56(1-2): 49-59
- Mahoney-SA; Perry-M; Seddon-A; Bohlen-P; Haynes-L  
Transglutaminase forms midkine homodimers in cerebellar neurons and modulates the neurite-outgrowth response.  
Biochem-Biophys-Res-Commun. 1996 Jul 5; 224(1): 147-52

- Manechez-D ; tbarka-N ; Danze-PM ; Onraed-B ; Formetrcher-P ; Dautrevaux-M  
Régulation négative par la dexaméthasone de l'expression de la transglutaminase de tissu dans les cellules de leucémie à promyélocytes HL-60.  
Journées franco-belge de pharmacochimie, Liile, 1991.
- Mangelsdorf-DJ; Ong-ES ; Dyck-JA ; Evans-RM  
Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway.  
Nature. 1990 ; 345 : 224-229
- Mangelsdorf-DJ; Umesono-K; Kliewer-SA; Borgmeyer-U; Ong-ES; Evans-RM  
A direct repeat in the cellular retinol binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR.  
Cell- 1991; 66:555-61
- Mangelsdorf-DJ; Borgmeyer-U; Heyman-RA ; Zhou-JY ; Ong-ES ; Oro-AE ; Kakizuka-A; Evans-RM  
Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid.  
Genes-Develop. 1992 ; 6 : 329-44
- Mangelsdorf-DJ; Umesono-K; Evans-RM  
The retinoid receptors.  
Biol-Chem-Med. 1994; 319-49
- Margosiak-SA ; Dharma-A ; Bruce-Carver-MR ; Gonzales-AP ; Louie-D ; Kuehn-GD  
Identification of the large subunit of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase as a substrate for transglutaminase in Medicago sativa L.  
Plant. Physiol ; 1990 ; 92 : 88-96
- Mariniello-L; Esposito-C; Di-Pierro-P; Cozzolino-A; Pucci-P; Porta-R  
Human-immunodeficiency-virus transmembrane glycoprotein gp41 is an amino acceptor and donor substrate for transglutaminase in vitro.  
Eur-J-Biochem. 1993 Jul 1; 215(1): 99-104
- Mariniello-L; Esposito-C; Gentile-V; Porta-R  
Transglutaminase covalently incorporates amines into human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 in vitro.  
Int-J-Pept-Protein-Res. 1993 Aug; 42(2): 204-6
- Martin-B ; Bradley-JG ; Cotter-TG  
HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis.  
Clin-exp-Immunol. 1990 ; 79 : 448-53
- Martin-B ; Bernardon-JM ; Cavey-MT ; Bernard-B ; Carlavan-I ; Charpentier-B ; Pilgrim-WR ; Shroot-B ; Reichert-U  
Selective synthetic ligands for human nuclear retinoic acid receptor.  
Skin-Pharmacol. 1992 ; 5(1) : 57-65
- Martin-SJ; Green-DR  
Protease activation during apoptosis : death by a thousand cuts?  
Cell. 1995 Aug 11; 82(3): 349-352
- Martinez-J; Rich-E; Barsigian-C  
Transglutaminase-mediated cross-linking of fibrinogen by human umbilical vein endothelial cells.  
J-Biol-Chem. 1989 Dec 5; 264(34): 20502-8
- Martinez-J; Chalupowicz-DG; Roush-RK; Sheth-A; Barsigian-C  
Transglutaminase-mediated processing of fibronectin by endothelial cell monolayers.  
Biochemistry. 1994 Mar 8; 33(9): 2538-45

Marins-LM ; Earnshaw-WC

Apoptosis : alive and kicking in 1997.

Trends in cell Biology. 1997 ; 7 : 111-114

McCormack-SA; Viar-MJ; Tague-L; Johnson-LR

Altered distribution of the nuclear receptor RAR beta accompanies proliferation and differentiation changes caused by retinoic acid in Caco-2 cells.

In-Vitro-Cell-Dev-Biol-Anim. 1996 Jan; 32(1): 53-61

Mehta-K; Lopez-Berestein-G

Expression of tissue transglutaminase in cultured monocytic leukemia (THP-1) cells during differentiation.

Cancer-Res 1986 Mar; 46(3): 1388-94

Mehta-K; Rao-UR; Vickery-AC; Fesus-L

Identification of a novel transglutaminase from the filarial parasite *Brugia malayi* and its role in growth and development.

Mol-Biochem-Parasitol. 1992 Jul; 53(1-2): 1-15

Mehta-K; McQueen-T; Neamati-N; Collins-S; Andreeff-M

Activation of retinoid receptors RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$  induces differentiation and apoptosis, respectively, in HL-60 cells.

Cell-Gro-Diff. 1996 Feb; 7: 179-86

Mehul-B; Bawumia-S; Hughes-RC

Cross-linking of galectin 3, a galactose-binding protein of mammalian cells, by tissue-type transglutaminase.

FEBS-Lett. 1995 Feb 27; 360(2): 160-4

Melino-G; Farrace-MG; Ceru-MP; Piacentini-M

Correlation between transglutaminase activity and polyamine levels in human neuroblastoma cells. Effect of retinoic acid and alpha-difluoromethylornithine.

EXP-CELL-RES. 1988 Dec; 179(2): 429-45

Melino-G; Annicchiarico-Petruzzelli-M; Piredda-L; Candi-E; Gentile-V; Davies-PJ; Piacentini-M

Tissue transglutaminase and apoptosis: sense and antisense transfection studies with human neuroblastoma cells.

Mol-Cell-Biol. 1994 Oct; 14(10): 6584-96

Metafora S; Peluso G; Ravagnan G; Marchese M; Di Pietro M; Mancini A; Panza N; Fusco A; Porta R

Transglutaminase in cell proliferation and transformation.

Med Oncol Tumor Pharmacother, 5(4):223-31 1988

Milhaud-PG ; Davies-PJ ; Pastan-I ; Gottesman-MM

Regulation of transglutaminase activity in Chinese hamster ovary cells.

Biochim-biophys-Acta ; 1980 Jul 15 ; 630(4) : 476-84

Miller-ML; Johnson-GV

Transglutaminase cross-linking of the tau protein.

J-Neurochem. 1995 Oct; 65(4): 1760-70

Minucci-S; Ozato-K

Retinoid receptors in transcriptional regulation.

Curr-Opi-Gen-Dev 1996; 6:567-74

Minucci-S; Leid-M; Toyama-R; Saint-Jeannet-JP; Peterson-V; Horn-V; Ishmael-J, Bhattacharyya-N; Dey-A; Dawid-I; Ozato-K

Retinoid X Receptor (RXR) within the RXR-Retinoic acid receptor heterodimer binds its ligand and enhances Retinoid-dependent gene expression.

Mol-Cell-Biol. 1997 Feb; 17(2): 644-55

Mitkevich-OV; Sobel-JH; Shainoff-JR; Vlasik-TN; Kalantarov-GF; Trakht-IN; Streltsova-ZA; Samokhin-GP  
Monoclonal antibody directed to a fibrinogen A alpha #529-539 epitope inhibits alpha-chain crosslinking by  
transglutaminases.

Blood-Coagul-Fibrinolysis. 1996 Jan; 7(1): 85-92

Moore-WTJ; Murtaugh-MP; Davies-PJ

Retinoic acid-induced expression of tissue transglutaminase in mouse peritoneal macrophages.

J-Biol-Chem. 1984; 259(20): 12794-802

Muesch-A; Hartmann-E; Rohde-K; Rubartelli-A; Sitia-R; Rapoport-TA

A novel pathway for secretory proteins?

TIBS 1990;15: 86-8

Mulders-JW; Hoekman-WA; Bloemendal-H; de-Jong-WW

Beta B1 crystallin is an amine-donor substrate for tissue transglutaminase.

Exp-Cell-Res. 1987 Aug; 171(2): 296-305

Murtaugh-M; Mehta-K ; Johnson-J ; Myers-M ; Juliano-RL ; Davies-PJ

Induction of tissue transglutaminase in mouse peritoneal macrophages.

J-Biol-Chem. 1983 Sep 25; 258(18): 11074-81

Murtaugh-M; Arend-W; Davies-PJ

Induction of tissue transglutaminase in human peripheral blood monocytes.

J-Exp-Med. 1984 Jan; 159: 114-25

Murtaugh-M; Moore-WT; Davies-PJ

Cyclic AMP potentiates the retinoic acid-induced expression of tissue transglutaminase in peritoneal  
macrophages.

J-Biol-Chem. 1986 Jan 15; 261(2): 614-21

Murtaugh-M; dennison-O ; Stein-JP ; Davies-PJ

Retinoic acid-induced gene expression in normal and leukemic myeloid cells.

J-Exp-Med. 1986 May 1 ; 163(5) : 1325-30

Murthy-SN; Wilson-J; Guy-SL; Lorand-L

Intramolecular crosslinking of monomeric fibrinogen by tissue transglutaminase.

Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1991 Dec 1; 88(23): 10601-4

Nagpal-S; Athanika-J; Chandraratna

Separation of transactivation and AP1 antagonism functions of retinoic acid receptor  $\alpha$ .

J-Biol-Chem. 1995; 270(): 923-27

Nagy L, Thomazy V; Davies PJA.

Transglutaminase : effector molecules in physiologic cell death.

Cancer Bull. 1994 ; 46 : 136-140

Nagy L, Thomazy VA, Shipley GL, Fesus L, Lamph W, Heyman RA, Chandraratna RAS, Davies PJA.

Activation of Retinoid X Receptor induce Apoptosis in HL-60 cell lines.

Mol Cell Biol 15:3540, 1995.

Nagy-L; Saydak-M; Shipley-N; Lu-S; Basilion-JP; Yan-ZH; Syka-P; Chandraratna-RA; Stein-JP; Heyman-RA;  
Davies-PJ

Identification and characterization of a versatile retinoid response element (retinoic acid receptor response  
element-retinoid X receptor response element) in the mouse tissue transglutaminase gene promoter.

J-Biol-Chem. 1996 Feb 23; 271(8): 4355-65

- Nagy-L; Thomazy-VA; Chandraratna-RA; Heyman-RA; Davies-PJ  
Retinoid-regulated expression of BCL-2 and tissue transglutaminase during the differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia (HL-60) cells.  
Leuk-Res. 1996 Jun; 20(6): 499-505
- Najfeld V; Ballard SG; Menninger J; Ward DC; Bouhassira EE; Schwartz RS; Nagel RL; Rybicki AC  
The gene for human erythrocyte protein 4.2 maps to chromosome 15q15.  
Am J Hum Genet, 50(1):71-5 1992 Jan
- Nakanishi-K; Nara-K; Hagiwara-H; Aoyama-Y; Hirose-S  
Cloning and sequence analysis of cDNA clones for bovine aortic-endothelial-cell transglutaminase.  
Eur-J-Biochem. 1991; 202(): 15-21
- Nakaoka-H; Perez-DM; Baek-KJ; Das-T; Husain-A; Misono-K; Im-MJ; Graham-RM  
Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function.  
Science. 1994 Jun 10; 264(5165): 1593-6
- Napoli-JL  
Regulation of the biosynthesis and catabolism of retinoids.  
FASEB-J 1996; 10: 993-1001
- Nara-K; Nakanishi-K; Hagiwara-H; Wakita-KI; Kojima-S; Hirose-S  
Retinol-induced morphological changes of cultured bovine endothelial cells are accompanied by a marked increase in transglutaminase.  
J-Biol-Chem. 1989; 264(): 19308-12
- Cell cycle-dependent changes in tissue transglutaminase mRNA levels in bovine endothelial cells.  
Nara-K; Aoyama-Y; Iwata-T; Hagiwara-H; Hirose-S  
Biochem-Biophys-Res-Commun. 1992 Aug 31; 187(1): 14-7
- Nicholson-RC ; Mader-S ; Nagpal-S ; Leid-M ; Rochette-Egly-C ; Chambon-P  
Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoid acid is mediated by an AP1 binding site.  
EMBO-J. 1990 Dec; 9(13): 4443-54
- Nicotera-P ; Leist-M  
Energy supply and the shape of death in neurons and lymphoid cells.  
Cell Death Diff. 1997 ; 4 : 435-442
- Novogrodsky-A ; Quittner-S ; Rubin-AL ; Stenzel-KH  
Transglutaminase activity in human lymphocytes : early activation by phytoestrogens.  
Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1978 Mar; 75(3) : 1157-61
- Numes-I ; Gleizes-PE ; Metz-CN ; Rifkin-DB  
Latent transforming growth factor-beta binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor-beta.  
J-Cell-Biol. 1997 Mar 10 ; 136(5) : 1151-63
- Oridate-N ; Higuchi-M ; Suzuki-S ; Shroot-B ; Hong-WK ; Lotan-R  
Rapid induction of apoptosis in human C33A cervical carcinoma cells by the synthetic retinoid 6-[3-(1-adamantyl)hydroxyphenyl]-2 naphthalene carboxylic acid (CD437).  
Int. J. Cancer. 1997 ; 70 : 484-487
- Parameswaran-K; Cheng-XF; Chen-E; Velasco-T; Wilson-J; Lorand-L  
Hydrolysis of fibrinogen isopeptides by cytosolic transglutaminases and by coagulation factor XIII<sub>a</sub>.  
J-Biol-Chem. 1997 Apr 11; 272(15): 10311-17

Paye-M ; Lapiere-CM

The lack of attachment of transformed embryonic lung epithelial cells to collagen I is corrected by fibronectin and factor FXIII.

J-Cell-Sci 1986 Dec ; 86() : 95-107

Pemrick SM; Lucas DA; Grippo JF

The retinoid receptors.

Leukemia, 8 Suppl 3():S1-10 1994

Petkovich-M; Brand-NJ; Krust-A; Chambon-P

A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors.

Nature 1987; 330: 444-50

Pfahl-M ; Apfel-R ; Bendik-I ; Fanjul-A ; Graupner-G ; Lee-MO ; Lavista-N ; Lu-XP ; Piedrafita-J ; Ortiz-MA ; Salbert-G ; Zhang-XK

Nuclear retinoid receptors and their mechanism of action.

Vitamins and Hormones. 1994 ; 49 : 327-382

Phillips-MA; Stewart-BE; Qin-Q; Chakravarty-R; Floyd-EE; Jetten-AM; Rice-RH

Primary structure of keratinocyte transglutaminase.

Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1990 Dec; 87(23): 9333-7

Phillips-MA; Stewart-BE; Rice-RH

Genomic structure of keratinocyte transglutaminase. Recruitment of new exon for modified function.

J-Biol-Chem. 1992 Feb 5; 267(4): 2282-6

Piacentini-M; Fesus-L; Sartori-C; Ceru-MP

Retinoic acid-induced modulation of rat liver transglutaminase and total polyamines *in vivo*.

Biochem-J. 1988 Feb 18; 253: 33-38

Piacentini-M; Autuori-F; Dini-L; Farrace-MG; Ghibelli-L; Piredda-L; Fesus-L

"Tissue" transglutaminase is specifically expressed in neonatal rat liver cells undergoing apoptosis upon epidermal growth factor-stimulation.

Cell-Tissue-Res. 1991 Feb; 263(2): 227-35

Piacentini-M; Fesus-L; Farrace-MG; Ghibelli-L; Piredda-L; Melino-G

The expression of "tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis).

Eur-J-Cell-Biol. 1991 Apr; 54(2): 246-54

Piacentini-M; Ceru-MP; Dini-L; Di-Rao-M; Piredda-L; Thomazy-V; Davies-PJ; Fesus-L

In vivo and in vitro induction of 'tissue' transglutaminase in rat hepatocytes by retinoic acid.

Biochim-Biophys-Acta. 1992 Jun 10; 1135(2): 171-9

Piacentini-M; Annicchiarico-Petruzzelli-M; Oliverio-S; Piredda-L; Biedler-JL; Melino-E

Phenotype-specific "tissue" transglutaminase regulation in human neuroblastoma cells in response to retinoic acid: correlation with cell death by apoptosis.

Int-J-Cancer. 1992 Sep 9; 52(2): 271-8

Piacentini-M; Fesus-L; Melino-G

Multiple cell cycle access to the apoptotic death programme in human neuroblastoma cells.

FEBS-Lett. 1993 Apr 5; 320(2): 150-4

Piacentini-M; Melino-G

Role of tissue transglutaminase in neuroblastoma cells undergoing apoptosis.

Prog-Clin-Biol-Res. 1994; 385: 123-9

Piacentini M, Davies PJA, Fesus L.

Apoptosis II: Tissue transglutaminase in cells undergoing apoptosis.

in Tomei LD, Cope FO (eds): The Molecular Basis of Apoptosis in Disease, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1994, p 143.

Piacentini-M

Tissue transglutaminase: a candidate effector element of physiological cell death.

Curr-Top-Microbiol-Immunol. 1995; 200: 163-75

Differential growth of N- and S-type human neuroblastoma cells xenografted into scid mice. correlation with apoptosis.

Piacentini M; Piredda L; Starace DT; Annicchiarico-Petruzzelli M; Mattei M; Oliverio S; Farrace MG; Melino G  
J Pathol, 180(4):415-22 1996 Dec

Piredda-L ; Amendola-A ; Colizzi-V ; Davies-PJA ; Farrace-MG ; Maurizio-F ; Gentile-V ; Uray-I ; Piacentini-M ; Fesus-L

Lack of « tissue » transglutaminase protein cross-linking : leads to leakage of macromolecules from dying cells : relationship to development of autoimmunity in MRL *Ipr/Ipr* mice.

Cell Death Diff. 1997 ; 4 : 463-472

Polakowska-RR; Eddy-RL; Shows-TB; Goldsmith-LA

Epidermal type I transglutaminase (TGM1) is assigned to human chromosome 14.

Cytogenet-Cell-Genet. 1991; 56(2): 105-7

Polakowska-R; Herting-E; Goldsmith-LA

Isolation of cDNA for human epidermal type I transglutaminase.

J-Invest-Dermatol. 1991 Feb; 96(2): 285-8

Polakowska-RR; Eickbush-T; Falciano-V; Razvi-F; Goldsmith-LA

Organization and evolution of the human epidermal keratinocyte transglutaminase I gene.

Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1992 May 15; 89(10): 4476-80

Prince-CW; Dickie-D; Krumdieck-CL

Osteopontin, a substrate for transglutaminase and factor XIII activity.

Biochem-Biophys-Res-Commun. 1991 Jun 28; 177(3): 1205-10

Radek-JT; Jeong-JM; Murthy-SN; Ingham-KC; Lorand-L

Affinity of human erythrocyte transglutaminase for a 42-kDa gelatin-binding fragment of human plasma fibronectin.

Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1993 Apr 15; 90(8): 3152-6

Raghunath-M; Hopfner-B; Aeschlimann-D; Luthi-U; Meuli-M; Altermatt-S; Gobet-R; Bruckner-Tuderman-L; Steinmann-B

Cross-linking of the dermo-epidermal junction of skin regenerating from keratinocyte autografts. Anchoring fibrils are a target for tissue transglutaminase.

J-Clin-Invest. 1996 Sep 1; 98(5): 1174-84

Raff-RA

Evolution of developmental decisions and morphogenesis : the view from two camps.

Dev-Suppl. 1992 ;() : 15-22

Rasmussen LK; Sørensen ES; Petersen TE; Gliemann J; Jensen PH

Identification of glutamine and lysine residues in Alzheimer amyloid beta A4 peptide responsible for transglutaminase-catalysed homopolymerization and cross-linking to alpha 2M receptor.

FEBS Lett, 338(2):161-6 1994 Jan 31

Reed-JC

Bcl-2 and the regulation of programmed cell death.  
J-Cell-Biol. 1994 Jan ; 124(1-2) : 1-6

Rice-RH ; Mehrpouyan-M ; Quin-Q ; Phillips-MA ; Lee-YM  
Identification of phosphorylation sites in keratinocyte transglutaminase.  
Biochem-J. 1996 Dec 1 ; 320() : 547-50

Richter-C ; Schweizer-M ; Cassarizza-A ; Franceschi-C  
control of apoptosis by the cellular ATP level.  
FEBS-Lett. 1996 Jan 8; 378(2): 107-10

Riddle-RD ; Johnson-RL ; Laufer-E ; Tabin-C  
sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA.  
Cell. 1993 ; 75 : 1401-1416

Rsinger-M ; Cohen-CM  
Third international conference on transglutaminases and protein cross-linking reactions, june 7-10, 1992, p8,  
Samuel Roberts Noble Fondation, Ardmore, OK

Rorke-EA; Eckert-RL  
Stable expression of transfected human involucrin gene in various cell types: evidence for in situ cross-linking  
by type I and type II transglutaminase.  
J-Invest-Dermatol. 1991 Sep; 97(3): 543-8

Rorke EA; Jacobberger JW  
Transforming growth factor-beta 1 (TGF beta 1) enhances apoptosis in human papillomavirus type 16-  
immortalized human ectocervical epithelial cells.  
Exp Cell Res, 216(1):65-72 1995 Jan

Ross-AC ; Hammerling-UG  
Retinoids and the immune system.  
Retinoids : Biology, chemistry. 1994 ; 444-451

Roy-B; Taneja-R; Chambon-P  
Synergistic activation of retinoic acid (RA)-responsive genes and induction of embryonal carcinoma cell  
differentiation by a RAR receptor a (RAR $\alpha$ )-, RAR $\beta$  or RAR $\gamma$ -selective ligand in combination with a retinoid X  
receptor-specific ligand.  
Mol-Cell-Biol. 1995; 15: 6481-87

Rubin-AL; Rice-RH  
Differential regulation by retinoic acid and calcium of transglutaminases in cultured neoplastic and normal  
human keratinocytes.  
Cancer-Res. 1986 May; 46(5): 2356-61

Rubin-AL; Rice-RH  
Characterization of the calcium sensitivity of differentiation in SCC-13 human squamous carcinoma cells.  
In-Vitro-Cell-Dev-Biol. 1988 Sep; 24(9): 857-61

Ruiz-Herrera-J; Iranzo-M; Elorza-MV; Sentandreu-R; Mormeneo-S  
Involvement of transglutaminase in the formation of covalent cross-links in the cell wall of *Candida albicans*.  
Arch-Microbiol. 1995 Sep; 164(3): 186-93

Sane-DC ; Moser-TL ; Pippen-AM ; Parker-CJ ; Achyuthan-KE ; Greenberg-CS  
Vitronectin is a substrate for transglutaminases.  
Biochem-Biophys-Res-Commun. 1988 Nov 30 ; 157(1) : 115-20

Schadendorf-D ; Worm-M ; Jurgovsky-K ; Dippel-E ; Reichert-U ; Czarnetzki-BM  
Effects of various synthetic retinoids on proliferation and immunophenotype of human melanoma cells in vitro.  
Recent-Results-Cancer-Res. 1995 ; 139() : 183-93

Schadendorf-D ; Kern-MA ; Artuc-M ; Pahl-HL ; Rosenbach-T ; Fichtner-I ; Nurnberg-W ; Stuting-S ; Von-  
Stebut-E ; Worm-M ; Makki-A ; Jurgovsky-K ; Kolde-G ; Henz-BM  
Treatment of melanoma cells with the synthetic retinoid CD437 induces apoptosis via activation of AP-1 in  
vitro, and causes growth inhibition in xenografts in vivo.  
J-Cell-Biol. 1996 Dec ; 135(6 Pt 2) : 1889-98

Shainoff JR; Urbanic DA; DiBello PM  
Immunoelectrophoretic characterizations of the cross-linking of fibrinogen and fibrin by factor XIIIa and tissue  
transglutaminase. Identification of a rapid mode of hybrid alpha-/gamma-chain cross-linking that is promoted by  
the gamma-chain cross-linking.  
J Biol Chem, 266(10):6429-37 1991 Apr 5

Schroff-G ; Neumann-C ; Sorg-C  
Transglutaminase as a marker for subsets of murine macrophages.  
Eur-J-Immunol. 1981 Aug ; 11(8) : 637-42

Schulze-Osthoff-K ; Walczak-H ; Droge-W ; Krammer-PH  
Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis.  
J-Cell-Biol. 1994 Oct ; 127(1) : 15-20

Scott-KF ; Meyskens-FLJr. Russell-DH  
Retinoids increase transglutaminase activity and inhibit ornithine decarboxylase activity in Chinese hamster  
ovary cells and in melanoma cells stimulated to differentiate.  
Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1982 Jul 15; 79(13) : 4093-7

Seiving-B; Ohlsson-K; Linder-C; Stenberg-P  
Transglutaminase differentiation during maturation of human blood monocytes to macrophages.  
Eur-J-Haematol. 1991 May; 46(5): 263-71

Sener-A ; Dunlop-ME ; Gomis-R ; Mathias-PC ; Malaisse-Lagae-F ; Malaisse-WJ  
Role of transglutaminase in insulin release. Study with glycine and sarcosine methylesters.  
Endocrinology 1985 Jul ; 117(1) : 237-42

Sessa-A; Tunici-P; Perilli-E; Perin-A  
Transglutaminase activity in rat liver after acute ethanol administration.  
Biochim-Biophys-Acta. 1995 Dec 14; 1245(3): 371-5

Shao-ZM ; Dawson-MI ; Li-XS ; Rishi-AK ; Sheikh-MS ; Han-QX ; Ordonez-JV ; Shroot-B ; Fontana-JA  
p53 independent G0/G1 arrest and apoptosis induced by a novel retinoid in human breast cancer cells.  
Oncogene 1995 Aug 3 ;11(3) : 493-504

Sidell-N ; Taga-T ; Hirano-T ; Kishimoto-T ; Saxon-A  
Retinoic acid-induced growth inhibition of a human myeloma cell line via down-regulation of IL-6 receptors.  
J-Immunolo. 1991 ; 146 : 3809-14

Signorini-M; Chiozzi-P; Bergamini-CM  
Interaction of erythrocyte transglutaminase with calcium ions.  
Biochem-Int. 1989 Dec; 19(6): 1205-12

Singer-MA; Hortsch-M; Goodman-CS; Bentley-D  
Annulin, a protein expressed at limb segment boundaries in the grasshopper embryo, is homologous to protein  
cross-linking transglutaminases.  
Dev-Biol. 1992 Nov; 154(1): 143-59

Singh-RN; Mehta-K

Purification and characterization of a novel transglutaminase from filarial nematode *Brugia malayi*.  
Eur-J-Biochem. 1994 Oct 15; 225(2): 625-34

Singh-RN; Chandrashekar-R; Mehta-K

Purification and partial characterization of a transglutaminase from dog filarial parasite, *Dirofilaria immitis*.  
Int-J-Biochem-Cell-Biol. 1995 Dec; 27(12): 1285-91

Singh-US; Cerione-RA

Biochemical effects of retinoic acid on GTP-binding Protein/Transglutaminases in HeLa cells. Stimulation of GTP-binding and transglutaminase activity, membrane association, and phosphatidylinositol lipid turnover.  
J-Biol-Chem. 1996 Nov 1; 271(44): 27292-8

Skorstengaard-K; Halkier-T; Hojrup-P; Mosher-D

Sequence location of a putative transglutaminase cross-linking site in human vitronectin.  
FEBS-Lett. 1990 Mar 26; 262(2): 269-74

Slack-JMW

We have a morphogen !  
Nature. 1987 ; 327 : 553-554

Slife CW; Dorsett MD; Bouquett GT; Register A; Taylor E; Conroy S

Subcellular localization of a membrane-associated transglutaminase activity in rat liver.  
Arch Biochem Biophys, 241(2):329-36 1985 Sep

Safonova I; Darimont C; Amri EZ; Grimaldi P; Ailhaud G; Reichert U; Shroot B

Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation.  
Mol Cell Endocrinol, 104(2):201-11 1994 Sep

Schroeder WT; Thacher SM; Stewart-Galetka S; Annarella M; Chema D; Siciliano MJ; Davies PJ; Tang HY; Sowa BA; Duvic

Type I keratinocyte transglutaminase: expression in human skin and psoriasis.  
J Invest Dermatol, 99(1):27-34 1992 Jul

Sporn-MB ; Roberts-AB

Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis.  
Cancer-Res. 1983 ; 43 : 3034-40

Sporn-MB ; Roberts-AB

What is a retinoid ?  
In retinoids, differentiation and disease Pityman Eds, London. 1985 ; 1-5

Standen GR; Bowen DJ

Factor XIII A Bristol 1: detection of a nonsense mutation (Arg171-->stop codon) in factor XIII A subunit deficiency.  
Br J Haematol, 85(4):769-72 1993 Dec

Steller-H

Mechanisms and genes of cellular suicide.  
Science 1995 Mar 10; 267: 1445-49

Suedhoff-T; Birckbichler-PJ; Lee-KN; Conway-E; Patterson-MK Jr

Differential expression of transglutaminase in human erythroleukemia cells in response to retinoic acid.  
Cancer-Res. 1990 Dec 15; 50(24): 7830-4

Suto-N; Ikura-K; Shinagawa-R; Sasaki-R

Identification of promoter region of guinea pig liver transglutaminase gene.  
Biochim-Biophys-Acta. 1993 Mar 20; 1172(3): 319-22

- Suto-N; Ikura-K; Sasaki-R  
Expression induced by interleukin-6 of tissue-type transglutaminase in human hepatoblastoma HepG2 cells.  
J-Biol-Chem. 1993 Apr 5; 268(10): 7469-73
- Szende-B; Schally-AV; Lapis-K  
Immunocytochemical demonstration of tissue transglutaminase indicative of programmed cell death (apoptosis) in hormone sensitive mammary tumours.  
Acta-Morphol-Hung. 1991; 39(1): 53-8
- Szondy-Z; Molnar-P, Nemes-Z; Boyiadzis-M; Kedei-N; Toth-R; Fesus-L  
Differential expression of tissue transglutaminase during in vivo apoptosis of thymocytes induced via distinct signalling pathways.  
FEBS-Lett. 1997 Jan 31; 404: 307-13
- Szondy-Z; Reichert-U; Bernardon-JM; Toth-R; Ancian-P; Ajner-E; Fesus-L  
Induction of apoptosis by retinoids and retinoic acid receptor g-selective compounds in mouse thymocytes through a novel apoptosis pathway.  
Mol. Pharmacol. 1997 ; 51 : 972-982
- Takahashi-N; Takahashi-Y; Putnam-FW  
Primary structure of blood coagulation factor XIIIa (fibrinolygase, transglutaminase) from human placenta.  
Proc-Natl- Acad-Sci. USA 1986; 83: 8019-23
- Takeuchi-Y; Birckbichler-PJ; Patterson-MK Jr; Lee-KN  
Putative nucleotide binding sites of guinea pig liver transglutaminase.  
FEBS-Lett. 1992 Jul 28; 307(2): 177-80
- Tanaka H; Shinki T; Takito J; Jin CH; Suda T  
Transglutaminase is involved in the fusion of mouse alveolar macrophages induced by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3.  
Exp Cell Res, 192(1):165-72 1991 Jan
- Tanabe-T ; Nukada-T ; Nishikawa-Y ; Sugimoto-K ; Suzuki-H ; Takahashi-H ; Noda-M ; Haga-T ; Ichiyama-A ; Kangawa et al  
Primary structure of the alpha-subunit of transducin and its relationship to ras proteins.  
Nature 1985 May 16-22 ; 315(6016) : 242-5
- Taneja-R; Bouillet-P; Boylan-J; Gaub-MP; Roy-B; Gudas-L; Chambon-P  
Reexpression of retinoic acid receptor (RAR) $\gamma$  or overexpression of RAR $\alpha$  or RAR $\delta$  in RAR $\gamma$ -null F9 cells reveals a partial functional redundancy between the three RAR types.  
Proc-Natl- Acad-Sci. USA 1995 Aug; 92: 7854-58
- Taneja-R; Roy-B; Plassat-JL; Zusi-C; Ostrowski-J; Reczek-P; Chambon-P  
Cell-type and promoter-context dependent retinoic acid receptor (RAR) redundancies for RAR $\delta$ 2 and Hoxa-1 activation in F9 and P19 cells can be artefactually generated by gene knockouts.  
Proc-Natl- Acad-Sci. USA 1996 Jun; 93: 6197-6202
- Taresa-E; Kedei-N; Thomazy-V; Fesus-L  
An involucrin-like protein in hepatocytes serves as a substrate for tissue transglutaminase during apoptosis.  
J-Biol-Chem. 1992 Dec 25; 267(36): 25648-51
- Thomazy-V; Fesus-L  
Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. An immunohistochemical study.  
Cell-Tissue-Res. 1989 Jan; 255(1): 215-24
- Thompson-CB  
Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.  
Science 1995 Mar 10; 267:1456-62

- Tokunaga-F; Yamada-M; Miyata-T; Ding-YL; Hiranaga-Kawabata-M; Muta-T; Iwanaga-S; Ichinose-A; Davie-EW  
Limulus hemocyte transglutaminase. Its purification and characterization, and identification of the intracellular substrates.  
J-Biol-Chem. 1993 Jan 5; 268(1): 252-61
- Tokunaga-F; Muta-T; Iwanaga-S; Ichinose-A; Davie-EW; Kuma-K; Miyata-T  
Limulus hemocyte transglutaminase. cDNA cloning, amino acid sequence, and tissue localization.  
J-Biol-Chem. 1993 Jan 5; 268(1): 262-8
- Tsujimoto-Y  
Apoptosis and necrosis : intracellular ATP level as a determinant for cell death modes.  
Cell Death Diff. 1997 ; 4 : 429-434
- Turner-PM; Lorand-L  
Complexation of fibronectin with tissue transglutaminase.  
Biochemistry. 1989 Jan 24; 28(2): 628-35
- Tyrrell-DJ; Sale-WS; Slife-CW  
Fibronectin is a component of the sodium dodecyl sulfate-insoluble transglutaminase substrate.  
J-Biol-Chem. 1988 Jun 15; 263(17): 8464-9
- Umesono-K ; Murakami-KK ; Thompson-CC ; Evans-RM  
Direct repeats as selective response elements for thyroid hormone, retinoic acid and vitamin D3 receptors.  
Cell. 1993 ; 65 : 1255-1266
- Uhl-L ; Schindler-J  
Transglutaminase activity and embryonal carcinoma cell differentiation.  
Exp-Cell-Biol. 1987 ; 55(1) : 28-33
- Upchurch-HF; Conway-E; Patterson-MK Jr; Birckbichler-PJ; Maxwell-MD  
Cellular transglutaminase has affinity for extracellular matrix.  
In-Vitro-Cell-Dev-Biol. 1987 Nov; 23(11): 795-800
- Upchurch-HF; Conway-E; Patterson-MK Jr; Maxwell-MD  
Localization of cellular transglutaminase on the extracellular matrix after wounding: characteristics of the matrix bound enzyme.  
J-Cell-Physiol. 1991 Dec; 149(3): 375-82
- Valcarcel-R ; Holz-H ; Jimenez-CG ; Baretino-D ; Stunnenberg-HG  
Retinoid-dependent in vitro transcription mediated by the RXR/RAR heterodimer.  
Genes-develop. 1994 ; 8 : 3068-79
- Van Pelt-AM ; Rooij-DG  
Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate dose support the full development of spermatogenic cells.  
Endocrinology. 1991 ; 128 : 697-704
- Veis-DJ  
Bcl-2 deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair.  
Cell. 1993 ; 75 : 229-240.
- Verma-AK; Shoemaker-A; Simsiman-R; Denning-M; Zachman-Rd  
Expression of retinoic acid nuclear receptors and tissue transglutaminase is altered in various tissues of rats fed a vitamin-A-deficient diet.  
J-Nutr. 1992; 122: 2144-52

- Vollberg-TM; George-MD; Nervi-C; Jetten-AM  
Regulation of type I and type II transglutaminase in normal human bronchial epithelial and lung carcinoma cells.  
Am-J-Respir-Cell-Mol-Biol. 1992 Jul; 7(1): 10-8
- Wahli-W ; Martinez-E  
Superfamily of steroid nuclear receptors : positive and negative regulators of gene expression.  
FASEB-J. 1991 ; 5 : 2243-49
- Wang-JY; Viar-MJ; Johnson-LR  
Transglutaminase in response to hypertonic NaCl-induced gastric mucosal injury in rats.  
Gastroenterology. 1993 Jan; 104(1): 65-74
- Wang-M; Kim-IG; Steinert-PM; McBride-OW  
Assignment of the human transglutaminase 2 (TGM2) and transglutaminase 3 (TGM3) genes to chromosome 20q11.2.  
Genomics. 1994 Oct; 23(3): 721-2
- Washizu-K; Ando-K; Koikeda-S; Hirose-S; Matsuura-A; Takagi-H; Motoki-M; Takeuchi-K  
Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from Streptovorticillium and its expression in Streptomyces lividans.  
Biosci-Biotechnol-Biochem. 1994 Jan; 58(1): 82-7
- Weinberg JB; Phippen AM; Greenberg CS  
Extravascular fibrin formation and dissolution in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis.  
Arthritis Rheum, 34(8):996-1005 1991 Aug
- Weisberg LJ; Shiu DT; Greenberg CS; Kan YW; Shuman MA  
Localization of the gene for coagulation factor XIII a-chain to chromosome 6 and identification of sites of synthesis.  
J Clin Invest, 79(2):649-52 1987 Feb
- Weraarchakul-Boonmark-N; Jeong-JM; Murthy-SN; Engel-JD; Lorand-L  
Cloning and expression of chicken erythrocyte transglutaminase.  
Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1992 Oct 15; 89(20): 9804-8
- Wilhelm-B; Meinhardt-A; Seitz-J  
Transglutaminases : purification and activity assays.  
J-Chromatogr-B-Biomed-Appl. 1996 Sep 20, 684(1-2): 163-77
- Willy-PJ ; Umesono-K ; Ong-ES ; Evans-RM ; Heymann-RA ; Mangelsdorf-DJ  
LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway.  
Gene Develop. 1995 ; 9 : 1033-1045
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR.  
Cell death: the significance of apoptosis.  
Int Rev Cytol 68:251, 1980.
- Yamanishi-K; Liew-FM; Konishi-K; Yasuno-H; Doi-H; Hirano-J; Fukushima-S  
Molecular cloning of human epidermal transglutaminase cDNA from keratinocytes in culture.  
Biochem-Biophys-Res-Commun. 1991 Mar 29; 175(3): 906-13
- Yamanishi-K; Inazawa-J; Liew-FM; Nonomura-K; Ariyama-T; Yasuno-H; Abe-T; Doi-H; Hirano-J;  
Fukushima-S  
Structure of the gene for human transglutaminase 1.  
J-Biol-Chem. 1992 Sep 5; 267(25): 17858-63

- Yan-ZH; Noonan-S; Nagy-L; Davies-P; Stein-J  
Retinoic acid induction of the tissue transglutaminase promoter is mediated by a novel response element.  
Mol-Cell-Endo. 1996 Jul 1; 120: 203-12
- Yang-Yen-HF; Zhang-XK; Graupner-G; Tzukerman-M; Sakamoto-B; Karin-M; Pfahl-M  
Antagonism between retinoic acid receptors and AP-1 : implications for tumor promotion and inflammation.  
New-Biol 1991; 3: 1206-19
- Yang-Y ; Minucci-S ; Ozato-K ; Heyman-RA ; Ashwell-JD  
Efficient inhibition of activation-induced Fas ligand up-regulation and T cell apoptosis by retinoids require occupancy of both retinoid X receptors and retinoic acid receptors.  
J-Biol-Chem. 1995 ; 270 : 18672-77
- Yang E; Korsmeyer SJ  
Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death.  
Blood, 88(2):386-401 1996 Jul 15
- Yang-J ; Liu-X ; Bhalla-K ; Kim-CN ; Ibrado-AM ; Cai-J ; Peng-TI ; Jones-DP ; Wang-X  
Prevention of apoptosis by Bcl-2 : release of cytochrome c from mitochondria blocked.  
Science 1997 Feb 21 ; 275(5303) : 1129-32
- Yasueda-H; Nakanishi-K; Kumazawa-Y; Nagase-K; Motoki-M; Matsui-H  
Tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). Sequence analysis of the cDNA and functional expression in *Escherichia coli*.  
Eur-J-Biochem. 1995 Sep 1; 232(2): 411-9
- Yee-VC; Pedersen-LC; Le-Trong-I; Bishop-PD; Stenkamp-RE; Teller-DC  
Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII.  
Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1994 Jul 19; 91(15): 7296-300
- Yuspa SH, Ben T, Steinert P.  
Retinoic acid induces transglutaminase activity but inhibits cornification of cultured epidermal cells.  
J Biol Chem 257:9906, 1982.
- Zatloukal-K; Fesus-L; Denk-H; Tarcsa-E; Spurej-G; Bock-G  
High amount of epsilon-(gamma-glutamyl)lysine cross-links in Mallory bodies.  
Lab-Invest. 1992 Jun; 66(6): 774-7
- Zamzami-N ; Susin-SA ; Marchetti-P ; Hirsch-T ; Gomez-Monterrey-I ; Castedo-M ; Kroemer-G  
Mitochondrial control of nuclear apoptosis.  
J-Exp-Med. 1996 Apr 1 ; 183(4) : 1533-44
- Zamzami-N ; Marchetti-P ; Castedo-M ; Hirsch- T ; Susin-SA ; Masse-B ; Kroemer-G  
Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis.  
FEBS-Lett. 1996 Apr 8 ; 384(1) : 53-7
- Zavalova-L ; Lukyanov-S ; Baskova-I ; Snezhkov-E ; Akopov-S ; Berezhnoy-S ; Bogdanova-E ; Barsova-E ; Sverdlov  
Genes from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) coding for unusual enzymes that specifically cleave endo-epsilon (gamma-Glu)-Lys isopeptide bonds and help to dissolve clots.  
Mol. Gen. Genet. 1996 ; 253 : 20-25.
- Zelent A; Krust A; Petkovich M; Kastner P; Chambon P  
Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin.  
Nature, 339(6227):714-7 1989 Jun 29

Zha-H ; Fisk-HA ; Yaffe-MP ; Mahajan-N ; Herman B ; Reed-JC  
Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells.  
Mol-Cell-Biol. 1996 Nov ; 16(11) : 6494-508

Zhang-XK; Lehmann-J; Hoffmann-B; Dawson-MI; cameron-J; Graupner-G; Hermann-T; Tran-P; Pfahl-M  
Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid.  
Nature 1992; 358: 587-91

Zhang-LX; Mills-KJ; Dawson-MI; Collins-SJ; Jetten-AM  
Evidence for the involvement of retinoic acid receptor RAR alpha-dependent signaling pathway in the induction  
of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoids.  
J-Biol-Chem. 1995 Mar 17; 270(11): 6022-9

Zhang-SR; Li-SH; Abler-A; Fu-J; Tso-MO; Lam-TT  
Tissue transglutaminase in apoptosis of photoreceptor cells in rat retina.  
Invest-Ophthalmol-Vis-Sci. 1996 Aug; 37(9): 1793-9

# TABLE DES TABLEAUX

## REVUE GENERALE :

### LA TRANSGLUTAMINASE DE TISSU : UN MEMBRE DE LA FAMILLE DES TRANSGLUTAMINASES

Tableau I : Terminologie des transglutaminases

Tableau II : Caractéristiques des transglutaminases humaines

Tableau III : Pathologies associées aux transglutaminases

Tableau IV : Homologie stricte (exprimée en %) entre les structures primaires des transglutaminases humaines (FXIIIa, TGk, TGt, TGe, TGp) et des analogues d'invertébrés (TGh, annuline)

Tableau V : Homologie stricte (exprimée en %) entre les structures primaires des transglutaminases de tissu chez l'homme, le boeuf, la souris, le cochon d'Inde, le poulet et le poisson

Tableau VI : Structure des gènes des transglutaminases

Tableau VII : Localisation chromosomique des transglutaminases humaines

Tableau VIII : Liste partielle des modulateurs de l'expression de la transglutaminase de tissu

Tableau IX : Distribution de la transglutaminase de tissu dans les lignées cellulaires

Tableau X : Protéines de la matrice extra-cellulaire servant de substrats *in vitro* à la transglutaminase de tissu

### LA REGULATION DE LA TRANSGLUTAMINASE DE TISSU PAR LES RETINOIDES

Tableau XI : Récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) et du rétinoïde X (RXR)

Tableau XII : Induction *in vivo* de la transglutaminase de tissu par les rétinoïdes

Tableau XIII : Induction *in vitro* de la transglutaminase de tissu par les rétinoïdes

### LA TRANSGLUTAMINASE DE TISSU, EFFECTEUR DE L'APOPTOSE

Tableau XIV : Signaux inducteurs et inhibiteurs de l'apoptose

Tableau XV : Gènes de la famille Bcl-2

Tableau XVI : Modèles cellulaires où l'expression de la transglutaminase de tissu est corrélée avec le processus apoptotique

## **RESULTATS :**

Tableau XVII : Rétinoïdes de synthèse utilisés dans cette étude

Tableau XVIII : Semi-quantification de l'apoptose *versus* la nécrose dans les cellules RPMI 8226

Tableau XIX : Effets de l'actinomycine D et de la cycloheximide sur l'induction par le CD437  $10^{-9}$  M de l'apoptose *versus* la nécrose dans les cellules RPMI 8226 après 7 heures de traitement

# TABLE DES FIGURES

## REVUE GENERALE :

### LA TRANSGLUTAMINASE DE TISSU : UN MEMBRE DE LA FAMILLE DES TRANSGLUTAMINASES

Figure 1 : Réactions biologiques catalysées par les transglutaminases

Figure 2 : Alignement des séquences des transglutaminases humaines

Figure 3 : Alignement des séquences des transglutaminases de tissu

Figure 4 : Les transglutaminases de tissu homologues

Figure 5 : Structure tridimensionnelle aux rayons X du FXIIIa

Figure 6 : Arbre phylogénique des transglutaminases

Figure 7 : Régions promotrices de la transglutaminase de tissu humaine

Figure 8 : Modèle pour la régulation des fonctions de signalisation et de liaison de la TGt/G $\alpha$ h par les récepteurs activés par les hormones



### LA REGULATION DE LA TRANSGLUTAMINASE DE TISSU PAR LES RETINOIDES

Figure 9 : Mécanisme de la synthèse de l'acide rétinoïque et stockage des rétinoïdes

Figure 10 : Structure des rétinoïdes et principaux rétinoïdes naturels

Figure 11 : Mécanisme moléculaire d'action des acides 9 cis et tout-trans rétinoïque

Figure 12 : Domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires

Figure 13 : Homologie de séquence entre les différentes formes de RAR et de RXR

Figure 14 : Exemples d'éléments de réponse parmi les différents types de RARE et de RXRE

Figure 15 : Modèle de régulation de l'activité de transcription par un RXR-RAR et interaction avec les corépresseurs et coactivateurs

Figure 16 : Modèle illustrant la stabilisation du complexe de pré-initiation de la transcription par l'hétérodimère RXR/RAR

Figure 17 : Exemples de rétinoïdes de synthèse sélectifs de RARs, RXRs, à activités anti-rétinoïdes et de dérivés présentant des activités transactivatrices et anti-AP1 dissociées

Figure 18 : Élément de réponse aux rétinoïdes versatiles (DR5/7) dans la région promotrice du gène de la transglutaminase de tissu murine

## LA TRANSGLUTAMINASE DE TISSU, EFFECTEUR DE L' APOPTOSE

Figure 19 : Changements morphologiques essentiels dans l'apoptose et dans la nécrose

Figure 20 : Modèle représentant les interactions agoniste-antagoniste de mort entre les membres de la famille Bcl2 et protéines associées

Figure 21 : Signaux mitochondriaux et nécessité de l'ATP dans la mort cellulaire

Figure 22 : Différentes voies de dégradation de l'ADN observées durant le processus apoptotique

Figure 23 : Les caspases humaines et leurs substrats connus

### RESULTATS :

#### PARTIE I

Figure 24 : Effet de l'ARtt  $10^{-7}$ M sur les ARNm, la protéine et l'activité enzymatique de la TGt dans les cellules RPMI 8226

Figure 25 : RT-PCR réalisée sur les ARN totaux dans les cellules RPMI 8226

Figure 26 : Identification de la bande correspondant à la TGt

Figure 27 : Séquençage des produits de PCR de la TGt

Figure 28 : Hybridation différentielle des produits de RT-PCR de la TGt dans les cellules RPMI 8226

Figure 29 : Cinétique d'apparition des ARNm de la TGt après traitement par l'ARtt  $10^{-7}$  M des cellules RPMI 8226

Figure 30 : Effet des rétinoïdes sur l'expression des ARNm de la TGt dans les cellules RPMI 8226 après 7 heures de traitement

Figure 31 : Etude des homologues de la TGt par RT-PCR

Figure 32 : Effets de l'actinomycine D et de la cycloheximide sur l'induction de l'expression de la TGt par l'ARtt

Figure 33 : Etude des effets des rétinoïdes sur l'induction de la protéine de la TGt par Western-blot dans les cellules RPMI 8226 après 48 heures de traitement.

Figure 34 : Effets des inhibiteurs des PKC sur l'induction de l'expression de la TGt par l'ARtt

Figure 35 : Etude d'une phosphorylation potentielle de la TGt. Effet de la phosphatase alcaline inactivée ou non par la chaleur sur la TGt induite par l'ARtt

#### PARTIE II

Figure 36 : Effet de l'ARtt, des RAR $\gamma$  sélectifs : CD437 et CD666, seuls ou associés avec un RXR sélectif et/ou antagoniste RAR $\beta$  sur la prolifération des cellules RPMI 8226

- Figure 37 : Caractérisation de l'apoptose induite par l'ARtt  $10^{-7}$  M dans les cellules RPMI 8226 après 6 jours de traitement
- Figure 38 : Caractérisation de l'apoptose induite par le CD437  $10^{-9}$  M dans les cellules RPMI 8226 après 7 heures de traitement
- Figure 39 : Quantification de l'apoptose dans les cellules RPMI 8226, U266 et L363
- Figure 40 : Equipement en RARs et RXRs dans la lignée L363
- Figure 41 : Effets de l'actinomycine D et de la cycloheximide sur l'induction de l'apoptose dans les cellules RPMI 8226 après 7 heures de traitement par le CD437  $10^{-9}$  M
- Figure 42 : Effet du CD437  $10^{-9}$  M sur la dégradation de la lamine B détectée par Western-blot, dans les cellules RPMI 8226 après 7 heures de traitement
- Figure 43 : Effets des rétinoïdes RAR $\gamma$  sélectifs, seuls ou associés avec un RXR sélectif et/ou un antagoniste RAR $\beta$  sur le taux d'ARNm détecté par RT-PCR et l'activité enzymatique de la TGt dans les cellules RPMI 8226
- Figure 44 : Effet d'une pré-induction des cellules RPMI 8226 par l'ARtt  $10^{-7}$  M pendant 48 heures avant leur traitement par le CD437  $10^{-9}$  M pendant 7 heures

